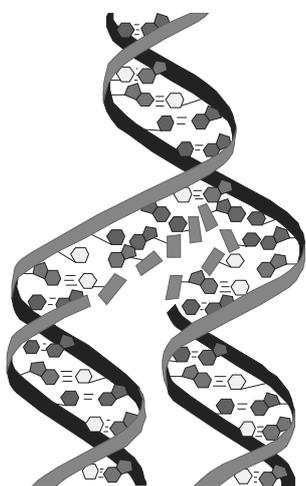


Всеукраїнська громадська наукова організація "Українська академія наук"
ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України"

МЕДИЧНА ХІМІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ



*All-Ukrainian Public Scientific Organization
"Ukrainian Academy of Sciences"
SHEI "I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University MPH of Ukraine"*

MEDICAL CHEMISTRY

SCIENTIFIC JOURNAL

2(59) TOM 16
2014

- ❖ *Молекулярні механізми розвитку патології*
- ❖ *Біохімія у діагностиці та лікуванні*
- ❖ *Біохімія серцево-судинних хвороб*
- ❖ *Біохімічна гепатологія та нефрологія*
- ❖ *Біохімія ендокринних хвороб*
- ❖ *Патохімія спадкових хвороб*
- ❖ *Патохімія екстремальних станів*
- ❖ *Біохімія в хірургічній клініці*
- ❖ *Нейрохімія та патохімія головного мозку*
- ❖ *Імунохімія*
- ❖ *Біохімія радіаційних уражень*
- ❖ *Біохімічні аспекти моделювання патологічних процесів*
- ❖ *Ксенобіохімія*
- ❖ *Методи біохімічних досліджень*
- ❖ *Історія біохімії*
- ❖ *Проблеми і досвід викладання біологічної та медичної хімії*
- ❖ *Інформація, хроніка, ювілеї*

- ❖ *Molecular Mechanisms of Pathology Development*
- ❖ *Biochemistry in Diagnostics and Treatment*
- ❖ *Biochemistry of Cardiovascular Diseases*
- ❖ *Biochemical Hepatology and Nephrology*
- ❖ *Biochemistry of Endocrinopathy*
- ❖ *Pathochemistry of Hereditary Diseases*
- ❖ *Pathochemistry of Extremal States*
- ❖ *Biochemistry in Surgical Clinics*
- ❖ *Neurochemistry and Pathochemistry of Cerebrum*
- ❖ *Immunochemistry*
- ❖ *Biochemistry of Radiation Injuries*
- ❖ *Biochemical Aspects of Simulation of Pathologic Processes*
- ❖ *Xenobiochemistry*
- ❖ *Methods of Biochemical Investigations*
- ❖ *History of Biochemistry*
- ❖ *Problems and Experience of Biological and Medical Chemistry Teaching*
- ❖ *Information, Chronicle, Jubilees*

МЕДИЧНА ХІМІЯ

Науковий журнал

MEDICAL CHEMISTRY

Scientific Journal

ISSN 1681-2557

Виходить щоквартально
Published 4 times per year

Заснований у грудні 1999 року
Founded in December 1999

Свідоцтво про державну реєстрацію: серія KB № 3647 від 26.01.1999 р.
Certificate of state registration: series KB № 3647 from 26.01.1999

Передплатний індекс: 22869
Subscription index: 22869

Відповідно до постанови Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.2010 р. журнал "Медична хімія" внесений до переліку фахових видань, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата медичних і біологічних наук. Журнал включено до Міжнародної наукометричної бази Google Scholar.

Журнал "Медична хімія" акредитований науково-видавничою радою Президії АМН України (лист № 02-17/1341 від 25.10.2001 р.).

Рекомендовано до видання вченою радою ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України" (протокол № 14 від 27 травня 2014 р.).

АДРЕСА РЕДАКЦІЇ:
Журнал "Медична хімія"
Видавництво "Укрмедкнига"
Майдан Волі, 1
46001, м. Тернопіль
УКРАЇНА

EDITORIAL OFFICE ADDRESS:
Journal "Medical Chemistry"
Publishing House "Ukrmedknyga"
Maidan Voli, 1
46001, Ternopil
UKRAINE

Tel.: (0352) 43-49-56
(0352) 52-80-09
Fax: (0352) 52-41-83
<http://www.tdmu.edu.te.ua>

За зміст рекламних матеріалів відповідальність несе рекламодавець.
При передруці або відтворенні повністю чи частково матеріалів журналу "Медична хімія" посилання на журнал обов'язкове.

© Науковий журнал "Медична хімія", 2014
© Scientific Journal "Medical Chemistry", 2014

Зміст

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

- Макарчук В. А., Ушакова Г. О.* (Дніпропетровськ) ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ S-100B І ГЛІАЛЬНОГО ФІБРИЛЯРНОГО КИСЛОГО ПРОТЕЇНУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТА ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПАНКРЕАТИЧНОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ 5
- Вельчинська О. В.* (Київ) ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ ХІМІКО-БІОЛОГІЧНИХ АДДУКТІВ 1,1-БІС-[МЕТИЛПІРИМІДИН-2',4'-ДІОН-1'-ІЛ]-2-БРОМО-2'-ХЛОРОЕТИЛЕНІВ 13
- Кушч О. Г.* (Запоріжжя) ВУГЛЕВОДНИЙ КОД АНТИГЕНПРЕЗЕНТУЮЧИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ 17
- Андрейчин Ю. М., Хлебан О. В.* (Тернопіль) ОЦІНКА БІОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ У ХВОРИХ НА ВЕРХНЬОЩЕЛЕПНИЙ СИНУСИТ 22
- Іваночко Р. Б., Склярів О. Я.* (Львів) СТАН СИСТЕМИ NO-СИНТАЗА/АРГІНАЗА Й ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ХВОРИХ ІЗ ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ ДО ТА ПІСЛЯ СЕАНСУ ГЕМОДІАЛІЗУ 26
- Лимар Л. Є.* (Тернопіль) СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ПРЕГРАВІДАРНОЇ ПІДГОТОВКИ ЖІНОК З ПОРУШЕННЯМИ МЕНСТРУАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ НА ТЛІ ХРОНІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ 31
- Сухомлин Т. А., Нетюхайло Л. Г.* (Полтава) БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ В СПОЛУЧНІЙ ТКАНИНІ ЛЕГЕНЬ ЗА УМОВ ОПІКОВОЇ ХВОРОБИ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ПРЕПАРАТОМ "ЛІПІН" 35
- П'ятницький Ю. С., Олещук О. М., Бондаренко Ю. І.* (Тернопіль) ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ АНТИГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КРІОКСЕНОДЕРМИ 38
- Гرابовська О. І., Кириченко С. В., Штеменко Н. І.* (Дніпропетровськ) ІНТЕНСИВНІСТЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ КРОВІ ЩУРІВ ЗА РОЗВИТКУ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ТА ВВЕДЕННЯ ЦИСПЛАТИНУ 42
- Твердохліб Н. О.* (Тернопіль) МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ПОРОЖНИНИ РОТА ПРИ МЕХАНІЧНІЙ ЖОВТЯНИЦІ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ КОРИГУВАЛЬНИХ ВПЛИВІВ 47
- Максимлюк В. І.* (Тернопіль) ДИСФУНКЦІЯ ЦИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ НА ФОНІ ВУЗЛОВИХ УТВОРІВ 52
- Маслак Г. С.* (Дніпропетровськ) ЕКСПОНУВАННЯ α 1,2-ФУКОАНТИГЕНІВ НА ЛІМФОЦИТАХ ХВОРИХ НА ІСТИННУ ПОЛІЦИТЕМІЮ ТА СУБЛЕЙКЕМІЧНИЙ МІЄЛОЗ 55

Contents

ORIGINAL INVESTIGATIONS

- Makarchuk V. A., Ushakova H. O.* (Dnipropetrovsk) DISTRIBUTION OF S-100B AND GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN IN THE RAT BRAIN AND PANCREAS UNDER THE CONDITIONS OF PANCREATIC ENCEPHALOPATHY 5
- Velchynska O. V.* (Kyiv) ANTITUMOUR ACTIVITY OF CHEMICAL-BIOLOGICAL ADDUCTS OF 1,1-BIS-[METHYLPIRIMIDINE-2',4'-DIONO-1'-IL]-2-BROMO-2'-CHLOROETHYLENES 13
- Kushch O. H.* (Zaporizhzhia) CARBOHYDRATE CODE ANTIGEN PRESENTING CELLS OF PLACENTA 17
- Andreychyn Yu. M., Khlyeban O. V.* (Ternopil) EVALUATION OF BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE REMODELING IN PATIENTS WITH MAXILLARY SINUSITIS 22
- Ivanochko R. B., Sklyarov O. Ya.* (Lviv) STATUS OF NO-SYNTHASE/ARGINASE SYSTEM AND OXIDATIVE PROCESSES IN LYMPHOCYTES LYSATE IN BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC RENAL INSUFFICIENCY AFTER THE SESSION OF HEMODIALYSIS 26
- Lymar L. Ye.* (Ternopil) NEW APPROACHES OF PREGRAVIDAR TRAINING OF WOMEN WITH MENSTRUAL DYSFUNCTION AND CHRONIC DISEASES OF DIGESTIVE SYSTEM 31
- Sukhomlyn T. A., Netyukhaylo L. H.* (Poltava) BIOCHEMICAL CHANGES IN THE CONNECTIVE TISSUE OF LUNGS AT BURN DISEASE AND CORRECTION BY "LIPIN" 35
- Pyatnytskyi Yu. S., Oleshchuk O. M., Bondarenko Yu. I.* (Ternopil) EXPERIMENTAL STUDY OF CRYOKSENODERMA'S ANTIGENIC PROPERTIES 38
- Hrabovska O. I., Kyrychenko S. V., Shtemenko N. I.* (Dnipropetrovsk) OXIDATIVE STRESS INTENSITY IN BLOOD OF RATS UNDER DEVELOPMENT OF CARCINOMA GERENIUM AND PUTTING CISPLATIN 42
- Tverdokhlib N. O.* (Ternopil) MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF ORAL CAVITY MUCOSAL MEMBRANE IN OBSTRUCTIVE JAUNDICE UNDER THE CORRECTIVE EFFECTS 47
- Maksymlyuk V. I.* (Ternopil) THYROID GLAND DYSFUNCTION ON A BACKGROUND OF NODULAR LESIONS 52
- Maslak H. S.* (Dnipropetrovsk) α 1,2-FUCOANTIGENS EXPONATION ON LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH POLYCYTHEMIA VERA AND SUBLEUKEMIC MIELOSIS 55

Дуда К. М. (Тернопіль) РІВЕНЬ ІМУНОЛОГІЧНОЇ
АДАПТАЦІЇ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ
ПАРОДОНТИТІ НА ТЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ
2 ТИПУ

60

ОГЛЯД

Загайко А. Л., Кравченко Г. Б., Кочубей Ю. І. (Харків)
ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРІВ
JNK-КІНАЗ ПРИ ЛІКУВАННІ ДИСЛІПІДЕМІЙ

65

Duda K. M. (Ternopil) LEVEL OF IMMUNE ADAPTATION
IN THE SERUM OF RATS WITH PERIODONTITIS
ON THE BACKGROUND OF TYPE 2 DIABETES

REVIEW

Zahayko A. L., Kravchenko H. B., Kochubey Yu. I.
(Kharkiv) PROSPECTS FOR THE JNK KINASE
INHIBITORS USE IN THE TREATMENT
OF DYSLIPIDEMIC CONDITIONS

В. А. Макарчук¹, Г. О. Ушакова²ІНСТИТУТ ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ¹, ДНІПРОПЕТРОВСЬК
ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О. ГОНЧАРА²**ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ S-100b І ГЛІАЛЬНОГО ФІБРИЛЯРНОГО
КИСЛОГО ПРОТЕЇНУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТА ПІДШЛУНКОВІЙ
ЗАЛОЗІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПАНКРЕАТИЧНОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ**

Досліджено особливості розподілу S-100b і гліального фібрилярного кислого протеїну (ГФКП) в головному мозку та підшлунковій залозі щурів за умов моделювання хронічного панкреатиту. Методом конкурентного інгібіторного імуоферментного аналізу в структурно і функціонально різних відділах головного мозку виявлено підвищення рівня S-100b та розчинної форми ГФКП, перерозподіл між розчинною і філаментною фракціями ГФКП, що може бути однією з причин розвитку панкреатичної енцефалопатії. Методом тестування тварин у "відкритому полі" за умов панкреатичної енцефалопатії встановлено, що виявлені зміни в розподілі даних білків супроводжувалися зниженням локомоторної та пізнавальної активності щурів і збільшенням їх стресогенності. При розвитку експериментального хронічного панкреатиту в підшлунковій залозі відзначено збільшення вмісту S-100b та зниження розчинної і філаментної фракцій ГФКП, що свідчить про деполімеризацію проміжних філаментів гліальних клітин у периферичній нервовій системі в досліджуваному органі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: панкреатична енцефалопатія, мозочок, таламус, гіпокамп, підшлункова залоза, S-100b, гліальний фібрилярний кислий протеїн.

ВСТУП. В останні роки у всьому світі та Україні спостерігають збільшення кількості хворих на хронічний панкреатит, який є прогресуючим, запальним захворюванням підшлункової залози, що призводить до поступового руйнування паренхіми органа і його фіброзної трансформації [6, 26].

Порушення процесів вільнорадикального окиснення є раннім неспецифічним фактором пошкодження, що лежить в основі розвитку різних захворювань, у тому числі й хронічного панкреатиту. Рівень антиоксидантної активності тканини підшлункової залози один із найнижчих в організмі, тому вивільнення в кров продуктів вільнорадикального окиснення та ендотоксинів буде сприяти формуванню синдрому ендогенної інтоксикації [19]. Ендотоксини змінюють проникність гематоенцефалічного бар'єру. Основна їх частина належить до молекул середньої маси, що здатні проявляти нейротоксичну активність, приєднуватися до рецепторів і блокувати їх, неадекватно змінюючи метаболізм та функції нервових клітин [11].

Раннім і тяжким ускладненням гострого панкреатиту є панкреатична енцефалопатія [13, 20, 21]. Дослідження молекулярно-біохімічних механізмів її розвитку на сьогодні є досить

© В. А. Макарчук, Г. О. Ушакова, 2014.

актуальним. Патофізіологія даного захворювання не зовсім зрозуміла: зміна гемодинаміки, метаболічний статус, розлади рідинного чи електролітного балансу, запальні цитокіни і пряма нейротоксична дія фосфоліпази – всі ці фактори можуть бути причетні [29]. Високий рівень панкреатичних ензимів у крові при гострому панкреатиті призводить до зміни проникності гематоенцефалічного бар'єру і викликає пошкодження структур головного мозку [22]. Питання про розвиток панкреатичної енцефалопатії при хронічному панкреатиті на сьогодні мало розкрито, воно становить значний інтерес для дослідників.

Дія ендотоксикантів направлена насамперед на астроцитарні клітини, призводячи до їх морфологічних та біохімічних змін. Стан астрогліальних клітин зазвичай оцінюють за рівнем специфічних гліальних протеїнів – Ca²⁺-зв'язувального білка S-100b та гліального фібрилярного кислого протеїну (ГФКП).

S-100b бере участь в Ca²⁺-залежній регуляції різноманітних внутрішньоклітинних процесів, таких, як фосфорилування білків, активність ферментів, клітинна проліферація та диференціювання, динаміка зміни цитоскелетних складових, структурна організація мембран, внутрішньоклітинний Ca²⁺-гомеостаз, запален-

ня, захист від окиснювального пошкодження клітин [18]. S-100b локалізований переважно в астроцитах та шванівських клітинах нервової системи [9, 18]. При фізіологічних (наномолярних) концентраціях даний протеїн виконує захисні функції, що підтверджує його роль як нейротрофічного фактора під час розвитку та регенерації нейронів, а при мікромолярних – індукує апоптоз і нейродегенерацію клітин. S-100b – високочутливий біохімічний маркер пошкодження головного мозку, що може сигналювати про гліальну клітинну активацію, гибель нейронів [15, 18, 27].

ГФКП – протеїн проміжних філаментів, декілька ізоформ якого було описано, в тому числі α , β , γ , δ , $\Delta 135$, $\Delta 164$, Δ ехон і зовсім нещодавно κ . Переважає така форма, як ГФКП- α , що експресується більшістю астроцитів, володіє високою специфічністю до астрогліальної клітинної лінії, активується у відповідь на пошкодження та широко використовується як діагностичний маркер реактивного гліозу. ГФКП- β міститься переважно в периферичній нервовій системі [14]. ГФКП є специфічним маркером диференційованих астроцитів [16]. Даний протеїн забезпечує структурну підтримку та міцність на розтягнення цитоскелета нормальних астроцитів [12].

На сьогодні залишається нез'ясованим характер кількісного розподілу S-100b і гліального фібрилярного кислого протеїну в мозку та підшлунковій залозі щурів при розвитку панкреатичної енцефалопатії в експерименті.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили з використанням хімічно чистих реагентів: моноспецифічних поліклональних антитіл проти S-100b та ГФКП, очищених антигенів S-100b і ГФКП ("Santa Cruze", США), вторинних антитіл, мічених пероксидазою хрому ("Sigma", США).

Експеримент виконували на 36 нелінійних білих щурах-самцях (6 місяців, 190–220 г) згідно із Законом України № 3447-IV від 21.02.06 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження". Для моделювання хронічного панкреатиту тваринам під наркозом (кетамін гідрохлорид, 110 мг/кг) проводили лапаротомію та тривалу оклюзію панкреатичної протоки в хвостовій частині підшлункової залози лігатурою "Prolene" 6/0 [8].

Експериментальних тварин було поділено на дві групи: 1-ша – псевдооперовані щури, яким проводили лапаротомію і відразу ж зашивали розріз шкірного покриву на череві (контроль), з наступним виведенням на 6-ту (n=6), 15-ту (n=6) і 30-ту доби (n=6) дослідження

після попереднього введення наркозу; 2-га – щури з тривалою оклюзією панкреатичної протоки з виведенням на 6-ту (запально-некротична стадія гострого панкреатиту, n=6), 15-ту (перехідна, атрофічно-префіброзна стадія гострого панкреатиту, n=6) та 30-ту доби (фіброзна стадія хронічного панкреатиту, n=6) дослідження після попереднього введення наркозу.

Мозок щурів очищали від поверхневої плівки і капілярів, вилучали окремо мозочок, таламус та гіпокамп. Гомогенізацію тканини мозку та підшлункової залози проводили в буфері А, що містив трис-НCl – 25 мМ; рН 7,4; етилендіамінтетраоцет – 1 мМ; β -меркаптоетанол – 2 мМ; фосфометилсульфонілфторид – 0,2 мМ; мертіолят – 0,01 %, у співвідношенні 1:10 при температурі +4 °С. У ході послідовних стадій центрифугування було виділено фракції, що містили цитозольні (розчинні, soluble) білки (S-100b та sГФКП). Після цього осад ресуспендували в розчині буфера А, до складу якого додавали сечовину – 4 М, екстракція проходила протягом 18 год. Подальше центрифугування проводили при 100 000 g протягом 60 хв, супернатант містив сечовинорозчинні філаментні (filament) білки (fГФКП). Отримані фракції білків використовували для визначення в них кількісного вмісту S-100b та ГФКП методом конкурентного інгібіторного методу імуноферментного аналізу з застосуванням моноспецифічних антитіл проти S-100b та ГФКП і відповідних очищених білків-стандартів [4]. Вміст S-100b та ГФКП визначали як відношення їх кількості в пробі до кількості загального білка (ЗБ) в пробі (мкг S-100b (ГФКП)/мг ЗБ). Кількість ЗБ у фракціях мозку визначали за Bradford [10]. Дані дослідження з визначення вмісту S-100b та ГФКП в підшлунковій залозі й відділах мозку проводили у тварин 1-ї та 2-ї груп на 30-ту добу експерименту.

Поведінкову активність щурів досліджували за допомогою тестування у "відкритому полі" за методом Буреша [1]. Реєстрацію показників рухово-дослідницької та емоційної активності у тварин 1-ї та 2-ї груп проводили на 5-ту, 14-ту і 29-ту доби експерименту. В процесі проходження щурами "відкритого поля" фіксували горизонтальну і вертикальну рухову активність (кількість перетину ліній зовнішніх та внутрішніх квадратів і вертикальні стійки), реакції дефекації, уринації та число ґрумінгів, які розцінювали як емоційну реактивність тварин, і визначали їх орієнтовно-дослідницьку поведінку (число заглядань у нірки).

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з вико-

ристанням стандартного пакета прикладних програм SPSS for Windows 9.0. Для показника визначали вибіркове середнє значення (M) та похибку середнього (m). Досліджувані співвідношення вважали достовірними при $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$. Кореляційний аналіз проводили за Пірсоном [5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Відомо, що існує кореляційний зв'язок між функціональною активністю різних відділів мозку і видом діяльності організму тварини. Для дослідження розподілу Ca^{2+} -зв'язувального протеїну S-100b та ГФКП було обрано відділи мозку, відповідальні за рухову активність, сенсорну чутливість, у тому числі й больову, та процеси навчання і пам'яті.

Одержані величини S-100b складаються з концентрацій його розчинної форми й експресованих астроглією позаклітинних молекул. Результати досліджень показали достовірне збільшення рівня S-100b, екстрагованого з гіпокампа і таламуса, – на 78,0 % ($p < 0,001$) та 60,3 % ($p < 0,01$) відповідно відносно контролю. В мозочку вірогідних змін не було зареєстровано (рис. 1).

Розвиток хронічного панкреатиту супроводжувався достовірним підвищенням на 119,7 % ($p < 0,01$) вмісту S-100b із підшлункової залози – з $(0,06 \pm 0,01)$ мкг S-100b/мг ЗБ (контроль) до $(0,13 \pm 0,01)$ мкг S-100b/мг ЗБ, що може індукувати каскад кальціезалежних дегенеративних процесів у залозі.

ГФКП – один із головних імуноцитохімічних маркерів астроцитів, важливий представник макроглії в центральній нервовій системі ссавців. Як маркер астрогліальних клітин його широко застосовують у діагностичних цілях та експериментальних роботах при дослідженні функцій нервової системи в нормі й при патології. Однією з ключових і найбільш досліджуваних функцій астроцитів є їх участь в органі-

зації та регуляції проникності гемато- і ліквороенцефалічного бар'єрів. Відомо, що саме накопичення ГФКП пов'язане із забезпеченням астроцитами бар'єрних функцій [7]. Реакція астрогліальних елементів у відповідь на розвиток хронічного панкреатиту не тільки проявляється змінами кількості цих клітин внаслідок процесів міграції та проліферації, але і дозволяє припустити процеси перебудови (реорганізації) проміжних філаментів астроглії. Особливістю змін вмісту розчинної форми ГФКБ у щурів на 30-ту добу після тривалої оклюзії панкреатичної протоки, на відміну від філаментної фракції, було підвищення концентрації sГФКП в екстрактах із досліджуваних структур головного мозку. Так, вміст розчинної форми даного протеїну збільшився у мозочку на 31,3 % ($p < 0,05$), а в таламусі спостерігали тенденцію до його зростання на 12,3 % порівняно з контролем (рис. 2).

Вміст розчинної фракції ГФКП із підшлункової залози зазнав значних змін при фіброзній стадії хронічного панкреатиту – знизився на 41,9 % ($p < 0,05$) з $(0,13 \pm 0,02)$ мкг sГФКП/мг ЗБ (контроль) до $(0,08 \pm 0,008)$ мкг sГФКП/мг ЗБ.

Результати визначення вмісту філаментної фракції ГФКП у відділах мозку при розвитку хронічного панкреатиту наведено на рисунку 3. Встановлено, що на 30-ту добу експериментальних спостережень концентрація ГФКП у всіх досліджуваних відділах мозку щурів вірогідно знизилась порівняно з контролем. Так, у мозочку рівень fГФКП зменшився на 18,0 % ($p < 0,05$), у гіпокампі – на 43,5 % ($p < 0,001$), а в таламусі – на 41,7 % ($p < 0,01$) відносно контролю.

Вміст fГФКП із підшлункової залози знизився на 18,6 % ($p < 0,05$) до $(0,78 \pm 0,04)$ мкг fГФКП/мг ЗБ відносно контролю $(0,96 \pm 0,06)$ мкг fГФКП/мг ЗБ.

Як свідчать наведені результати, розвиток експериментального хронічного панкреатиту

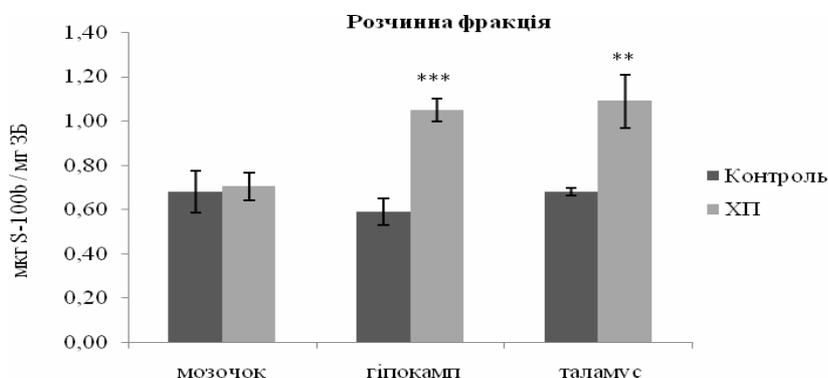


Рис. 1. Вміст S-100b в екстрактах із відділів головного мозку. Контроль – псевдооперовані щури, n=6; ХП – щури з експериментальним хронічним панкреатитом, n=6; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з контролем.

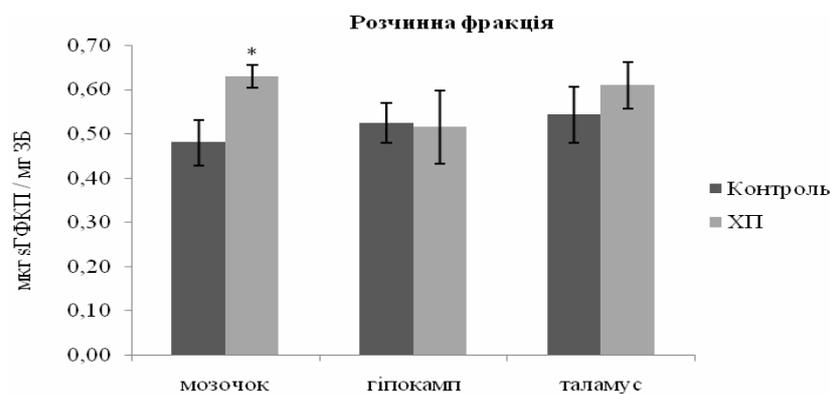


Рис. 2. Вміст sGFAP в екстрактах із відділів головного мозку. Контроль – псевдооперовані щури, n=6; ХП – щури з експериментальним хронічним панкреатитом, n=6; * – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

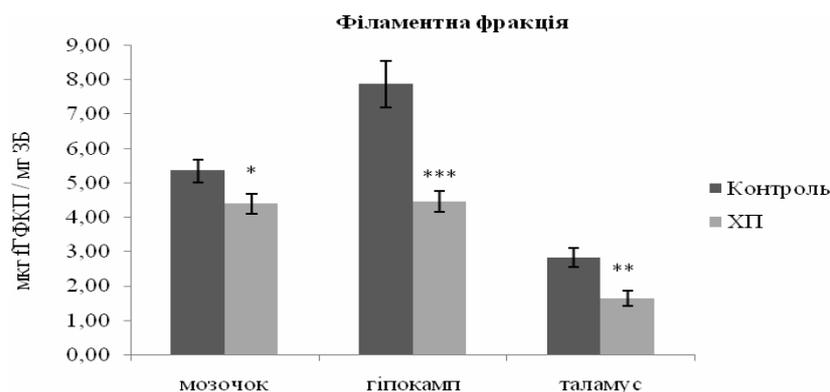


Рис. 3. Вміст fGFAP в екстрактах із відділів головного мозку. Контроль – псевдооперовані щури, n=6; ХП – щури з експериментальним хронічним панкреатитом, n=6; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з контролем.

суттєво впливає на функціонування структурно різних відділів головного мозку. За умов токсикації мозку під час розвитку хронічного панкреатиту відбувається активація астроглії: збільшення рівня кальцієзв'язувального білка S-100b призводить до деполімеризації проміжних філаментів, що підтверджується перерозподілом між розчинною і філаментною формами GFAP. Отримані дані свідчать про реорганізацію проміжних філаментів астроцитів, що зменшує функціональну цілісність їх цитоскелета, це, у свою чергу, може бути однією з причин розвитку панкреатичної енцефалопатії, яка супроводжується зниженням локомоторної і пізнавальної активності щурів та збільшенням їх стресочутливості (збільшення активів “уринація” і “дефекація”).

Так, у результаті проведених досліджень з визначення поведінкової активності щурів після тривалої оклюзії панкреатичної протоки було встановлено, що тварини проявляли локомоторну активність тільки на перших хвиликах тестування: вони зупинялись в одному з кутів поля вже через 1–2 хв. Кількість перетину ліній зовнішніх і внутрішніх квадратів достовірно знижувалася вже на 5-ту добу експерименту – на 51,1 % ($p < 0,01$) та 91,8 % ($p < 0,01$) відпо-

відно, продовжувала зменшуватися на 14-ту добу – на 80,7 % ($p < 0,001$) та 91,4 % ($p < 0,01$) і максимального зниження досягла на 29-ту добу експерименту – на 85,4 % ($p < 0,001$) та 100 % відносно контролю (табл.).

Спостерігали достовірне зниження кількості активів “вертикальна стійка” та “нірка” в щурів на 5-ту добу експерименту – на 37,9 % ($p < 0,05$) та 60,3 % ($p < 0,01$) відповідно відносно контролю. В подальшому значне порушення орієнтовно-дослідницької активності тварин проявлялося значимим зменшенням кількості активів “вертикальна стійка” і “нірка” – на 87,8 % ($p < 0,001$) та 84,7 % ($p < 0,001$) і на 95,4 % ($p < 0,001$) та 84,9 % ($p < 0,001$) відповідно на 14-ту і 29-ту доби порівняно з контролем. Кількість активів “грумінг” на 5-ту і 14-ту доби експериментального дослідження зростала на 76,3 % ($p < 0,05$) та 15,5 % відповідно, а на 29-ту добу спостерігали зниження даного показника на 15,8 % відносно контролю. При дослідженні динаміки вегетативної активності щурів слід відзначити збільшення на 5-ту добу тестування кількості активів “уринація” та “дефекація” – на 74,6 та 166,0 % відповідно, на 14-ту – на 34,0 та 123,9 % ($p < 0,05$), а на 29-ту – на 51,5 та 66,0 % порівняно з контролем (табл.).

Таблиця – Динаміка зміни показників тесту “відкрите поле” в експериментальних щурів ($M \pm m, n=36$),

Показник (кількість)	Контроль	Доба тестування тварин		
	Дослід	5-та	14-та	29-та
Лінії зовнішніх квадратів	Контроль	22,50±2,26	19,83±1,78	18,33±2,14
	Дослід	11,00±1,18**	3,83±0,48***	2,67±0,42***
Лінії внутрішніх квадратів	Контроль	4,00±1,00	3,83±1,08	3,17±0,87
	Дослід	0,33±0,21**	0,33±0,21**	0
Акти “вертикальна стійка”	Контроль	6,17±0,75	5,50±0,67	7,17±0,95
	Дослід	3,83±0,60	0,67±0,21***	0,33±0,21***
Акти “нірка”	Контроль	12,17±1,45	9,83±1,19	8,83±1,17
	Дослід	4,83±0,87**	1,50±0,56***	1,33±0,49***
Акти “грумінг”	Контроль	3,50±0,62	4,33±0,71	3,17±0,40
	Дослід	6,17±0,70	5,00±0,73	2,67±0,67
Акти “уринація”	Контроль	0,67±0,33	0,50±0,22	0,33±0,21
	Дослід	1,17±0,17	0,67±0,33	0,50±0,22
Акти “дефекація”	Контроль	0,50±0,22	0,67±0,21	0,50±0,34
	Дослід	1,33±0,49	1,50±0,22	0,83±0,31

Примітка. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (вірогідність різниці порівняно з контрольною групою).

Таким чином, визначене підвищення в гіпокампі й таламусі вмісту S-100b, який продукується переважно астроцитами мозку, свідчить про активацію астроглії внаслідок токсикації мозку при фіброзній стадії хронічного панкреатиту. S-100b, вивільняючись з пошкодженої тканини, може посилювати нейродегенерацію шляхом S-100b-індукованого апоптозу.

Встановлене достовірне підвищення S-100b в екстракті з підшлункової залози вказує на активацію пошкодження Ca^{2+} -залежних механізмів з участю цього протеїну в периферичних нервах і взаємодію з мультілігандним рецептором до кінцевих продуктів глікозилування цитоплазматичної мембрани, що може призводити до збудження сигнальних внутрішньоклітинних мітогенактивованих протеїнкіназ – екстрацелюлярних сигнальних кіназ, p38 та jun-термінальних кіназ, які беруть участь у процесах синтезу прозапальних цитокінів. Збудження рецепторів до кінцевих продуктів глікозилування активує внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, які зумовлюють індукцію нуклеарного фактора транскрипції κB [9].

Підвищена експресія ГФКП є важливим маркером активації глії після пошкодження центральної нервової системи, але не зовсім зрозуміло, що дане збільшення означає для виживання навколишніх нейронів і який його потенціал для регенерації аксонів. Підвищення вмісту ГФКП як маркера реактивності глії необхідно вважати негативним результатом для нейронів, є докази того, що це може бути не так і що гліальну реактивність та зміни експресії даного протеїну слід розглядати в контексті їх виникнення. ГФКП позитивно

впливає на здатність до регенерації нейронів, змінюючи локалізацію протеїнів, які можуть взаємодіяти з нейронами в гліальних клітинних мембранах; контролює експресію інших молекул, що секретуються, таких, як гліальний нейротрофічний фактор або позаклітинний матриксний протеїн ламінін, які змінюють регенерацію аксонів. ГФКП може бути каркасом для нових нейритів [28].

В результаті розвитку фіброзної стадії хронічного панкреатиту спостерігали перерозподіл вмісту ГФКП між розчинною та філаментною формами в мозочку і таламусі, тобто збільшення в цих відділах мозку концентрації sГФКП відбувалося за рахунок зниження вмісту fГФКП. Дані зміни в розчинній фракції досліджуваного протеїну свідчили про активацію астроглії внаслідок токсикації мозку при розвитку патології підшлункової залози, а перерозподіл між фракціями вказував на реорганізацію проміжних філаментів астроцитів, порушення структурної підтримки цих клітин.

Багато клітин за межами центральної нервової системи в нейронній та нейронній тканинах мають морфологічну і функціональну подібність з астроцитами. Периферичні ганглії містять клітини-сателіти, які експресують ГФКП, периферичні нерви – немієлінізовані шванівські клітини, що синтезують ГФКП та оточують немієлінізовані аксони. Він широко експресується в багатьох тканинах за допомогою різних видів клітин, включаючи мезенхімальні зірчасті клітини, що мають структурну та функціональну подібність з астроцитами, в тому числі у печінці, нирках і підшлунковій залозі. Функціональну роль цих клітин та їх потенційну подібність з астроцитами тільки починають досліджувати.

Наприклад, з'являється все більше доказів того, що ГФКП-експресія панкреатичними зірчастими клітинами відіграє важливу роль у тканинній репарації, фіброзі та формуванні рубців [25].

Слід відзначити середній зворотний кореляційний зв'язок між підвищенням у гіпокампі вмісту S-100b та зниженням fГФКП ($r=-0,657$, $p<0,05$) і між збільшенням у таламусі вмісту S-100b та зменшенням fГФКП ($r=-0,714$, $p<0,05$). Відомо, що S-100b пригнічує збирання проміжних філаментів шляхом інгібування полімеризації ГФКП за присутності Ca^{2+} [17, 23]. Тому в нашому експерименті при зростанні концентрації S-100b в таламусі та гіпокампі знижується вміст філаментної форми ГФКП у вказаних відділах мозку.

Відомо, що енцефалопатія може призводити до легких і тяжких психоневрологічних симптомів, набряку мозку з підвищенням внутрішньочерепного тиску. Астроцити відіграють центральну роль у патофізіології енцефалопатії. Набряк мозку значною мірою відбувається внаслідок набряку астроцитів, що, у свою чергу, спричинено поглинанням цими клітинами NH_4^+ . Хоча таке поглинання розглядають спочатку як нейропротекторні механізми, воно також призводить до синтезу глутаміну з глутамату за допомогою глутаматсинтетази, в результаті чого виникають зміни в гомеостазі нейромедіаторів, що може викликати поведінкові симптоми. Накопичення глутаміну в астроцитах також призводить до осмотичного стресу, що спричиняє набряк астроцитів і прогресування цитотоксичного набряку [25].

Для дослідження особливостей вищої нервової діяльності гризунів, зокрема поведінки щурів, широко використовують тест "відкрите поле" [3]. Відомо, що нервова система найбільш чутлива до різних впливів. На даний час спостерігають розширення сфери застосування поведінкових реакцій тварин як тестових систем [2]. Більшість авторів вважає, що факторами, які визначають поведінку тварин у "відкритому полі", є дослідницька мотивація та емоційна реактивність (Чуян, 2003). Фактор емоційності при проведенні даного тесту проявляється через локомоторну активність щурів (Титов, Каменский, 1980) і вегетативну функцію у вигляді уринації та дефекації (Кулагин, Федоров, 1969). Згідно з даними (Hall, 1934), емоційність свідчить про пасивно-оборонну поведінку щурів, для яких характерні низька рухова активність і високий рівень вегетативної реакції, відповідно, проводять деяку аналогію між неемоційністю та активно-оборонною поведінкою. Водночас вертикальні стійки, ґрумінг

та заглядання в нірки вважають видоспецифічними проявами орієнтувально-дослідницької діяльності (Silverman, 1996). Зі збільшенням величини дефекації знижується рухова активність тварин (Кулагин, Федоров, 1969). Але також існують дані, що ці два показники взаємно не пов'язані (Титов, Каменский, 1980). Це пояснюють тим, що локомоторна реакція тварин при розміщенні їх у нових обставинах може здійснюватись у зв'язку з різними мотиваціями: уникненням і дослідженням нової території (Маркель, Хусаинов, 1976) [3].

Підсумовуючи результати проведених нами досліджень щодо моделювання панкреатиту шляхом оклюзії панкреатичної протоки, можна стверджувати, що зниження локомоторної активності та зростання показників вегетативної функції вказують на посилення тривожно-фобічних реакцій у піддослідних щурів. Різновидом орієнтувально-дослідницької поведінки тварин є кількість здійснених ними вертикальних стійок та обстежених отворів. Дані показники статистично значимо знижувалися в щурів протягом усього експерименту. Кількість актів "ґрумінг", що також характеризує поведінку тварин у "відкритому полі", достовірно зростала на 5-ту добу експерименту порівняно з контролем, а в подальшому спостерігали лише незначні коливання даного показника.

Кореляційний аналіз виявив також при фіброзній стадії хронічного панкреатиту пряму залежність між зниженням концентрації fГФКП із мозочка та зменшенням перетину тваринами ліній зовнішніх квадратів ($r=0,941$, $p<0,01$) і між зростанням вмісту sГФКП із мозочка та збільшенням актів "ґрумінг" ($r=0,812$, $p<0,05$). Відмічали різнонаправлений зв'язок між зниженням концентрації fГФКП із мозочка та зростанням кількості дефекацій ($r=-0,926$, $p<0,01$).

ВИСНОВКИ. 1. Підвищення вмісту S-100b у різних відділах головного мозку та підшлунковій залозі може індукувати розвиток панкреатичної енцефалопатії за умов ендогенної токсикації при хронічному панкреатиті в щурів.

2. Достовірне зниження вмісту філаментної форми ГФКП у центральній та периферичній нервовій системі свідчить про реорганізацію цитоскелета астрогліальних клітин, що опосередковано впливає на синаптичну пластичність і забезпечення функцій нервової системи.

3. За умов розвитку експериментальної панкреатичної енцефалопатії встановлено залежність між рівнем астроцитспецифічних протеїнів у мозку щурів та їх фізіологічними реакціями.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М. : Высшая школа, 1991. – 352 с.
2. Влияние диоксида титана на некоторые функции центральной нервной системы крыс / Н. А. Кривова, М. Ю. Ходанович, Т. А. Замощина [и др.] // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. – 2011. – **14**, № 2. – С. 96–109.
3. Кальян В. В. Поведінкові реакції самиць-щурів, матері яких підлягали дії різних рухових режимів, в умовах відкритого поля / В. В. Кальян // Вісник Харківського нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. – 2007. – Вип. 6, № 788. – С. 134–140.
4. Нго Т. Т. Иммуноферментный анализ / Т. Т. Нго, Г. М. Ленхофф, А. Яклич. – М. : Мир, 1988. – 444 с.
5. Петри А. Наглядная статистика в медицине / А. Петри, К. Сэбин. – М. : Гэотар-Мед, 2003. – 144 с.
6. Степанов Ю. М. Хронічний панкреатит: білярний механізм, чинники та перебіг / Ю. М. Степанов, Н. Г. Заїченко // Запороз. мед. журн. – 2012. – **70**, № 1. – С. 46–50.
7. Сухорукова Е. Г. Структурная организация астроцитов неокортекса крысы и человека, содержащих глиальный фибриллярный кислый белок : автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. мед. наук / Е. Г. Сухорукова. – С. Пб., 2011. – 22 с.
8. An Immunocytochemical Profile of the Endocrine Pancreas Using an Occlusive Duct Ligation Model / B. J. Page, D. F. Toit, C. Muller [et al.] // Journal of the Pancreas. – 2000. – **4**, № 1. – P. 191–203.
9. 100B Protein, a Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond / G. Sorci, R. Bianchi, F. Riuizi [et al.] // Cardiovascular Psychiatry and Neurology. – 2010. – **2010**, Article ID 656481. – 13 p.
10. Bradford M. Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1985. – **72**. – P. 248–254.
11. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions / A. Catala // Chemistry and Physics of Lipids. – 2009. – **157**. – P. 1–11.
12. Epigenetic regulation of glial fibrillary acidic protein by DNA methylation in human malignant gliomas / A. Restrepo, C. A. Smith, S. Agnihotri [et al.] // Neuro-Oncology. – 2011. – **13**, № 1. – P. 42–50.
13. Experimental pancreatitis results in increased blood-brain barrier permeability in rats: A potential role of MCP-1 / D. Zhen, L. Jun, L. Rong, H. Xiao Hua // Journal of Digestive Dis. – 2012. – **13**. – P. 179–185.
14. Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associated lesional pathologies / L. Martinian, K. Boer, J. Middeldorp [et al.] // Neuropathology and Applied Neurobiology. – 2009. – **35**, Issue 4. – P. 394–405.
15. Functional Assessment of a Promoter Polymorphism in S100B, a Putative Risk Variant for Bipolar Disorder / E. Dagdan, D. W. Morris, M. Campbell [et al.] // American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics. – 2011. – **156**, Issue 6. – P. 691–699.
16. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling / C. S. Ennen, T. A. Huisman, W. J. Savage [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2011. – **205**, № 3. – P. 251–257.
17. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity / V. L. Savchenko, J. A. Mckanna, I. R. Nikonenko, G. G. Skibo // Neuroscience. – 2000. – **96**, № 1. – P. 195–203.
18. Morphologic, flow cytometric, functional, and molecular analyses of S100B positive lymphocytes, unique cytotoxic lymphocytes containing S100B protein / Y. Miki, Y. Gion, Y. Mukae [et al.] // European Journal of Haematology. – 2012. – **90**. – P. 99–110.
19. Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis / C. Col, K. Dinler, O. Hasdemir [et al.] // Hepatobiliary Pancreat Dis. Int. – 2010. – **9**, № 1. – P. 78–82.
20. Pancreatic encephalopathy and Wernicke encephalopathy in association with acute pancreatitis: A clinical study / G.-H. Sun, Y.-S. Yang, Q.-S. Liu [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2006. – **12**, № 26. – P. 4224–4227.
21. Ramanathan R. S. Acute necrotizing pancreatitis leading to pancreatic encephalopathy in a patient undergoing long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis / R. S. Ramanathan, T. Ahluwalia // Journal of Academy of Medical Sciences. – 2012. – **2**, Issue 2. – P. 85–87.
22. Ruggieri R. M. Pancreatic encephalopathy: a 7-year follow-up case report and review of the literature / R. M. Ruggieri, I. Lupo, F. Piccoli // Neurol. Sci. – 2002. – **23**. – P. 203–205.
23. S100b is expressed in, and released from, oligodendrocytes: influence of serum and glucose deprivation / J. Steiner, H.-G. Bernstein, B. Bogerts [et al.] // Neuroscience. – 2008. – **154**, № 2. – P. 496–503.
24. S100B protein in tissue development, repair and regeneration / G. Sorci, F. Riuizi, C. Arcuri [et al.] // World J. Biol. Chem. – 2013. – **4**, Issue 1. – 12 p.
25. Sofroniew M. V. Astrocytes: biology and pathology / M. V. Sofroniew, H. V. Vinters // Acta Neuropathol. – 2010. – **119**, № 1. – P. 7–35.
26. Tandon R. K. Oxidative Stress in Chronic Pancreatitis: Pathophysiological Relevance and Management / R. K. Tandon P. K. Garg // Antioxidants & Redox Signaling. – 2011. – **15**, № 10. – P. 2757–2766.
27. The Danger Signal S100B Integrates Pathogen and Danger-Sensing Pathways to Restrain Inflammation / G. Sorci, G. Giovannini, F. Riuizi [et al.] // PLoS Pathogens. – 2011. – **7**, Issue 3. – e1001315. – 15 p.
28. The effect of glial fibrillary acidic protein expression on neurite outgrowth from retinal explants in a

permissive environment / K. Toops, T. Hagemann, A. Messing, R. Nickells // BMC Research Notes. – 2012. – 5, № 693. – 9 p.

29. Wernicke Encephalopathy Presenting in a Patient with Severe Acute Pancreatitis / A. C. Arana-Guajardo, C. R. Camara-Lemarroy, E. J. Rendon-Ramirez [et al.] // JOP. Journal of the Pancreas. – 2012. – 13, № 1. – P. 104–107.

В. А. Макаrchук¹, Г. А. Ушакова²

ИНСТИТУТ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ НАМН УКРАИНЫ¹, ДНЕПРОПЕТРОВСК
ДНЕПРОПЕТРОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ О. ГОНЧАРА²

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ S-100B И ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО ПРОТЕИНА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС ПРИ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Исследовано особенности распределения S-100b и глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в головном мозге и поджелудочной железе крыс в условиях моделирования хронического панкреатита. Методом конкурентного ингибиторного иммуноферментного анализа в структурно и функционально различных отделах головного мозга выявлено повышение уровня S-100b и растворимой формы ГФКБ, перераспределение между растворимой и филаментной фракциями ГФКБ, что может быть одной из причин развития панкреатической энцефалопатии. Методом тестирования животных в “открытом поле” в условиях панкреатической энцефалопатии установлено, что обнаруженные изменения в распределении данных белков сопровождались снижением локомоторной и познавательной активности крыс и увеличением их стрессогенности. При развитии экспериментального хронического панкреатита в поджелудочной железе отмечено увеличение содержания S-100b и снижение растворимой и филаментной фракций ГФКБ, что свидетельствует о деполимеризации промежуточных филаментов глиальных клеток в периферической нервной системе в исследуемом органе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: панкреатическая энцефалопатия, мозжечок, таламус, гиппокамп, поджелудочная железа, S-100b, глиальный фибриллярный кислый протеин.

V. A. Makarchuk¹, H. O. Ushakova²

INSTITUTE OF GASTROENTEROLOGY OF NAMS OF UKRAINE¹, DNIPROPETROVSK
OLES HONCHAR DNIPROPETROVSK NATIONAL UNIVERSITY²

DISTRIBUTION OF S-100B AND GLIAL FIRILLARY ACIDIC PROTEIN IN THE RAT BRAIN AND PANCREAS UNDER THE CONDITIONS OF PANCREATIC ENCEPHALOPATHY

Summary

The aspects of the S-100b and glial fibrillary acidic protein (GFAP) distribution in the brain and pancreas of rats were analyzed under the conditions of experimental chronic pancreatitis. Using competitive inhibition ELISA we discovered the increase S-100b level and the soluble form of GFAP, along with redistribution between the soluble and filament fractions of GFAP in structurally and functionally differ regions of brain, which may be one of the causes of pancreatic encephalopathy. Under development of pancreatic encephalopathy we found that the observed changes in the proteins distribution were accompanied by a decrease of locomotor and cognitive activities and increase of stress level in rats as the animals were tested in the “open field” also. Under the conditions of chronic pancreatitis development we discovered elevation of S-100b and reduction of soluble and filament fractions of GFAP in the rat pancreas, which goes to prove the intermediate filaments depolymerization in glial cells of the peripheral nervous system in the organ.

KEY WORDS: pancreatic encephalopathy, cerebellum, thalamus, hippocampus, pancreas, S-100b, glial fibrillary acidic protein.

Отримано 28.01.14

Адреса для листування: В. А. Макаrchук, Інститут гастроентерології НАМН України, просп. Газети “Правда”, 96, Дніпропетровськ, 49074, Україна, e-mail: viktoriam7@gmail.com.

ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ ХІМІКО-БІОЛОГІЧНИХ АДДУКТІВ 1,1-БІС-[МЕТИЛПІРИМІДИН-2',4'-ДІОН-1'-ІЛ]-2-БРОМО-2'- ХЛОРОЕТИЛЕНІВ

Дослідження антиметаболітів піримідинового обміну, які відіграють роль преформованих сполук у низці біосинтетичних процесів та гальмують пухлинний ріст, є найбільш успішним напрямком пошуку нових протипухлинних засобів. З метою отримання нових потенційних протипухлинних засобів створено хіміко-біологічні аддукти на основі 1,1-біс-[5(6)-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бромо-2'-хлороетиленів та бактерійного лектину *Bacillus polytuxa*. Встановлено, що хіміко-біологічні аддукти біс-похідних піримідинів та бактерійного лектину є малотоксичними (LD_{50} від 338 до 335 мг/кг) та проявляють значущий протипухлинний ефект до 62,8 % на Лімфосаркомі Пліса. Це свідчить про те, що нові хіміко-біологічні аддукти перспективні для подальшого вивчення як малотоксичні речовини з високою протипухлинною активністю.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: піримідин, 5(6)-метилурацил, протипухлинна активність, бактерійний лектин.

ВСТУП. Хіміко-біологічні аддукти з прогнозованою біологічною активністю, що утворюються на основі біологічних структур – бактерійних лектинів та гетероциклічної компоненти, не описано в літературі. В арсеналі протипухлинних засобів значне місце займають ліки, що належать до гетероциклічних систем (рак шлунково-кишкового тракту та ін.) [7–10]. Пошук, вивчення та клінічне використання таких сполук у клінічній практиці досі не втрачають своєї інтенсивності. Протипухлинна активність бактерійних лектинів та їх вузька вуглеводна специфічність дозволяють застосовувати їх як базисні речовини для конструювання медико-біологічних препаратів направленої дії. У попередніх дослідженнях було показано, що бактерійні лектини означених штамів бацил проявляють виражений та вибірковий протипухлинний ефект відносно пухлин різного виду [4]. Тому певний інтерес становили створення та дослідження біологічної активності, а саме протипухлинної активності хіміко-біологічних аддуктів синтезованих гетероциклічних біс-похідних з бактерійним лектином **102**.

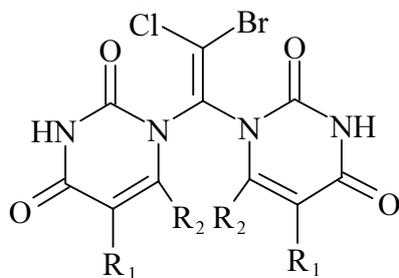
Мета роботи полягала у створенні та вивченні протипухлинної дії нових препаратів хіміко-біологічної будови з протипухлинною дією на основі 1,1-біс-[5(6)-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бромо-2'-хлороетиленів та

бактерійного лектину *Bacillus polytuxa*, який проявляє протипухлинну активність на коліштамів експериментальних пухлин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами дослідження були нові біс-похідні – 1,1-біс-[5(6)-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бромо-2'-хлороетилені, синтезовані на основі 5- або 6-метилурацилу та фторотану. Для створення хіміко-біологічних аддуктів 1,1-біс-[5(6)-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бромо-2'-хлороетиленів з бактерійним лектином відібрали найбільш активний продуцент позаклітинних лектинів – бактерійний лектин сапрофітного штаму *Bacillus polytuxa* **102** КГУ з Української колекції мікроорганізмів ІМВ НАНУ (лектин **102**). Сапрофітну культуру *Bacillus polytuxa* **102** КГУ було ізольовано з ґрунту [4]. Основні серії експериментальних досліджень виконано на дорослих білих нелінійних мишах-самцях (маса тіла – (17,0±2,0) та (22,0±2,0) г) та щурах-самцях (маса тіла – (160,0±20,0) г), яких утримували у віварії ДУ “Інститут фармакології та токсикології НАМН України”. Утримували тварин та проводили досліди на них відповідно до правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Результати дослідів обраховували в альтернативній формі на 14 добу після введення. Статистичну обробку проводили за В. Б. Прозоровським та ін. [6].

Оскільки структурних аналогів синтезованих сполук у літературі не описано, препаратом порівняння був відомий протипухлинний лікарський засіб 5-фторурацил (5-ФУ). Кров та пухлину піддослідного щура-пухлиноносія відібрано через 30 хв після введення сполук у терапевтичній дозі. З крові одержано сироватку шляхом центрифугування, а подрібнену пухлину екстрагували ізоаміловим спиртом та ізотонічним розчином (центрифугування суспензії протягом 40 хв при 8000 об./хв).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За розробленим автором методом синтезу отримано нові 1,1-біс-[5(6)-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бromo-2'-хлороетилені з фармакофорною групою C=CBrCl, які синтезовано при взаємодії 5(6)-метилурацилів з 2-бromo-1,1,1-трифлуоро-2-хлороетаном (фторотаном) у молярному співвідношенні реагентів 2:1, в системі розчинників (ДМФА–бензен) за умов міжфазного каталізу ДБ-18-краун-6 у лужному середовищі. У літературі описано синтез галогенопохідних аліфатичних сполук з використанням міжфазного каталізу та коло хімічних перетворень молекул урацилу [1, 3]. Однак метод синтезу нових галогенопохідних піримідинів, які синтезовано при міжфазному каталізі, раніше в літературі не було описано. З використанням вищенаведеної методики синтезовано 1,1-біс-[піримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бromo-2'-хлороетилені, для яких характерне розташування метил-радикала в 5-му або 6-му положенні молекул вихідних урацилів, **I, II** (схема).

**I, II**

де $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$ (**I**); $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$ (**II**)
Схема.

Синтезовані біс-похідні **I, II** було використано для створення хіміко-біологічних аддуктів з бактерійним лектином **102** як найбільш активним продуцентом позаклітинних лектинів. Хіміко-біологічні аддукти **III, IV**: лектин – гете-

роциклічне біс-похідне **I, II** отримували шляхом простого механічного перемішування двох компонентів у співвідношенні 1:1 у фізіологічному розчині (табл. 1).

Встановлено, що хіміко-біологічні аддукти **III, IV**: лектин **102** – гетероциклічне біс-похідне **I, II** належать до малотоксичних речовин (ЛД₅₀ між 338 та 335 мг/кг). Значення ЛД₅₀ лектину **102** дорівнює 248 мг/кг. Піддослідні тварини – білі нелінійні миші-самці, маса тіла становить (17,0±2,0) та (22,0±2,0) г. Препарат порівняння – 5-ФУ (ЛД₅₀ 375 мг/кг).

При аналізі значень ЛД₅₀ лектину **102** та його хіміко-біологічних аддуктів **III, IV** виявлено такі закономірності:

- хіміко-біологічні аддукти з лектином **102 III, IV** менш токсичні, ніж лектин **102**;
- в аддуктів з менш токсичними гетероциклічними компонентами зростала їх токсичність (значення ЛД₅₀ змінювалися в 1,46–1,5 раза);
- розташування метил-радикала в 5-му або 6-му положенні молекул вихідних урацилів **I, II** не впливає на токсичність відповідних аддуктів **III, IV** (табл. 2).

Певний інтерес становило дослідження протипухлинної активності аддуктів **III, IV**. Препаратом порівняння був 5-ФУ [2, 5]. 5-ФУ є найближчим аналогом за типом дії (прототип) сполук **I, II**, на основі яких створено аддукти **III, IV**. Для порівняння протипухлинної дії аддуктів **III, IV** та 5-ФУ було відмічено параметр протипухлинної дії останнього – гальмування росту Лімфосаркоми Пліса (55 %) [2]. Прийнятий критерій значущості для речовини з протипухлинною активністю – гальмування росту пухлини (понад 50 %). Кількість тварин у досліді – 6. Протипухлинну активність отриманих аддуктів **III, IV** оцінювали за такими показниками, як відсоток гальмування росту пухлини, відсоток загибелі піддослідних тварин.

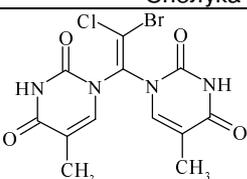
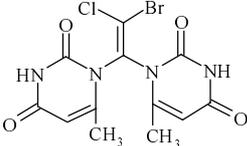
Дослідження щодо специфічної протипухлинної активності аддуктів **III, IV** проведено на моделі експериментального пухлинного росту – Лімфосаркома Пліса в дозах 20 і 24,0 мг/кг (табл. 3).

Виражений протипухлинний ефект з високим відсотком гальмування росту пухлини зареєстровано на Лімфосаркомі Пліса для хіміко-біологічних аддуктів: лектину **102** – біс-похідного 5-метилурацилу **III** (гальмування рос-

Таблиця 1 – Аддукти **III, IV**: лектин **102** – гетероциклічне біс-похідне **I, II**

№ аддукту	Склад аддукту
III	лектин 102 – 1,1-біс-[5'-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бromo-2'-хлороетилен (I)
IV	лектин 102 – 1,1-біс-[6'-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бromo-2'-хлороетилен (II)

Таблиця 2 – Параметри гострої токсичності речовин (I, II, III, IV), лектину 102

Сполука	ЛД ₅₀ , мг/кг	Хіміко-біологічний аддукт	ЛД ₅₀ , мг/кг
 I лектин 102	515	III (I+лектин 102)	5
 II лектин 102	495	IV (II+лектин 102)	8

Таблиця 3 – Протипухлинна активність лектину 102, аддуктів III, IV

Хіміко-біологічний аддукт	Доза, мг/кг	Середня маса пухлини, г		Гальмування росту пухлини, %
		контроль	дослід	
Лімфосаркома Пліса				
III	24,0	13,9±1,93	5,17±0,09	62,8
IV	24,0	13,9±1,93	5,21±0,09	62,5
Лектин 102	20,0	42,0±2,77	21,0±0,18	50,0
5-ФУ (контроль)				55,0

ту пухлини – 62,8 %); лектину **102** – *бис*-похідного 6-метилурацилу **IV** (гальмування росту пухлини – 62,5 %).

Індекс ефективності досліджуваних хіміко-біологічних аддуктів **III**, **IV** на Лімфосаркомі Пліса перебував у межах 2,66–5,88.

Таким чином, встановлено, що розташування метил-радикала в 5-му або 6-му положенні молекул вихідних урацилів **I**, **II** практично не впливає на виражений протипухлинний ефект аддуктів **III**, **IV**, оскільки відсоток гальмування росту пухлини на Лімфосаркомі Пліса при лікуванні вказаними речовинами має достатньо високі та близькі значення – 62,8 і 62,5 %.

У цілому пошук протипухлинних засобів на основі комбінацій ряду гетероциклічних сполук із бактерійними лектинами слід вважати перспективним новим напрямком, розвиток якого передбачає можливість одержання нових ліків з вираженою протипухлинною дією.

ВИСНОВКИ. 1. З метою отримання ефективних протипухлинних препаратів створено нові хіміко-біологічні аддукти: лектин **102** – 1,1-*бис*-[5'(6')-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бromo-2'-хлороетилени.

2. Хіміко-біологічні аддукти: лектин **102** – 1,1-*бис*-[5'(6')-метилпіримідин-2',4'-діон-1'-іл]-2-бromo-2'-хлороетилени належать до малотоксичних речовин (ЛД₅₀ між 338 та 335 мг/кг).

3. Розташування метил-радикала в 5-му або 6-му положенні молекул вихідних урацилів не впливає на токсичність відповідних аддуктів.

4. Хіміко-біологічні аддукти з лектином **102** менш токсичні, ніж сам лектин **102**; також спостерігали незначне зростання токсичності аддуктів, до складу яких входили менш токсичні гетероциклічні компоненти.

5. Виразений протипухлинний ефект з високим відсотком гальмування росту пухлини зареєстровано на Лімфосаркомі Пліса для аддуктів: лектину **102** – *бис*-похідного 5-метилурацилу (гальмування росту пухлини – 62,8 %); лектину **102** – *бис*-похідного 6-метилурацилу (гальмування росту пухлини – 62,5 %).

6. Розташування метил-радикала в 5-му або 6-му положенні молекул вихідних урацилів практично не впливає на виражений протипухлинний ефект їх аддуктів з бактерійним лектином, оскільки відсоток гальмування росту пухлини на Лімфосаркомі Пліса при лікуванні вказаними речовинами має достатньо високі та близькі значення – 62,8 і 62,5 %.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 1-Алкокси (арилокси)-1,1-дифтор-2-хлор-2-бромэтаны / И. И. Герус, М. Т. Колычева, Ю. Л. Ягу-

польский, В. П. Кухарь // Журн. орг. хим. – 1989. – 25. – С. 2020–2021.

2. Блохин Н. Н. Химиотерапия опухолевых заболеваний / Н. Н. Блохин, Н. И. Переводчикова. – М. : Медицина, 1984. – С. 15–82.
3. Клецкий М. Е. Структура и реакционная способность производных урацила / М. Е. Клецкий, Е. Б. Цупак, Д. А. Назаров // ХГС. – 2002. – № 8. – С. 1106–1108.
4. Коваленко Э. А. Внеклеточные лектины бактерий / Э. А. Коваленко // Микробиолог. журн. – 1990. – 5, № 3. – С. 92–99.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – М. : Новая волна, 2006. – 1200 с.
6. Прозоровский В. Б. Экспресс метод определения средней эффективности дозы и ее ошибки / В. Б. Прозоровский, В. П. Прозоровский, В. М. Демченко // Фармакол. и токсикол. – 1978. – 41, № 4. – С. 407–509.
7. Adjei A. A. Review of pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer / A. A. Adjei // Clinical Pharmacology. – 1999. – 48. – P. 265–277.
8. Anderson N. Controversial issues in 5-fluorouracil infusion use. Dose intensity, treatment duration, and cost comparisons / N. Anderson, J. Lokich // Cancer. – 1992. – 70. – P. 998–1002.
9. Anttila M. I. Pharmacokinetics of ftorafur after intravenous and oral administration / M. I. Anttila, E. A. Sotaniemi, M. I. Kairaluoma (Eds.) // Cancer Chemotherapy and Pharmacology. – 1983. – 10. – P. 150–153.
10. Baba H. State of the treatment for gastrointestinal cancer / H. Baba, S. Kohnoe, K. Endo (Eds.) // Gan To Kagaku Ryoho. – 2000. – 27. – P. 1233–1246.

Е. В. Вельчинская

НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А. А. БОГОМОЛЬЦА, КИЕВ

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ХИМИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ АДДУКТОВ 1,1-БИС-[МЕТИЛПИРИМИДИН-2',4'-ДИОН-1'-ИЛ]-2-БРОМО-2'-ХЛОРОЭТИЛЕНОВ

Резюме

Исследование антиметаболитов пиримидинового обмена, которые выступают в качестве преформированных соединений в ряду биосинтетических процессов и тормозят рост опухоли, является наиболее успешным направлением поиска новых противоопухолевых средств. С целью получения новых потенциальных противоопухолевых средств создано химико-биологические аддукты на основе 1,1-бис-[5(6)-метилпиримидин-2',4'-дион-1'-ил]-2-бromo-2'-хлороэтиленов и бактериального лектина *Bacillus polymyxa*. Установлено, что химико-биологические аддукты бис-производных пиримидинов и бактериального лектина являются малотоксичными (LD_{50} от 338 до 335 мг/кг) и проявляют значительный противоопухолевый эффект до 62,8 % на Лимфосаркоме Плиса. Это свидетельствует о том, что новые химико-биологические аддукты перспективны для дальнейшего изучения как малотоксичные вещества с высокой противоопухолевой активностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пиримидин, 5(6)-метилурацил, противоопухолевая активность, бактериальный лектин.

O. V. Velchynska

O. O. BOHOMOLETS NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY, KYIV

ANTITUMOUR ACTIVITY OF CHEMICAL-BIOLOGICAL ADDUCTS OF 1.1-BIS-[METHULPYRIMIDINE-2'.4'-DIONO-1'-IL]-2-BROMO-2'-CHLOROETHYLENES

Summary

Investigations of the antimetabolites of pyrimidin's change which forwards as preformed compounds at the link of biosynthetic processes and brakes tumour's growth is more successful finding direction of new antitumour preparations. With a purpose of new potential antitumour preparation's obtaining chemical-biological adducts on the base of 1.1-bis-[5(6)-methylpyrimidine-2'.4'-diono-1'-il]-2-bromo-2'-chloroethylenes and bacterial lectin *Bacillus polymyxa* were produced. It was discovered that chemical-biological adducts of bis-derivatives of pyrimidines and bacterial lectin applies to a little toxic preparations (LD_{50} from 338 to 335 mg/kg) and demonstrates considerable antitumour effect upon to 62.8 % on Lymphosarcoma Plisa tumour. It confirms that new chemical-biological adducts are perspective for the future investigation as substances with a little toxicity and high antitumour activity.

KEY WORDS: pyrimidine, 5(6)-methyluracile, antitumour activity, bacterial lectin.

Отримано 20.03.14

Адреса для листування: О. В. Вельчинська, вул. А. Ахматової, 16 Г, 14, Київ, 02068, Україна, e-mail: elena_www@ukr.net.

ВУГЛЕВОДНИЙ КОД АНТИГЕНПРЕЗЕНТУЮЧИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ

Дендритні клітини є важливою складовою імунної системи плаценти, що зумовлено їх численними регуляторними та ефекторними функціями. Плюрипотентність плацентарних дендритних клітин полягає, з одного боку, в презентації антигену лімфоцитам і активації імунної відповіді, а з іншого – в розвитку імунологічної толерантності материнського організму відносно плода. Антигенпрезентуючі клітини плаценти несуть рецептори до лектинів арахісу, сої, конконоваліну А, що відповідає їх антигенрозпізнаючій і антигенпрезентуючій функціям. На час пологів на цитоплазматичній мембрані антигенпрезентуючих клітин збільшується кількість рецепторів до лектинів арахісу, сої і конконоваліну А, що є маркером зростання їх функціональної активності й відміни стану імунологічної толерантності материнського організму до плода.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антигенпрезентуючі клітини, плацента, лектини.

ВСТУП. Однією з центральних проблем імунології репродукції є визначення імунних процесів, що забезпечують нормальний розвиток вагітності та пологів [1]. Взаємодія між організмами матері та плода зводиться, в кінцевому результаті, до взаємодії їх клітин. Важливе й актуальне місце в імуноморфологічному вивченні системи мати–плацента–плід посідають антигенпрезентуючі дендритні клітини [4].

Дендритні клітини є важливою складовою імунної системи плаценти, що зумовлено їх численними регуляторними та ефекторними функціями [10]. Плюрипотентність плацентарних дендритних клітин полягає, з одного боку, в презентації антигену лімфоцитам і активації імунної відповіді, а з іншого – в розвитку імунологічної толерантності материнського організму відносно плода завдяки контролю над Th₁/Th₂ балансом і регуляції активації проліферативної відповіді аутологічних NK-клітин, що розпізнають клітини трофобласту [11].

На даний момент не визначено, в яких випадках дендритні клітини викликають індукцію імунної відповіді на антигени, а в яких вони забезпечують толерантність. Крім того, за даними Y.-L. Van і співавт., у децидуальному шарі існує 3 субпопуляції дендритних клітин: 2 типи мієлоїдних клітин (BDCA-1⁺CD19⁻CD14⁻ і BDCA-1⁺CD14⁻) та плазмацитоїдні дендритні клітини (BDCA-2⁺CD123⁺) [6]. Незважаючи на мієлоїд-

ний фенотип, обом субпопуляціям дендритних клітин децидуальної оболонки притаманні властивості незрілих дендритних клітин, тобто не відбувалося стимулювання Th₁-типу імунної відповіді й таким чином забезпечувався фізіологічний перебіг вагітності. Аналогічні дані наведено в іншій роботі: дендритні клітини децидуальної оболонки з фенотипом CD14⁺CD4⁺CD68⁺HLADR⁺CD209⁺ перебували в тісному контакті з NK-клітинами, активно захоплювали антиген, але не були здатні стимулювати наївні Т-лімфоцити [9]. Після дії цитокінів – індукторів запального процесу дендритні клітини *in vitro* експресували маркери зрілих дендритних клітин (CD83 і CD25) і набували властивості активувати імунну відповідь [7].

На сьогодні недостатньо вивчено, як змінюється фенотип дендритних клітин за будовою вуглеводовмісних рецепторів протягом вагітності. Дослідження морфофункціонального стану дендритних клітин лектингістохімічним методом при патології вагітності дозволило б з'ясувати дисфункцію дендритних клітин і провести відповідну корекцію. Наприклад, як експериментальне лікування спонтанних викиднів запропоновано введення сингенних дендритних клітин, що супроводжується зростанням кількості TGF-β1 і PIBF на фетоплацентарному рівні й виношуванням вагітності [8].

Тому метою дослідження стало вдосконалення способу виявлення антигенпрезентуючих клітин із використанням двох лектинів у

гістологічних препаратах методом лектинової гістохімії, що забезпечило б ефективність додаткового високоспецифічного виявлення цих клітин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження стали плаценти щурів на 18-ту, 20-ту, 22-гу доби вагітності та на час пологів. Забір плацент здійснювали в декапітованих щурів і під час пологів згідно із законодавчими правилами про гуманне ставлення до тварин (правилами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей). Виготовляли гістологічні препарати. Плаценти фіксували в розчині Буена, заливали в парафін. Для більш детального й ефективного виявлення антигенпрезентуючих клітин проводили лектин-гістохімічну реакцію, застосовуючи комбінацію з 2 лектинів і, відповідно, 2 системи візуалізації [3]. Використовували комерційний набір "Лектинтест" (м. Львів). Після постановки реакції кон'югації з першим лектином із проявленням продуктів реакції діамінбензидином (продукти реакції мали коричневий колір) на тому ж самому гістологічному препараті ставили другу реакцію кон'югації з іншим лектином із проявленням продуктів реакції α -нафтолом, дофарбованим кристалфіолетом (продукти реакції мали фіолетовий колір). Гістологічні препарати занурювали у гліцерин-желатин. Комбінацію лектинів підбирали емпіричним і теоретичним шляхами. З огляду на власні дослідження і дані інших дослідників, було підбрано найбільш вдалу комбінацію лектинів для вивчення антигенпрезентуючих клітин (соя і конконовалін А та арахіс і конконовалін А). Результати реакції оцінювали напівкількісним методом.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На 18-ту добу пренатального розвитку антигенпрезентуючі клітини виявляють на межі плодової і материнської частин плаценти. Вони тісно контактують із поодинокими гігантськими трофобластичними клітинами. Розміри їх соми – до 30 мкм, візуалізується декілька виходів відростків. Розміри ядер – 8–10 мкм, вони мають коричневе забарвлення, тобто по каріолемі накопичуються вуглеводи, що мають рецептори до лектинів арахісу та сої. Інтенсивність забарвлення, враховуючи напівкількісний метод, відбулася на +. Одночасно виявляють макрофаги з типовим ядром, у яких забарвленість більш інтенсивна і характеризується на ++++. В цитоплазмі антигенпрезентуючих клітин

накопичуються вуглеводовмісні сполуки, що проявляють спорідненість до лектину конконоваліну А, тому цитоплазма має фіолетовий колір (+++). У макрофагів цитоплазма слабофіолетового кольору (+), також присутній коричневий відтінок (+). На поверхні цитоплазматичної мембрани в антигенпрезентуючих клітин виявляють одиничні бісерні нашарування коричневих часточок.

Як відомо, найбільш ранньою, а пізніше центральною функцією імунної відповіді є антигенрозпізнаюча роль імунітету. Розпізнаються маркери "свого", загальні для всього організму, і такими маркерами є найбільш архаїчні молекули міжклітинної адгезії – кадгерини. Кадгерини – трансмембранні глікопротеїни. Кадгерини опосередковують гомо- і гетеротипічну адгезію, тому як антигенрозпізнаючі рецептори вони еволюційно закріпилися і збереглися на антигенпрезентуючих клітинах. Так, відомо, що в шкірі, плаценті, лімфатичних вузлах антигенпрезентуючі клітини мають на цитоплазматичній мембрані рецептори з вуглеводними залишками (D-Gal) і проявляють спорідненість до лектину арахісу (PNA). Оскільки вагітність в експериментальних тварин перебігала фізіологічно, на поверхні антигенпрезентуючих клітин не виявили значної кількості рецепторів до лектинів арахісу і сої, що свідчить про їх помірну функціональну активність, тобто про підтримку імунологічної толерантності в системі мати–плацента–плід.

Функція протокадгеринів тісно пов'язана з функцією протеосом. Протеосоми – мультикаталітичні високомолекулярні ендопротеази, які відіграють провідну роль у процесингу антигенів. Засіб процесування детермінується спектром протеаз і тим самим специфічним типом рецептора, активація якого ініціює синтез протеаз для презентації розпізаного імуногена. Рецептор-активатор протеаз має уніфіковану будову [13]. Рецептори-активатори функціонують паралельно з молекулами головного комплексу гістосумісності та з протеосомним апаратом.

Контроль над процесом підтримки постійності внутрішнього середовища багатоклітинного організму відбувається внаслідок процесування сингенів або гомоалогенів на протеосомах (ендогенним шляхом) в антигенпрезентуючих клітинах. Процесування антигенів сингенного або гомоалогенного походження призводить до утворення супрамолекулярних комплексів – частково розщеплених антигенів з молекулами I класу головного комплексу, що зіставляється антигенпре-

зентуючими клітинами з автохтонним варіантом організму. Процесування алогенів та сингенів, на відміну від ксеногенів, відбувається трансмембранними толлоподібними рецепторами (Toll-like receptors – TLR) [14]. Рецептори головного комплексу гістосумісності мають у своєму складі вуглеводну частину. Якщо вуглеводний ланцюг не редукований, він закінчується фукозою і сіаловою кислотою, які завжди перебувають у дистальному положенні до поліпептидного ланцюга, тоді як ацетилгалактозамін і галактоза – в проксимальному положенні й часто утворюють зв'язок з амінокислотами в молекулах білків, перш за все аспарагіном, серином, тріоніном, гідроксилізином і гідроксипроліном. Найбільшу концентрацію рецепторів головного комплексу гістосумісності відмічають на цитоплазматичній поверхні антигенпрезентуючих клітин, тому виявлення вуглеводних залишків галактози до і після десіалування можна вважати реакцією специфічною [12].

Яку ж роль відіграють вуглеводи, споріднені до конконоваліну А, яких так багато в цитоплазмі антигенпрезентуючих клітин? Антигенрозпізнаюча функція дендритних клітин не обмежується розпізнаванням лише свого, а й чужого. Тому активуються манозовмісні рецептори.

Рецептори до манози зв'язують залишки D-манози, D-N-ацетилглюкозаміну, L-фукози, D-N-ацетилманозоаміну. Специфічне зв'язування вуглеводних залишків визначається наявністю в останніх двох екваторіально розташованих гідроксильних груп у положеннях 3 і 4, що формують водневі зв'язки з парами амінокислот. Кожна з гідроксильних груп пов'язана з Ca^{2+} , що відіграє ключову роль у стабілізації ліганд-білкового комплексу. Галактоза, що має гідроксильну групу OH_4 в аксіальному положенні, не здатна утворювати подібні комплекси. Саме ця обставина перешкоджає зв'язуванню манозозв'язуючого лектину з глікопротеїнами клітин еукаріотів, термінальне положення в яких займають галактоза, сіалові кислоти та їх похідні. Тому в нормі залишки манози на клітинах багатоклітинного організму повинні бути екрановані, наприклад сіаловою кислотою, що є основою дискримінації "своє-чуже" [5].

Оголення залишків D-галактози і N-ацетил-D-галактозаміну лежить в основі молекулярного механізму розпізнавання ендогенними манозними лектинами, що розміщені на цитоплазматичній поверхні, мононуклеарних фагоцитів і дендритних клітин чужорідних макромолекул [4].

Манозний рецептор є трансмембранним білком I типу, N-кінцева частина якого локалізована поза клітиною, з коротким (45 кислотних залишків) цитоплазматичним фрагментом. Позаклітинна частина, що бере участь в детекції залишків термінально локалізованих маноз, представлена вісьма доменами, характерними для лектинів С-типу, короткого N-кінцевого фрагмента, збагаченого цистеїном і фібронектиновим повтором II типу. Фібронектинова частина має вуглеводну частину (Cal β 1-CalNac α), яка є спорідненою до лектину арахісу (PNA) [15].

На 20-ту, 22-гу доби вагітності й на час пологів, із стоншенням шару клітин, що несуть неklasичні рецептори головного комплексу гістосумісності, до повного їх зникнення, антигенпрезентуючі клітини починають контактувати з клітинами плідного походження, які експресують рецептори головного комплексу гістосумісності. Антигенпрезентуючі клітини активуються, і в них посилюється експресія рецепторів як до арахісу, сої, так і до конконоваліну А. Тому клітини мають інтенсивні хромогенні мітки (коричневого кольору – +++ і фіолетового – +++). Візуалізуються відростки у клітин, можна дослідити їх довжину і товщину.

Подібні зміни в морфології дендритних клітин описали автори, які вивчали морфологічні зміни дендритних клітин у клітинних культурах і периферичній крові [16].

ВИСНОВКИ. 1. Антигенпрезентуючі клітини плаценти мають рецептори до лектинів арахісу, сої, конконоваліну А, що відповідає їх антигенрозпізнаючій і антигенпрезентуючій функціям.

2. На час пологів на цитоплазматичній мембрані антигенпрезентуючих клітин збільшується кількість рецепторів до арахісу, сої і конконоваліну А, що є маркером зростання їх функціональної активності й вказує на відміну стану імунологічної толерантності материнського організму до плода.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гаврилюк А. М. Сучасні напрямки розвитку імунології репродукції / А. М. Гаврилюк, М. Курпіш // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2011. – № 3 (42). – С. 5–12.
2. Кокряков В. Н. Очерки о врожденном иммунитете / В. Н. Кокряков. – СПб. : Наука, 2006. – 261 с.
3. Луцик А. Д. Лектины в гистохимии / А. Д. Луцик, Е. С. Детюк, М. Д. Луцик. – Львов : Выща школа, 1988. – 109 с.
4. Сельков С. А. Иммунологические механизмы контроля развития плаценты / С. А. Сельков, Д. И. Соколов // Журнал акушерства и женских болезней. – 2010. – В. 1. – Т. LIX. – С. 6–11.
5. Akira S. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses / S. Akira, K. Hoshino, T. Kaisho // J. Endotoxin. Res. – 2000. – **6** (5). – P. 383–387.
6. BDCA-1+, BDCA-2+ and BDCA-3+ dendritic cells in early human pregnancy deciduas / Y.-L. Ban, B.-H. Kong, X. Qu [et al.] // Exp. Immunol. – 2008. – **151** (3). – P. 399–406.
7. CD83⁺dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy / K. Askelund, H. S. Liddell, A. M. Zanderigo [et al.] // Placenta. – 2004. – **25**. – P. 140–145.
8. Chen M.-L. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo / M.-L. Chen, L. Pittet, M. J. Gorelik // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – **102**. – P. 419–424.
9. Coulam C. D. Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer / C. D. Coulam, R. G. Roussev // J. Ass. Reprod. Gene. – 2003. – **20**. – P. 58–62.
10. Gardner L. Dendritic Cells in the Human Decidua / L. Gardner, A. Moffett // Biology of reproduction. – 2012. – **245**. – P. 1223–1234.
11. Identification of cytotoxic lymphocytes in decidua at term / K. Calazka, P. Basta, K. Piekutowski [et al.] // Archives of Perinatal Medicine. – 2010. – **16** (1). – P. 26–31.
12. Kadowaki N. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens / N. Kadowaki, S. Ho // J. Exp. Med. – 2001. – **194**. – P. 863–869.
13. Lipscomb M. F. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease / M. F. Lipscomb, B. J. Masten // Physiol. Rev. – 2002. – **82**. – P. 97–130.
14. Opal S. M. Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock / S. M. Opal, C. E. Huber // Crit. Care. – 2002. – **6** (2). – P. 125–136.
15. Stahl P. D. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense / P. D. Stahl, R. A. Ezekowitz // Curr. Opin. Immunol. – 1998. – **10**. – P. 50–55.
16. Thiel S. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response / S. Thiel, U. Holmskov, L. Hviid // Clin. Exp. Immunol. – 2009. – **90**. – P. 31–35.

О. Г. Куц

ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

УГЛЕВОДНЫЙ КОД АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ

Резюме

Дендритные клетки являются важной составляющей иммунной системы плаценты, что обусловлено их многочисленными регуляторными и эффекторными функциями. Плюрипотентность плацентарных дендритных клеток состоит, с одной стороны, в презентации антигена лимфоцитам и активации иммунного ответа, с другой – в развитии иммунологической толерантности материнского организма по отношению к плоду. Антигенпрезентирующие клетки плаценты несут рецепторы к лектинам арахиса, сои, конконовалина А, что отвечает их антигенраспознающей и антигенпрезентирующей функциям. К родам на цитоплазматической мембране антигенпрезентирующих клеток увеличивается количество рецепторов к лектинам арахиса, сои, конконовалина А, что является маркером возрастания их функциональной активности и отмены состояния иммунологической толерантности материнского организма по отношению к плоду.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антигенпрезентирующие клетки, плацента, лектины.

CARBOHYDRATE CODE ANTIGEN PRESENTING CELLS OF PLACENTA

Summary

Dendritic cells are an important component of the immune system of the placenta, which causes them to numerous regulatory and effectors functions. Plyurypotentnist placental dendritic cells are, on the one hand, the presentation of antigen to lymphocytes and activation of the immune response, and the other in the development of immunological tolerance of the parent body in relation to the fetus. Antigen presenting placental cells have receptors for lectins peanut, soybean, konkonovalinu A that suits their antyhenrozpiznayuchiy and antyhenprezentuyuchiy function. At the time of delivery to the cytoplasm membrane antyhenprezentuyuchyh cells increases the number of receptors for peanut, soybean and konkonovalinu A, which is a marker for the growth of their functional activity and abolish the state of immunological tolerance maternal organism to the fetus.

KEY WORDS: antyhen presenting cells, placenta lectin.

Отримано 06.05.14

Адреса для листування: О. Г. Куц, вул. Тovarиська, 43, кв. 42, Запоріжжя, 69121, Україна, e-mail: sidorov0240@mail.ru.

ОЦІНКА БІОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ У ХВОРИХ НА ВЕРХНЬОЩЕЛЕПНИЙ СИНУСИТ

У хворих на гострий і хронічний гнійні верхньощелепні синусити досліджено маркери ремоделювання кісткової тканини і рівень ендогенної інтоксикації. При обох клінічних формах в їх крові виявлено зниження вмісту остеокальцину; активність кісткового ізоферменту лужної фосфатази коливалась у межах норми. За умов гострого гнійного синуситу відзначено зворотний середньої сили кореляційний зв'язок між кількісними значеннями остеокальцину та молекул середньої маси (МСМ 280), при інших порівняннях кореляція була слабкою.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: верхньощелепний синусит, остеокальцин, ізофермент лужної фосфатази, ремоделювання кістки, ендогенна інтоксикація.

ВСТУП. Гострі та хронічні синусити належать до розповсюджених захворювань із стійкою тенденцією до зростання частоти [2, 4, 8]. Однак їх патогенез усе ще досліджено недостатньо, що гальмує розробку високо-ефективних методів лікування та об'єктивного прогнозу близьких і віддалених наслідків. Найбільшу увагу, на нашу думку, приділено ролі співусть приносних пазух, порушень їх дренажної функції, зменшенню дієздатності мукоциліарної транспортної системи при ураженні слизової оболонки синусів, що призводить до зниження її резистентності до інфекції, застою слизу і сприяє прогресуванню патологічного процесу [5, 6, 12, 14]. В основі цих функціональних змін лежать порушення структури і руйнування епітелію слизової оболонки носа та приносних пазух [7].

Згідно з результатами наших попередніх клініко-морфологічних досліджень, запальні процеси у верхньощелепній пазусі супроводжуються структурною перебудовою не тільки слизової оболонки, а й кісткового шару пазухової стінки. Ремоделювання має чіткі морфометричні критерії: при гострому синуситі збільшуються висота епітеліального шару, площа епітеліоцитів, площа лакун і товщина трабекул кісткової тканини, а при хронічному поліпозному синуситі ці показники регресують [9]. За умов папілярної гіперплазії слизової оболонки в кістковій тканині превалюють процеси ремо-

делювання за типом остеосклерозу в поєднанні з остеопорозом, а при деформаційному склеротичному поліпозному синуситі переважають процеси остеопорозу [1]. Разом із тим, біохімічні маркери перебудови кісткової тканини при синуситах потребують окремого дослідження, що дало б змогу поглибити уявлення про механізми виявлених морфологічних змін.

Метою роботи було дослідити процеси кісткоутворення при гострому і хронічному верхньощелепних синуситах за вмістом остеокальцину та кісткового ізоферменту лужної фосфатази в сироватці крові хворих.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Під спостереженням перебувало 34 хворих на гнійний верхньощелепний синусит, з них 12 – на гострий і 22 – на хронічний у фазу загострення. Чоловіків було 13, жінок – 21. Їх вік коливався від 24 до 45 років. Клінічні та рентгенологічні ознаки синуситів були типовими. Групу порівняння (n_1) склали 28 здорових осіб обох статей і такого ж віку.

Забір крові в обстежуваних здійснювали натщесерце. Отримані зразки сироватки зберігали при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведення аналізу. Концентрацію остеокальцину та активність кісткового ізоферменту лужної фосфатази визначали імуноферментним методом з використанням тест-систем виробництва фірм "Nordic Bio" (Данія) та "Quidel Corporation" (США) відповідно.

© Ю. М. Андрейчин, О. В. Хлебан, 2014.

Ступінь ендогенної інтоксикації організмів піддослідних тварин оцінювали за вмістом у крові двох фракцій молекул середньої маси (МСМ) за допомогою спектрофотометра при довжинах хвиль 252 та 280 нм (методика Габрієляна і співавт., 1984). Контрольна група (n_2) складалась із 20 здорових осіб.

Аналіз отриманих цифрових даних проводили на персональному комп'ютері з використанням U-критерію Манна-Уїтні. Значення $p < 0,05$ вважали статистично достовірними. Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень університету в програмному пакеті Statsoft STATISTIKA.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані дані (табл.) вказують на те, що в сироватці крові хворих на гнійний верхньощелепний синусит зменшувався вміст остеокальцину ($p < 0,05$). Ступені цього зниження відносно норми при гострій і хронічній формах захворювання суттєво не відрізнялися ($p < 0,05$). Менших змін зазнала активність кісткового ізоферменту лужної фосфатази: при гострому синуситі зберігалась у межах норми, при хронічному – мала тенденцію до підвищення ($p = 0,098$).

Концентрація МСМ 254 у сироватці крові хворих була підвищеною як при гострій, так і при хронічній формах верхньощелепного синуситу ($p < 0,05$ – $0,001$), а МСМ 280 – лише при хронічній формі ($p < 0,01$). Важливо зазначити, що в більшості порівнянь коефіцієнт кореляції (r) між кількісними значеннями остеокальцину чи кісткового ізоферменту лужної фосфатази та МСМ обох фракцій вказував на слабкий зв'язок, коливаючись від 0,01 до -0,26, і лише при гострому гнійному синуситі виявлено зворотний середній зв'язок між кількісними значеннями остеокальцину та МСМ 280 ($r = -0,58$). Останнє дає підставу вважати, що підвищення рівня ендогенної інтоксикації організму, зокрема МСМ 280 у крові, супроводжується пригніченням синтезу остеокальцину.

Як відомо, в основі ремоделювання кісткової тканини лежать процеси її резорбції (розсмоктування) і кісткоутворення. Об'єм ремоделювання становить 2–10 % за рік. Важливу роль у біомінералізації хрящової і грубоволокнистої тканин відіграють матриксні пухирці (везикули), що насичують органічний матрикс кристалами гідроксиапатиту, створюючи умови для їх формування. Ці пухирці містять лужну фосфатазу, остеокальцин, кальцій та інші сполуки. Припускають, що лужна фосфатаза вивільняє неорганічний фосфат з ефірів, унаслідок чого утворюються локальний надлишок іонів та преципітати фосфору і кальцію. Крім того, лужна фосфатаза діє як трансфераза й забезпечує фосфорилювання колагену. Мінералізація колагену I типу, на який припадає близько 90 % органічного матриксу, відбувається з участю остеокальцину [3].

Білок остеокальцин виробляється, головним чином, остеообластами та одонтообластами, його вважають найбільш специфічним маркером остеобластичної активності. Сповільнюючи преципітацію гідроксиапатиту, остеокальцин може втягуватись у регуляцію мінералізації матриксу [3, 10, 13].

Результати наших гістологічних досліджень біоптатів стінки верхньощелепного синуса при гнійно-запальних процесах у хворих засвідчили розвиток місцевого остеоосклерозу та остеопорозу [11]. Можна припустити причетність виявлених змін вмісту остеокальцину в крові до вказаних морфологічних процесів. Очевидно, цей маркер можна використовувати в клінічній практиці для оцінювання процесів ремоделювання при гнійних синуситах і ефективності медикаментозної корекції виявлених змін.

ВИСНОВКИ. 1. У сироватці крові хворих на гострій і хронічній гнійні верхньощелепні синусити знижується вміст остеокальцину.

2. При гострому і хронічному гнійних верхньощелепних синуситах активність кісткового

Таблиця – Рівень маркерів утворення кісткової тканини в сироватці крові хворих на гнійний верхньощелепний синусит ($M \pm m$)

Показник	Здорові особи ($n_1=28, n_2=20$)	Хворі	
		гострий синусит ($n=12$)	хронічний синусит ($n=22$)
Остеокальцин, нг/мл	29,67±1,93	20,04±2,43*	19,81±2,23*
Кістковий ізофермент лужної фосфатази, Од/мл	32,48±1,62	32,82±4,38	38,26±2,49
МСМ 254, ум. од.	0,50±0,02	0,57±0,02*	0,65±0,03*
МСМ 280, ум. од.	0,27±0,01	0,34±0,06	0,45±0,05*

Примітка. * – показник достовірності відносно норми ($p < 0,01$).

изоферменту лужної фосфатази зберігається в межах норми.

3. Концентрація МСМ 254 у крові хворих підвищується як при гострій, так і при хронічній

формах гнійного верхньощелепного синуситу, а МСМ 280 – лише при хронічній формі.

4. При гнійному синуситі виявлено зворотний середній зв'язок між вмістом остеокальцину та МСМ 280 у крові.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрейчин Ю. М. Морфологічні критерії хронічних синуситів / Ю. М. Андрейчин, Я. П. Нагірний // Шпитальна хірургія. – 2008. – № 1. – С. 78–81.
2. Березнюк В. В. Рациональна антибіотикотерапія у лікуванні захворювань ЛОР-органів / В. В. Березнюк, Ф. Б. Юрочко, В. І. Попович // Новости медицины и фармации. – 2009. – № 18 (292).
3. Биохимические маркеры метаболизма костной ткани / В. В. Поворознюк, С. В. Малышкина, Л. Д. Горидова, Л. М. Сторожук // Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение : монография / Акад. мед. наук Украины ; под ред. Н. А. Коржа, В. В. Поворознюка, Н. В. Дедух, И. А. Зупанца. – Харьков : Золотые страницы, 2002. – С. 98–107.
4. Богданов В. В. Одонтогенный гайморит / В. В. Богданов, А. Г. Балабан // Журн. вушн., нос. і горл. хвороб. – 2005. – № 4. – С. 72–78.
5. Богомилский М. Р. Острые синуситы у детей и их рациональная терапия // Ринологія. – 2002. – № 3. – С. 41–48.
6. Завалий М. А. Анализ клинических симптомов физико-химических показателей функции мукоцилиарной транспортной системы у больных острым гнойным синуситом / М. А. Завалий, С. Б. Бесшапочный // Ринологія. – 2010. – № 4. – С. 13–14.
7. Захаров Г. П. Нарушения мукоцилиарной системы у больных хроническим риносинуситом и их коррекция : автореф. дисс. на соискание учен. степени доктора мед. наук / Г. П. Захаров. – СПб., 2007. – 38 с.
8. Неинвазивные методы лечения больных острым гнойным гайморитом: за и против / И. В. Деменков, Т. М. Приставко, В. В. Деменков, И. Ю. Ватанская // Журн. вушн., нос. і горл. хвороб. – 2013. – 5-С. – С. 66–67.
9. Ремоделирование стінки верхньощелепной пазухи при синуситах – морфометричні аспекти / Ю. М. Андрейчин, Ю. М. Орел, Я. Я. Боднар, Т. В. Дацко // Вісник наукових досліджень. – 2010. – № 4. – С. 108–109.
10. Сміян С. І. Біохімічні маркери резорбції кісткової тканини / С. І. Сміян // Проблеми остеопорозу / за ред. Л. Я. Ковальчука. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2002. – С. 50–56.
11. Andreychyn Yu. M. Histological changes of maxillary sinus at chronic purulent sinusitis / Yu. M. Andreychyn // Международный бюллетен по оториноларингология. – 2012. – № 4. – P. 8–11.
12. Betlejewski S. The influence of nasal flow aerodynamics on the nasal physiology / S. Betlejewski, A. Betlejewski // Otolaryngol. – 2008. – 62, № 3. – P. 321–325.
13. Osteocalcin – a marker of bone metabolism in endocrine diseases // Europ. J. of Endocrinol. – 1994. – 130 (suppl.2). – P. 135.
14. Topographical differences in distribution and responsiveness of trigeminal sensitivity within the human nasal mucosa / T. Meusel, S. Negoias, M. Scheibe, T. Hummel // Pain. – 2010. – 151, № 2. – P. 516–521.

Ю. М. Андрейчин, О. В. Хлебан

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ОЦЕНКА БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНЫМ СИНУСИТОМ

Резюме

У больных острым и хроническим гнойными верхнечелюстными синуситами исследовано маркеры ремоделирования костной ткани и уровень эндогенной интоксикации. При обеих клинических формах в их крови обнаружено снижение содержания остеокальцина; активность костного изофермента

лужной фосфатазы колебалась в пределах нормы. В условиях острого гнойного синусита отмечено обратную средней силы корреляционную связь между количественными значениями остеокальцина и молекул средней массы (МСМ 280), при других сравнениях установлено слабую корреляцию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: верхнечелюстной синусит, остеокальцин, изофермент лужной фосфатазы, ремоделирование кости, эндогенная интоксикация.

Yu. M. Andreychyn, O. V. Khlyeban
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

EVALUATION OF BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE REMODELING IN PATIENTS WITH MAXILLARY SINUSITIS

Summary

The markers of bone remodeling and the level of endogenous intoxication investigated in patients with acute and chronic suppurative maxillary sinusitis. At both clinical forms in the blood of patients indicated a reduction of osteocalcin; the activity of the bone isoenzyme of alkaline phosphatase ranged about normal. At acute purulent sinusitis is observed inverse medium strength correlation between quantitative values of osteocalcin and the molecules of average mass (MAM 280), while other comparable correlation was weak.

KEY WORDS: maxillary sinusitis, osteocalcin, alkaline phosphatase isoenzyme, bone remodeling, endogenous intoxication.

Отримано 30.04.14

Адреса для листування: Ю. М. Андрейчин, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

СТАН СИСТЕМИ NO-СИНТАЗА/АРГІНАЗА Й ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ХВОРИХ ІЗ ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ ДО ТА ПІСЛЯ СЕАНСУ ГЕМОДІАЛІЗУ

Вивчено стан системи NO-синтаза/аргіназа та оксидативних процесів у лізатах лімфоцитів крові хворих із хронічною нирковою недостатністю за умов гемодіалізу. Показано зростання нітратооксидативного стресу в лімфоцитах порівняно з контрольною групою. Гемодіаліз викликав різке зниження активності iNOS, eNOS, вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну, нітрит-аніона в лізаті лімфоцитів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: NO-синтаза, аргіназа, ТБК-активні продукти, нітрит-аніон, L-аргінін, лімфоцити, хронічна ниркова недостатність.

ВСТУП. Розвиток хронічної ниркової недостатності (ХНН) супроводжується дисфункцією ендотеліоцитів, гіпертензією, підвищенням вмісту цитокінів, що циркулюють у крові, зміною функцій клітин крові, оксидативним стресом та порушенням системи NO-синтаза/аргіназа [12, 21]. У пацієнтів із ХНН V ступеня основним методом лікування є замісна ниркова терапія (ЗНТ), завдяки якій забезпечується продовження тривалості життя.

У хворих із ХНН, які отримують ЗНТ методом гемодіалізу, відзначають зниження концентрації амінокислоти L-аргініну в крові, яка є субстратом для NO-синтаз та аргінази, і вмісту нітрогену оксиду (NO), що викликає розвиток ендотеліальної дисфункції [4, 9].

Наскільки сама процедура проведення гемодіалізу (ГД) впливає на показники активності NO-синтаз, вміст нітрогену оксиду та його похідних, а також оксидативні процеси, на сьогодні детально вивчають. Показано, що сеанс ГД викликає зниження рівня нітритів, асиметричного диметиларгініну, гомоцистеїну [13].

Відносно змін вмісту нітратів при ГД дані літератури є неоднозначними – відзначено як зростання їх концентрації, так і зниження [3, 4, 9, 13].

Серед факторів, що впливають на вміст та рівень біоактивності NO у плазмі крові при ГД, виділяють такі: зниження синтезу ендогенного L-аргініну та його надходження в організм з

їжею; використання L-аргініну в інших метаболічних процесах (аргіназою тощо); зменшення рівня транспорту L-аргініну в ендотеліоцити; збільшення вмісту асиметричного диметиларгініну та інших метаболітів нітрогену оксиду, які блокують активність NO-синтази, зниження реабсорбції L-аргініну в ниркових канальцях [9, 16]. Окрім цього, протягом ГД відбувається зростання виділення прозапальних цитокінів, які підвищують синтез NO, активуючи індукбельну NO-синтазу (iNOS); вміст NO може зменшуватись внаслідок його деградації, зниження активності NO-синтази, а також у результаті внутрішньосудинного гемолізу еритроцитів та виходу в плазму крові гемоглобіну, з яким NO швидко взаємодіє [16, 17].

Значну роль у функціонуванні ендотеліальної системи та формених елементів крові хворих із ХНН відіграють зростання оксидативних процесів та зниження активності антиоксидантного захисту. Рівень оксидативного стресу підвищується з прогресуванням розвитку ХНН [2, 5, 19].

Однак щодо зміни вмісту ТБК-активних продуктів при ГД у літературі є різноспрямовані результати – як зростання їх вмісту в плазмі крові після сеансу ГД [3], так і зниження [4, 13].

За умов ГД зміни активності NO-синтаз, вмісту нітрогену оксиду та процесів ліпопероксидації відбуваються також у формених елементах крові, зокрема в лімфоцитах. Відомо,

що лімфоцити крові беруть участь у підтримці імунологічного статусу організму, синтезують про- й антизапальні цитокіни і NO, яке бере участь в їх розвитку, диференціації та функціонуванні [10, 20].

Метою даної роботи було дослідити зміни активності показників NO-синтази, аргінази і процесів ліпопероксидації у лімфоцитах крові хворих із хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідження було включено 18 хворих (8 чоловіків, 10 жінок) із ХНН V ступеня (гломерулонефрит), які отримували ЗНТ методом ГД. Середній вік пацієнтів становив 56 років. Артеріальний тиск у хворих із ХНН становив: систолічний – 170 мм рт. ст., діастолічний – 85 мм рт. ст. Групу порівняння склали 20 донорів (їх кров) середнім віком – 48 років.

Обстеження проводили на базі відділення хронічного гемодіалізу Львівської обласної клінічної лікарні. ЗНТ методом гемодіалізу здійснювали 3 рази на тиждень по 4 год з використанням синтетичних діалізаторів і бікарбонатного буфера. Кров для дослідження в кожного хворого забирали зі сформованого судинного доступу “A-V” фістули до та після ГД. Дослідження проведено з дотриманням біоетичних норм.

Для оцінки стану системи NO-синтаза/аргіназа визначали активність NO-синтази (ендотеліальної – eNOS та індукційної – iNOS) [7], вміст L-аргініну [1], нітрит-аніона [15] та актив-

ність аргінази [14]. Рівень процесів ліпопероксидації оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів [6], антиоксидантний захист – визначаючи активність супероксиддисмутази (СОД) [8]. Лізат лімфоцитів готували згідно з [11].

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням прикладної програми ANOVA “Statistica”. Статистично достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У лізаті лімфоцитів хворих із ХНН, порівняно з контрольною групою обстежених, було відзначено: зростання рівня активності iNOS у 15 разів ($p < 0,01$) та вмісту ТБК-активних продуктів на 23 % ($p < 0,05$); зниження рівня активності eNOS на 70 % ($p < 0,05$), СОД на 19 %, вмісту L-аргініну на 31 % ($p < 0,05$). Активність аргінази та вміст нітрит-аніона виражено не змінювалась (табл. 1, 2).

Після сеансу гемодіалізу в лізаті лімфоцитів, порівняно з показниками до ГД, різко знижувався рівень активності iNOS (у 14 разів) та eNOS (у 8 разів). Паралельно зменшувалась концентрація L-аргініну на 30 % ($p < 0,05$), нітрит-аніона на 15 % ($p < 0,05$), ТБК-активних продуктів на 22 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками до діалізу. Активність аргінази мала спрямованість до зростання.

Отже, проведення сеансу ЗНТ методом ГД у хворих із ХНН V ступеня спричиняло різке зниження активності iNOS та eNOS, зменшення вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну і нітрит-аніона в лізаті лімфоцитів.

Таблиця 1 – Вміст у лізаті лімфоцитів L-аргініну, нітрит-аніона та активність NO-синтази й аргінази у хворих із хронічною нирковою недостатністю до і після гемодіалізу

Група досліджених	L-аргінін, мкг/мл	Нітрит-аніон, мкмоль/л	iNOS, нмоль/хв·мл	eNOS, нмоль/хв·мл	Аргіназа, мкмоль/хв·мг
Контроль	35,5±3,8	19,8±1,6	0,06±0,02	0,81±0,17	0,22±0,05
Лімфоцити до ГД	24,6±3,2*	18,6±1,5	0,89±0,19**	0,24±0,08*	0,19±0,04
Лімфоцити після ГД	17,1±2,7#	15,9±1,1#	0,06±0,02##	0,03±0,01##	0,23±0,03

Примітки:

- * – достовірність змін відносно контрольних значень ($p < 0,05$).
- ** – достовірність змін відносно контрольних значень ($p < 0,01$).
- # – достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).
- ## – достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,01$).

Таблиця 2 – Концентрація у плазмі крові ТБК-активних продуктів та активність супероксиддисмутази у хворих із хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Група досліджених	ТБК-активні продукти, мкмоль/г·тк	СОД, мкмоль НСТ/ хв·мг білка
Контроль	26±2,2	24±1,6
Лімфоцити до ГД	31,9±3,2*	19,5±1,4*
Лімфоцити після ГД	24,8±3,3#	18,1±5

Примітки:

- * – достовірність змін відносно вихідних значень ($p < 0,05$).
- # – достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Прогресування розвитку ХНН супроводжується ендотеліальною дисфункцією та зростанням рівня нітратооксидативного стресу, що проявляється відповідними змінами вмісту ТБК-активних продуктів, нітратів, нітритів, асиметричного диметиларгініну, L-аргініну, активності ензимів антиоксидантного захисту як у плазмі крові, так і формених елементах крові, зокрема лімфоцитах.

У хворих із ХНН у термінальній стадії, які отримували сеанси ГД, відзначають зростання оксидативних процесів, про що свідчить підвищення вмісту ТБК-активних продуктів у плазмі крові [2, 4, 5, 19]. У наших дослідженнях показано збільшення ТБК-активних продуктів у лізаті лімфоцитів пацієнтів із ХНН V ступеня порівняно з показниками контрольної групи. Паралельно в лімфоцитах різко підвищувалась активність iNOS, знижувались активність eNOS та вміст L-аргініну. Отримані результати свідчать про активацію нітратооксидативного стресу в лімфоцитах крові, що буде викликати порушення їх функцій.

Після сеансу ГД у лізаті лімфоцитів відзначали зниження рівня активності iNOS та eNOS, зменшення вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну та нітрит-аніона порівняно з відповідними показниками до ГД.

Проведення сеансу ГД, при якому відбувається механічний контакт компонентів плазми крові та формених елементів з діалізною мембраною, викликає різносторонні ефекти – як зростання процесів пероксидного окиснення ліпідів [3], так і виведення продуктів їх метаболізму під час діалізу. Про те, наскільки вплив ГД змінює стан нітратооксидативних процесів у крові та формених елементах, свідчить зміна відповідних показників.

Після ГД у плазмі крові знижується вміст ТБК-активних продуктів, L-аргініну, нітрит-аніона, вітаміну С [4, 9, 18]. Подібні зміни вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну та нітрит-аніона спостерігають і в лізаті лімфоцитів.

Оцінюючи вплив ГД на стан системи NO-синтаза/аргіназа, слід зазначити, що до ГД у лізаті лімфоцитів були різко підвищена активність iNOS, зменшені рівень активності eNOS та вміст L-аргініну порівняно з контрольною групою. Після ГД відмічено різке зниження не тільки активності iNOS, але і рівня активності eNOS із паралельним зменшенням вмісту L-аргініну та нітрит-аніона. Активність аргінази мала тенденцію до зростання. Значне зниження рівня eNOS може викликати порушення у функціонуванні лімфоцитів після діалізу з подальшим погіршенням імунного захисту.

Таким чином, сеанс ГД у хворих із ХНН V ступеня спричиняє зниження рівня нітратооксидативного стресу в лімфоцитах, при цьому різко зменшувались активність як iNOS, так і eNOS та вміст L-аргініну.

ВИСНОВКИ. 1. У лізаті лімфоцитів хворих із ХНН V ступеня, які отримували ЗНТ методом ГД, відзначено зростання вмісту ТБК-активних продуктів, активності iNOS, зменшення активності eNOS та вмісту L-аргініну порівняно з контрольною групою.

2. Сеанс ГД у хворих із ХНН V ступеня спричинив різке зниження активності iNOS та eNOS, ТБК-активних продуктів, L-аргініну та нітрит-аніона, зростання активності аргінази в лізаті лімфоцитів.

3. Зниження активності eNOS та L-аргініну в лімфоцитах після ГД може викликати зменшення імунологічного захисту у хворих із ХНН та впливати на тривалість життя.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алейникова Т. Л. Руководство к практическим занятиям по биохимии / Т. Л. Алейникова, Г. В. Рубцова. – М. : Высшая школа, 1988. – 239 с.

2. Антиоксидантна система, церулоплазмин-трансферин та стан коморбідності у хворих на хронічну хворобу нирок, які лікуються гемодіалізом / Л. В. Король, Л. Я. Мигаль, І. О. Дудар [та ін.] // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2011. – 4. – С. 35–39.

3. Вплив сеансу гемодіалізу на структурно-функціональний стан ендотелію у хворих із термінальною нирковою недостатністю / А. І. Гоженко,

О. Б. Сусла, А. А. Клим, О. З. Яремчук // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2013. – 3. – С. 102–107.

4. Іваночко Р. Б. Зміни показників системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу / Р. Б. Іваночко, О. Я. Склярів // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2014. – № 1. – С. 66–71.

5. Прогресування хронічної хвороби нирок: стан оксидативного стресу на різних стадіях ХНН / І. О. Дудар, О. М. Лобода, Л. В. Король [та ін.] //

Укр. журнал нефрології та діалізу. – 2012. – **2**. – С. 18–24.

6. Сумбаев В. В. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс / В. В. Сумбаев, И. М. Ясинская // Совр. пробл. токсикологии. – 2000. – № 3. – С. 3–7.

7. Тимурбулатов М. А. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / М. А. Тимурбулатов, Е. И. Селезнев // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.

8. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Чевари, Т. Андял, Я. Штрэнгер // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9–13.

9. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease / C. Baylis // Amer. J. Physiol – Renal Physiol. – 2008. – **294**. – № F1–F9.

10. Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide / C. Bogdan // Methods Mol. Biol. – 2011. – **677**. – P. 375–393.

11. Boyum A. A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood / A. A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – **21**, suppl. 97. – P. 51–76.

12. Effect of a single hemodialysis session on endothelial dysfunction / P. R. Errakonda, P. Pamakrishna, A. R. Bitla [et al.] // J. Nephrol. – 2011. – **24**, № 1. – P. 83–90.

13. Effects of lipoprotein-associated phospholipase A2 on arginase/nitric oxide pathway in hemodialysis patients / A. K. Tektas, S. Uslu, A. U. Yalcin [et al.] // Ren. Fail. – 2012. – **34**, № 6. – P. 738–743.

14. Geyer J. W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabich // Anal. Biochem. – 1971. – **39**, № 2. – P. 412–417.

15. Green L. C. Analysis of nitrate, nitrite and (1515) nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. David // Anal. Biochem. – 1982. – **126**. – P. 131–138.

16. Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress / T. Weinstein, A. Chagnac, A. Korzets [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 2000. – **15**. – P. 883–887.

17. Hemodialysis-induced release of hemoglobin limits nitric oxide bioavailability and impairs vascular function / C. Meyer, C. Heiss, C. Drexhage [et al.] // J. Amer. Coll. Cardiol. – 2010. – **55**, № 5. – P. 454–459.

18. Hon W. M. Effect of hemodialysis on plasma nitric oxide levels / W. M. Hon, J. C. Lee, K. H. Lee // Artif. Organs. – 2000. – **24**, № 5. – P. 387–390.

19. Increased prevalence of oxidant stress, and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease / B. P. Oberg, E. McMenamin, F. L. Lucas [et al.] // Kidney Int. – 2004. – **65**. – P. 1009–1016.

20. Uremia, atherothrombosis and malnutrition: the role of L-arginine-nitric oxide pathway / T. M. Brunini, C. D. da Silva, M. A. Siqueira [et al.] // Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets. – 2006. – **6**, № 2. – P. 133–140.

21. Weinberg J. B. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review / J. B. Weinberg // Molecular Med. – 1998. – **4**. – P. 557–591.

Р. Б. Иваночко, А. Я. Скляр

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ NO-СИНТАЗА/АРГИНАЗА И ОКСИДАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ДО И ПОСЛЕ СЕАНСА ГЕМОДИАЛИЗА

Резюме

Изучено состояние системы NO-синтаза/аргиназа и оксидативных процессов в лимфоцитах крови больных с хронической почечной недостаточностью в условиях гемодиализа. Продемонстрировано рост нитрозооксидативного стресса в лимфоцитах по сравнению с контрольной группой. Гемодиализ спровоцировал резкое снижение активности iNOS, eNOS, содержания ТБК-активных продуктов, L-аргинина, нитрит-аниона в лизате лимфоцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: NO-синтаза, аргиназа, ТБК-активные продукты, нитрит-анион, L-аргинин, лимфоциты, хроническая почечная недостаточность.

STATUS OF NO-SYNTHASE/ARGINASE SYSTEM AND OXIDATIVE PROCESSES IN LYMPHOCYTES LYSATE IN BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC RENAL INSUFFICIENCY AFTER THE SESSION OF HEMODIALYSIS

Summary

The status of NO-synthase/arginase system and oxidative processes in lymphocytes lysate in blood of patients with chronic renal failure under conditions of hemodialysis was investigated. The increase of nitrosooxidative stress of lymphocytes compared with the control group was shown. Hemodialysis caused an acute decrease of iNOS, eNOS activity, TBA-active products content, L-arginine, nitrite-anion in lymphocytes lysate.

KEY-WORDS: NO-synthase, arginase, TBA-active products, nitrite-anion, L-arginine, lymphocytes, chronic renal insufficiency.

Отримано 10.04.14

Адреса для листування: О. Я. Склярів, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, e-mail: sklyarov@meduniv.lviv.ua.

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ПРЕГРАВІДАРНОЇ ПІДГОТОВКИ ЖІНОК З ПОРУШЕННЯМИ МЕНСТРУАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ НА ТЛІ ХРОНІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ

Проблема порушень менструальної функції (ПМФ) займає одне з чільних місць серед захворювань репродуктивної системи і продовжує бути актуальною, оскільки призводить не лише до втрати працездатності, але й до проблем у реалізації репродуктивної функції. Зростання супутньої патології, зокрема хронічних захворювань травної системи, з одного боку, посилює перебіг ПМФ, з іншого – обмежує можливість застосування лікарських засобів, які часто мають побічний негативний вплив на органи травної системи. Крім того, значний відсоток жінок із ПМФ планує реалізувати репродуктивну функцію. Науковці продовжують активний пошук методів адекватного лікування ПМФ та реабілітації цих захворювань. Комплексна терапія повинна включати засоби, які б мали добрий лікувальний ефект, не викликали вираженої побічної дії на організм та забезпечували стійку ремісію супутньої патології. Вивчено результати клінічних, ехографічних, біохімічних, імунологічних досліджень у жінок із ПМФ та хронічними захворюваннями травної системи. Обстежено 60 жінок із ПМФ, а саме олігоменореєю та дисменореєю, які страждають від хронічних захворювань травної системи. Розроблено методику комплексної прегравідарної терапії із застосуванням аргініну гідрохлориду, коензим-композитуму, ендометрину.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: олігоменорея, дисменорея, хронічні захворювання травної системи, імунний статус, прегравідарна підготовка.

ВСТУП. Проблема порушень менструальної функції (ПМФ) впродовж багатьох років займає одне з чільних місць серед гінекологічної патології, сягаючи, за даними багатьох авторів, 50–60 % [1, 4, 7]. Незважаючи на досягнення фармакології та значний арсенал лікарських засобів, не завжди вдається досягти достатньої ефективності лікування, особливо при супутній екстрагенітальній патології [2, 3, 5, 6, 8, 9]. Значна частота ПМФ, які призводять не лише до втрати працездатності, але й до непліддя, невиношування, плацентарної дисфункції, спонукає спеціалістів до пошуку нових методів лікування даного захворювання [1, 6, 9].

Метою даного дослідження було визначити стан імунної системи і його кореляцію з клінічними проявами та розробити метод ефективного прегравідарного лікування жінок із гіпоменструальним синдромом і хронічними захворюваннями травної системи (ХЗТС).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Було обстежено 60 жінок із ПМФ та ХЗТС, яких поділили на дві групи. До 1-ї групи ввійшли 30 жінок, які отри-

© Л. Є. Лимар, 2014.

мували традиційну терапію, до 2-ї – 30 жінок, яким проводили лікування за запропонованою схемою. Контрольну групу склали 30 соматично здорових жінок.

Традиційну терапію супутньої патології проводили ситуативно, симптоматичними засобами лише при наявності клінічних проявів захворювання в поєднанні з противірусними засобами [2, 3, 5, 6, 8]. Запропонована нами терапія включала аргініну гідрохлорид, який чинить антигіпоксичну, мембраностабілізуювальну, цитопротекторну, антиоксидантну, антирадикальну, дезінтоксикаційну дії, відіграє певну роль у підтриманні гормонального балансу в організмі, має гепатопротекторну дію, позитивно впливає на процеси енергозабезпечення в гепатоцитах (по 100 мл внутрішньовенно краплинно щодня протягом 10 днів), антигомотоксичний засіб коензим-композитум по 2,2 мл внутрішньом'язово двічі на тиждень, 10 ін'єкцій на курс та ендометрит по 1 таблетці інтравагінально двічі на день з 11 по 25 день менструального циклу впродовж 3–6 менструальних циклів. Усім пацієнткам виконували клінічне обстеження, УЗД геніталій, органів

черевної порожнини, загальноприйняте лабораторне обстеження: клінічне дослідження крові, сечі, визначення глюкози, білірубину, холестерину, білка, трансаміназ у крові. Імунологічні дослідження проводили шляхом визначення загальної популяції Т-лімфоцитів, субпопуляції Т-хелперів (Тх), Т-супресорів (Тс), В-лімфоцитів. Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень університету в програмному пакеті Statsoft STATISTIKA.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Середній вік обстежуваних жінок склав у досліджуваних групах (23,6±2,5) і (23,7±2,3) року, в контрольній – (23,5±2,3) року. В 45 (76,3 %) пацієнток діагностовано дискінезію жовчних шляхів, у 35 (59,3 %) пацієнток досліджуваних груп спостерігали хронічний холецистохолангіт, у 26 (44,1 %) – хронічний гепатохолецистит, у 14 (23,7 %) – хронічний панкреатит, у 21 (35,6 %) – хронічний невірусний гепатит. ХЗТС відзначали від 4,0 до 12,0 років. В обох групах вказані захворювання були пропорційними. ПМФ у жінок 1-ї групи відмічали від 3,0 до 5,0 років, у жінок 2-ї групи – від 2,5 до 6,0 років. Пацієнтки перебували під спостереженням протягом 1 року. Обстеження проводили до лікування, після лікування та через 1 рік після лікування. У 1-й групі первинне непліддя спостерігали в 7 пацієнток, 1 викидень в анамнезі – у 5, звичне невиношування – в 4. У 2-й групі непліддя відзначали в 9 пацієнток, 1 викидень – у 7, звичне невиношування – в 4. Тривалість менструального циклу в 1-й групі склала 39,3 дня, в 2-й групі – 41,3 дня. Вказані показники підтверджують літературні дані [1, 4]. Ехографічне обстеження жінок виявило монофазний менструальний цикл у 18 (60,0 %) пацієнток 1-ї групи та 20 (66,7 %) жінок 2-ї групи. Після лікування через 3 місяці у 21 (70,0 %) пацієнтки

1-ї групи відновився двофазний менструальний цикл, у пацієнток 2-ї групи цей показник склав 27 (90,0 %).

Біохімічні дослідження в жінок 1-ї групи до лікування виявили таке: загальний білірубін – (21,33±0,63) мкмоль/л; загальний білок – (45,70±0,87) г/л, причому альбуміново-глобуліновий коефіцієнт склав 1,5:1; рівень глюкози – (5,88±0,14) ммоль/л; рівень холестерину – (7,93±0,17) ммоль/л; (АлАТ) (104,40±2,43) Од/л; АсАТ – (83,83±1,82) Од/л; ГГТ – (138,40±4,73) Од/л. У пацієнток 2-ї групи отримано такі результати: білірубін – (21,71±0,57) мкмоль/л; загальний білок – (45,67±0,80) г/л, причому альбуміново-глобуліновий коефіцієнт склав 1:1,7; глюкоза – (5,89±0,20) ммоль/л; холестерин – (7,64±0,13) ммоль/л; АлАТ – (98,20±2,46) Од/л; АсАТ – (82,80±1,84) Од/л; ГГТ – (142,53±3,96) Од/л. Після лікування показники білка підвищились до (59,33±0,88) г/л ($p<0,05$) та альбуміново-глобуліновий коефіцієнт становив 1,5:1. Нормалізувались показники АлАТ: в 1-й групі – до (20,87±1,38) Од/л ($p<0,05$); в 2-й групі – до (22,00±1,09) Од/л ($p<0,05$). Показники АсАТ після лікування також достовірно знизились і досягли (30,03±2,32) Од/л ($p<0,05$) в 1-й групі й (24,53±0,79) Од/л ($p<0,05$) в 2-й групі. Рівень ГГТ у 1-й групі зменшився до (50,53±1,57) Од/л ($p<0,05$). У 2-й групі після лікування нормалізувались показники білка і становили (70,40±0,80) г/л, знизився рівень загального білірубину до (12,63±0,41) мкмоль/л ($p<0,05$), альбуміново-глобуліновий коефіцієнт склав 2:1. Показник холестерину після лікування в 1-й групі становив (5,25±0,14) ммоль/л ($p<0,05$), у 2-й групі знизився до (3,96±0,11) ммоль/л ($p<0,05$), що дорівнювало показнику контрольної групи. Рівень ГГТ зменшився до (36,70±1,60) Од/л ($p<0,05$) (табл.). Результати наших досліджень відповідають літературним даним [2, 5–7].

Таблиця – Біохімічні показники крові жінок із ПМФ

Показник	1-ша група (n=30)		2-га група (n=30)		Контроль (n=30)
	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування	
Загальний білок, г/л	45,70±0,87	59,33±0,88*	45,67±0,80	70,40±0,80*	73,37±0,85
Загальний білірубін, мкмоль/л	21,33±0,63	20,68±0,66	21,71±0,57	12,63±0,41*	11,82±0,63
Холестерин, ммоль/л	7,93±0,17	5,25±0,14*	7,64±0,13	3,96±0,11*	3,90±0,10
Глюкоза, ммоль/л	5,88±0,14	4,88±0,17	5,89±0,20	5,13±0,17*	3,67±0,19
Аланінамінотрансфераза (АлАТ), Од/л	104,40±2,43	20,87±1,38*	98,20±2,46	22,00±1,09*	13,00±0,62
Аспартатамінотрансфераза (АсАТ), Од/л	83,83±1,82	30,03±2,32*	82,80±1,84	24,53±0,79*	17,00±0,62
Гамма-глутаматтрансфераза (ГГТ), Од/л	138,40±4,73	50,53±1,57*	142,53±3,96	36,70±1,60*	31,00±1,02

Примітка. * – достовірність порівняння з показниками до лікування ($p<0,05$).

Отримані результати імунологічних досліджень до лікування свідчили про достовірне зниження загальної популяції Т-лімфоцитів в 1-й та 2-й дослідних групах, також знизилась кількість Тх та підвищилась кількість Тс, зменшилась кількість В-лімфоцитів, що підтверджує дані літератури [1, 3, 4, 5, 7–9]. Після традиційної терапії відмічено зростання рівня загальної популяції Т-лімфоцитів та Тх, що співзвучно літературним даним [3, 5, 8, 9]. У пацієток 2-ї групи після лікування відзначено підвищення рівня загальної популяції Т-лімфоцитів, яка достовірно не відрізнялася від контролю. Через 1 рік після застосування традиційної терапії в 15 (50,00 %) пацієток 1-ї групи діагностовано ознаки олігоменореї, крім того, у 12 (40,00 %) з них ці клінічні прояви спостерігали на фоні загострення ХЗТС. Через 1 рік після лікування в пацієток 1-ї групи знизилися всі показники клітинного імунітету. В пацієток 2-ї групи через 1 рік після лікування досліджувані показники імунного статусу достовірно не відрізнялись від контролю. Отримані результати свідчать про стійку нормалізацію досліджуваних показників клітинного імунітету при застосуванні запропо-

нованого лікування. Важливо відзначити, що у 18 (60,0 %) пацієток 1-ї групи протягом року спостереження мали місце рецидиви ХЗТС. У 2-й дослідній групі загострення ХЗТС відмічено у 6 (20,0 %) пацієток, у них на фоні загострення спостерігали прояви дисменореї.

ВИСНОВКИ. 1. У жінок із ХЗТС спостерігають порушення менструальної функції у вигляді олігоменореї та дисменореї.

2. При спробі реалізувати репродуктивну функцію відзначають непліддя, невиношування до 70 %.

3. Запропонована терапія з використанням агрініну гідрохлориду, коензим-комполімеру та ендометрину в жінок із ХЗТС дає змогу забезпечити стійку ремісію екстрагенітальної патології, стабілізувати стан імунної системи, відновити нормальний менструальний цикл, що сприятиме реалізації репродуктивної функції.

Перспективи подальших досліджень. Планується продовження досліджень проблем реалізації репродуктивної функції, перебігу вагітності та стану плода при ХЗТС.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дубоссарская З. М. Теория и практика гинекологической эндокринологии / З. М. Дубоссарская. – Днепропетровск, 2005. – 409 с.
2. Ильченко Л. Ю. Хронические вирусные гепатиты: перспективы и достижения / Л. Ю. Ильченко, Г. Н. Якимчук // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. – 2007. – № 2. – С. 34–38.
3. Про організацію надання акушерсько-гінекологічної та неонатологічної допомоги в Україні : наказ № 620. – К., 2003.
4. Татарчук Т. Ф. Эндокринная гинекология / Т. Ф. Татарчук, Я. П. Сольский. – К., 2003. – 304 с.
5. Ткач С. М. Применение антигемотоксических препаратов в гастроэнтерологии / С. М. Ткач, Б. М. Марусанич // Метод. рекомендации МОЗ Украины. – 2006.

6. Філіппов Ю. О. Епідеміологічні особливості хвороб органів травлення та гастроентерологічна служба в Україні: здобутки, проблеми та шляхи їх вирішення / Ю. О. Філіппов, І. О. Скирта // Гастроентерология. – 2005. – № 36. – С. 9–17.
7. Царегородцева Т. М. Диагностическое и прогностическое значение показателей гуморального иммунного статуса при заболеваниях органов пищеварения / Т. М. Царегородцева, Т. И. Серова // Гастроэнтерология. – 2007. – № 2. – С. 93–99.
8. Immunopathogenesis of hepatitis infection / A. G. Freeman, G. Marinos, G. Fren, A. R. Lloyd // Immunol. Cell Biol. – 2001. – 2. – P. 515–536.
9. Neoptolemos J. P. Fast fact: Diseases of the pancreas and biliary tract / J. P. Neoptolemos, M. S. Bhutani // Oxford: Health Press. – 2006. – P. 112–117.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРЕГРАВИДАРНОЙ ПОДГОТОВКЕ ЖЕНЩИН С НАРУШЕНИЯМИ МЕНСТРУАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

Проблема нарушений менструальной функции (НМФ) занимает одно из ведущих мест среди заболеваний репродуктивной системы и продолжает быть актуальной, поскольку приводит не только к потере трудоспособности, но и к проблемам в реализации репродуктивной функции. Рост сопутствующей патологии, в частности хронических заболеваний пищеварительной системы, с одной стороны, усугубляет течение НМФ, с другой – ограничивает возможность применения лекарственных средств, которые часто имеют побочное негативное влияние на органы пищеварительной системы. Кроме этого, значительный процент женщин с НМФ планирует реализовать репродуктивную функцию. Ученые продолжают активный поиск методов адекватного лечения НМФ и реабилитации этих заболеваний. Комплексная терапия должна включать средства, которые имели бы хороший лечебный эффект, не вызывали выраженного побочного действия на организм и обеспечивали устойчивую ремиссию сопутствующей патологии. Изучены результаты клинических, эхографических, биохимических, иммунологических исследований у женщин с НМФ и хроническими заболеваниями пищеварительной системы. Обследовано 60 женщин с НМФ, а именно олигоменореей и дисменореей, страдающих хроническими заболеваниями пищеварительной системы. Разработана методика комплексной прегравидарной терапии с применением аргинина гидрохлорида, коэнзим-композиума, эндометрина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: олигоменорея, дисменорея, хронические заболевания пищеварительной системы, иммунный статус, прегравидарная подготовка.

L. Ye. Lymar

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

NEW APPROACHES OF PREGRAVIDAR TRAINING OF WOMEN WITH MENSTRUAL DYSFUNCTION AND CHRONIC DISEASES OF DIGESTIVE SYSTEM

Summary

The problem of menstrual dysfunction is one of the leading places among the diseases of the reproductive system, and continues to be relevant, since it leads not only to a loss of efficiency, but also to problems in the implementation of reproductive function. Growth of comorbidity, including CDDS on the one hand, PMF increase course, on the other – limits the applicability of medications that often have side negative effect on the organs of the digestive system. In addition, a significant percentage of women with MO plans to implement reproductive function. Scientists continue to actively seek adequate treatment and rehabilitation MO these diseases. Combined therapy should include agents that would have a good therapeutic effect, not cause severe side effects on the body and provide stable remission comorbidity. Results of the clinical, ultrasound, biochemical, immunological studies in women with MO and CDDS. The study involved 60 women with MO, ie, oligomenorrhoea and dysmenorrhoea, chronic diseases of the digestive system. The technique of complex pregravidarum therapy with arginin hydrochlorid, coenzyme-kompozytumu, endometryn.

KEY WORDS: oligomenorrhoea, dysmenorrhoea, chronic diseases of the digestive system, immune status, pregravidar training.

Отримано 07.05.14

Адреса для листування: Л. Є. Лимарь, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

**БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ В СПОЛУЧНІЙ ТКАНИНІ ЛЕГЕНЬ ЗА УМОВ
ОПІКОВОЇ ХВОРОБИ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ПРЕПАРАТОМ “ЛІПІН”**

У статті наведено результати вивчення впливу препарату “Ліпін” на зміни в сполучній тканині легень щурів на моделі експериментальної опікової хвороби. За умов опікової хвороби спостерігають збільшення вмісту вільного оксипроліну внаслідок активації катаболізму колагенових білків. Показано здатність ліпіну нормалізувати стан протеолітичної активності в легенях щурів при опіковій хворобі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: опікова хвороба, легені, протеоліз, оксипролін, ліпін.

ВСТУП. Термічні опіки, за даними ВООЗ, посідають третє місце у структурі смертності внаслідок отриманих травм [2, 3]. Це пов'язано з тим, що в тяжкообпечених хворих усе частіше розвивається опікова хвороба, яка призводить до синдрому поліорганної недостатності. Ушкодження легень виникає не тільки внаслідок прямого ураження дихальних шляхів, але і через розвиток шоківих змін, дію ендогенних токсинів [4, 8]. Ураження дихальних шляхів значно погіршує прогноз при опіковій хворобі, що робить питання профілактики ушкоджень легень важливою проблемою сучасної медицини.

Відомо, що при опіковій хворобі порушується стан сполучної тканини [9]. Фібрилярні компоненти сполучної тканини, зокрема колагенові волокна, мають високу чутливість до впливу патогенних чинників. Оксипролін – це маркерна амінокислота для колагену, яка відображає його катаболізм. Тільки 1 % оксипроліну перебуває у вільному вигляді в організмі, тому збільшення його вмісту в тканинах чи рідинах організму свідчить про посилення розпаду колагену [5]. Головним ферментом деструкції колагенових білків є ММП-1 (металоматрична протеїназа-1, істинна колагеназа). За рахунок зростання колагенолітичної активності відбувається деструкція волокнистих структур сполучної тканини, що призводить до порушення функціонування респіраторної системи.

Метою дослідження було вивчити вплив препарату “Ліпін” на стан сполучної системи в легенях щурів за умов експериментальної опікової хвороби (ЕОХ) в докладній динаміці.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти виконано на 112 білих щурах-самцях ма-
© Т. А. Сухомлин, Л. Г. Нетюхайло, 2014.

сою 180–250 г з дотриманням рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Тварин утримували на звичайному раціоні в стандартних умовах віварію. Опікову хворобу моделювали за методом А. П. Довганського [1] шляхом занурення епільованої задньої кінцівки в гарячу воду ($t +70-75\text{ }^{\circ}\text{C}$) під ефірним наркозом протягом 7 с. За цих умов утворювався опік IIIA-B ступеня, площа якого становила 12–15 % поверхні тіла тварини, що є стандартною моделлю розвитку експериментальної опікової хвороби. Евтаназію проводили на 1-шу, 7-му, 14-ту, 21-шу, 28-му доби під ефірним наркозом, що відповідало стадіям опікового шоку, ранньої та пізньої токсемії, септикотоксемії. Препарат “Ліпін”, що є природним фосфатидилхоліном, вводили внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг відразу після моделювання ЕОХ. Для оцінки стану сполучної тканини визначали вміст вільного оксипроліну [6]. Отримані результати обробляли статистично з використанням U-критерію Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Вивчаючи вміст вільного оксипроліну в легенях за умов опікової хвороби, одержали такі результати: максимально він збільшувався на 1-шу добу – в 1,69 раза ($p < 0,05$), що відповідало стадії опікового шоку; в подальшому, в період токсемії та септикотоксемії, рівень оксипроліну знижувався, на 7-му добу він перевищував вихідні показники в 1,54 раза ($p < 0,05$), на 14-ту – в 1,38 раза ($p < 0,05$), на 21-шу – був у 1,25 раза вищим за контроль ($p < 0,05$), а на 28-му – в 1,17 раза ($p < 0,05$).

Отримані результати свідчать про те, що опікова хвороба супроводжується вираженою інтенсифікацією деструкції колагенових білків сполучної тканини легень.

При застосуванні препарату "Ліпін" відзначали достовірне зниження вмісту вільного оксипроліну в легеневій тканині порівняно з контролем. Ліпін належить до метаболіто-тропних препаратів і є ліпосомальною формою природного ліофілізованого яєчного фосфатидилхоліну [7]. У воді та кристалоїдних розчинах переходить у суспензію з утворенням ліпосом. Ліпосоми як наночастинки можуть відігравати роль переносників лікарських засобів, а також

мають власні ефекти, впливаючи на протеолітичні процеси [5]. Препарат "Ліпін" має антиоксидантну, антигіпоксичну та мембранопротекторну дію. Крім того, він нормалізує вміст сурфактанта і покращує мікроциркуляцію. На 1-шу добу рівень оксипроліну підвищувався в 1,53 раза ($p < 0,05$), на 7-му – в 1,44 раза ($p < 0,05$), на 14-ту – в 1,29 раза ($p < 0,05$), на 21-шу – в 1,15 раза ($p < 0,05$) відповідно. На 28-му добу він повернувся до нормальних показників (табл.). Отже, препарат "Ліпін" здатний стабілізувати стан сполучної тканини легень за умов опікової хвороби.

Таблиця – Вміст оксипроліну в тканинах легень щурів при ЕОХ за умов корекції препаратом "Ліпін" ($M \pm m$)

Група тварин	Вміст оксипроліну, мкмоль/г	Вміст оксипроліну за умов корекції, мкмоль/г
1. Контроль (n=7)	3,64±0,089	3,49±0,075
2. Опікова хвороба, 1-ша доба (n=7)	6,17±0,145	5,61±0,082
3. Опікова хвороба, 7-ма доба (n=7)	5,63±0,089	5,26±0,084
4. Опікова хвороба, 14-та доба (n=7)	5,04±0,145	4,7±0,083
5. Опікова хвороба, 21-ша доба (n=7)	4,55±0,126	4,22±0,066
6. Опікова хвороба, 28-ма доба (n=7)	4,26±0,107	3,85±0,09
Статистичний показник	$p_{1-2} < 0,05$, $p_{1-3} < 0,05$, $p_{1-4} < 0,05$, $p_{1-5} < 0,05$, $p_{1-6} < 0,05$	

ВИСНОВКИ. Аналіз результатів дослідження засвідчив, що за умов опікової хвороби в легеневій тканині зростає вміст вільного оксипроліну, що вказує на підвищення колагено-

літичної активності. Застосування препарату "Ліпін" нормалізує метаболізм сполучної тканини, запобігаючи активації катаболізму колагенових білків.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Довганский А. П. Материалы к патогенезу ожоговой болезни : автореф. дисс. на соискание учен. степени доктора мед. наук / А. П. Довганский. – Кишинев, 1971. – 32 с.
2. Клименко М. О. Опікова хвороба (патогенез і лікування) / М. О. Клименко, Л. Г. Нетюхайло. – Полтава, 2009. – 118 с.
3. Нетюхайло Л. Г. Механізми опікової хвороби та обґрунтування застосування препарату "Кріохор" для її лікування : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук / Л. Г. Нетюхайло. – Харків, 2007. – 34 с.
4. Нетюхайло Л. Г. Стан вільнорадикальних процесів, системи антиоксидантного захисту та протеолізу в легенях щурів при експериментальній опіковій хворобі / Л. Г. Нетюхайло, Т. А. Сухомлин // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – 7, № 1. – С. 80–83.
5. Сухомлин Т. А. Експериментальна корекція препаратом "Ліпін" протеолітичної активності в

легеневій тканині щурів в умовах опікової хвороби / Т. А. Сухомлин // Актуальні проблеми сучасної медицини : Вісник УМСА. – 2012. – 12, вип. 4 (40). – С. 181–183.

6. Тетянець С. С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови // Лаб. дело. – 1985. – № 1. – С. 61–62.

7. Хромов О. С. Експериментальне обґрунтування застосування фосфатидилхолінових ліпосом як нового гіпотензивного засобу / О. С. Хромов, Н. В. Добреля // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2008. – 1, вип. 16. – С. 197–203.

8. Chai J. The relationship between skeletal muscle proteolysis and ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in burned rats / J. Chai, Y. Wu, Z. Sheng // Burns. – 2002. – 28, № 6. – P. 527–533.

9. Jeschke M. G. Pathophysiologic response to severe burn injury / M. G. Jeschke., D. L. Chinkes, C. C. Finnerty // Ann. Surg. – 2008. – 248, № 3. – P. 387–399.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ЛЕГКИХ В УСЛОВИЯХ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПРЕПАРАТОМ “ЛИПИН”

Резюме

В статье представлены результаты изучения влияния препарата “Липин” на изменения в соединительной ткани легких крыс на модели экспериментальной ожоговой болезни. В условиях ожоговой болезни наблюдают увеличение содержания свободного оксипролина вследствие активации катаболизма коллагеновых белков. Показана способность липина нормализовать состояние протеолитической активности в легких крыс при ожоговой болезни.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ожоговая болезнь, легкие, протеолиз, оксипролин, липин.

T. A. Sukhomlyn, L. H. Netyukhaylo
UKRAINIAN MEDICAL STOMATOLOGICAL ACADEMY, POLTAVA

BIOCHEMICAL CHANGES IN THE CONNECTIVE TISSUE OF LUNGS AT BURN DISEASE AND CORRECTION BY “LIPIN”

Summary

In the article the results of study of influence of “Lipin” on changes of connective tissue in rats lungs on model experimental burn disease. Under conditions of burn disease is observed the the increase of a level free oxyproline because of activation of collagen proteins catabolism. Experimental correction by “Lipin” leads normalization of proteolysis in rats lungs at burn disease.

KEY WORDS: burn disease, lungs, proteolysis, oxyproline, lipin.

Отримано 28.04.14

Адреса для листування: Т. А. Сухомлин, Українська медична стоматологічна академія, вул. Шевченка, 23, Полтава, 36011, Україна, e-mail: sukhomlynta@mail.ru.

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ АНТИГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
КРІОКСЕНОДЕРМИ**

Проведено експериментальне вивчення антигенних властивостей кріоксендерми за допомогою люмінесцентної мікроскопії. Встановлено, що досліджувана субстанція чинить виражений альтеративний вплив на ізольовані лейкоцити донора. Результати дослідження дозволяють припустити, що механізм позитивного впливу пероральної толеративної терапії кріоксендермою базується на феномені тригерної активації цитопатичних реакцій імунних клітин, можливо, лімфоцитів і лейкоцитів, у криптах кишечника.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кріоксендерма, лейкоцити, люмінесцентна мікроскопія, антигенні властивості.

ВСТУП. На сьогодні є достатньо підстав стверджувати, що впровадження в медичну практику сучасних способів корекції імунної резистентності організму на принципово нових методичних засадах пероральної толеративної терапії (oral tolerance therapy) з використанням органопрепаратів на основі структурних білків тваринного походження є перспективним напрямком патогенетичної терапії при імунозалежній патології [1, 5–7, 9].

Разом із тим, беручи до уваги загальний висновок про імунотропний характер дії перорально введених в організм чинників біоорганічної природи, наприклад внаслідок їх імуномодельюючого впливу, залишається в цілому нез'ясованим механізм розвитку вказаного ефекту. Вимагає подальшого вивчення питання, чи встановлені при вказаному прийомі ефекти і феномени імунотолерантності [1, 8, 9] є результатом імунного стимулу клітин імунної системи, чи вони формуються внаслідок ентеральної гіпосенсибілізації імунокомпетентних клітин, зокрема лімфоцитів, які зазвичай виконують функцію пристінкового травлення. Відповідь на поставлене питання має принципове значення, оскільки може стати визначальною щодо напрямку формування лікувальної технології на основі принципу толеративної терапії та розвитку відповідного фармацевтичного забезпечення.

© Ю. С. П'ятницький, О. М. Олещук, Ю. І. Бондаренко, 2014.

Виходячи з розуміння того, що важливим чинником лікувальної ефективності кріоксендерми є її антигенні властивості, які забезпечують здатність її білкових макромолекул вступати в реакції взаємодії із сенсибілізованими імунними клітинами (макрофагами, нейтрофільними лейкоцитами, лімфоцитами), реакції, що на рівні тканин, органів і цілісного організму реалізуються процесами гіпосенсибілізації, вочевидь, вимагають дослідження цього аспекту властивостей подрібненої ксеноскіри. Це тим більш доцільно, що саме контрольовані реакції антиген-антитіло, як відомо, є патогенетичним обґрунтуванням позитивного впливу та феномена толеративної терапії [1, 4]. Принципово важливою парадигмою при цьому слід вважати те, що реакція взаємодії кріоксендерми як параспецифічного антигену (АГ) з ізольованими лейкоцитами на предметному склі достатньо коректно та ілюстративно відображає фундаментальні фізичні, фізико-хімічні й біофізичні процеси, на дослідження яких, власне, й спрямовано дану роботу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для проведення досліджень використовували кріоксендерму (подрібнений субстрат кріоліофілізованої шкіри свині), виготовлену за захищеною патентом технологією [2].

Взаємодію мікрочастинок кріоксендерми з ізольованими лейкоцитами досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопа

ЛЮМАМ 8-3М за методикою, наведеною в захищеному нами патенті “Спосіб моделювання реакції лейкоцитів на хімічний подразник” [3]. Проводили реакцію гетероімунного лейкоцитолізу, відтворену на предметному склі в рідкому середовищі при інкубації водного екстракту АГ із кріоксенодерми. Для цього впродовж 30 хв 20 мг подрібненого субстрату інкубували в 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду в мікропробірці при 37 °С, після чого на предметному склі змішували 20 мкл нативної крові донора – здорової дорослої людини з аналогічним об’ємом розчину АГ кріоксенодерми, інкубат витримували при кімнатній температурі ще 30 хв, потім змішували з 20 мкл розчину флуорохрому АО в розведенні 1:5000. Далі мікропрепарат накривали скельцем і спостерігали в полі зору люмінесцентного мікроскопа у відбитому світлі.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Взаємодію мікрочастинок кріоксенодерми з ізольованими

лейкоцитами досліджували в полі зору люмінесцентного мікроскопа (рис. 1, 2). Особливістю методики цього фрагмента досліджень є те, що взаємодію інгредієнтів імуногематологічної реакції здійснювали на предметному склі у збідненому на воду середовищі. За цих умов більш рельєфно проявлялися фізичні сили взаємодії між інгредієнтами, зокрема індуковані дією електричних зарядів мікрочастинок шкіри та ізольованих клітин. Так, на рисунках 1 та 2 відображено реакцію хемотаксису лейкоцитів, яка супроводжується формуванням на поверхні скла своєрідних флуоресцентних слідів, індукованих дією на клітини відомих фізичних, перш за все, сил електромагнітної взаємодії. Власне, за останніми залишається пріоритет, оскільки клітини форсують шлях до АГ навіть за умови втрати своєї цілісності: виявлені флуоресцентні траси (траєкторії) у вигляді ДНК-тяжів – тому доказ.

Наведена на рисунку 2 завершальна фаза взаємодії інгредієнтів реакції (шкірного АГ із

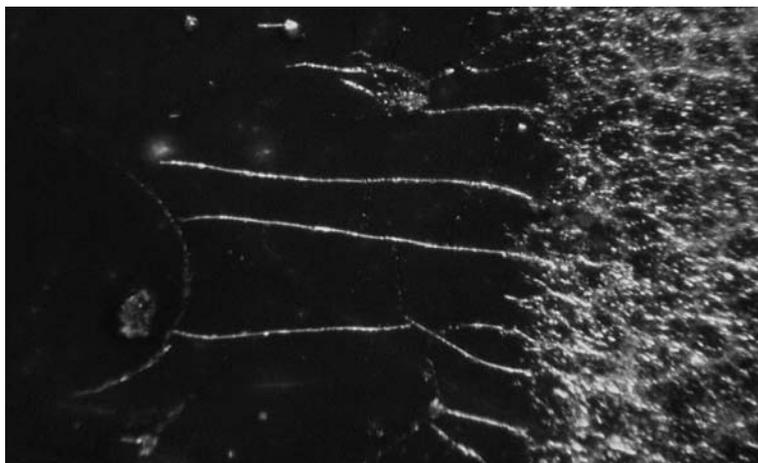


Рис. 1. Фаза міграції ізольованих лейкоцитів до шкірного АГ у вигляді мікрочастинок субстрату кріоксенодерми як прояв реакції імунного хемотаксису. ЛЮМАМ 8-3М: об. х8; ок. х7.

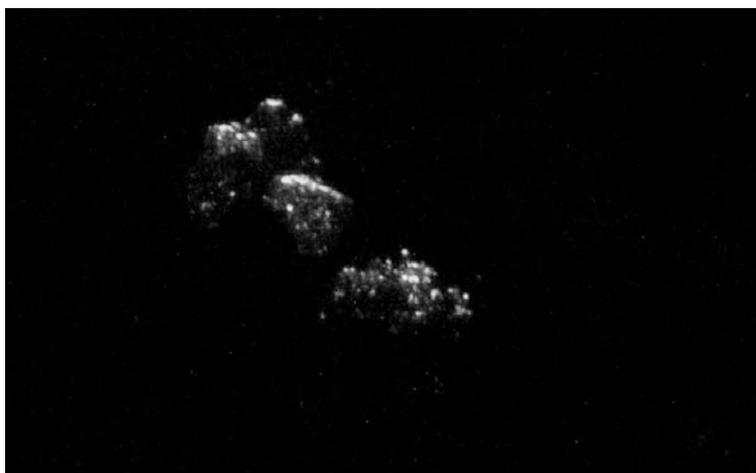


Рис. 2. Завершення реакції хемотаксису: кон’юговані на мікрочастинках кріоксенодерми лейкоцити. ЛЮМАМ 8-3М: об. х8; ок. х7.

кріоксендерми – з одного боку і лейкоцитів – з іншого) не тільки відображає результат реакції взаємодії між АГ ксеноскіри і лейкоцитами у вигляді кон'югацій клітин довкола частинок ліофілізату ксендерми, але й достатньо ілюстративно окреслює імовірну картину взаємодії вказаних інгредієнтів за умов пристінково-мембранного травлення, в тому числі у форматі технології пероральної толеративної терапії.

Про виражені антигенні властивості кріоксендерми свідчать також результати дослідження реакції гетероімунного лейкоцитолізу, відтвореної на предметному склі в рідкому середовищі при інкубації водного екстракту АГ із кріоксендерми.

У результаті дослідження встановлено виражений альтеративний вплив на ізольовані лейкоцити донора з боку АГ субстанцій кріоксендерми: клітини інтенсивно набрякають, руйнуються за відомим механізмом імунного цитолізу. Зміни спектрального складу вторинної люмінесценції ядрових нуклеїнових кислот у вигляді зниження інтенсивності світіння клітинних структур, тих же ядрових РНК і ДНК, достатньо ілюстративно відображають порушення біоенергетичного гомеостазу клітин. Попри, власне, важливе значення наведеної особливості антигенного стимулу з боку кріоксендерми на клітини імунної системи,

зокрема лейкоцити периферійної крові донорів, що відображає цілу низку притаманних кріоксендермі й клітинам імунної системи поверхневих явищ, головним результатом наведеного фрагмента дослідження є виражена лейкоцитотропність кріоксендерми. При екстраполяції вказаного ефекту на процеси взаємодії зосереджених у криптах кишечника імунних клітин, зокрема лімфоцитів і лейкоцитів, з антигенними компонентами кріоксендерми є достатньо підстав розглядати вказаний феномен як тригерний механізм цитопатичних реакцій у системі реалізації саногенетичних механізмів пероральної толеративної терапії.

ВИСНОВКИ. 1. Експериментальне вивчення антигенних властивостей кріоксендерми з використанням люмінесцентної мікроскопії свідчить про те, що досліджувана субстанція кріоліофілізованої шкіри свині чинить виражений альтеративний вплив на ізольовані лейкоцити донора.

2. Отримані результати можуть слугувати підґрунтям для пояснення механізму позитивного впливу пероральної толеративної терапії кріоксендермою з огляду на те, що остання може бути тригером активації цитопатичних реакцій імунних клітин, зокрема лімфоцитів і лейкоцитів, у криптах кишечника.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пат. 27174 У, Україна. Спосіб експериментальної терапії виразки шлунка / Гоцинський В. Б., Бойко Т. Я. – № у 200704657 ; заявл. 26.04.07, Бюл. № 17.

2. Пат. 36019 У, Україна. Спосіб виготовлення субстрату тканинного антигену / Дем'яненко В. В., П'ятницький Ю. С., Гуда Н. В., Лучанко П. І., Лоза Л. С. – № 2008 06245 від 12.05.2008 р.

3. Пат. 36339 У, Україна. Спосіб моделювання реакції лейкоцитів на хімічний подразник / Дем'яненко В. В., П'ятницький Ю. С., Бігуняк Т. В., Лоза Л. С., Саушев А. С. – № у 2008 05507 від 29.04.2008 р.

4. Пат. 79561 У, Україна. Спосіб оцінки біотропних властивостей пружного полімерного матеріалу / Дем'яненко В. В., Бігуняк В. В., Волков К. С. – № а 2005 11274 ; заявл. 28.11.05 ; опубл. 25.06.07, Бюл. № 9.

5. Anti-CD4 Monoclonal Antibody-Induced Tolerance to MHC-Incompatible Cardiac Allografts Main-

tained by CD4+ Suppressor T Cells That Are Not Dependent upon IL-4 / B. M. Hall, L. Fava, J. Chen [et al.] // J. Immunol. – 1998. – **161**. – P. 5147–5156.

6. EAE Tolerance Induction with Hsp70-Peptide Complexes Depends on H60 and NKG2D Activity / G. Galazka, A. Jurewicz, W. Orłowski [et al.] // J. Immunol. – 2007. – **179**. – P. 4503–4512.

7. Involvement of TNF-Like Weak Inducer of Apoptosis in the Pathogenesis of Collagen-Induced Arthritis / K. Kamata, S. Kamijo, A. Nakajima [et al.] // J. Immunol. – 2006. – **177**. – P. 6433–6439.

8. P-Selectin Can Support Both Th1 and Th2 Lymphocyte Rolling in the Intestinal Microvasculature / C. S. Bonder, M. U. Norman, T. MacRae [et al.] // Am. J. Pathol. – 2005. – **167**. – P. 1647–1660.

9. The use of rituximab as an adjuvant for immune tolerance therapy in a hemophilia B boy with inhibitor and anaphylaxis to factor IX concentrate / Ch. Ampaiwan, M. Yingwan, S. Nongnuch [et al.] // Blood coagulation & fibrinolysis. – 2008. – **19**, № 3. – P. 208–211.

Ю. С. Пятницкий, А. М. Олещук, Ю. И. Бондаренко
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ КРИОКСЕНОДЕРМЫ

Резюме

Проведено экспериментальное изучение антигенных свойств криоксенодермы с помощью люминесцентной микроскопии. Установлено, что исследуемая субстанция оказывает выраженное альтеративное влияние на изолированные лейкоциты донора. Результаты исследования позволяют предположить, что механизм положительного влияния пероральной толеративной терапии криоксенодермой базируется на феномене триггерной активации цитопатических реакций иммунных клеток, вероятно, лимфоцитов и лейкоцитов, в криптах кишечника.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: криоксенодерма, лейкоциты, люминесцентная микроскопия, антигенные свойства.

Yu. S. Pyatnytskyi, O. M. Oleshchuk, Yu. I. Bondarenko
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

EXPERIMENTAL STUDY OF CRYOKSENERMA'S ANTIGENIC PROPERTIES

Summary

An experimental study of the antigenic properties of cryoxenoderma using fluorescent microscopy was held. It was established that the investigated substance has a pronounced alternative effect on isolated donor leukocytes. The survey results suggest that the mechanism of the positive impact of oral tolerance therapy by cryoxenoderma is based on the phenomenon of trigger activation cytopathic responses of immune cells, possibly lymphocytes and leukocytes in the intestinal crypts.

KEY WORDS: cryoxenoderma, leukocytes, fluorescent microscopy, antigenic properties.

Отримано 08.05.14

Адреса для листування: О. М. Олещук, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

ІНТЕНСИВНІСТЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ КРОВІ ЩУРІВ ЗА РОЗВИТКУ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ТА ВВЕДЕННЯ ЦИСПЛАТИНУ

Досліджено інтенсивність процесу пероксидного окиснення ліпідів та стійкість еритроцитів щурів при розвитку звичайної і резистентної карциноми Герена за введення цисплатину в розчинній та ліпосомальній формах. Показано, що процеси пероксидного окиснення ліпідів проходять повільніше при розвитку резистентного штаму, ніж звичайного, карциноми Герена. Встановлено, що введення цисплатину в ліпосомальній формі є більш перспективним напрямком для подолання лікарської резистентності, ніж цисплатину в розчинній формі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: карцинома Герена, резистентний штаму, цисплатин, ліпосомальна форма.

ВСТУП. Розвиток оксидативного стресу та, як наслідок, інтенсивний процес пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) в організмі пухлиноносіїв є відомим фактом [13, 16]. Оксидативний стрес може відігравати регуляторну роль і сприяти виникненню та розвитку резистентності до певних цитостатиків [15]. Звичайна і резистентна до цисплатину карцинома Герена є зручною моделлю для вивчення біохімічних особливостей явища резистентності [6]. Відомо, що ліпосомальна форма цисплатину менш токсична для організму щурів-пухлиноносіїв у цій моделі та призводить до більш ефективного гальмування росту резистентної карциноми Герена [3, 7]. Окрім показників інтенсивності ПОЛ у плазмі крові, що є загальним показником рівня оксидативного стресу організму, важливим параметром у моделі звичайної карциноми Герена вважають стан системи червоної крові, а саме: рівень ПОЛ у червонокривцях та їх стійкість до гемолізу [2]. Ці показники віддзеркалювали токсичність цисплатину щодо загального стану організму експериментальних тварин та корелювали з тривалістю їх життя в моделі пухлинного росту [9, 20, 24].

Отже, метою роботи було визначити інтенсивність ПОЛ у плазмі та еритроцитах, еритроцитарну стійкість щурів-пухлиноносіїв із звичайною і резистентною формами карциноми Герена за введення розчинної та ліпосомальної форм цисплатину.

© О. І. Грабовська, С. В. Кириченко, Н. І. Штеменко, 2014.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі досліджували цисплатин у двох формах – розчинній та у формі ліпосом, які було синтезовано на кафедрі неорганічної хімії Українського державного хіміко-технологічного університету [23].

Експерименти проводили на щурах лінії Вістар масою 100–150 г, яким перещеплювали підшкірно в ліву задню ногу звичайну карциному Герена Т8 (0,5 мл 20 % суспензії клітин у фізіологічному розчині) [11] та резистентну карциному Герена. Штами клітин одержано з Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України. Щурів було поділено на групи по 8 тварин у кожній: інтактні тварини; щури-пухлиноносії зі звичайною карциномою Герена (група КГ); щури-пухлиноносії з карциномою Герена, яким вводили цисплатин (сPt) (група КГ+сPt); щури-пухлиноносії з карциномою Герена, яким вводили цисплатин у ліпосомальній формі (група КГ+[сPt]лп); щури-пухлиноносії з резистентною до цисплатину карциномою Герена (група РКГ); щури-пухлиноносії з резистентною карциномою Герена, яким вводили цисплатин (сPt) (група РКГ+сPt); щури-пухлиноносії з резистентною карциномою Герена, яким вводили цисплатин у ліпосомальній формі (група РКГ+[сPt]лп). Розчин цисплатину та ліпосомальну форму (розміром 50–100 нм) вводили внутрішньочеревно одноразово в дозі 8 мг/кг на 9-ту добу після трансплантації пухлини [25]. Декапітацію тварин здійснювали під ефірним наркозом відповідно до правил Європейської

конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Після цього збирали кров у пробірки з гепарином, центрифугували 10 хв при 3000 g. Досліджували концентрацію ТБК-активних продуктів у плазмі та еритроцитах [1], ступінь пероксидного гемолізу еритроцитів [5]. Статистичний аналіз одержаних результатів здійснювали за допомогою методів варіаційної статистики з використанням стандартного пакета комп'ютерних програм Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Звичайна і резистентна до цисплатину карцинома Герена росла з різною швидкістю і на 21 день після інокуляції та ізоляції мали масу ($63,00 \pm 3,15$) і ($25,60 \pm 1,28$) г відповідно (рис. 1, 2).

За введення цисплатину гальмування росту звичайної карциноми складало 61 %, а резистентної – 47 %, що відповідає раніше отриманим даним [7] та підтверджує резистентність штаму РКГ до цисплатину. Введення ліпосомальної форми цисплатину щурам зі звичайною КГ викликало таке ж саме гальмування, тобто використання ліпосомального препарату не призводило до підвищення ефективності цисплатину проти КГ. Натомість ліпосомальний цисплатин гальмував РКГ набагато ефективніше (на 63 %), ніж введений у розчині.

Відомо, що використання ліпосомальних препаратів є ефективнішим, ніж введення розчинів, завдяки більш цільовому транспорту, тривалішому циркулюванню лікарського препарату, меншій токсичності для організму в цілому [14, 17]. Проте слід звернути увагу на розміри остаточних пухлин на 21 добу після інокуляції штаму: в РКГ маса пухлини практично вдвічі менша в експерименті із цисплатином у ліпосомальній формі, ніж у КГ. Можна припустити, що в цих експериментах відіграють роль два важливих фактори: швидкість росту пухлини й ефективність доставки препарату. У звичайній КГ швидкість росту дуже висока і швидкість доставки до мішені не залежить від форми введення, інакше кажучи, ліпосомальна форма “не встигає” виявити свої переваги у транспортуванні й доставці цисплатину. В РКГ ріст набагато повільніший, і в цих експериментах ліпосомальна форма має перевагу, оскільки “адсорбційна” функція пухлини РКГ набагато менша, тобто транспортується ефективніше.

Ліпосомальний цисплатин накопичується набагато більше в злоякісних пухлинах. Більше того, ліпосомальний цисплатин має тільки одну форму, яка може перетинати мембранний бар'єр [21, 26]. Дослідження розподілу по тка-

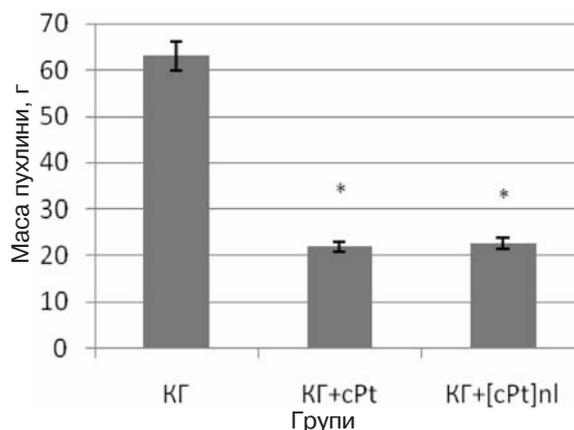


Рис. 1. Маса звичайної карциноми Герена за введення цисплатину, г (* – достовірна різниця порівняно з групою КГ, $p < 0,05$).

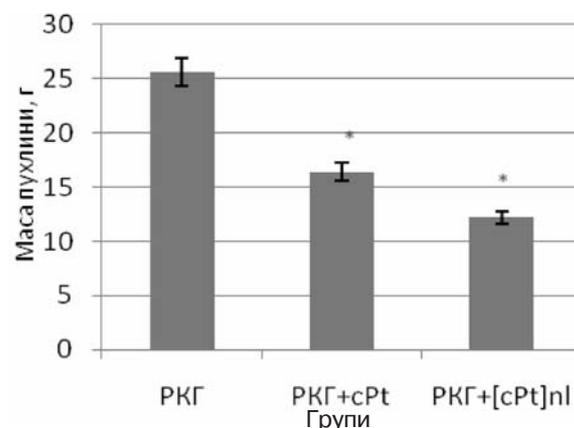


Рис. 2. Маса карциноми Герена, резистентної до цисплатину, за введення цисплатину, г (* – достовірна різниця порівняно з групою РКГ, $p < 0,05$).

нинах цієї форми цисплатину, міченої радіоактивною міткою, показало більше накопичення в крові та, відповідно, пухлині [6].

Інтенсивність ПОЛ за розвитку КГ була в 1,8 раза вищою, ніж при розвитку РКГ (табл. 1).

У деяких роботах відзначено, що інтенсивність ПОЛ в органах щурів-пухлиноносіїв з КГ вища, ніж із РКГ [4, 10], проте цей факт не коментували детально. У дійсності саме рівень ПОЛ, що віддзеркалює інтенсивність радикального вибуху, може відігравати значну роль у феномені резистентності або його відсутності [15]. Тим більше, що, за даними нашого експерименту, існує тісна позитивна кореляція між розміром пухлини та інтенсивністю ПОЛ (концентрацією ТБК-активних продуктів у плазмі крові) (табл. 2).

Введення водного розчину цисплатину знижувало оксидативний стрес у плазмі тварин із КГ у 1,5 раза, а в щурів із РКГ – у 1,48 раза, а введення ліпосомального препарату – в 3 та у 5 разів відповідно. Слід відзначити, що ліпосомальний цисплатин ефективно гальмував інтенсивність ПОЛ в обох експериментальних

Таблиця 1 – Вміст ТБК-активних сполук (мкмоль/л) у плазмі та еритроцитах, ступінь гемолізу еритроцитів (%) експериментальних тварин (n=8)

Група	Вміст ТБК-активних сполук, мкмоль/л		Ступінь гемолізу, %
	плазма	еритроцити	
Контроль	6,25±0,31	6,28±0,31	7,94±0,39
КГ	52,88±2,64	28,44±1,42	62,00±3,10
КГ+cPt	34,10±1,71	42,31±2,11	44,28±2,21*
КГ+[cPt]nl	23,30±1,16*	32,69±1,63	21,90±1,09*
РКГ	18,50±0,92	20,14±1,01	26,14±1,31
РКГ+cPt	12,50±0,62	18,97±0,95	26,46±1,32
РКГ+[cPt]nl	3,85±0,19**	8,33±0,42**	15,38±0,57**

Примітки:

1. * – достовірна різниця порівняно з групою КГ (p<0,05).
2. ** – достовірна різниця порівняно з групою РКГ (p<0,05).

Таблиця 2 – Коефіцієнти кореляції параметрів, які вивчали

Параметри, які вивчали	Вид карциноми							
	КГ				РКГ			
	маса, г	ТБК-активні продукти в плазмі, мкмоль/л	ТБК-активні продукти в еритроцитах, мкмоль/л	ступінь гемолізу, %	маса, г	ТБК-активні продукти в плазмі, мкмоль/л	ТБК-активні продукти в еритроцитах, мкмоль/л	ступінь гемолізу, %
Маса, г	–	0,92	-0,76	0,81	–	0,95	0,80	0,73
ТБК-активні продукти в плазмі, мкмоль/л	0,92	–	-0,44	0,98	0,95	–	0,95	0,90
ТБК-активні продукти в еритроцитах, мкмоль/л	-0,75	-0,44	–	-0,24	0,80	0,95	–	0,99
Ступінь гемолізу, %	0,81	0,98	-0,23	–	0,72	0,90	0,99	–

Коефіцієнти кореляції склали r=+0,92, +0,95 відповідно.

групах з різними за резистентністю перевитими штамами. Це може бути пояснено меншою токсичністю ліпосомальної форми введення цисплатину як в одному, так і в другому експериментах.

Ліпосомальну форму цисплатину було розроблено саме для того, щоб знизити його системну токсичність при одночасному підвищенні адресності доставки препарату до пухлини шляхом збільшення часу циркуляції в рідинах та тканинах організму [18, 26]. Дослідження показують нижчу нефротоксичність, гепатотоксичність та ототоксичність ліпосомальної форми цисплатину порівняно з водним розчином [12, 26]. При дослідженні на щурах токсичності ліпосомальної форми цисплатину було відзначено, що його внутрішньочеревне введення навіть у дозі 30 мг/кг не викликало токсичних проявів в органах та тканинах, тоді як введення 5 мг/кг розчинної форми супроводжувалося вираженою нефротоксичністю [6].

Біохімічні характеристики РКГ взагалі не вивчали, незважаючи на те, що відомим ускладненням онкологічних захворювань є анемічний стан пацієнтів [19]. Відомо, що оксидативний

стрес, гіпоксія, притаманні процесу розвитку новоутворень, призводять до зниження стійкості червонокривців як наслідку розвитку оксидативного стану в еритроциті [8].

Дійсно, за розвитку КГ інтенсивність оксидативного стресу в еритроцитах зростає в 4,5 рази (табл. 1), тоді як у групі щурів з РКГ це явище спостерігали меншою мірою. Введення водного розчину цисплатину і, меншою мірою, ліпосомального виявилось токсичним для еритроцитів щурів з КГ (підвищений рівень малонового діальдегіду в 1,5 та 1,2 рази відповідно). Проте введення розчину цисплатину практично не впливало на рівень малонового діальдегіду в еритроцитах тварин з РКГ. Введення ліпосомального цисплатину значно знижувало інтенсивність ПОЛ в еритроцитах щурів з РКГ. Отже, було знайдено різні біохімічні характеристики еритроцитів звичайної та резистентної карциноми Герена, які полягають у різному рівні інтенсивності ПОЛ всередині клітини та його різній регуляції введенням цитостатика цисплатину.

При дослідженні ступеня пероксидного гемолізу еритроцитів було відмічено знижену в 7,8 рази гемолітичну стійкість еритроцитів за

розвитку КГ, тоді як при розвитку РКГ – лише у 3,3 раза (табл. 1). Серед усіх біологічних мембран найбільш чутливими до дії вільних радикалів та ПОЛ є еритроцитарні мембрани, стан яких визначає функціональну активність еритроцитів [22]. Введення водного розчину цисплатину в ліпосомальній формі призводило до зниження показника в обох пухлинних моделях (у 2,8 раза у групі щурів з КГ та в 1,7 раза у групі тварин з РКГ).

Таким чином, за розвитку РКГ формувалася більш стійка популяція еритроцитів, ніж при розвитку КГ, введення цисплатину різними способами менше впливало на еритроцитарну стійкість щурів з РКГ, що може робити певний внесок у феномен резистентності та повинно стати об'єктом подальших досліджень.

Було показано (табл. 2), що в моделі пухлинного росту РКГ та при застосуванні цитостатика існував більш тісний кореляційний зв'язок між інтенсивністю росту пухлини (маса), інтенсивністю ПОЛ у плазмі крові, інтенсивністю ПОЛ в еритроцитах, еритроцитарною стійкістю, ніж за розвитку КГ, що може бути пояснено меншою швидкістю ПОЛ у РКГ та його нижчою руйнівною активністю порівняно з КГ.

ВИСНОВКИ. 1. Використання ліпосомальних препаратів є ефективнішим, ніж введення розчинів, завдяки більш цільовому транспорту, тривалішому циркулюванню, меншій токсичності для організму в цілому. Злоякісний ріст як звичайної, так і резистентної до цисплатину карциноми Герена призводить до посилення процесів ПОЛ у крові та проходить повільніше при розвитку резистентного штаму, ніж звичайного, карциноми Герена.

2. Встановлено тісну позитивну кореляцію між розміром пухлини та інтенсивністю ПОЛ за розвитку КГ і РКГ.

3. Визначено різні біохімічні характеристики еритроцитів звичайної та резистентної карциноми Герена, які полягають у різному рівні інтенсивності ПОЛ всередині клітини та його різній регуляції введенням цитостатика цисплатину.

4. За розвитку РКГ формується більш стійка популяція еритроцитів, ніж при розвитку КГ; введення цисплатину різними способами менше впливає на еритроцитарну стійкість щурів з РКГ, що може робити певний внесок у феномен резистентності та повинно стати об'єктом подальших досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 2. – С. 41–43.

2. Антиоксидантна і протипухлинна активність та механізм дії дикарбоксилатів диренію у тварин із карциномою Герена / І. В. Леус, К. Л. Шамелашвілі, О. Д. Скорик [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 3. – С. 86–96.

3. Бабій С. О. Зміни стану нирок щурів за розвитку карциноми Герена та застосування цитостатиків / С. О. Бабій, Т. О. Лоскутова, Н. І. Штеменко // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 3. – С. 63–71.

4. Вплив препарату “Грінізація Грін R” на злоякісний ріст у щурів з карциномою Герена, а також з резистентною формою карциноми Герена / М. В. Хімич, Я. Б. Гаєцька, Є. А. Строцька [та ін.] // Фізика живого. – 2011. – **19**, № 2. – С. 35–38.

5. Комышников В. С. Клинико-химическая лабораторная диагностика : справочник / В. С. Комышников. – Минск : Интерсервис, 2003. – Т. 2.

6. Липосомальные препараты: путь к преодолению лекарственной устойчивости к цисплатину / Г. И. Кулик, В. М. Пивнюк, М. М. Носко [и др.] // Онкология. – 2009. – **11**, № 1. – С. 76–80.

7. Носко М. М. Сравнение противоопухолевой активности цисплатина в свободной и липосомаль-

ной формах в эксперименте / М. М. Носко // Укр. мед. альманах. – 2008. – **11**, № 5. – С. 114–115.

8. Пірождкова-Паталах І. В. Поверхнева архітектоніка еритроцитів крові під впливом кластерної сполуки ренію (III) при гемолітичній анемії / І. В. Пірождкова-Паталах, Н. І. Штеменко // Вісник Дніпропетровського Університету. – 2001. – № 9. – С. 29–33.

9. Скорик О. Д. Інтенсивність оксидативного стресу та склад вільних амінокислот крові при гальмуванні росту карциноми Герена сполуками ренію : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / О. Д. Скорик. – К., 2009. – 20 с.

10. Стан антиоксидантної системи і процесів ПОЛ при злоякісному рості у щурів з резистентною формою карциноми Герена за умов введення “Грінізація Грін R” / Я. Б. Раєцька, Є. А. Строцька, М. В. Хімич [та ін.] // Фізика живого. – 2011. – **19**, № 2. – С. 44–47.

11. Тимофеевский А. Д. Модели и методы экспериментальной онкологии / А. Д. Тимофеевский. – М. : Медгиз, 1960. – 245 с.

12. Circumventing Tumor Resistance to Chemotherapy by Nanotechnology / Xing-Jie Liang, Chunying Chen, Yuliang Zhao [et al.] // Multi-Drug Resistance in Cancer. – 2010. – P. 467–488.

13. Das U. N. A radical approach to cancer / U. N. Das // Med. Sci. Monot. – 2002. – **8**, № 4. – P. 79–92.

14. Drummond D. C. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors / D. C. Prummand // Pharmacological reviews. – 1999. – № 51. – P. 691–743.
15. Dunyaporn T. / Oxidative Stress and Drug Resistance in Cancer / Dunyaporn Trachootham, Wan Zhang, Peng Huang // Drug Resistance in Cancer Cells. – 2009. – P. 137–175.
16. Durackova Z. Some current insights into oxidative stress / Z. Durackova // Physiol. Res. – 2010. – № 59. – P. 459–469.
17. Go R. S. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin / R. S. Go, A. A. Adjei // J. Clin. Oncol. – 1999. – № 17. – P. 409–422.
18. Jung Y. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage / Y. Jung, S. J. Lippard // Chem. Rev. – 2007. – № 107. – P. 1387–1407.
19. Knight K. Prevalence and outcomes of anaemia in cancer: a systematic review of the literature / K. Knight, S. Wade, L. Balducci // Am. J. Med. – 2004. – № 116. – P. 115–265.
20. Liposomal forms of rhenium cluster compounds: enhancement of biological activity / N. I. Shtemenko, O. V. Berzenina, D. E. Yegorova [et al.] // Chem. Biodiversity. – 2008. – № 5. – P. 1660–1667.
21. McNeil S. E. Nanotechnology for the biologist / S. E. McNeil // J. Leukoc. Biol. – 2005. – № 78. – P. 85–94.
22. Portacal O. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients / O. Portacal // Clin. Biochem. – 2000. – № 4. – P. 284–297.
23. Shtemenko N. I. Dichlorotetra-m-isobutirato-dirhenium (III): Enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties / N. I. Shtemenko, P. Coltery, A. V. Shtemenko // Anticancer Research. – 2007. – № 27, № 4. – P. 2487–2492.
24. Synthesis, characterization, in vivo antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin / A. V. Shtemenko, P. Coltery, N. I. Shtemenko [et al.] // Dalton. Trans. – 2009. – № 26. – P. 5132–5136.
25. Taylor S. K. Erythropoietine (Erh-ipo) more than treatment of anemia in cancer and chemotherapy? / S. K. Taylor // Med. Hypothesis. – 2003. – № 1. – P. 89–93.
26. Terkola R. Liposomal cisplatin: Lipoplatin / R. Terkola // European journal of oncology pharmacy. – 2007. – № 1, № 2. – P. 15–20.

Е. И. Грабовская, С. В. Кириченко, Н. И. Штеменко
ДНЕПРОПЕТРОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ О. ГОНЧАРА

ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА КРОВИ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА И ВВЕДЕНИИ ЦИСПЛАТИНА

Резюме

Исследованы интенсивность процесса пероксидного окисления липидов и устойчивость эритроцитов крыс при развитии обычной и резистентной карциномы Герена в условиях введения цисплатина в растворимой и липосомальной формах. Показано, что процессы пероксидного окисления липидов проходят медленнее при развитии резистентного штамма, чем обычного, карциномы Герена. Установлено, что введение цисплатина в липосомальной форме является более перспективным направлением для преодоления лекарственной резистентности, чем цисплатина в растворимой форме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карцинома Герена, резистентный штамм, цисплатин, липосомальная форма.

О. I. Hrabovska, S. V. Kyrychenko, N. I. Shtemenko
OLES HONCHAR DNIPROPETROVSK NATIONAL UNIVERSITY

OXIDATIVE STRESS INTENSITY IN BLOOD OF RATS UNDER DEVELOPMENT OF CARCINOMA GERENIUM AND PUTTING CISPLATIN

Summary

The intensity of lipid peroxidation and stability of erythrocytes of rats during the development of normal and resistant Guerin carcinoma for cisplatin in a soluble and liposomal form was investigated. It was shown that LPO pass more slowly in the development of a resistant strain than usual Guerin's carcinoma. The administration of cisplatin in the form of liposomes have more promising avenue for overcoming drug resistance than cisplatin in a soluble form was found.

KEY WORDS: Geranium carcinoma, resistant strain, cisplatin, liposomal form.

Отримано 06.05.14

Адреса для листування: О. І. Грабовська, вул. Войцеховича, 112, кв. 71, Дніпропетровськ, 49101, Україна.

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ПОРОЖНИНИ РОТА ПРИ МЕХАНІЧНІЙ ЖОВТЯНИЦІ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ КОРИГУВАЛЬНИХ ВПЛИВІВ

У ході дослідження встановлено, що застосування місцевих лікувальних засобів при ураженнях слизової оболонки порожнини рота в різні терміни обтураційного холестазу сприяє попередженню та зменшенню глибини розвитку дистрофічних і атрофічних змін.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: слизова оболонка порожнини рота, механічна жовтяниця, місцеві коригувальні засоби.

ВСТУП. При багатьох захворюваннях відбуваються структурні та функціональні зміни у слизовій оболонці порожнини рота [2]. Часто такі патологічні процеси мають місце на тлі зниження слиновиділення та резистентності тканин, внаслідок зміни мікробіоценозу слизової оболонки [5, 13]. При цьому процеси ремоделювання проявляються атрофічними змінами епітеліального шару, зменшенням кількості еластичних волокон, погіршенням мікроциркуляції м'яких тканин та кісткової основи [7, 12]. Майже всі процеси пов'язані з гідратацією або дегідратацією тканин [1, 3, 9].

Морфологічні зміни слизової оболонки порожнини рота, які розвиваються при механічній жовтяниці, проявляються як атрофічними, так і склеротичними явищами. Причому загальноприйняті принципи лікування механічної жовтяниці в основному направлені на ліквідацію причинного фактора та зниження загальнотоксичних впливів білірубінемії [6, 8, 11].

Проте часто проблемою практикуючого стоматолога є той факт, що при лікуванні поєднаної патології необхідно застосовувати місцеві лікувальні засоби [10]. До цих засобів ставлять такі вимоги: зменшувати запалення, відновлювати епітеліальний пласт слизової оболонки порожнини рота, покращувати мікроциркуляцію та локальний кровообіг [4, 11]. Особливо актуальними на сьогодні є пептидні біорегулятори та засоби діалізату крові тварин, які здатні активувати транспорт кисню і поживних речовин на клітинному рівні, підвищувати спожив-

© Н. О. Твердохліб, 2014.

вання кисню клітиною, стимулювати відновлення пошкоджених клітин, особливо за умов гіпоксії [4–6].

Метою даного дослідження було вивчити особливості морфологічних змін слизової оболонки та її гемомікроциркуляторного русла в динаміці експериментальної механічної жовтяниці при місцевому застосуванні в корекції процесів ремоделювання солкосерилової дентальної адгезивної пасти.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експериментальні дослідження проведено на 72 білих щурах-самцях. Контрольну групу склали 12 інтактних тварин. Механічну жовтяницю моделювали шляхом перев'язування та перерізання між двома лігатурами спільної жовчної протоки. Починаючи з 1-ї доби від початку відтворення механічної жовтяниці, слизову оболонку порожнини рота в ділянках щоки, губи та ясен двічі щодня змащували солкосериловою дентальною адгезивною пастою. Дослідження слизової оболонки порожнини рота проводили на 3, 7, 14, 28-му доби експерименту. Евтаназію щурів здійснювали шляхом введення великих доз 10 % розчину тіопенталу натрію. Усі дослідження виконували, дотримуючись Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин.

Для виконання морфологічних та морфометричних досліджень кусочки слизової оболонки порожнини рота вирізали в ділянках щоки, губи, ясен та фіксували в 10 % нейтральному розчині формаліну, а після проведення

через етилові спирти зростаючих концентрацій поміщали в парафін. Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном і еозином, за ван Гізон, за Вейгертом. Проводили гістологічне та морфометричне дослідження слизової оболонки вказаних відділів порожнини рота. При виконанні світлооптичних досліджень використовували мікроскопи МБД-15, "SEO SCAN" та фотодокументували за допомогою відеокамери "Vision CCD Camera". Морфометрію тканини слизової оболонки проводили на комп'ютерних зображеннях гістологічних мікропрепаратів. При морфометричному дослідженні вимірювали товщину слизової оболонки, її епітеліального шару, власної пластинки та базальної мембрани, визначали питому вагу пошкоджених епітеліоцитів остеоподібного шару. Також проводили морфометричне дослідження елементів гемомікроциркуляторного русла. Додатково мікроциркуляторне русло вивчали шляхом ін'єкції останнього туш-желатиновою масою з подальшим виготовленням просвітлених препаратів, а також за допомогою імпрегнації азотнокислим сріблом. Серед елементів гемомікроциркуляторного русла визначали відносний об'єм кровоносних капілярів, вимірювали діаметр артеріол, капілярів, венул. Для визначення критеріально-значимого показника формування гідростатичного капілярного тиску визначали артеріоло-венулярний індекс (співвідношення діаметрів артеріол і венул).

Вміст білірубину в плазмі крові експериментальних тварин визначали загальними біохімічними методами.

Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень університету в програмному пакеті Statsoft STATISTIKA. Вірогідність даних оцінювали, використовуючи U-критерій Манна-Уїтні. Статистично значимими відмінності вважали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За допомогою комплексного морфологічного та морфометричного дослідження встановлено динаміку процесів ремоделювання слизової оболонки порожнини рота, а також її гемомікроциркуляторного русла в ділянках губи, щоки та ясен при різних термінах obturaційного холестазу на тлі місцевого застосування у досліджуваних ділянках слизової оболонки солкосерилової дентальної адгезивної пасти.

Незважаючи на формування вираженої холемії, вже на 3-тю добу експериментальної механічної жовтяниці, коли рівень загального білірубину в плазмі крові експериментальних

тварин сягав $(81,36 \pm 3,08)$ мкмоль/л, процеси ремоделювання слизової оболонки не були значуще вираженими і характеризувалися помірними процесами гідратації, яким сприяли незначні констрикторні явища артеріолярної частини та дилатаційні явища у капілярах і венулярній частині гемомікроциркуляторного русла. При цьому в артеріолярній стінці підвищувався базальний тонус, просвіти капілярів у ділянці губи переважали контрольні величини незначно, а результати їх морфометричного аналізу не мали достовірних відмінностей із контролем (табл. 1).

Останні не призводили до значущих порушень локального кровообігу та зменшення відносного об'єму капілярного русла в досліджуваних ділянках ($p > 0,05$). При цьому в ході морфометричних досліджень слизової оболонки встановлено незначне збільшення їх товщини (табл. 2).

Даний параметр змінювався за рахунок як потовщення епітеліального шару слизової оболонки, так і набряку та потовщення її власної пластинки. Застосування солкосерилової адгезивної пасти у ранні терміни механічної жовтяниці покращувало гомеостаз епітеліального шару слизової оболонки, внаслідок чого питома вага пошкоджених епітеліоцитів у остеоподібному шарі не мала значущої різниці з контрольними даними.

При тижневій механічній жовтяниці на тлі місцевого застосування солкосерилової адгезивної пасти рівень білірубину в плазмі крові становив $(178,42 \pm 5,36)$ мкмоль/л. Параметри останнього свідчили про високий рівень загальної токсемії, на тлі якої в ділянках слизової оболонки порожнини рота, де використовували коригувальні впливи у складі елементів гемомікроциркуляторного русла власної пластинки слизової оболонки, просвіти артеріол, капілярів та венул не мали достовірної різниці з контрольними даними. Поряд із цим відносний об'єм кровоносних капілярів у ділянці губи був на 3,9 % меншим від контрольних величин, щоки – на 5,3 %, ясен – на 13,5 % ($p < 0,05$).

Під час морфометричних досліджень слизової оболонки порожнини рота на 7 добу механічної жовтяниці при місцевому застосуванні солкосерилової адгезивної пасти не було виявлено достовірних відмінностей товщини слизової оболонки, її епітеліального шару, власної пластинки та базальної мембрани від контрольних величин. У власній пластинці при помірному набряку відзначали невелику кількість лімфоцитів та поодинокі лейкоцити. Поряд із цим питома вага пошкоджених епі-

Таблиця 1 – Результати морфометричного аналізу елементів гемомікроциркуляторного русла слизової оболонки порожнини рота при механічній жовтяниці на тлі застосування солкосерилової адгезивної пасти ($M \pm m$)

Термін спостереження	Ділянка дослідження	Діаметр артеріол, мкм	Діаметр венул, мкм	Діаметр капілярів, мкм	Відносний об'єм кровоносних капілярів, %	Артеріоло-венулярний індекс
Контроль (n=12)	Губа	19,21±0,19	28,16±0,18	5,98±0,05	6,22±0,03	0,68±0,01
	Щока	19,03±0,11	28,34±0,14	6,04±0,05	5,48±0,04	0,67±0,01
	Ясна	18,79±0,13	28,47±0,15	5,82±0,06	6,84±0,04	0,65±0,01
3 доба (n=12)	Губа	19,07±0,07	28,35±0,16	6,03±0,04	6,18±0,02	0,67±0,01
	Щока	18,97±0,11	28,71±0,21	6,11±0,04	5,41±0,02	0,65±0,01
	Ясна	18,63±0,11	28,94±0,36	5,91±0,03	6,78±0,02	0,64±0,01
7 доба (n=12)	Губа	18,97±0,11	28,42±0,29	6,08±0,03	5,98±0,01*	0,67±0,02
	Щока	18,83±0,08	28,98±0,27	6,14±0,03	5,19±0,02*	0,65±0,01
	Ясна	18,60±0,08	29,02±0,44	5,94±0,02	5,92±0,08**	0,64±0,01
14 доба (n=12)	Губа	18,76±0,13	30,24±0,49*	6,14±0,07	5,57±0,04*	0,62±0,02*
	Щока	18,67±0,15	31,53±0,60*	6,27±0,09	5,06±0,08*	0,59±0,02*
	Ясна	18,45±0,15	32,07±0,51*	5,96±0,05	5,23±0,17***	0,57±0,02*
28 доба (n=12)	Губа	17,05±0,05*	34,56±0,35*	6,71±0,03*	5,10±0,03***	0,49±0,01***
	Щока	17,01±0,14*	34,79±0,18*	6,83±0,04*	4,83±0,03***	0,49±0,01***
	Ясна	16,12±0,07*	35,14±0,34*	6,92±0,03*	5,01±0,04***	0,46±0,02***

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ порівняно з контрольними величинами, отриманими в інтактних тварин.

Таблиця 2 – Морфометрична характеристика слизової оболонки різних відділів порожнини рота при механічній жовтяниці на тлі застосування солкосерилової адгезивної пасти ($M \pm m$)

Досліджуваний параметр	Ділянка дослідження	Контроль	Тривалість механічної жовтяниці			
			3 доба	7 доба	14 доба	28 доба
Товщина слизової оболонки, мкм	Губа	428,23±0,88	429,71±0,58	428,08±0,58	425,56±0,73	409,10±2,21***
	Щока	462,35±1,39	463,51±1,23	460,70±1,32	458,88±1,30	401,65±6,36***
	Ясна	375,02±0,63	376,90±1,84	373,15±1,70	362,60±1,65*	326,43±4,62***
Товщина епітеліального шару, мкм	Губа	293,14±0,71	294,82±1,73	292,04±1,72	289,54±1,40	263,85±3,63***
	Щока	308,05±0,77	309,62±0,85	306,95±0,62	306,26±0,65	284,11±4,44***
	Ясна	275,94±0,68	276,91±1,27	274,20±1,41	264,52±1,36*	242,13±4,43***
Товщина власної пластинки, мкм	Губа	122,41±0,47	123,00±0,71	121,57±0,70	121,33±1,14	116,53±2,51
	Щока	139,26±0,64	140,65±1,29	138,17±1,27	136,26±1,14	122,75±1,67***
	Ясна	91,67±0,45	92,41±0,43	91,06±0,34	90,91±0,34	90,41±0,29
Товщина базальної мембрани, мкм	Губа	10,27±0,01	10,29±0,01	10,27±0,01	10,24±0,01	10,22±0,02
	Щока	10,32±0,02	10,36±0,04	10,27±0,03	10,25±0,04	10,21±0,04
	Ясна	8,49±0,01	8,56±0,05	8,52±0,05	8,47±0,03	7,80±0,17*
Питома вага пошкоджених епітеліоцитів остеоподібного шару, %	Губа	6,83±0,03	6,87±0,02	7,54±0,02*	10,57±0,02*	14,42±0,02***
	Щока	5,97±0,03	6,01±0,03	7,26±0,03*	10,96±0,03*	13,35±0,03***
	Ясна	8,41±0,06	8,50±0,03	10,37±0,04*	12,38±0,05*	17,27±0,04***

телиоцитів остеоподібного шару в ділянці губи зросла на 10,4 %, щоки – на 21,6 %, ясен – на 22,7 % ($p < 0,05$).

При двотижневій експериментальній механічній жовтяниці на тлі вираженої холемії ступінь ремоделювання гемомікроциркуляторного русла та морфологічних змін слизової оболонки порожнини рота збільшувався. За допомогою морфометричних вимірів встановлено зменшення товщини як епітеліального шару, так і власної пластинки слизової оболонки. Причому в ділянці ясен товщина слизової оболонки була достовірно меншою від контрольних

величин ($p < 0,05$). У даний термін експерименту виразно збільшувався відносний об'єм пошкоджених епітеліоцитів остеоподібного шару, який у ділянці губи переважав контрольні величини в 1,54 раза ($p < 0,05$), щоки – в 1,83 раза ($p < 0,05$), ясен – в 1,47 раза ($p < 0,05$).

У гемомікроциркуляторному руслі наростали констрикторні властивості в артеріолах, які особливо вираженими були у ділянці ясен, а також достовірно розширювався просвіт венул ($p < 0,05$). Щільність капілярного русла була достовірно меншою від контролю в ділянках губи та ясен ($p < 0,05$). У даний термін

експерименту виразно знижувалися показники артеріоло-венулярних відношень, які в ділянці губи були меншими на 8,82 % ($p < 0,05$), щоки – на 11,9 % ($p < 0,05$), ясен – на 12,3 % ($p < 0,05$).

Застосування солкосерилової адгезивної пасти протягом місячного терміну обтураційної жовтяниці не створювало достатніх можливостей щодо захисту слизової оболонки порожнини рота від розладів мікроциркуляції, токсичних холевмічних впливів. При цьому у власній пластинці слизової оболонки та підслизовій основі значно збільшувалася кількість фіброзних волокон. У власній пластинці слизової оболонки зростала кількість колагенових волокон, відбувалося її стоншення. Базальна мембрана зменшувала свою звивистість, вирівнювалася, іноді нечітко контурувалася. Згладжувалися сосочки та спрощувався рельєф епітеліально-сполучнотканинного відношення. Товщина слизової оболонки в ділянках щоки та губи вирівнювалася і була значно меншою від контрольних величин з високим ступенем значущості ($p < 0,001$). Стоншення слизової оболонки було пов'язане в основному зі зменшенням товщини епітеліального шару. Кількість пошкоджених клітин остеоподібного шару в ділянці губи переважала контрольні величини у 2,12 раза, щоки – в 2,23 раза, ясен – у 2,1 раза.

У гемомікроциркуляторному руслі в даний термін експерименту процеси ремоделювання елементів мікросудин доповнювалися геометричними змінами в артеріолярному відділі, розширенням та кологенізацією периваскулярних просторів. Артеріальна ланка мікросудин зменшила свою ємність порівняно з двотижневим терміном холевмії, і величини діаметрів артеріол у всіх ділянках дослідження були достовірно меншими від контролю ($p < 0,05$). Часто виявляли локальні звуження артеріол внаслідок формування гладком'язовими клітинами манжеткоподібних сфінктерів. Просвіти венул найбільш розширеними були в ділянці слизової оболонки ясен ($p < 0,05$). Щільність капілярного русла у всіх відділах слизової оболонки зменшувалася ($p < 0,001$), в результаті чого можна зробити висновок, що застосування коригувальних впливів при місячній

тривалості обтураційного холевміазау та холевмії не забезпечувало корекції мікроциркуляторних порушень і зниження локального кровотоку. Поряд із цим знижувалися і величини артеріоло-венулярних відношень, які засвідчують сповільнення кровотоку, що пов'язано зі зменшенням пропускної здатності артеріол та порушенням венозного відтоку.

Таким чином, застосування солкосерилової адгезивної пасти в корекції морфологічних змін та порушень мікроциркуляції в слизовій оболонці порожнини рота у ранні терміни експерименту, завдяки властивостям, які характеризувалися покращенням кровопостачання ішемізованих ділянок, мембраностабілізаційним, а також цитопротекторним властивостям, запобігало розвитку морфологічних змін як у гемомікроциркуляторному руслі, так і в самій слизовій оболонці порожнини рота. При довготривалих місячних жовтяницях внаслідок тривалої білірубінемії і токсемії, порушень мікроциркуляції та архітекtonіки мікросудинних модулів наставали процеси розвитку атрофічних і склеротичних змін у слизовій оболонці порожнини рота, які більш вираженими були в ділянках щоки та ясен.

ВИСНОВКИ. 1. Застосування солкосерилової адгезивної пасти попереджує в ранні терміни обтураційного холевміазау і холевмії (до 14 днів) морфологічні та структурні зміни слизової оболонки порожнини рота.

2. При місячній механічній жовтяниці місце застосування солкосерилової адгезивної пасти сприяє зменшенню глибини розвитку атрофічних змін слизової оболонки порожнини рота. При цьому настають розлади мікроциркуляції, які пов'язані зі зменшенням відносного об'єму кровоносних капілярів та порушеннями локального кровотоку внаслідок вираженого зниження артеріоло-венулярних градієнтів.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним є проведення експериментальних досліджень щодо порівняння різних способів коригувальних впливів, які запобігатимуть розвитку атрофічних змін слизової оболонки порожнини рота при холевмічних станах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 2002. – 240 с.

2. Бородай Н. В. Морфофункціональні особливості слизової оболонки порожнини рота та зміни в ній

при різних патологічних процесах / Н. В. Бородай // Лаб. діагностика. – 2001. – № 1. – С. 49–55.

3. Быков В. Л. Иммунокомпетентные клетки десны человека в норме и при воспалительных заболеваниях пародонта / В. Л. Быков // Архив пат. – 2005. – 67, № 2. – С. 51–55.

4. Вебер В. Р. Клиническая фармакология для стоматологов / В. Р. Вебер, Б. Т. Мороз. – СПб. : Человек, 2003. – 352 с.

5. Ласкарис Д. Лечение заболеваний слизистой оболочки рта / Д. Ласкарис. – М. : ООО “Медицинское информационное агентство”, 2006. – 304 с.

6. Рациональная фармакотерапия в стоматологии / под ред. Г. М. Барера, Е. В. Зорян. – М. : Литтерра, 2006. – 568 с.

7. Стоян Н. О. Особливості структурної організації гемомікроциркуляторного русла слизової оболонки порожнини рота [Текст] / Н. О. Стоян // Вісник наук. досл. – 2012. – № 2. – С. 96–98.

8. Твердохліб Н. О. Морфометрична характеристика слизової оболонки порожнини рота при механічній жовтяниці / Н. О. Твердохліб // Шпит. хірургія. – 2013. – № 4. – С. 45–49.

9. Твердохліб Н. О. Структурна перебудова кровоносного русла слизової оболонки порожнини

рота при експериментальній механічній жовтяниці / Н. О. Твердохліб, А. Г. Шульгай // Клін. анатомія та опер. хірургія. – 2013. – № 3. – С. 6–10.

10. Шульгай А. Г. Морфометричні особливості ремоделювання структур привушної слинної залози при механічній жовтяниці / А. Г. Шульгай, М. О. Левків // Шпит. хірургія. – 2012. – **57**, № 1. – С. 39–43.

11. Шумский А. В. Иммунопатогенетический подход в лечении воспалительных заболеваний полости рта / А. В. Шумский // Пародонтология. – 2005. – **37**, № 4. – С. 36–38.

12. Lombardi T. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions / T. Lombardi, C. Hauser, E. Budtz-Jorgensen // J. Oral. Pathol. Med. – 1993. – **22**, № 5. – P. 193–202.

13. Oral infections as predictors of mortality / P. Hamalainen, J. H. Meurman, M. Kauppinen, M. Keskinen // Gerodontology. – 2005. – **22**, № 3. – P. 151–157.

Н. О. Твердохліб

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХЕ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ КОРРЕКТИРУЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Резюме

В ходе исследования установлено, что применение местных лекарственных средств при поражениях слизистой оболочки полости рта в различные сроки обтурационного холестаза способствует предупреждению и уменьшению глубины развития дистрофических и атрофических изменений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *слизистая оболочка полости рта, механическая желтуха, местные корректирующие средства.*

N. O. Tverdokhlib

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF ORAL CAVITY MUCOSAL MEMBRANE IN OBSTRUCTIVE JAUNDICE UNDER THE CORRECTIVE EFFECTS

Summary

The study found that the use of local remedies in lesions of the oral mucosa at different times of obstructive cholestasis, helps to prevent and reduce the depth of dystrophic and atrophic changes.

KEY WORDS: *mucous membrane of the mouth, obstructive jaundice, local corrections facilities.*

Отримано 28.01.14

Адреса для листування: *Н. О. Твердохліб, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.*

ДИСФУНКЦІЯ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ НА ФОНІ ВУЗЛОВИХ УТВОРІВ

У статті наведено результати дослідження рівня тиреотропного гормону у хворих із вузловими (злоякісними) утворами щитоподібної залози, яким було проведено тонкоголкову аспіраційну пункційну біопсію. Визначення рівня цього гормону може бути лабораторним предиктором розвитку злоякісних новоутворень щитоподібної залози.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: тиреотропний гормон, щитоподібна залоза, тонкоголкова аспіраційна пункційна біопсія, вузлові утвори, злоякісні утвори щитоподібної залози.

ВСТУП. Вузловий і багатовузловий зоб – збірне клінічне поняття, яке об'єднує всі утвори щитоподібної залози (ЩЗ), що мають різні морфологічні характеристики. Вузли є найпоширенішою патологією ЩЗ, у 4–8 разів частіше зустрічаються в жінок. Частота і кількість вузлів, які виникають у ЩЗ, збільшуються з віком. Вузли, що пальпуються, виявляють у 4–7 % дорослого населення [5], застосування ультразвукового дослідження збільшує виявлення вузлів до 19–67 % [6]. Злоякісні утвори ЩЗ є найрозповсюдженішою ендокринною патологією з тенденцією до зростання. Однак актуальність та непередбачуваність цієї проблеми полягають у тому, що, за літературними даними, 10–22 % солітарних вузлів є злоякісними, а приблизно в 90 % хворих рак щитоподібної залози розвивається під маскою вузлового зоба. За 30 років у США (1973–2002) злоякісні новоутворення ЩЗ збільшилися у 2,4 раза. Найчастіше рак ЩЗ виявляють у вигляді солітарного або на фоні домінуючого вузла на тлі багатовузлового зоба [4]. Окремі автори показали, що підвищений рівень тиреотропного гормону (ТТГ), який навіть не виходить за межі норми, корелює з частотою злоякісних утворів ЩЗ на фоні вузлового зоба [8] та асоціюється з агресивними формами раку ЩЗ [2, 3, 7].

Метою дослідження було з'ясувати зміни функціональної активності щитоподібної залози за показником ТТГ при злоякісних вузлових утворах ЩЗ за даними ТАПБ.

© В. І. Максимлюк, 2014.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Проведено дослідження функціональної активності щитоподібної залози за показником ТТГ у пацієнтів із злоякісними утворами ЩЗ за результатами тонкоголкової аспіраційної пункційної біопсії (ТАПБ) у 1026 хворих протягом 2007–2011р. На даний час тестом першого рівня, найчутливішим методом вважають визначення концентрації ТТГ. Розробка принципово нових неізотопних технологій гормонального імунологічного аналізу, які ґрунтуються на використанні флюорометричного методу і методу посиленої люмінесценції, дозволила підвищити чутливість методу визначення ТТГ до рівня менше ніж 0,01 мМО/л (методики 2-го покоління) і навіть менше ніж 0,001 мМО/л (методики 3-го покоління). Діапазон нормальних значень ТТГ у здорових людей становить 0,3–4,0 мМО/л. Значення ТТГ нижче 0,1 мМО/л або понад 10 мМО/л вказують на суттєві порушення в регуляційному колі. Пограничні базальні рівні ТТГ, тобто в межах 0,1–0,3 мМО/л або ж 4–10 мМО/л, здебільшого пов'язані з латентною дисфункцією залози (при нормальних рівнях тиреоїдних гормонів) [1].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проаналізовано зміни функціональної активності щитоподібної залози за показником ТТГ при злоякісних вузлових утворах ЩЗ за даними ТАПБ у 1026 хворих за період 2007–2011р. Злоякісні утвори щитоподібної залози, за даними ТАПБ, діагностовано в 56 хворих (5,46 %), відповідно у 7 чоловіків (12,5 %) та 49 жінок (87,5 %). Як

видно з діаграми 1, злоякісні новоутворення ЩЗ найчастіше виявляють в осіб працездатного віку (83,8 %).

До 20 років рак діагностовано в 1 (1,7 %), від 21 до 30 років – у 8 (14,3 %), від 31 до 40 років – у 11 (19,6 %), від 41 до 50 років – у 14 (25 %), від 51 до 60 – у 13 (23,2 %) та понад 61 – у 9 (16,2 %) хворих.

У 43 (76,8 %) хворих рівень ТТГ перевищував 1,5 мМО/л, серед них у 21 (48,8 %) пацієнта він був більшим 4,5 мМО/л.

Як видно з діаграми 2, на фоні виявлених видів злоякісного утвору щитоподібної залози найчастіше виявляли папілярний – 46 пацієнтів (82,15 %), медулярний – 6 (10,7 %) та анапластичний рак – 4 (7,15 %).

Зрозуміло, що за даними ТАПБ діагностувати фолікулярний рак неможливо.

Звертає на себе увагу те, що при папілярному раку рівень ТТГ становив від 1,5 до 6,0 мМО/л, при медулярному раку в усіх хворих він складав від 3,5 до 7,0 мМО/л, а при анапластичному коливався від 2,2 до 4,5 мМО/л.

Злоякісні новоутворення ЩЗ у солітарних вузлах діагностовано у 33 пацієнтів (59 %) та, відповідно, у 23 (41 %) хворих на багатовузловий зоб (діаграма 3).

При солітарних злоякісних вузлах ЩЗ рівень ТТГ у 20 (60,6 %) хворих становив від 1,5 до 7,0 мМО/л, у 15 (45,5 %) хворих на багатовузловий зоб коливався від 2,2 до 6,0 мМО/л.

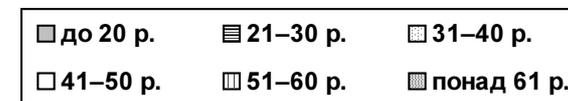
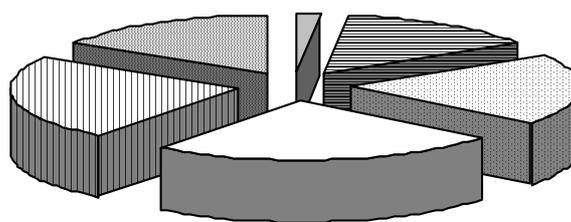
ВИСНОВКИ. 1. Концентрація ТТГ у хворих на вузловий зоб може бути предиктором розвитку раку щитоподібної залози.

2. При солітарних злоякісних вузлах щитоподібної залози рівень сироваткового ТТГ вищий.

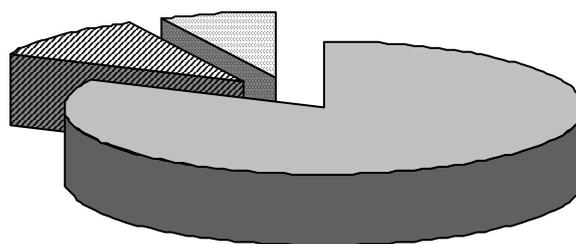
3. У всіх випадках анапластичного раку щитоподібної залози рівень ТТГ не перевищує норми.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

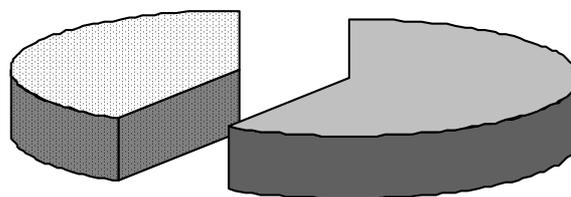
1. Клінічна ендокринологія в схемах і таблицях / [М. І. Швед, Н. В. Пасечко, Л. П. Мартинюк та ін.]. – Тернопіль : ТДМУ, 2006. – 344 с.
2. Паньків В. І. Практична тиреоїдологія / В. І. Паньків. – Донецьк : Видавець Заславський О. Ю., 2011. – 224 с.
3. Черненко О. В. Роль тиреотропного гормону у генезі раку щитоподібної залози / О. В. Черненко, В. Г. Хоперія // Клін. ендокринолог. та ендокрин. хір. – 2013. – № 2 (43). – С. 59–65.



Діаграма 1. Розподіл хворих із злоякісними новоутвореннями за віком.



Діаграма 2. Розподіл хворих за видом злоякісного утвору.



Діаграма 3. Розподіл хворих залежно від кількості вузлів.

4. Davies L. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002 / L. Davies, H. G. Welch // Journal of the American Medical Association. – 2006. – **295**. – P. 2164–2167.
5. Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule / L. Hegedus // New England Journal of Medicine. – 2004. – **351**. – P. 1764–1771.
6. Hegedus L. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives / L. Hegedus, S. J. Bonnema, F. N. Bennedbaek // Endocrine Reviews. – 2003. – **24**. – P. 102–132.

7. Higher serum TSH in thyroid cancer patients occurs independent of age and correlates with extra-thyroidal extension / M. R. Haymart, S. L. Glinberg, J. Liu [et al.] // *Clinical Endocrinology*. – 2009. – **71**. – P. 434–439.

8. Serum thyrotropin concentration as a biochemical predictor of thyroid malignancy in patients presenting with thyroid nodules / S. A. Polyzos, M. Kita, Z. Efstathiadou [et al.] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2008. – **134**. – P. 953–960.

В. И. Максимлюк

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ДИСФУНКЦИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ФОНЕ УЗЛОВЫХ ОБРАЗОВАНИЙ

Резюме

В статье приведены результаты исследования уровня тиреотропного гормона у больных с узловыми (злокачественными) образованиями щитовидной железы, которым была проведена тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия. Определение уровня этого гормона может быть лабораторным предиктором развития злокачественных новообразований щитовидной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тиреотропный гормон, щитовидная железа, тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия, узловые образования, злокачественные образования щитовидной железы.

V. I. Maksymlyuk

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPII STATE MEDICAL UNIVERSITY

THYROID GLAND DYSFUNCTION ON A BACKGROUND OF NODULAR LESIONS

Summary

The results of studies of thyroid stimulating hormone in patients with nodal (malignant) thyroid gland lesions who underwent fine needle aspiration puncture biopsy. Determining the level of this hormone may be a laboratory predictor of malignant thyroid gland tumors.

KEY WORDS: thyroid stimulating hormone, thyroid gland, fine needle aspiration puncture biopsy, nodal lesions, malignant lesions of the thyroid gland.

Отримано 02.04.14

Адреса для листування: В. І. Максимлюк, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

ЕКСПОНУВАННЯ α 1,2-ФУКОАНТИГЕНІВ НА ЛІМФОЦИТАХ ХВОРИХ НА ІСТИННУ ПОЛІЦИТЕМІЮ ТА СУБЛЕЙКЕМІЧНИЙ МІЄЛОЗ

Досліджували експонування α 1,2-фукозильованих глікополів на поверхні лімфоцитів у гематологічно здорових донорів та хворих на істинну поліцитемію, сублейкемічний мієлоз. Локалізацію глікополів визначали методом проточної цитометрії з використанням лектинів кори золотого дощу звичайного – LАВА та дроку англійського – UEA I, кон'югованих із флуоресцентними мітками. Кількість лімфоцитів, що взаємодіяли з ФІТЦ-UEA I, при сублейкемічному мієлозі та еритремії значно зростала ($p < 0,01$) порівняно з контрольною групою та складала (12,09±2,0) і (19,02±2,8) % відповідно. Водночас із кон'югатами ФІТЦ-LАВА зв'язувалося (2,02±0,30) і (11,0±1,04) % лімфоцитів хворих на сублейкемічний мієлоз та еритремію відповідно. Було відзначено їх значне і достовірне підвищення ($p < 0,01$) при досліджуваних лейкозах. При сублейкемічному мієлозі інтенсивність експонування фукоантигенів, що взаємодіяли з ФІТЦ-UEA I, на плазматичній мембрані лімфоцитів зростала вдесятеро, а при еритремії – в 100 разів. Разом із тим, інтенсивність експонування LАВА-зв'язувальних антигенів не змінювалась в обох досліджуваних групах порівняно з контрольною групою. Використання лектину UEA I в проточній цитометрії може бути додатковим критерієм для диференціації цих захворювань на тих стадіях, коли їх клінічні прояви дуже подібні.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: α 1,2-фукозильованість, лектини, лімфоцити, істинна поліцитемія, сублейкемічний мієлоз.

ВСТУП. Істинна поліцитемія (еритремія) є хронічним мієлопроліферативним захворюванням, доброякісним лейкозом, який характеризується підвищеним утворенням еритроцитів, нейтрофільних лейкоцитів і тромбоцитів. Часто симптоми захворювання з'являються лише на II стадії, що значно ускладнює своєчасну діагностику та лікування хворих. Крім того, симптоматичні ознаки істинної поліцитемії можуть бути ознакою інших захворювань. Одним із найбільш розповсюджених захворювань і тих, що мають спільну клінічну картину з еритремією, є сублейкемічний мієлоз – хронічний мієлолейкоз із клональною проліферацією кровотворних клітин. Характерною ознакою сублейкемічного мієлозу в термінальних стадіях є інтенсивна реакція стромы кісткового мозку, яка призводить до розвитку колагенового фіброзу [4].

Оскільки ці лейкози є так званими “liquid cancer”, дослідження клітин кровотоку з метою своєчасної діагностики та оцінювання стадії захворювання набуває великого значення, а використання методу проточної цитометрії є логічним і найбільш прийнятним інструментом для виконання такого завдання. Доведено, що © Г. С. Маслак, 2014.

при еритремії або сублейкемічному мієлозі мутацію JAK2 V617F гена відзначають не тільки в клітинах-попередниках лімфомієлоїдного ростка, але й у клітинах, що циркулюють у периферичній крові, в тому числі у лімфоцитах. Виявлення цього типу мутації майже завжди супроводжується ідентифікацією CD34+ антигенів на поверхні лімфоцитів, особливо Т-клітинної фракції [11]. Оскільки дані характеристики є загальними для обох типів мієлолейкозів, питання їх диференціювання залишається актуальним.

До фукоантигенів належать вуглеводні детермінанти на поверхні мембран клітин із термінальною або короною L-фукозою N- чи O-гліканів [13]. α 1,2-зв'язане термінальне фукозильювання спостерігають у складі Lewis антигенів (Le^x- та Le^y), які відсутні на клітинах здорової людини, але інтенсивно експонуються на їх поверхні за умов пухлинного росту. Такий тип фукозильювання на поверхні клітин змінює їх функції, прискорює процеси міграції клітин та метастазування і часто є поганим прогнозом для хворого [16].

Дослідження фукозильованості поверхневих глікокон'югатів в основному стосувалося поліпатентних клітин при мієлопроліферативних

захворюваннях та мало певні проблеми, оскільки потребувало додаткових процедур для отримання аспірату кісткового мозку [12]. Тому більш доступними та інформативними можуть бути дослідження методом проточної цитометрії клітин кровотоку, таких, як, наприклад, лімфоцити. За попередніми даними нашої лабораторії, поверхня цих клітин зазнає змін за умов мієлопроліферативних захворювань [2, 3]. Отже, метою роботи було дослідити $\alpha 1,2$ -фукозилізовані глікопротеїни на поверхні лімфоцитів хворих на істинну поліцитемію та сублейкемічний мієлоз.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження були лімфоцити крові хворих на істинну поліцитемію на стадії IIb із вираженим синдромом гіперв'язкості крові ($n=8$) та сублейкемічний мієлоз ($n=8$) віком 58–66 років. Контрольну групу становили гематологічно здорові волонтери ($n=10$) віком від 55 до 65 років.

Клінічне обстеження пацієнтів проводили згідно із стандартами медичної допомоги в умовах спеціалізованого стаціонару – гематологічного відділення комунального закладу “Міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4” (м. Дніпропетровськ). Усі обстежувані в письмовому вигляді давали згоду на участь у дослідженні.

Лімфоцити виділяли з гепаринізованої крові (20–25 ОД гепарину на 1 мл крові) за модифікованим методом А. Воуп (1976), який оснований на седиментації клітин в градієнті густини фікол-урографіну ($\rho=1,077$ г/мл) [1]. Для цього в центрифужну пластикову пробірку наливали 2–3 мл градієнта густини, на нього нашарували 4–6 мл відстояної та попередньо розведеної вдвічі у фізіологічному розчині плазми і верхній шар еритроцитів. Пробірки центрифугували впродовж 40 хв із прискоренням 200 g за кімнатної температури. Інтерфазне кільце з лімфоцитів відбирали в суху конічну центрифужну пробірку. Отриману суспензію клітин двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) таким чином: до суспензії лімфоцитів додавали 3–4 мл ЗФР, вміст пробірки ретельно перемішували і центрифугували з прискоренням 200–300 g за кімнатної температури, потім рідину над осадом відбирали. Після відмивання клітини ресуспендували в ЗФР, підраховували їх кількість у камері Горяєва. Життєздатність клітин (понад 90 %) визначали за допомогою триптанового синього (Д. К. Новиков, В. И. Новикова, 1996), готували робочу концентрацію лімфоцитів (300 тис./мл у кожному зразку) [7]. Фукозилізовані глікопротеїни визначали методом проточної цитофлуори-

метрії з використанням лектину кори золотого дощу звичайного – LABA – *Laburnum anagyroides lectin* (Лектинотест, Україна) та лектину дроку англійського – UEA I – *Ulex europaeus agglutinin* (EU Laboratories, Switzerland), кон'югованих із флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ). Кількість мертвих клітин контролювали за їх зв'язуванням із пропідій йодидом. Реєстрацію даних проводили на проточному цитометрі Beckman Coulter EPICS. Обробку результатів здійснювали за допомогою програми FC Express.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм Statistics 6.0. Достовірність відмінностей у групах порівняння встановлювали з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження експонування фукоантигенів на поверхні лімфоцитів проводили, використовуючи фукозоспецифічні аглютиніни рослинного походження: лектин кори золотого дощу звичайного – LABA та лектин дроку англійського – UEA I. За даними V. E. Piskarev (2007), застосування цих лектинів може відображати наявність $\alpha 1,2$ -фукозилізованих антигенів [13], оскільки вони мають найбільшу спорідненість до послідовності $Fuc\alpha(1,2)Gal\beta 1-R$.

Дослідження лімфоцитів із поверхневими фукоантигенами в гематологічно здорових донорів показали їх незначну кількість: $(2,9\pm 0,2)$ % за зв'язуванням з UEA I та $(0,9\pm 0,1)$ % – з LABA (рис. 1). Разом із тим, за умов сублейкемічного мієлозу та еритремії ці показники значно зростали ($p<0,01$). Кількість лімфоцитів, що взаємодіяли з ФІТЦ-UEA I, складала $(12,09\pm 2,0)$ і $(19,02\pm 2,8)$ % при субмієлозі та еритремії відповідно. Водночас із, кон'югатами ФІТЦ-LABA зв'язувалося лише $(2,02\pm 0,30)$ і $(11,0\pm 1,04)$ % лімфоцитів хворих на сублейкемічний мієлоз та еритремію відповідно.

Дослідження інтенсивності експонування фукоантигенів, що взаємодіяли з ФІТЦ-UEA I, на плазматичній мембрані лімфоцитів показали їх значне і достовірне підвищення ($p<0,01$) при досліджуваних лейкозах. При сублейкемічному мієлозі цей показник зростав вдесятеро, а при еритремії – в 100 разів (рис. 2, А). Разом із тим, інтенсивність експонування LABA-зв'язувальних антигенів не змінювалась в обох досліджуваних групах порівняно з контрольною групою (рис. 2, В).

Згідно з отриманими результатами, при мієлопроліферативних захворюваннях визначається перерозподіл лімфоцитів крові за експонуванням на них фукоантигенів порівняно з

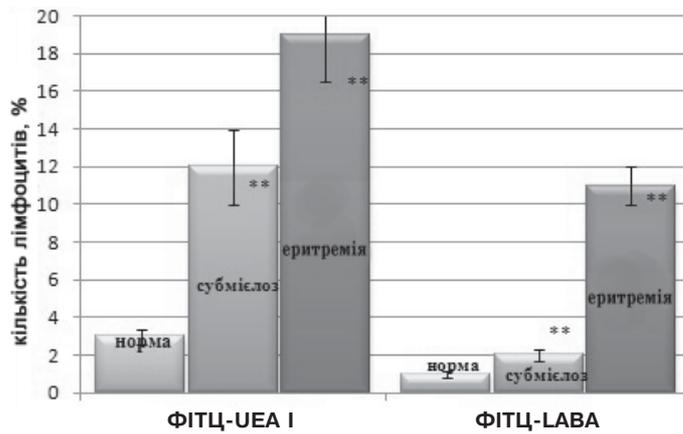


Рис. 1. Кількість лімфоцитів крові хворих на сублейкемічний мієлоз і еритремію та гематологічно здорових донорів із поверхневою локалізацією фукоантигенів, виявлених за допомогою мічених флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ) лектину кори золотого дощу звичайного – LABA та лектину дроку англійського – UEA I (* – вірогідна різниця порівняно з контрольною групою норми при $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$).

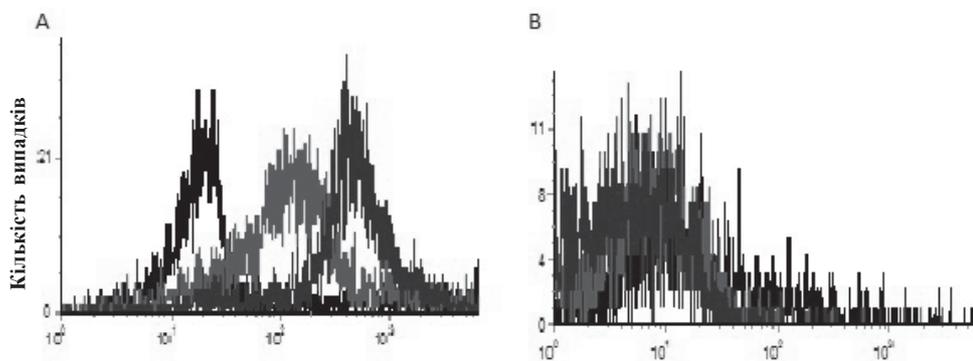


Рис. 2. Інтенсивність флуоресценції ФІТЦ-UEA I (А) і ФІТЦ-LABA (В) на лімфоцитах гематологічно здорового донора (чорна лінія), хворого на сублейкемічний мієлоз (червона лінія) і хворого на еритремію (синя лінія) за даними проточної цитометрії на Beckman Coulter EPICS.

групою гематологічно здорових донорів. Значно зростає не тільки кількість клітин, що зв'язуються з фукозоспецифічними лектинами, але й інтенсивність експонування фукоантигенів на їх поверхні. Слід звернути увагу на різні результати у хворих на еритремію та субмієлоз щодо як кількості клітин, так і інтенсивності їх зв'язування з фукозоспецифічними лектинами. Найбільшу різницю за цими параметрами було отримано при використанні лектину UEA I. Його пухлинспецифічність доведено при генітоуринарних та ендометріальних карциномах, раку легенів [9]. Також робили спроби використати даний лектин у діагностичному напрямку при мієлопроліферативних захворюваннях. S. Y. Yoon та ін. на біопсійних мазках мегакаріоцитів спинного мозку хворих на хронічні мієлопроліферативні захворювання показали не тільки різний ступінь зв'язування UEA I порівняно зі здоровими донорами, але й залежність інтенсивності взаємодії цього лектину від впливу анагреліду – препарату, який призначають таким хворим для контролю процесів тромбоцитозу [8]. Однак подальші дослідження в цьому напрямку довели більшу ефективність

використання UEA I разом із додатковим маркером – фактором Віллебранда [10].

Перерозподіл глікокон'югатів із $\alpha 1,2$ -фукозильованими детермінантами при мієлопроліферативних захворюваннях тісно пов'язаний з експресією та активністю ензиму посттрансляційної модифікації – $\alpha 1,2$ -фукозилтрансферази, яка транспортує фукозу на попередник лактозамінового типу [7]. S. Mathieu та ін. показали, що експресія $\alpha 1,2$ -фукозилтрансферази селективно гальмує синтез sialyl-Lewis антигенів на різних клітинах, у тому числі й лейкоцитах, та призводить до порушень взаємодії таких клітин та розповсюдження метастазів [14]. Можливо, такі самі процеси супроводжують перебіг мієлопроліферативних лейкозів, які було досліджено. Крім того, важливе значення мають CD-антигени, які з'являються при розвитку цих захворювань. CD34+ синтезується практично на всіх клітинах крові та є мікрогетерогенним білком, модифікації якого, в тому числі й ступеня фукозилювання, призводять до порушень процесів міжклітинної взаємодії при пухлинних процесах [15]. За даними B. Andreasson, завдяки різному ступеню експонування

CD34+ антигену можна розрізнити еритремію, тромбоцитемію та мієлофіброз, який є проявом сублейкемічного мієлозу [6]. Отже, можливо, зміни α 1,2-фукозилування, отримані нами за допомогою проточної цитометрії, пов'язані саме з порушенням процесів посттрансляційної модифікації глікопротеїнів, синтез яких прискорюється при мієлопроліферативних захворюваннях.

Глікокон'югати клітинної поверхні мають фундаментальне значення в різноманітних біологічних процесах, таких, як міжклітинна взаємодія, адгезія, мембранна організація та клітинна імуногенність, а модифікація їх структури призводить до зміни функціонування клітини. Тому пов'язане з хворобою порушення глікозилуваності має великий потенціал як джерело пухлиноасоційованих маркерів для модуляції імунної відповіді та визначення поведінки пухлини [5]. Отримані в роботі результати можуть бути корисними для розуміння глікобіологічних процесів перебігу еритремії та сублейкемічного мієлозу, викорис-

тання лектину UEA I в проточній цитометрії може бути додатковим критерієм для диференціації цих захворювань на тих стадіях, коли їх клінічні прояви дуже подібні.

ВИСНОВКИ. 1. Кількість лімфоцитів із фукоантигенами, які взаємодіють з ФІТЦ-LABA, зростає, порівняно з групою гематологічно здорових донорів, удвічі та вдесятеро при сублейкемічному мієлозі й еритремії відповідно.

2. Рівень клітин, які взаємодіють з UEA I, також підвищується, порівняно з групою контролю, при субмієлозі та еритремії в 4 і майже 7 разів відповідно.

3. При сублейкемічному мієлозі інтенсивність експонування фукоантигенів, що взаємодіють з ФІТЦ-UEA I, на плазматичній мембрані лімфоцитів зростає вдесятеро, а при еритремії – в 100 разів.

4. Інтенсивність експонування LABA-зв'язувальних антигенів не змінюється в групах хворих на мієлопроліферативні захворювання порівняно з контрольною групою.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Иммунология: практикум : учеб. пособ. / под ред. Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 176 с.
2. Маслак А. С. Распределение гранулоцитов с поверхностными гликопротеинами в норме и при миелопролиферативных заболеваниях / А. С. Маслак // Актуальные проблемы биологии и медицины. – 1. – С. 29–31.
3. Маслак Г. С. Порівняльний аналіз лімфоцитів крові хворих на гострі та хронічні мієлолейкози за експонованими на поверхні внутрішньоклітинними глікопротеїнами / Г. С. Маслак // Біологічні Студії. – 2014. – 8, № 1. – С. 117–124.
4. Особенности структурной организации костного мозга при различных стадиях миелофиброза с миелоидной метаплазией / И. Н. Кабаченко, В. Г. Бебешко, А. Н. Грабовой [и др.] // Вісник морфології. – 2005. – № 2. – С. 164–168.
5. Adamczyk B. Glycans as cancer biomarkers / B. Adamczyk, T. Tharmalingam, P. M. Rudd // Biochim Biophys Acta. – 2012. – 20, № 9. – P. 1347–1353.
6. Andreasson B. Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD34+ cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythemia vera and essential thrombocythaemia / B. Andreasson, B. Swolin, J. Kutti // Eur. J. Haematol. – 2002. – 68, № 4. – P. 189–193.
7. Becker D. J. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals / D. J. Becker, J. B. Lowe // Glycobiology. – 2003. – 13, № 7. – P. 41–53.
8. Bone marrow effects of anagrelide therapy in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia / S. Y. Yoon, C. Y. Li, R. A. Mesa [et al.] // Br. J. Haematol. – 1999. – 106, № 3. – P. 682–688.
9. Characterization of lectins and their specificity in carcinomas—An appraisal / F. S. Asma, M. Sameena, F. Khan [et al.] // Indian J. Clin. Biochem. – 2003. – 18, № 2. – P. 169–180.
10. Chuang S. S. von Willebrand factor is the most reliable immunohistochemical marker for megakaryocytes of myelodysplastic syndrome and chronic myeloproliferative disorders / S. S. Chuang, Y. C. Jung, C. Y. Li // Am. J. Clin. Pathol. – 2000. – 113, № 4. – P. 506–511.
11. Delhommeau F. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis / F. Delhommeau, S. Dupont, C. Tonetti // Blood. – 2007. – 109, № 1. – P. 71–77.
12. Fucose binding lectin for characterizing acute myeloid leukemia progenitor cells / R. Delwel, I. Touw, F. Bot [et al.] // Blood. – 1986. – 68, № 1. – P. 41–45.
13. Piskarev V. E. Interaction of the Laburnum anagyroides lectin with fucoantigens / V. E. Piskarev, T. L. Bushueva, I. A. Iamskov // Bioorg. Khim. – 2007. – 33, № 1. – P. 182–186.
14. Transgene expression of alpha(1,2)-fucosyltransferase-I (FUT1) in tumor cells selectively inhibits sialyl-Lewis x expression and binding to E-selectin without affecting synthesis of sialyl-Lewis a or binding to P-selectin

tin / S. Mathieu, M. Prorok, A. M. Benoliel [et al.] // Am. J. Pathol. – 2004. – 164, № 2. – P. 371–383.

15. Tuccillo F. M. Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43 / F. M. Tuccillo, A. Laurentiis, C. Palmieri // BioMed. Research International. – 2014. – 742.

16. Zerfaoui M. $\alpha(1,2)$ -Fucosylation prevents sialyl Lewis x expression and E-selectin-mediated adhesion of fucosyltransferase VII-transfected cells / M. Zerfaoui, M. Fukuda, V. Sbarra // European Journal of Biochemistry. – 2001. – 267, № 1. – P. 53–61.

А. С. Маслак

ДНЕПРОПЕТРОВСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

ЭКСПОНИРОВАНИЕ $\alpha(1,2)$ -ФУКОАНТИГЕНОВ НА ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИЕЙ И СУБЛЕЙКЕМИЧЕСКИМ МИЕЛОЗОМ

Резюме

Исследовали экспонирование $\alpha(1,2)$ -фукозилированных гликотопов на поверхности лимфоцитов у гематологически здоровых доноров и больных истинной полицитемией, сублейкемическим миелозом. Локализацию гликотопов определяли методом проточной цитометрии с использованием лектинов коры золотого дождя обычного – LABA и дрока английского – UEA I, конъюгированных с флуоресцентными метками. Количество лимфоцитов, которые взаимодействовали с ФИТЦ-UEA I, при сублейкемическом миелозе и эритремии значительно возрастало ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой и составляло $(12,09 \pm 2,0)$ и $(19,02 \pm 2,8)$ % соответственно. В то же время с конъюгатами ФИТЦ-LABA связывалось $(2,02 \pm 0,30)$ и $(11,0 \pm 1,04)$ % лимфоцитов больных сублейкемическим миелозом и эритремией соответственно. Было отмечено их значительное и достоверное повышение ($p < 0,01$) при исследуемых лейкозах. При сублейкемическом миелозе интенсивность экспонирования фукоантигенов, которые взаимодействовали с ФИТЦ-UEA I, на плазматической мембране лимфоцитов возрастала в 10 раз, а при эритремии – в 100 раз. В то же время интенсивность экспонирования LABA-связывающих антигенов не изменялась в обеих исследуемых группах по сравнению с контрольной группой. Использование лектина UEA I в проточной цитометрии может быть дополнительным критерием для дифференциации этих заболеваний на тех стадиях, когда их клинические проявления очень сходны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: $\alpha(1,2)$ -фукозилированность, лектины, лимфоциты, истинная полицитемия, сублейкемический миелоз.

H. S. Maslak

DNIPROPETROVSK MEDICAL ACADEMY

$\alpha(1,2)$ -FUCOANTIGENS EXPONATION ON LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH POLYCYTHEMIA VERA AND SUBLEUKEMIC MIELOSIS

Summary

$\alpha(1,2)$ -fucosylated glycotopes exponation on the surface of lymphocytes from hematologically healthy donors and patients with polycythemia vera and subleukemic myelosis were investigated. Glycotopes localization was investigated by flow cytometry using lectins from the bark of Golden Rain shrub – LABA and lectin from gorse seeds – UEA I conjugated with fluorescent labels. The number of lymphocytes that interact with FITC-UEA I at subleukemic mieloses and polycythemia vera was significantly increased ($p < 0.01$) compared with the control group and was (12.09 ± 2.0) and (19.02 ± 2.8) %, respectively. An intensity of fukoantigens exponation that interact with FITC-UEA I on the plasma membrane of lymphocytes increased tenfold in subleukemic mieloses patients and in 100 times for polycythemia vera patients. At the same time exhibiting intensity of LABA- binding antigens not changed in both studied groups as compared with the control group. Using lectin UEA I in flow cytometry be effective criteria to differentiated these diseases on the stage when their clinical manifestations very similar.

KEY WORDS: $\alpha(1,2)$ -fucosylation, lectins, lymphocytes, polycythemia vera, subleukemic mieloses.

Отримано 25.03.14

Адреса для листування: Г. С. Маслак, Дніпропетровська медична академія, вул. Весела, 30 а, Дніпропетровськ, 49024, Україна.

РІВЕНЬ ІМУНОЛОГІЧНОЇ АДАПТАЦІЇ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ПАРОДОНТИТІ НА ТЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

При експериментальному пародонтиті на тлі стрептозотоциніндукованого цукрового діабету 2 типу визначали стан гуморальної ланки імунної системи. Встановлено дисбаланс основних показників імуноглобулінів у сироватці крові на тлі даних патологій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **цукровий діабет 2 типу, пародонтит, імуноглобуліни.**

ВСТУП. Актуальність проблеми пов'язана зі значним поширенням цукрового діабету (ЦД) серед населення. Дані літератури свідчать про те, що найпоширенішим є інсулінонезалежний цукровий діабет 2 типу, який у певних вікових групах перевищує епідемічний поріг та становить 12 % [2, 3, 5, 8, 15]. Цукровий діабет – це хронічне ендокринно-обмінне захворювання, зумовлене абсолютною (порушення утворення) або відносною (порушення дії) недостатністю інсуліну внаслідок дії різноманітних ендотажних факторів, що супроводжується порушенням усіх видів обміну речовин, перш за все вуглеводного з найбільш характерним його проявом – гіперглікемією, ураженням різних органів і тканин, насамперед судин та нервів [4, 6, 9, 10, 13].

Захворювання тканин пародонта є одним з ускладнень ЦД поряд із серцево-судинними патологіями, нефропатією, нейропатією та порушенням регенерації тканин [1, 3, 17, 18].

Метою даного дослідження було вивчити вплив гіперглікемії в крові на гуморальну ланку імунної системи та встановити взаємозв'язок між ними при пародонтиті на тлі стрептозотоциніндукованого цукрового діабету 2 типу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Було проведено дослідження на білих безпородних щурах обох статей, отриманих з віварію Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського, згідно з вимогами Правил проведення роботи з використанням експериментальних тварин [11]. Тварини отримували звичайний раціон харчування та мали цілодобовий

© К. М. Дуда, 2014.

доступ до води. Експериментальне моделювання цукрового діабету 2 типу проводили шляхом одноразового внутрішньочеревного введення щурам масою (200±20) г розчину стрептозотоцину з розрахунку 65 мг/кг, який розводили цитратним буфером (рН 4,5), з попереднім (за 15 хв) введенням нікотинаміду в дозі 230 мг/кг [16]. Для контрольної групи ми використовували тварин з тією ж масою, яким вводили аналогічний об'єм розчинника (цитратний буфер із рН 4,5). За даними ряду авторів [14], попереднє введення нікотинаміду підвищує стійкість β-клітин острівців Лангенгарса до пошкоджувальної дії стрептозотоцину, це дозволяє моделювати стан, що значною мірою відповідає змінам, характерним для ЦД 2 типу. Здійснювали контроль за рівнем глюкози у крові глюкозооксидазним методом із застосуванням наборів "Філісіт-діагностика" (Україна) на аналізаторі "Humalyser 2000", рівнем глюкози в сечі й наявністю кетонів у сечі з використанням напівавтоматичного аналізатора сечі "Combilyzerplus", ступенем толерантності до навантаження глюкозою [7].

Вплив стрептозотоциніндукованого цукрового діабету 2 типу на патогенез пародонтиту вивчали методом моделювання гострої травми тканин десни [12]. Щурам з вестибулярної сторони до тканин пародонта нижнього різця підводили робочу голівку ультразвукового скейлера ART (Великобританія) та протягом 60 с направляли ультразвукову хвилю частотою 50 МГц. Через 1 та 8 днів здійснювали декапітацію щурів під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг). Досліджували клітинну (CD-4, CD-8) ланку імунітету імунофлуоресцентним методом

за допомогою моноклональних антитіл до CD-4 і CD-8 антигенів щура, кон'югованих із флуоресцеїн ізотіоціанатом (FITC) виробництва "BeckmanCoulter" (США). Імунореактивність організму вивчали за вмістом сироваткових імуноглобулінів (Ig) А, М, G методом твердофазового імуноферментного аналізу за допомогою набору реагентів "eBioscience, Inc" із використанням аналізатора "StatFax". Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень університету в програмному пакеті Statsoft STATISTIKA.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз показників клітинного імунітету вказує на суттєві відмінності між досліджуваними групами тварин. У щурів із ЦД 2 типу показник CD-4 лімфоцитів був на 28 % нижчим, ніж у здорових тварин. Дещо менше зниження відмічено стосовно CD-8 лімфоцитів – на 12 % від норми, що призвело до зниження імунорегуляторного індексу з $1,52 \pm 0,06$ до $1,25 \pm 0,04$. На сьогодні рівень імунорегуляторного індексу оцінюють при зіставленні з фазою імунної відповіді. У період розпалу клінічних проявів запального процесу імунорегуляторний індекс сягає високих значень за рахунок великого відсоткового вмісту Т-хелперів (CD-4 Т-клітин). У період реконвалесценції значення показника зменшується у зв'язку з наростанням рівня CD-8 Т-клітин (кілерів). Порушення такої закономірності свідчить про неадекватність імунної реакції та можливість хронізації процесу через неповну ерадикацію збудника.

Моделювання гострого пародонтиту супроводжувалося різнонаправленими змінами показників клітинного імунітету. Зокрема, на 2-гу добу показник CD-4 у тварин склав 120 % від рівня здорових, а CD-8 – 110 %, що спричинило зростання імунорегуляторного індексу в 1,17 раза. Достовірні зміни ми відмітили і на 8-му добу: CD-4 склав 121 % від норми, CD-8 – 105 %. Такі зміни проявлялися дещо меншим збільшенням співвідношення CD-4/CD-8, яке становило $1,74 \pm 0,04$. Отже, у тварин спостерігали нормальний перебіг запального процесу з переважанням зростання Т-хелперів над рівнем цитотоксичних Т-лімфоцитів і, відповідно, підвищенням імунорегуляторного індексу (табл. 1).

У щурів, в яких гострий пародонтит моделювали на тлі ЦД 2 типу, зміни мали протилежний напрямок. Вміст CD-4 лімфоцитів на 2-гу добу, порівняно зі здоровими тваринами, вірогідно зменшився і становив 55 % від їх рівня, це спричинило значне зниження імунорегуляторного індексу – до $0,97 \pm 0,04$, що склало 64 % від показника здорових щурів. На 8-му добу експерименту показник CD-4 клітин був ще меншим, становлячи 49 % від норми, а CD-8 – 81 %. Імунорегуляторний індекс знизився ще більше і склав $0,92 \pm 0,04$, що на 74 % менше, ніж в інтактних тварин (табл. 1).

Таким чином, у тварин з пародонтитом на тлі ЦД 2 типу відзначили суттєве зниження CD-4 лімфоцитів, порушення співвідношення основних субпопуляцій лімфоцитів (CD-4 і CD-8), що супроводжувалося достовірним зменшенням

Таблиця 1 – Показники клітинної ланки імунітету у тварин з гострим пародонтитом на тлі цукрового діабету 2 типу ($M \pm m$)

Показник група тварин	Група тварин					
	інтактні (n=10)	ЦД 2 типу (n=10)	гострий пародонтит		гострий пародонтит+ЦД 2 типу	
			2-га доба (n=7)	8-ма доба (n=7)	2-га доба (n=7)	8-ма доба (n=7)
CD-4, %	$39,43 \pm 0,73$	$28,32 \pm 0,62$ $p < 0,05$	$50,49 \pm 0,67$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	$47,73 \pm 1,09$ $p < 0,05$ $p_2 < 0,05$	$21,61 \pm 0,70$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	$19,51 \pm 0,83$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
CD-8, %	$26,03 \pm 0,83$	$22,85 \pm 0,85$ $p < 0,05$	$28,59 \pm 0,67$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	$27,33 \pm 0,53$ $p > 0,05$ $p_2 < 0,05$	$22,31 \pm 0,60$ $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$	$21,21 \pm 0,39$ $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$
Імунорегуляторний індекс CD-4/CD-8	$1,52 \pm 0,06$	$1,25 \pm 0,04$ $p < 0,05$	$1,77 \pm 0,05$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	$1,76 \pm 0,06$ $p < 0,05$ $p_2 < 0,05$	$0,97 \pm 0,04$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	$0,92 \pm 0,04$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примітки. Тут і в таблиці 2:

1. p – достовірність різниці порівняно з інтактними тваринами.
2. p_1 – достовірність різниці порівняно з тваринами, в яких моделювали цукровий діабет 2 типу.
3. p_2 – достовірність різниці тварин із гострим пародонтитом на тлі цукрового діабету 2 типу порівняно з нормоглікемічними тваринами з гострим пародонтитом.

імунорегуляторного індексу. Виявлена недостатність клітинної ланки імунної відповіді відображає посилення взаємного негативного впливу запального процесу в пародонті й системних порушень імунного захисту за умов супутньої гіперглікемії, спричиненої моделюванням цукрового діабету 2 типу.

Для оцінки стану гуморального імунітету при пародонтиті на тлі цукрового діабету 2 типу було визначено рівень IgG, IgM, IgA в сироватці крові (табл. 2). Спостерігали зниження кон-

центрації імуноглобулінів у сироватці крові щурів на тлі цієї патології. Так, після моделювання ЦД відбулись зміни показників гуморального імунітету, зокрема рівень IgG зменшився в 1,8 раза, IgM – у 2 рази та IgA – в 1,7 раза ($p < 0,01$). Результати наших досліджень свідчать про те, що хронічна гіперглікемія призводила до зниження резистентності гуморальної ланки імунної системи при антигенній стимуляції та до вторинних імунодефіцитних станів.

Таблиця 2 – Рівень імуноглобулінів у сироватці крові щурів з пародонтитом на тлі стрептозотоциніндукованого цукрового діабету 2 типу ($M \pm m$)

Показник	Група тварин					
	інтактні (n=10)	ЦД 2 типу (n=10)	гострий пародонтит		ЦД 2 типу+гострий пародонтит	
			2-га доба (n=6)	8-ма доба (n=6)	2-га доба (n=6)	8-ма доба (n=6)
IgG	6,75±0,14	3,8±0,08 $p < 0,05$	5,67±0,14 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	5,73±0,13 $p < 0,05$ $p_2 > 0,05$	6,03±0,19 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	5,87±0,06 $p < 0,05$ $p_2 > 0,05$
IgM	3,78±0,18	1,9±0,11 $p < 0,05$	6,08±0,15 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	3,65±0,11 $p > 0,05$ $p_2 < 0,05$	2,82±0,12 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	4,77±0,19 $p < 0,05$ $p_2 < 0,05$
IgA	1,77±0,06	1,03±0,05 $p < 0,05$	2,5±0,05 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	2,33±0,11 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	1,3±0,09 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	1,23±0,06 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$

Доведено, що у тварин з пародонтитом IgG на 2-гу добу становив 84 %, IgM – 161 %, а IgA – 141 % стосовно контрольної групи. Гіперпродукція імуноглобулінів у крові свідчила про надлишок токсинів та антигенів при пародонтиті. Тоді як на 8-му добу моделювання пародонтиту IgM, IgA дорівнювали 97 та 132 % відповідно, як ми бачимо (табл. 2), показник IgG практично не змінився та складав 85 %. Отримані результати вказують на те, що у тварин при експериментальному пародонтиті на 2-гу добу відбулась активація імуноглобулінів з крові з подальшим пригніченням механізмів адаптації, що проявлялось зменшенням синтезу IgG, IgM та IgA порівняно з контрольною групою.

При моделюванні пародонтиту на тлі цукрового діабету 2 типу ми відзначали зниження рівня імуноглобулінів у крові вже на 2-гу добу. Так, показник IgG був у 1,2 раза нижчим, ніж у контрольній групі, IgM – в 1,2 раза, IgA – в 1,4 раза. Потрібно зауважити, що рівень імуноглобулінів у експериментальних тварин з гострим пародонтитом на тлі цукрового діабету 2 типу значно перевищував такий у групі щурів із цукровим діабетом 2 типу. На 8-му добу моде-

лювання пародонтиту на тлі цукрового діабету 2 типу показник IgG дещо зменшився та становив 97 %, тоді як IgM дорівнював 126 %, а IgA – 70 % відносно 2-ї доби.

ВИСНОВКИ. 1. У тварин з пародонтитом на тлі цукрового діабету 2 типу відзначили суттєве зниження CD-4 лімфоцитів, порушення співвідношення основних субпопуляцій лімфоцитів (CD-4 і CD-8), що супроводжувалось достовірним зменшенням імунорегуляторного індексу. Виявлена недостатність клітинної ланки імунної відповіді відображає посилення взаємного негативного впливу запального процесу в пародонті й системних порушень імунного захисту за умов супутньої гіперглікемії, спричиненої моделюванням цукрового діабету 2 типу.

2. Існує прямий зв'язок рівня глюкози в крові щурів та показників імуноглобулінів класів А, G, M. Доведено, що при гострому пародонтиті на тлі стрептозотоциніндукованого цукрового діабету 2 типу порушується функціональність імунної системи, що проявляється дисбалансом імуноглобулінів у кров'яному руслі та зниженням резистентності гуморальної ланки імунної системи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексеева О. А. Роль коррекции общего и местного иммунного статуса и биохимических показателей ротовой жидкости в комплексной терапии пародонтита при сахарном диабете : дисс. ... канд. мед. наук / О. А. Алексеева. – Рязань, 2001. – 169 с.
2. Бажора Ю. І. Механізми макромолекулярних взаємодій у системному гомеостазі при формуванні первинної імунної відповіді в експерименті / Ю. І. Бажора, Ю. В. Петрашевич // Бук. мед. вісник. – 2001. – 5, № 3. – С. 162–167.
3. Воложин А. И. Патогенетические механизмы поражения пародонта при сахарном диабете / А. И. Воложин // Стоматология нового тысячелетия : сб. тезисов. – М. : Авиаиздат, 2002. – С. 130–131.
4. Горбачева И. А. Единство системных патогенетических механизмов при заболеваниях внутренних органов, ассоциированных с генерализованным пародонтитом / И. А. Горбачева, А. И. Кирсанов, Л. Ю. Орехова // Стоматология. – 2004. – № 3. – С. 13–15.
5. Демидова И. Сахарный диабет 2 типа: патогенез и лечение / И. Демидова // Врач. – 2000. – № 1. – С. 16–19.
6. Джураева Ш. Ф. Распространенность и интенсивность заболеваний пародонта при сахарном диабете / Ш. Ф. Джураева, Ш. С. Анварова, Г. Г. Ашуров // Стоматология Таджикистана. – Душанбе, 2006. – № 4. – С. 40–42.
7. Ибрагимов Т. И. Прогнозирование эффективности лечения пародонтита на фоне сахарного диабета / Т. И. Ибрагимов, И. Ю. Лебедеко, С. Д. Арутюнов // Terramedica. – 2001. – № 4 (24). – С. 30–32.
8. Кирилюк М. Л. Сучасні клініко-патофізіологічні аспекти цукрового діабету 2 типу / М. Л. Кирилюк, О. Д. Гавловський // Інтегративна антропологія. – 2009. – № 2 (14). – С. 40–44.
9. Лянова Д. К. Роль иммунной активации в развитии воспалительных заболеваний пародонта у больных сахарным диабетом / Д. К. Лянова, Ф. Ю. Даурова // Пародонтология. – 2006. – № 1. – С. 22–26.
10. Мащенко И. С. Иммунологические и гормональные аспекты патогенеза генерализованного пародонтита / И. С. Мащенко // Вісник стоматології. Спеціальний випуск. – 2003. – № 1. – С. 19–24.
11. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожемякін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.
12. Пат. на корисну модель № 65771. Спосіб моделювання пародонтиту / Мачоган В. Р., Авдеев О. В. – 2011. – Бюл. № 23.
13. Слонова В. М. Роль иммуновоспалительной активации в развитии воспалительных заболеваний пародонта у больных сахарным диабетом / В. М. Слонова, А. И. Галабуева, Л. В. Цокова // Сборник научных трудов центра социально-гуманитарного образования СОГУ. – Владикавказ, 2008. – С. 156–162.
14. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 / А. А. Спасов, М. П. Воронкова, Г. Л. Снигур [и др.] // Биомедицина. – 2011. – № 3. – С. 12–18.
15. Islam S. Experimental rodent model of type 2 diabetes: a review / S. Islam, D. T. Loots // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. – 2009. – № 31(4). – P. 249–261.
16. Islam S. Nongenetic Model of Type 2 Diabetes: A Comparative Study / S. Islam, H. Choi // Pharmacology. – 2007. – № 79. – P. 243–249.
17. Loe H. Periodontal Disease. The sixth Complication of Diabetes Mellitus / H. Loe // Diabetes Care. – 1999. – 16. – P. 329–334.
18. Teng Y. T. The role of acquired immunity and periodontal disease / Y. T. Teng // Crit. Res. Oral. Biol. Med. – 2003. – 14. – P. 237–252.

Е. М. Дуда

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

УРОВЕНЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ПАРОДОНТИТЕ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Резюме

При экспериментальном пародонтите на фоне стрептозотоцининдуцированного сахарного диабета 2 типа определяли состояние гуморального звена иммунной системы. Установлено дисбаланс основных показателей иммуноглобулинов в сыворотке крови на фоне данных патологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет 2 типа, пародонтит, иммуноглобулины.

LEVEL OF IMMUNE ADAPTATION IN THE SERUM OF RATS WITH PERIODONTITIS ON THE BACKGROUND OF TYPE 2 DIABETES

Summary

In experimental paradontitis in the background of streptozotocin-induced diabetes type 2 status was determined humoral immune system. Established imbalance of key indicators immunoglobulins in serum on the background this pathologies.

KEY WORDS: **diabetestype 2, periodontaldisease, immunoglobulins.**

Отримано 29.04.14

Адреса для листування: *К. М. Дуда, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.*

A. L. Zahayko, H. B. Kravchenko, Yu. I. Kochubey
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

PROSPECTS FOR THE JNK KINASE INHIBITORS USE IN THE TREATMENT OF DYSLIPIDEMIC CONDITIONS

Numerous works have been devoted to the JNK regulatory pathways studies since the disorders of JNK activity were observed during carcinogenesis, neurodegenerative processes, cardiovascular diseases, diabetes, etc. Accumulating evidence supports a potential role of the JNK kinases inhibitors in treatment of obesity, metabolic syndrome, diabetes, etc. This discussion devoted to the prospects for their use in treatment of dyslipidemia associated pathologies.

KEY WORDS: **JNK-kinase, JNK-kinase inhibitors, dyslipidemia.**

INTRODUCTION. c-Jun N-terminal kinases (JNK) are members of a large group of stress-activated serine/threonine mitogen-activated protein kinases (MAPK), which are involved in the regulation of important cellular processes such as proliferation, differentiation, apoptosis, inflammation, and more [6, 25, 28]. Numerous works have been devoted to the JNK regulatory pathways studies since the disorders of JNK activity were observed during carcinogenesis, neurodegenerative processes, cardiovascular diseases, diabetes, etc. This enzyme is considered as a potential therapeutic target for pharmacological approach to therapy of diseases associated with the JNK activation. Taking into account the fact that this issue has been widely discussed in different publications, we expect to clarify the JNK participation in the dyslipidemic states development, as well as to analyze the effectiveness of the most widely used inhibitors of JNK in experimental studies. This discussion can open the prospects for their use in treatment of dyslipidemia associated pathologies.

DISCUSSION. Jun amino-terminal kinases. In mammals, JNKs are encoded by three different genes (JNK1, JNK2 and JNK3). Multiple molecular forms result from alternative splicing, thereby increasing the amount of 10 different protein products from 46 kDa to 55 kDa [26]. JNK1 and JNK2 are found in various tissues, the expression of JNK3 is restricted mainly in the brain, heart and testicle.

Structure of the JNK kinases is well studied. They have a typical structure characteristic of eukaryotic protein kinases: consist of two do-

main. N-terminal domain is rich of β -structures and C-terminal domain rich of α -helices. These two fragments were joined together site, which interacts with the JNK substrate. ATP molecules also bind near the domain surface [6]. All these structures have been identified for the inactive forms of JNK. Important changes in the structure were observed after activated by phosphorylation of the enzyme.

Inflammatory signals, reactive oxygen species, ultraviolet radiation, protein synthesis inhibitors and a variety of stress stimuli activate JNK. Activation may occur through disruption of the conformation of sensitive protein phosphatase enzymes since specific phosphatases inhibit the activity of JNK.

JNK signaling pathway. JNKs are activated by MAPK kinases, such as MKK-4, MKK-6 and MKK-7 [23]. These kinases in turn are activated by MAPK3 and, such as ASK1 – the adjustable kinase 1 – which is also known as a MAP3 kinases 5, the mixed lines of kinases (MLKs): MLK1, MLK2 and MLK3, MAP/ERK (the kinase regulated by extracellular signals) a kinase a kinase 1 – MEKK1, MEKK4 and transforming factor of growth (TGF)- β -activated kinase 1 – TAK1. JNK/MAP3 alarm ways are activated by MAP4 kinases which are connected with various cellular receptors sensitive to stress and inflammation, including death-receptors (Fas), receptors to inflammatory cytokines, tumor necrosis factor receptors - TNF- α and TGF- β , the receptors connected with G-protein (GPCRs) and receptors of anti-genes [25]. Signals are transmitted to JNK/MAP4 kinase through effector molecules and tyrosine kinases receptors and/or G-protein-coupled signal ways.

© A. L. Zahayko, H. B. Kravchenko, Yu. I. Kochubey, 2014.

ASK1 is connected with stress receptors, such as TNF- α receptors and Fas, and in turn are activated by thioredoxin binding to TNF receptor-associated factor 2 or proteins associated with death-domains [3].

At least 50 proteins have been identified as JNK substrates. These proteins control multiple cellular processes, acting either as transcription factors or by controlling protein degradation, localization, and signaling. JNK substrates include c-Jun, JunB, JunD, activating transcription factor 2, p53, c-Myc, serum response factor, insulin receptor substrate-1, JNK interacting protein 1 JIP1, 14-3-3, Sab SH3BP5, Bcl-2, Bcl-xL, Bid, Bim, Bad, Bax, and Mcl-1 [6, 25]. Among these substrates, c-Jun is a representative target of JNKs. c-Jun forms dimeric complexes with JunB, JunD, or Fos to form the transcription factor activator protein (AP)-1, whereas SRF controls expression of the Fos proteins [20].

JNK1 is involved in apoptosis, neurodegeneration, cell differentiation and proliferation, inflammation and cytokine production mediated by AP-1 (activation protein 1) such as RANTES, IL-8 and GM-CSF [6, 25, 26, 28].

JNK mediates the dyslipidemia states development. JNK activity, which is mainly related to the JNK1 isoform, is increased in obese mice. In response to a high fat diet or in the context of genetically obese rodents, JNK1-null animals gain less body weight and are less prone to altered insulin sensitivity [1]. Liver-specific down-regulation of JNK signaling improves insulin responsiveness in animal models of type 2 diabetes.

A functional role for JNK1 in obesity was shown by the finding that standard or high fat diet-fed *jnk1*^{-/-} but not *jnk2*^{-/-} mice had decreased weight gain attributed to a reduction in adipose tissue mass. JNK1 null mice also had decreased serum glucose and insulin levels and increased hepatic insulin signaling, indicating improved insulin sensitivity [15]. Effects on hepatic lipid accumulation were not examined. Although these studies suggested no JNK2 involvement in obesity and insulin resistance, the ability of JNK2 to oppose JNK1 phosphorylation of c-Jun suggested that the effect of a loss of JNK2 may be compensated for by increased JNK1 function. To address whether JNK2 contributed to this metabolic phenotype, *jnk2* null mice lacking one *jnk1* allele were examined. Mice lacking one *jnk1* and both *jnk2* alleles were protected from HFD-induced obesity but *jnk1*^{+/-} mice were not, indicating that JNK2 contributed to obesity.

Palmitic acid but not oleic acid induced insulin resistance in L6 myotubes through JNK and insulin receptor substrate 1 Ser307 phosphorylation.

Inhibitors of ceramide synthesis did not block insulin resistance by palmitic acid [19].

Obesity is associated with an increased risk of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Steatosis, the hallmark feature of NAFLD, occurs when the rate of hepatic fatty acid uptake from plasma and de novo fatty acid synthesis is greater than the rate of fatty acid oxidation and export. Although the mechanisms for development of steatosis and chronic liver injury in NAFLD remain unclear, recent investigations have indicated that overactivation of JNK is critical to this process [28].

Investigations in methionine- and choline-deficient (MCD) diet-induced murine steatohepatitis demonstrated that increased hepatic JNK, c-Jun and AP-1 signaling occurred in parallel with the development of lipid overaccumulation and hepatitis [21]. The MCD diet model of NASH is limited by the lack of the extrahepatic manifestations of the metabolic syndrome including obesity, dyslipidemia and peripheral insulin resistance [19].

Cytokines and ROS activate JNK, IKK- β , PKC and perhaps other stress- and inflammation-activated kinases in the pathogenesis of ROS-induced insulin resistance [13]. As JNK-1 deficiency results in reduced adiposity and improved insulin sensitivity, this also may be a key regulator of the OIC. Thus, all these kinases might be attractive pharmacological targets for increasing insulin sensitivity.

Initial data suggesting a role for JNK in atherosclerosis were based on observations that the macrophages and smooth muscle cells of human and animal model atheromatous plaques had prominently activated JNK signaling [16]. Further evidence was provided by Ricci et al. [24] by creating mice with macrophage-specific ablation of two of the JNK family members, JNK1 and JNK2, in an ApoE-null background.

Since JNKs comprise a central node in the inflammatory signaling network, it is not surprising that hyperactivation of JNK signaling is a very common finding in a number of disease states including cancer, inflammatory and neurodegenerative diseases. A significant body of genetic and pharmacological evidence suggests that inhibitors of JNK signaling may provide a promising therapeutic strategy: JNK3 knockout mice exhibit amelioration of neurodegeneration in animal models of Parkinson's and Alzheimer's disease [33]. JNK1 phosphorylates IRS-1, a key molecule in the insulin-sensing pathway which down-regulates insulin signaling and JNK1 knockout mice are resistant to diet-induced obesity. JNK2, often in concert with JNK1, has been implicated in the

pathology of autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis and asthma [30]. A recent study suggests that JNK2 may also play a role in vascular disease and atherosclerosis [9]. However, to date, no inhibitors of JNK have been approved for use in humans.

JNK inhibitors and their application.

Numerous small molecules from a variety of scaffolds such as indazoles, aminopyrazoles, aminopyridines, pyridine carboxamides, benzothien-2-ylamides and benzothiazol-2-yl acetonitriles, quinoline derivatives, and aminopyrimidines have been reported to act as selective ATP-competitive JNK inhibitors [22]. Despite this plethora of compounds, many exhibit poor kinase selectivity and/or do not inhibit the phosphorylation of well-characterized substrates of JNK in cells. For example, one of the earliest and still most widely used inhibitors is the anthrapyrazolone, SP600125 which exhibits exceptionally low specificity for JNK and should only be used in combination with other tools to rule-out a potential role for JNK in a particular process [11]. Other reported JNK inhibitors such as AS601245 only inhibit c-Jun phosphorylation at high concentrations which is likely due to a combination of limited cell penetration, ATP concentration and differences between biochemical and cellular sensitivities to JNK inhibitors.

There are mainly 3 types of inhibitors thoroughly studied up to now. The first is the ATP-competitive inhibitor of the JNK pathway such as CEP-1347 and SP600125. They occupy the ATP-binding site of the protein kinase, which is structurally similar in all kinases, so the phosphorylation of substrates is blocked.

In addition to the ATP-binding site, other sites on the kinase can also provide the target for inhibition, so the second kind of inhibitor targets the substrate-binding site. Based on this mechanism, many peptide inhibitors and dominant-negative mutants against kinases have been designed.

The third kind of inhibitor targets the allosteric regulatory sites. Either peptides or chemical non-peptides can be used if they can bind to the regulatory sites and block the phosphorylation.

SP600125 (Anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one) is a reversible ATP-competitive inhibitor with >20-fold selectivity vs. a range of kinases and enzymes tested. In cells, SP600125 dose dependently inhibited the phosphorylation of c-Jun, the expression of inflammatory genes COX-2, IL-2, IFN-gamma, TNF-alpha, and prevented the activation and differentiation of primary human CD4 cell cultures [27].

SP 600125 suppressed Cd-induced pancreatic β -cell apoptosis, but not ERK1/2 and p38-MAPK inhibitors [7]. Cd induces pancreatic β -cell

injury via an oxidative stress downstream-mediated JNK activation-triggered mitochondria-regulated apoptotic pathway. However, this JNK inhibitor did not suppress ROS generation in Cd-treated cells.

Hyperglycemia increased iNOS mRNA in cultured C57BL/6J, and SP600125 abolished this effect. Hyperglycemia increased iNOS-luciferase activities, and SP600125 also blocked this effect [32].

Lipotoxicity plays an important role in underlying mechanism of type 2 diabetes. Prolonged exposure of pancreatic beta-cells to elevated levels of fatty acid is associated with beta-cell apoptosis. Exposure of pancreatic β -cells to ghrelin caused a rapid activation of protein kinase B (PKB) and inhibition of JNK under lipotoxic state. SP600125 enhanced protective effect of ghrelin [14] and blocked palmitate induces autophagy in pancreatic β -cells.

The endemic occurrence of obesity and the associated risk factors that constitute the metabolic syndrome have been predicted to lead to a dramatic increase in chronic liver disease. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) has become the most frequent liver disease in countries with a high prevalence of obesity. Inhibition of JNK by SP600125 significantly reduced palmitate-induced steatosis, ROS accumulation, and apoptosis, indicating that the protective effect against palmitate-induced cellular damage result from blocking ROS-activated JNK signaling [2]. At the same time there are a number of problems in application of inhibitors of this type. Effects obtained on the isolated cells are not always reproduced in conditions *in vivo*.

MCD and control diet fed C57BLKS/J mice were treated with SP 600125 for 2 weeks. SP600125 decreased both JNK2/3 and JNK1 protein levels. As expected, mice fed the MCD diet developed steatohepatitis; however, the severity was not affected by SP600125. Serum ALT, hepatic triglycerides and the degree of steatohepatitis on histology remained unchanged in MCD fed mice treated with SP 600125 [10].

AS601245 (1,3-benzothiazol-2-yl (2-([2-(3-pyridinyl) ethyl] amino)-4 pyrimidinyl) acetonitrile), also inhibits the JNK, has neuroprotective properties in animal models of stroke. Some studies show that AS601245, in addition to its ability to protect neuronal cell bodies, also prevents loss of neuritis, decreases astrogliosis and improves long-term memory deficits induced by cerebral ischemia [3].

In vivo experiments showed that AS601245 administration provided significant protection against the delayed loss of hippocampal CA1

neurons in a gerbil model of transient global ischemia [4]. Results obtained demonstrated that the combined treatment with rosiglitazone and AS601245 increases the anticancer effects of the two substances in colon cancer cells.

AS601245 didn't affect under dyslipidemic states conditions in experimental animals. However, this inhibitor showed positive results in conditions in vitro and it reveals anti-inflammatory action that makes it perspective agent for dyslipidemia disease therapy.

CC-930 also known as Tanzisertib, is described as a potent, selective, and orally active JNK inhibitor with potential antifibrotic activity and also was used in intervention treatment for type 1 diabetic nephropathy in hypertensive rats [12]. At week 16 of diabetes in rats CC-930 in dose 60 mg/kg reduced macrophages and ccl2 mRNA levels in diabetic kidneys.

Curcumin is a compound isolated from the turmeric plant and primarily used as a natural yellow pigment. It has a variety of biological activities and pharmacological actions, such as anti-inflammatory, anti-carcinogenic, and anti-virus properties, as well as promising clinical applications due to its low toxicity. Most inflammatory stimuli are known to activate three independent MAPK pathways, leading to activation of p44/42 MAPK (also called ERK1/ERK2), JNK, and p38 MAPK pathway. Chen et al. [8] found that curcumin inhibits JNK activation induced by various agonists including PMA plus ionomycin, anisomycin, UV-C, gamma radiation, TNF, and sodium orthovanadate.

Although curcumin does not directly interact with NK kinase its synthetic analogs are specific inhibitors of this enzyme.

It was shown that a curcumin analogue C66 (2E,6E)-2,6-bis(2-(trifluoromethyl)benzylidene)cyclohexanone) exhibited strong inhibitory effect on LPS-induced inflammatory cytokine expression in mouse macrophages [18]. It also exhibited anti-inflammatory actions in HG-stimulated macrophages and renoprotective effects in diabetic rats [17].

C66 was buried inside JNK active site and achieved two hydrogen bonds with Arg72. C66 also interacted with the hydrophobic residues in this site in the most energetically favorable simulation.

Another curcumin analogue B06 exhibited an anti-inflammatory activity compared to curcumin. In vitro, pretreatment with B06 at a concentration of 5 mM significantly reduced the high-glucose-induced overexpression of inflammatory cytokines in macrophages. This effect of B06 is associated

with its inhibition of JNK/nuclear factor κ B activation. In vivo, despite that B06 administration at $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for 6 weeks did not affect the blood glucose profile of diabetic rats [5], the B06-treated animals displayed significant decreases in inflammatory mediators in the serum, kidney, and heart and renal macrophage infiltration. This was accompanied by attenuation of diabetes-induced structural and functional abnormalities in the kidney and heart. Taken together, these data suggest that B06 might be a potential therapeutic agent for diabetic complications via an anti-inflammatory mechanism.

Inhibition of JNK kinases: potential benefit versus risks. JNK inhibitors gives good results in model experiments, allowing the neck to discuss further enhance the prospects of their use of human clinical trials. At the same time there are still some obstacles. Possible problems with inhibiting JNK may be due to the important role it plays in other cellular functions such as cell proliferation, cell differentiation, the inflammatory response, and apoptosis.

Enthusiasm for the use of JNK inhibitors has been dampened by concerns about toxicity. SP600125 caused developmental abnormalities during zebrafish organogenesis starting at $1.25 \mu\text{m}$ and the defects were exacerbated with increasing concentrations [29].

Another important aspect of the use of inhibitors is their specificity, because with a few exceptions, for example, SP600125, the majority of newly synthesized or isolated inhibitors are active against other kinases. Based on the in vitro C66 directly targets JNK with a high selectivity on ERK. Using inhibitors that are active against various kinases and many signaling pathways require additional modeling experiments, as well as compliance with greater caution when moving to clinical trials.

CONCLUSION. Accumulating evidence supports a potential role of the JNK kinases inhibitors in treatment of obesity, metabolic syndrome, diabetes, etc. However, taking into account their possible toxicity, affinity for the whole group of signaling kinases, as well as the involvement of a wide variety of data kinases in signaling pathways in the cell, risk-benefit considerations have precluded their use in clinical trials in humans. At the same time, search and study of new selective inhibitors of kinases can be extremely promising in the treatment of dyslipidemic conditions and diseases mediated by JNK kinase participation.

REFERENCES

1. A central role for JNK in obesity and insulin resistance / J. Hirosumi, G. Tuncman, L. Chang [et al.] // *Nature*. – 2002. – № 420. – P. 333.
2. Antioxidative effects of *Alisma orientale* extract in palmitate-induced cellular injury / C. W. Han, E. S. Kang, S. A. Ham [et al.] // *Pharmaceutical Biology*. – 2012. – **10**, № 50. – P. 1281–1288.
3. AS601245, a c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) inhibitor, reduces axon/dendrite damage and cognitive deficits after global cerebral ischaemia in gerbils / S. Carboni, U. Boschert, P. Gaillard [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2008. – **1**, № 153. – P. 157–163.
4. AS601245 (1,3-benzothiazol-2-yl (2-[[2-(3-pyridinyl) ethyl] amino]-4 pyrimidinyl) acetonitrile): a c-Jun NH2-terminal protein kinase inhibitor with neuroprotective properties / S. Carboni, A. Hiver, C. Szyndralewicz [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2004. – **1**, № 310. – P. 25–32.
5. Attenuation of high-glucose-induced inflammatory response by a novel curcumin derivative B06 contributes to its protection from diabetic pathogenic changes in rat kidney and heart / Y. Pan, G. Zhu, Y. Wang [et al.] // *Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2013. – **1**, № 24. – P. 146–155.
6. Bogoyevitch M. A. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases / M. A. Bogoyevitch, B. Kobe // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2006. – **4**, № 7. – P. 1061–1095.
7. Chang K. C. Cadmium induces apoptosis in pancreatic β -cells through a mitochondria-dependent pathway: the role of oxidative stress-mediated c-Jun N-terminal kinase activation / K. C. Chang, C. C. Hsu, S. H. Liu // *PLOS Medicine: A Peer-Reviewed Open-Access Journal*. – 2013. – **2**, № 8. – P. 54374.
8. Chen Y. R. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin / Y. R. Chen, T. H. Tan // *Oncogene*. – 1998. – **2**, № 17. – P. 173–178.
9. c-Jun N-terminal kinase 2 deficiency protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress / E. Osto, C. M. Matter, A. Kouroedov [et al.] // *Circulation*. – 2008. – **20**, № 18. – P. 2073–2080.
10. Dysregulation of the unfolded protein response in db/db mice with diet-induced steatohepatitis / M. E. Rinella, M. S. Siddiqui, K. Gardikiotes [et al.] // *Hepatology*. – 2011. – **5**, № 54. – P. 1600–1609.
11. ERK5 pathway regulates the phosphorylation of tumour suppressor hDlg during mitosis / F. A. Inesta-Vaquera, D. G. Campbell, J. S. Arthur [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2010. – **1**, № 399. – P. 84–90.
12. Evaluation of JNK blockade as an early intervention treatment for type 1 diabetic nephropathy in hypertensive rats / A. K. Lim, F. Y. Ma, D. J. Nikolic Paterson [et al.] // *The American Journal of Nephrology*. – 2011. – **4**, № 34. – P. 337–346.
13. Evans J. L. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance / J. L. Evans, B. A. Maddux, I. D. Goldfine // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2005. – **7–8**, № 7. – P. 1040–1052.
14. Ghrelin inhibits cell apoptosis induced by lipotoxicity in pancreatic beta-cell line / W. Wang, D. Zhang, H. Zhao [et al.] // *Regulatory Peptides - Journal*. – 2010. – **1–3**, № 161. – P. 43–50.
15. GS Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance / G. Tuncman, J. Hirosumi, G. Solinas [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2006. – **28**, № 103. – P. 10741.
16. Immunohistochemical study of the phosphorylated and activated form of c-Jun NH2-terminal kinase in human aorta / H. Nishio, K. Matsui, H. Tsuji [et al.] // *Histochemical Journal*. – 2001. – **3**, № 33. – P. 167–171.
17. Inhibition of high glucose-induced inflammatory response and macrophage infiltration by a novel curcumin derivative prevents renal injury in diabetic rats / Y. Pan, Y. Wang, L. Cai [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2012. – № 166. – P. 1169–1182.
18. Inhibition of I β s-induced production of inflammatory factors in the macrophages by mono-carbonyl analogues of curcumin / G. Liang, H. Zhou, Y. Wang [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2009. – № 13. – P. 3370–3379.
19. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice / J. M. Schattenberg, R. Singh, Y. Wang [et al.] // *Hepatology*. – 2006. – № 43. – P. 163–172.
20. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases / M. Karin // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 1996. – № 351. – P. 127–134.
21. Larter C. Z. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right / C. Z. Larter, M. M. Yeh // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2008. – № 23. – P. 1635–1648.
22. LoGrasso P. Inhibitors of c-jun-N-terminal kinase (JNK) / P. LoGrasso, T. Kamenecka // *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2008. – **8**, № 8. – P. 755–766.
23. Munshi A. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response / A. Munshi, R. Ramesh // *Genes and Cancer*. – 2013. – **9–10**, № 4. – P. 401–408.
24. Ricci R. Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis / R. Ricci, G. Sumara, I. Sumara // *Science*. – 2004. – **5701**, № 306. – P. 1558–1561.
25. Sehgal V. Network Motifs in JNK Signaling / V. Sehgal, P. T. Ram // *Genes and Cancer*. – 2013. – **9–10**, № 4. – P. 409–413.
26. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors / S. Gupta, T. Barrett, A. J. Whitmarsh [et al.] // *European Molecular Biology Organization Journal*. – 1996. – **11**, № 15. – P. 2760–2770.
27. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase / B. L. Bennett, D. T. Sasaki, B. W. Murray [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2001. – **24**, № 98. – P. 13681–13686.

28. Tarantino G. JNKs, insulin resistance and inflammation: A possible link between NAFLD and coronary artery disease / G. Tarantino, A. Caputi // World Journal of Gastroenterology. – 2011. – **33**, № 17. – P. 3785–3794.

29. Valesio E. G. Exposure to the JNK inhibitor SP600125 (anthrapyrazolone) during early zebrafish development results in morphological defects / E. G. Valesio, H. Zhang, C. Zhang // Journal of Applied Toxicology. – 2013. – **1**, № 33. – P. 32–40.

30. Wong W. S. Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for asthma / W. S. Wong // Current Opinion in Pharmacology. – 2005. – **3**, № 5. – P. 264–271.

31. Yamawaki H. Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis / H. Yamawaki, J. Haendeler, B. C. Berk // Circulation Research. – 2003. – **11**, № 93. – P. 1029–1033.

32. Yang P. Hyperglycemia induces inducible nitric oxide synthase gene expression and consequent nitrosative stress via c-Jun N-terminal kinase activation / P. Yang, Y. Cao, H. Li // American Journal of Obstetrics and Gynecology. – 2010. – **2**, № 203. – P. 185–196.

33. Zhang G. Y. Agents targeting c-Jun N-terminal kinase pathway as potential neuroprotectants / G. Y. Zhang, Q. G. Zhang // Expert Opinion on Investigational Drugs. – 2005. – **11**, № 14. – P. 1373–1383.

А. Л. Загайко, Г. Б. Кравченко, Ю. І. Кочубей
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРІВ JNK-КІНАЗ ПРИ ЛІКУВАННІ ДИСЛІПІДЕМІЙ

Резюме

Велику кількість публікацій присвячено вивченню регуляторних метаболічних шляхів JNK-кіназ. Підвищену активність JNK-кіназ спостерігають при канцерогенезі, нейродегенеративних процесах, захворюваннях серцево-судинної системи, діабеті тощо. Численні експериментальні дані підтверджують потенційну роль інгібіторів JNK-кіназ у корекції ожиріння, метаболічного синдрому, діабету та інших захворювань. Даний огляд висвітлює перспективи їх застосування при лікуванні патологій, які супроводжуються дисліпідеміями.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: JNK-кінази, інгібітори JNK-кіназ, дисліпідемії.

А. Л. Загайко, А. Б. Кравченко, Ю. І. Кочубей
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ JNK-КИНАЗ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ДИСЛИПИДЕМИЙ

Резюме

Большое количество публикаций посвящено изучению регуляторных метаболических путей JNK-киназ. Повышенную активность JNK-киназ наблюдают при канцерогенезе, нейродегенеративных процессах, заболеваниях сердечно-сосудистой системы, диабете и др. Многочисленные эксперименты подтверждают потенциальную роль ингибиторов JNK-киназ в коррекции ожирения, метаболического синдрома, диабета и других заболеваний. Данный обзор освещает перспективы их применения в лечении патологий, которые вызваны дислипидемиями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: JNK-киназы, ингибиторы JNK-киназ, дислипидемии.

Отримано 11.04.14

Адреса для листування: А. Л. Загайко, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна, e-mail: annabk@rambler.ru.