

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержаних науковцями НДІ фізіології імені академіка Богача та ННЦ "Інститут біології" та інших наукових установ. Викладено також нові дані про патофізіологічні закономірності й біохімічні механізми регуляції процесів на клітинному та органному рівнях після впливу різноманітних фізико-хімічних чинників.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Подано экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученных учеными НИИ физиологии имени академика Богача и УНЦ "Институт биологии" и других научных учреждений. Изложены также новые данные о патофизиологических закономерностях и биохимических механизмах регуляции процессов на клеточном и органном уровнях после воздействия различных физико-химических факторов.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

The experimental dates development and function of the plant and animal organisms of research institute and ESC "Institute of Biology". Results of newly pathophysiological aspects and biochemical mechanisms of cell and organism processes regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and student.

**ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР
РЕДАКЦІЙНА
КОЛЕГІЯ**

Л.І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.

Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, асист. (техн. секр.); С. Сабо, д-р біол. наук, проф. (м. Ірвайн, США. Університет Каліфорнії); О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф. (Королівський університет Белфаста, м. Белфаст, Великобританія); М. Шандор, д-р біол. наук, проф. (Західно-Угорський Університет, м. Сомбатхей, Угорщина); С. Юозас, д-р біол. наук, проф. (Інститут ботаніки, м. Вільнюс, Литва); Б. Каленгхем, проф. (м. Кембридж, Великобританія); В. О. Іваниця, д-р біол. наук, проф.; Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; Д. Н. Говорун, д-р біол. наук, проф.; Дж. Воллес, д-р біол. наук, проф. (Торонто, Онтаріо, Канада); І. Г. Емельянов, д-р біол. наук, проф.; Е. М. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; І. Ю. Костіков, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Скларов, д-р біол. наук, проф.; В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаручук, д-р біол. наук, проф.; В. П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В. К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; Н.Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А. В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; А. Г. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН Білорусії

Адреса редколегії

03127, Київ-127, просп. акад. Глушкова, 2а, ННЦ "Інститут біології";
☎ (38044) 521-35-98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com

Затверджено

Вченою радою ННЦ "Інститут біології"
13.06.16 (протокол № 12)

Атестовано

Вищою атестаційною комісією України.
Постанова Президії ВАК України
№ 1-05/3 від 14.04.10

Зареєстровано

Міністерством юстиції України.
Свідоцтво про державну реєстрацію
КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09

**Засновник
та видавець**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет".
Свідоцтво внесено до Державного реєстру
ДК № 1103 від 31.10.02

Адреса видавця

01601, Київ-601, 6-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

**Журнал входить
до наукометричних баз /
Abstracted and Indexed:**

Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2013 = 5,93), Cite Factor (з 2014 р.),
Research Bible (з 2013 р.), Academic Keys (з 2013 р.), DOAJ (з 2013 р.),
EBSCO.EJS (з 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation
for Medical Education and Research (з 2014 р.); HINARI (з 2013 р.);
Medical Journals Links (з 2013 р.); OAJI (з 2012 р.); The Knowledge
Network (з 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (з 2012 р.); WorldCat
(з 2013 р.); E-Library.ru (з 2014 р.).

ЗМІСТ

Александров А., Конопельнюк В., Остапченко Л. Вміст периферичного серотоніну та триптофану у щурів за умов довготривалого введення прогестерону	5
Калиновський В., Пустовалов А., Держинський М., Гродзюк Г., Андрушина Н. Вплив наночастинок срібла на кісспептин-опосередковану регуляцію морфо-функціонального стану сім'яників щурів	8
Вірич П., Шелюк О., Мартинюк В., Чумаков С. Оптична система реєстрації скорочення гладеньких м'язів в ізометричному режимі	11
Воробйова Н., Корнелюк О., Ложко Д. Стабільність рекомбінантного білка AIMP1/P43 людини в нанокмполітному комплексі з бета-циклодекстрином	15
Клиш Ю., Верьовка С. Галенова Т., Вовк Т. Фактори ризику гемостатичного дисбалансу у хворих на запальні захворювання та новоутворення лор-органів	19
Катрій Т., Савчук О. Агрегаційна здатність тромбоцитів під дією імуноглобулінів класу G отриманих із плазми крові хворих на ішемічний інсульт.....	22
Андрійчук О., Голубенко А., Коротєєва Г., Перегудова О., Поліщук В. Ідентифікація збудників змішаної інфекції орхідних в колекції ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна	25
Воєйкова Д., Кондро М., Степанова Л., Берегова Т., Остапченко Л. Фосфоліпідний склад внутрішньої мітохондріальної мембрани гепатоцитів щурів за умов стеатогепатозу різної етіології	30
Бурлака Ю., Гринь Н., Голобородько О., Верьовка С. Дослідження агрегаційної здатності еритроцитів у хворих на рак гортані.....	34
Гром М., Яковенко Л., Сидорик Л., Корнелюк О., Григоренко В., Вікарчук М. Тирозин- тРНК синтетаза її окремі домени вірогідні аутоімунні компоненти патогенезу раку передміхурової залози	38
Харькова А., Мінченко О. Експресія генів подібних до інсуліну факторів росту та їх рецептора у клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму ERN 1 за умов дефіциту глюкози	44
Фіщенко Я., Заводовський Д., Матвієнко Т., Ноздренко Д., Мотузюк О. Структурні зміни фіброзу спинного мозку щурів при епідуральному введенні суміші лонгідази та дипроспану.....	49
Пажукова Є., Царенко Т., Тимошенко М., Кравченко О. Клініко-біохімічні показники обміну білків та вміст електролітів у крові пацієнтів за умов ішемічного інсульту, ускладненого цукровим діабетом другого типу	53
Радченко Л., Фесенко А., Міроненко А., Смутко О. Порівняльний аналіз мутацій в генах HA та NA вірусів грипу, виділених протягом 2012-2015 років	57
Ракша Н., Гладун Д. Детергент-стійкі протеїнази антарктичного гребінця <i>ADAMUSSIIUM COLBECKI</i>	62
Свєженцева І., Білько Д., Білько Н., Дягіль І. Особливості проліферації та диференціювання клітин-попередників еритропоезу при хронічній мієлоїдній лейкемії в культурі <i>IN VIVO</i>	65
Храновська Н., Скачкова О., Сидор Р., Сківка Л. Вплив анальгетиків омнопону та декскетопрофену на ендокитарну активність фагоцитів різної локалізації на моделі хірургічного видалення моделі.....	69
Салига Н., Іскра Р. Вплив L-глутамінової кислоти на деякі біохімічні параметри крові щурів за дії нітриту натрію	74
Дудар Л., Поліщук В. Гістологічні аспекти цирковірус-асоційованого синдрому свиней, уражених цирковірусом 2-го типу	77
Кожем'яко Н., Крижановський С., Чернінський А., Зима І., Карасевич Н. Гетерогенна природа тета-активності та її джерела при хворобі Паркінсона	80
Ніколаєнко Т., Гарманчук Л., Орисик С., Пехньо В. Проангіогенна дія новосинтезованих сполук-аналогів інгібіторів HIF-1	85

СОДЕРЖАНИЕ

Александров А., Конопельнюк В., Остапченко Л. Содержание периферического серотонина и триптофана у крыс в условиях длительного введения прогестерона	5
Калиновский В., Пустовалов А., Дзержинский М., Гродзюк Г., Андриюшина Н. Влияние наночастиц серебра на кистепептин-опосредованную регуляцию морфо-функционального состояния семенников крыс	8
Вирыч П., Шелюк О., Мартынюк В., Чумаков С. Оптическая система регистрации сокращения гладких мышц в изометрическом режиме	11
Воробьева Н., Корнелюк А., Ложко Д. Стабильность рекомбинантного белка AIMP1/P43 человека в наноккомпозитном комплексе с бета-циклодекстрином	15
Клысь Ю., Верева С., Галенова Т., Вовк Т. Факторы риска гемостатического дисбаланса у больных на воспалительные заболевания и новообразования лор-органов	19
Катрий Т., Савчук А. Агрегационная способность тромбоцитов под действием иммуноглобулинов класса G полученных из плазмы крови больных с ишемическим инсультом	22
Андрійчук Е., Голубенко А., Коротева А., Перегудова А., Полищук В. Идентификация возбудителей смешанной инфекции орхидных в коллекции Ботанического сада им. Акад. А.В. Фомина	25
Восійкова Д., Кондро М., Степанова Л., Береговая Т., Остапченко Л. Фосфолипидный состав внутренней митохондриальной мембраны гепатоцитов крыс в условиях стеатогепатозу различной этиологии	30
Бурлака Ю., Гринь Н., Голобородько О., Верева С. Исследование агрегации эритроцитов у больных раком гортани	34
Гром М., Яковенко Л., Сидорик Л., Корнелюк О., Григоренко В., Викарчук М. Тирозил-тРНК синтетаза и ее отдельные домены вероятные аутоиммунные компоненты патогенеза рака предстательной железы	38
Харькова А., Минченко А. Экспрессия генов инсулиноподобных факторов роста и их рецептора в клетках глиомы с угнетенной функцией энзима ERN 1 при дефиците глюкозы	44
Фищенко Я., Заводовский Д., Матвиенко Т., Ноздренко Д., Мотузюк О. Структурные изменения фиброза спинного мозга крыс при эпидуральном введении смеси лонгидазы и дипроспана	49
Пажукова Е., Царенко Т., Тимошенко М., Кравченко О. Клинико-биохимические показатели обмена белков и содержание электролитов в крови пациентов при ишемическом инсульте, осложненном сахарным диабетом второго типа	53
Радченко Л., Фесенко А., Мироненко А., Смутко О. Сравнительный анализ мутаций в генах вирусов гриппа, выделенных на протяжении 2012-2015 годов	57
Ракша Н., Гладун Д. Детергент-устойчивые протеиназы антарктического гребешка <i>ADAMUSSIUM COLBECKI</i>	62
Свеженцева И., Билько Д., Билько Н., Дягель И. Особенности пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников эритропоэза при хронической миелоидной лейкемии в культуре клеток <i>INVIVO</i>	65
Храновская Н., Скачкова О., Сидор Р., Скивка Л. Влияние анальгетиков омнопона и декскетопрофена на эндоцитарную активность фагоцитов различной локализации на модели хирургического удаления опухоли	69
Салыга Н., Искра Р. Влияние L-глутаминовой кислоты на некоторые биохимические параметры крови крыс при действии натрата натрия	74
Дудар Л., Полищук В. Гистологические аспекты цирковирус-ассоциированного синдрома свиней, пораженных цирковирусом 2-го типа	77
Кожемяко Н., Крижановський С., Чернинський А., Зима И., Карасевич Н. Гетерогенная природа тета-активности та ее источники при болезни Паркинсона	80
Николаєнко Т., Гарманчук Л., Орысык С., Пехньо В. Проангиогенное действие новосинтезированных соединений-аналогов ингибиторов HIF-1	85

CONTENTS

Aleksandrov A., Konopelnyuk V., Ostapchenko L. Peripheral serotonin and tryptophan levels in rats under progesterone long-term administration	5
Kalynovskyi V., Pustovalov A., Dzerzhynsky M., G. Grodzyuk., Andriushina N. Kisspeptin-mediated regulation of the morpho-functional state of the rat testicles under the effect of silver nanoparticles	8
Virysh P., Shelyuk O., Martynyuk V., Chumakov S. The optical registration system isometric contraction smooth muscle	11
Vorobyova N., Kornelyuk A., Lozhko D. Stability of human recombinant AIMP1/P43 protein in nanocomposite complex with beta-cyclodextrin.....	15
Klys' Yu., Verevka S., Galenova T., Vovk T. Risk factors for hemostatic imbalance in patients with inflammatory diseases and neoplasms of ENT organs.....	19
Katrii T., Savchuk O. Platelets aggregation under influence of immunoglobulin class G separated from the blood plasma of patients with ischemic stroke.....	22
Andriychuk O., Golubenko A., Korotyeyeva G., Perehudova O., Polischuk V. Identification of infectious agent of mixed infections in orchid collection of Fomin's Botanical Garden	30
Voieikova D., Kondro M., Stepanova L., Beregova T., Ostapchenko L. Phospholipid composition in the inner mitochondrial membrane of rat hepatocytes under the developing of different types of steatohepatosis.....	34
Burlaka Iu., Gryn' N., Goloborodko O., Verevka S. Investigation of erythrocyte aggregation in patients with laryngeal cancer	38
Grom M., Yakovenko L., Sidorik L., Kornelyuk A., Grygorenko V., Vikarchuk M. Tyrosyl-tRNA Synthetase and its Separated Domains are Suppositional Components of Prostate Cancer Pathogenesis	44
Kharkova A., Minchenko O. Factors and their receptor genes in glioma cells with suppressed function of ERN 1 enzyme upon glucose deprivation	49
Fishchenko Ya., Zavodovskyi D., Matvienko T., Nozdrenko D., Motuzuyk O. Structural changes of spinal cord fibrosis due to epidural application of mixture of longidaza and diprosal.....	53
Pazhukova E., Tsarenko T., Tymoshenko M., Kravchenko O. The protein metabolism parameters and electrolytes levels in the blood of patients with ischemic stroke complicated by type two diabetes.....	57
Radchenko L., Fesenko A., Mironenko A., Smutko O. Comparative analysis of mutations in influenza viruses genes HA and NA, isolated during 2012-215 years.....	62
Sviezhentseva I., Bilko D., Bilko N., Dyagil I. Characteristics of proliferation and differentiation of erythroid progenitor cells at chronic myeloid Leukemia in cells culture in vivo	65
Khranovska N., Skachkova O., Sydor R., Skivka L. The effect of analgesia with omnopon and dexketoprofen on the endocytic activity of phagocytes of different localization on the surgical tumor resection model	69
Salyha N., Iskra R. Effect of L-glutamic on some biochemical parameters of rat blood under the action of sodium nitrite	74
Dudar L., Polischuk V. Histological aspects of circovirus-associated syndrome of pigs infected with circovirus type 2.....	77
Kozhemiako N., Kryzhanovskyi S., Cherninskyi A., Zyma I., Karasevich N. Heterogeneity of teta-activity and its sources in Parkinson's disease.....	80
Nikolaenko T., Garmanchuk L., Orysyk S., Pekhnyo V. Proangiogenic effect of newly synthesized compounds-analogue of inhibitors HIF-1	85

PERIPHERAL SEROTONIN AND TRYPTOPHAN LEVELS IN RATS UNDER PROGESTERONE LONG-TERM ADMINISTRATION

Tryptophan and serotonin levels in duodenum mucosa and blood serum of rats under progesterone long-term administration have been determined. The studies show that tryptophan and the serotonin content increase in rats under progesterone long-term administration compared with control group of rats. Obtained data give evidence that biosynthetic pathway of serotonin, particularly, content of serotonin, is involved in the obesity development induced by progesterone long-term administration.

Key words: tryptophan, serotonin, progesterone, obesity.

Introduction. Obesity is one of the major health concerns in the 21st century and is one of the leading causes of preventable death [1]. According to the WHO 13% of the adult world population suffering from obesity (WHO, 2014). Some causes of the obesity development is associated with certain endocrine diseases, central nervous system disorders, and other illnesses [2, 3]. A lack of the accurate and scientifically recognized explanation of the mechanism of the body fat increase causes a difficult situation being currently present in the obesity treatment.

Progesterone, neuroactive steroid, is a female reproductive hormone. The major functions of progesterone are in the preparation of the uterus for implantation and maintenance of pregnancy. Progesterone is produced primarily by the corpus luteum of the ovary in normally menstruating women and to a lesser extent by the adrenal cortex [4]. At approximately the 6th week of pregnancy, the placenta becomes the major producer of progesterone [5-7]. Available literature data give evidence that there is a correlation between the progesterone excess and eating or affective disorders [8]. Progesterone launched in a woman's body artificially (as contraceptives or for the hormone replacement therapy) has the same fat accumulation effect as the natural hormone during pregnancy [9]. Recent studies also show that progesterone makes such effects leading to many changes in neurotransmitter levels, particularly, in the serotonin level [10]. The latter can be important for the obesity development.

Serotonin is a monoaminergic neurotransmitter with activities that modulate central and peripheral functions. The first step in the synthesis of serotonin from tryptophan depends on the enzyme tryptophan hydroxylase, which is also the rate-limiting enzyme in its biosynthesis. Accumulating evidence indicates that peripheral serotonin plays an important role in glucose and lipid metabolism. Recent studies have shown that the level of blood serotonin and the number of intestine enterochromaffin cells in obese mice was found to be much higher than that in lean mice [11, 12]. Also was shown that serotonin regulates fat metabolism and feeding behavior through independent molecular mechanisms in *Caenorhabditis elegans* [13].

It is suggested that progesterone may affect on serotonin metabolism and functioning. To verify these

hypotheses, we investigated the effect of progesterone long-term administration of rats on peripheral serotonin and tryptophan levels.

Materials and methods. White rats weighing 145-155 g were used in this study. The experiments met the basic requirements concerning the care and use of laboratory animals according to both the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1986) and ethical standards being in accordance with the legislation of Ukraine.

For experimental obesity to be developed the progesterone oil solution was administered subcutaneously (10 mg/kg body weight, treated daily for 28 days) following a procedure described in [12]. Rats belonged to the control group were injected with the oil used for the progesterone administration. All the animals were divided into two groups: 1 – normal control group; 2 – progesterone-induced obese group. To confirm the development of obesity, we have determined the body mass index and Li index. To determine the tryptophan and serotonin levels blood serum and duodenum were taken 28 days after the progesterone injection.

Both the tryptophan and the serotonin content were analyzed using ion exchange chromatographic method (KM-sepharose). The fluorescence of both the tryptophan and the serotonin eluate was measured at an excitation wavelength of 359 nm and 295 nm respectively and a fluorescence wavelength of 485 and 550 nm respectively using shimadzu spectrofluorophotometer (RF-1501) [13-15].

Statistical analysis of data was carried out by the software package 'Statistica 7.0'. For the analysis of data distribution type, Shapiro-Wilks criterion was used. As the data were normally distributed, we used Student's t test for independent samples. Mean values (M) and standard deviations (SD) were calculated. Significant difference was considered at $p \leq 0.05$.

Results and discussion.

We determined tryptophan and serotonin levels in duodenal mucosa of the rats under progesterone long-term administration. It has been established that the tryptophan level in the experimental group was 2.1 times greater than that of the control group (Fig. 1, A).

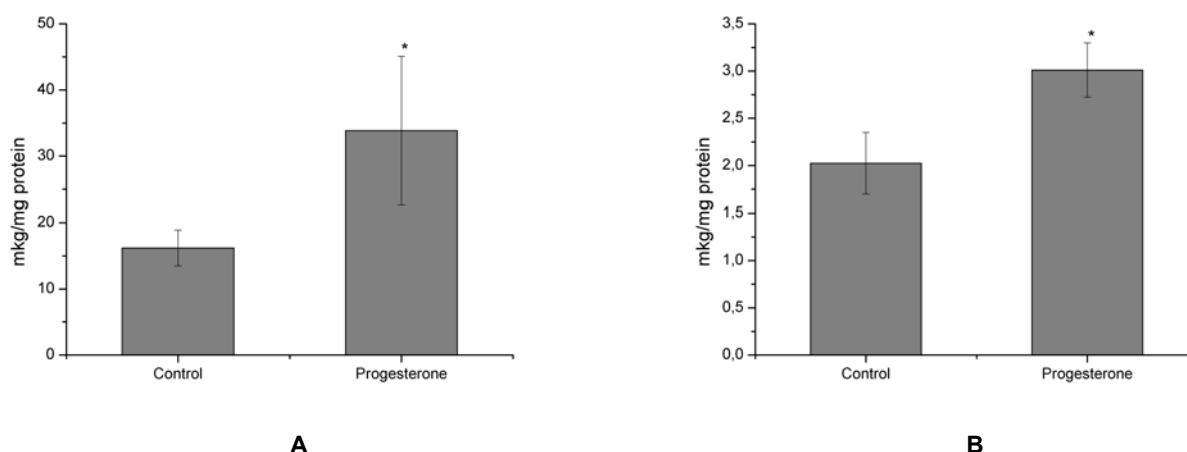


Fig. 1. Tryptophan (A) and serotonin (B) levels in duodenal mucosa of the rats under progesterone long-term administration compared to the control group

Data are shown as the mean $\pm$ SD of 15 animals; asterisk (*), $p < 0.05$ in comparison with control group

Serotonin was observed to increase by a factor of 1.5 in the experimental group as compared to the control group in studying serotonin content in duodenal mucosa of rats under progesterone long-term administration (Fig. 1, B). Increase in serotonin level could be due to the impaired function of enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract and releasing serotonin in response to a food intake. Serotonin released by enterochromaffin cells can stimulate 5-HT₃ receptors of the chemoreceptor trigger zone which produce impulses being transmitted to the vomiting center to initiate vomiting.

In blood almost whole pool of serotonin is located in storage vesicles of platelets and released under the influence of various stimuli, such as ADP, thrombin, collagen, and even serotonin. Serotonin removal from the circulatory system is caused by its inactivation in the liver or endocytosis in platelets and lung vascular endothelial cells.

The next stage of our work was to investigate the tryptophan and serotonin levels in serum. Tryptophan and serotonin levels have increased in 1.5 and 4.1 times respectively in rats under progesterone long-term administration compared with control group of rats (Fig. 2).

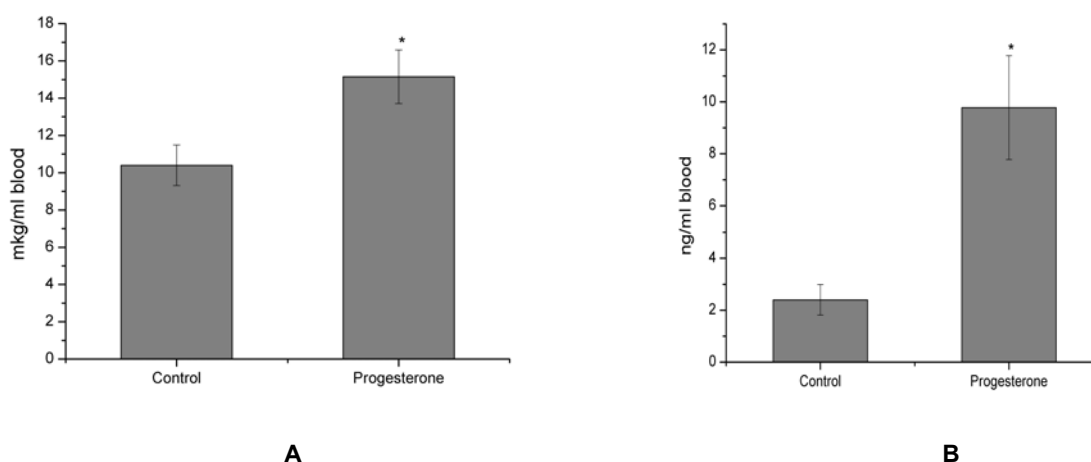


Fig. 2. The tryptophan (A) and serotonin (B) levels in serum of the rats under progesterone long-term administration compared to the control group

Data are shown as the mean $\pm$ SD of 15 animals; asterisk (*), $p < 0.05$ in comparison with control group

Tryptophan that located in the extracellular matrix is transported to serotonergic neurons by means of the nonspecific membrane transporter, which is assumed to be involved in transport of a number of amino acids such as valine, leucine, and isoleucine. Therefore, the possible cause of the rise in tryptophan level in rat serum is a competition between tryptophan and other metabolites for ways of crossing the blood-brain barrier. An establishment of the serotonin increase could be accounted for a malfunction of the vascular and platelet phases of

hemostasis since the platelets uptake a substantial portion of serotonin.

The results of this study have shown statistically significant changes in the tryptophan and serotonin levels in duodenal mucosa and serum of the rats under progesterone long-term administration. The findings indicate that biosynthetic pathway of serotonin is involved in the process of the obesity development. Taking into account this fact it would be promising to further investigate serotonin system functioning in the periphery and the CNS of rats under progesterone long-term administration.

Reference

1. Barness L.A. Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects / Barness L.A., Opitz J.M., Gilbert-Barness E. // Med Genet. – 2007. – № 143A. – P. 3016-34.
2. Rimmer J.H. Obesity and obesity-related secondary conditions in adolescents with intellectual/developmental disabilities / Rimmer J.H., Yamaki K., Lowry B.M., Wang E., Vogel L.C. // J Intellect Disabil Res. – 2010. – № 54(9). – P. 787-94.
3. Onakpoya I., Posadzki P., Ernst E. Chromium supplementation in overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials / Onakpoya I., Posadzki P., Ernst E. // Obes Rev. – 2013. – № 14(6). – P. 496-507.
4. Abraham G.E. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 β during the menstrual cycle / Odell W.D., Swerdloff R.S., Hopper K. // J Clin Endocr. – 1972. – № 34. – P. 312-318.
5. Strauss J., Hsueh A. Ovarian hormone synthesis / Strauss J., Hsueh A. // Endocrinology. – 2001. – Vol 3. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. – P. 2043-2052.
6. Weigel N.L. Estrogen and progesterone action / Weigel N.L., Rowan B.G. // Endocrinology. – 2001. – Vol 3. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. – P. 2053-2060.
7. Erickson G.F. Folliculogenesis, ovulation, and luteogenesis / Erickson G.F. // Endocrinology. – 2001. – Vol 3. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. – P. 2061-2071.
8. McMahon C.D. Estradiol/progesterone implants increase food intake, reduce hyperglycemia and increase insulin resistance in endotoxemic steers / McMahon C.D., Elsasser T.H., Gunter D.R., Sanders L.G., Steele B.P., Sartin J.L. // J Endocrinol. – 1998. – № 159(3). – P. 469-78.
9. Guberman A. Hormonal contraception and epilepsy / Guberman A. // Neurology. – 1999. – № 53(4 Suppl 1). – P. 38-40.
10. Mas M. In vivo monitoring of brain neurotransmitter release for the assessment of neuroendocrine interactions / Mas M., Gonzalez-Mora J.L., Hernandez L. // Cell Mol Neurobiol. – 1996. – № 16(3). – P. 383-96.
11. Kim H.J. Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice / Kim H.J., Kim J.H., Noh S., Hur H.J., Sung M.J., Hwang J.T., et al. // J Proteome Res. – 2011. – № 10. – P. 722-731.
12. Bertrand R.L. Western diet increases serotonin availability in rat small intestine / Bertrand R.L., Senadheera S., Markus I., Liu L., Howitt L., Chen H., et al. // Endocrinology. – 2011. – № 152. – P. 36-47.
13. Srinivasan S. Serotonin regulates C. elegans fat and feeding through independent molecular mechanisms / Srinivasan S., Sadegh L., Elle I.C., Christensen A.G., Faergeman N.J., Ashrafi K. // Cell Metab. – 2008. – № 7. – P. 533-544.
14. Vijay R. Sheth. the function of serotonergic path of tryptophan metabolism in brain of rats with experimental diabetes mellitus type 2 / Vijay R. Chidrawar, Krishnakant N. Patel, Navin R. Sheth. // Pharmacological Research. – 2011. – № 32 (4). – P. 576-584.
15. Maximenko E.G. The level of tryptophan and serotonin in terms of seizure activity in the brain / Maximenko E.G., Savchenko V.N. // Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Medicine. – 2000. – № 494(1). – P. 40-43.
16. Kang Y.M. Serotonin modulates hypothalamic neuronal activity / Kang Y.M. // International Journal of Neuroscience. – 2004. – № 114 (3). – P. 299-319.

17. Pons R. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, treatment, and prognosis / Pons R., Ford B., Chiriboga C.A. // Neurology. – 2004. – № 62(7). – P. 1068-1065.

References (SCOPUS)

1. Barness L.A., Opitz J.M., Gilbert-Barness E. Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects. Med Genet. 2007;143A:3016-34.
2. Rimmer J.H., Yamaki K., Lowry B.M., Wang E., Vogel L.C. Obesity and obesity-related secondary conditions in adolescents with intellectual/developmental disabilities. J Intellect Disabil Res. 2010;54(9):787-94.
3. Onakpoya I., Posadzki P., Ernst E. Chromium supplementation in overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. Obes Rev. 2013;14(6):496-507.
4. Odell W.D., Swerdloff R.S., Hopper K. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 β during the menstrual cycle. J Clin Endocr. 1972;34:312-318.
5. Strauss J., Hsueh A. Ovarian hormone synthesis. Endocrinology. 2001;3:2043-2052.
6. Weigel N.L., Rowan B.G. Estrogen and progesterone action. Endocrinology. 2001;3:2053-2060.
7. Erickson G.F. Folliculogenesis, ovulation, and luteogenesis. Endocrinology. 2001;3:2061-2071.
8. McMahon C.D., Elsasser T.H., Gunter D.R., Sanders L.G., Steele B.P., Sartin J.L. Estradiol/progesterone implants increase food intake, reduce hyperglycemia and increase insulin resistance in endotoxemic steers. J Endocrinol. 1998;159:469-78.
9. Guberman A. Hormonal contraception and epilepsy. Neurology. 1999;53(4):38-40.
10. Mas M., Gonzalez-Mora J.L., Hernandez L. In vivo monitoring of brain neurotransmitter release for the assessment of neuroendocrine interactions. Cell Mol Neurobiol. 1996;16(3):383-96.
11. Kim H.J., Kim J.H., Noh S., Hur H.J., Sung M.J., Hwang J.T., et al. Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. J Proteome Res. 2011;10:722-731.
12. Bertrand R.L., Senadheera S., Markus I., Liu L., Howitt L., Chen H., et al. Western diet increases serotonin availability in rat small intestine. Endocrinology. 2011;152:36-47.
13. Srinivasan S., Sadegh L., Elle I.C., Christensen A.G., Faergeman N.J., Ashrafi K. Serotonin regulates C. elegans fat and feeding through independent molecular mechanisms. Cell Metab. 2008;7:533-544.
14. Vijay R. Chidrawar, Krishnakant N. Patel, Navin R. Sheth. the function of serotonergic path of tryptophan metabolism in brain of rats with experimental diabetes mellitus type 2. Pharmacological Research. 2011;32(4):576-584.
15. Maximenko E.G., Savchenko V.N. The level of tryptophan and serotonin in terms of seizure activity in the brain. Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Medicine. 2000;494(1):40-43.
16. Kang Y.M. Serotonin modulates hypothalamic neuronal activity. International Journal of Neuroscience. 2004;114(3):299-319.
17. Pons R., Ford B., Chiriboga C.A. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, treatment, and prognosis. Neurology. 2004;62(7):1068-1065.

Надійшла до редколегії 14.03.15

А. Александров, асп., В. Конопельнюк, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВМІСТ ПЕРИФЕРИЧНОГО СЕРОТОНІНУ ТА ТРИПТОФАНУ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ДОВГОТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ПРОГЕСТЕРОНУ

Було визначено вміст триптофану та серотоніну в слизовій оболонці 12-палої кишки та сироватці крові щурів за умов розвитку ожиріння, індукованого введенням прогестерону. Дослідження показали, що має місце зростання вмісту триптофану та серотоніну в слизовій оболонці 12-палої кишки та сироватці крові щурів хворих ожирінням, яке було індуковане введенням прогестерону, у порівнянні зі здоровою контрольною групою щурів. Отримані дані свідчать про залучення шляху біосинтезу серотоніну в цілому та вмісту серотоніну зокрема в розвиток ожиріння, індукованого введенням прогестерону.

Ключові слова: триптофан, серотонін, прогестерон.

А. Александров, асп., В. Конопельнюк, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

СОДЕРЖАНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО СЕРОТОНИНА И ТРИПТОФАНА У КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА

Было определено содержание триптофана и серотонина в слизистой 12-перстной кишки и сыворотке крови крыс при условиях развития ожирения, индуцированного введением прогестерона. Исследования показали, что имеет место повышение содержания триптофана и серотонина в слизистой 12-перстной кишки и сыворотке крови крыс больных ожирением, которое индуцировалось введением прогестерона, в сравнении со здоровой контрольной группой крыс. Полученные данные свидетельствуют о том, что путь биосинтеза серотонина в целом и содержание серотонина в частности вовлечены в развитие ожирения, индуцированного введением прогестерона.

Ключевые слова: триптофан, серотонин, прогестерон.

УДК 546.57:591.463.2

В. Калиновський, асп., А. Пустовалов, канд. біол. наук, М. Держинський, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
Г. Гродзюк, канд. хім. наук, Н. Андрюшина, канд. хім. наук
ТОВ "Наномедтех", Київ

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА КІСПЕПТИН-ОПОСЕРЕДКОВАНУ РЕГУЛЯЦІЮ МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СІМ'ЯНИКІВ ЩУРІВ

Встановлено, що наночастинки срібла пригнічують функціонування репродуктивної системи самців щурів. При цьому активація гіпоталамічного центру регуляції статевих функцій не мала стимулюючого впливу на сім'яник. Отримані дані дозволяють припустити, що токсична дія наночастинок срібла пов'язана із безпосередньою їхньою дією на сім'яник.

Ключові слова: Наночастинки, срібло, сім'яник, кіспептин.

Вступ

Наночастинки металів володіють специфічними фізико-хімічними та біологічними властивостями, що забезпечує все більше їх використання у сучасній науці, промисловості та медицині. Серед різних типів наночастинок значна увага приділяється використанню наночастинок срібла (НЧС). Завдяки своїм антибактеріальним властивостям НЧС використовуються як компоненти фільтрів, перев'язувальних матеріалів, антисептиків, дезодорантів, тканин та зубних паст [2, 4, 10]. В той же час в сучасній літературі існують дані щодо негативного впливу НЧС на клітинному та організменному рівнях. Так було показано, що НЧС здатні накопичуватись у різних органах, в тому числі й в мозку [6, 20], проходити крізь плацентарний [9, 10, 23] та гемато-тестикулярний бар'єри [14]. Також різними авторами у досліджах *in vitro* було виявлено здатність НЧС викликати пошкодження ДНК та біологічних мембран [11], а також ініціювати апоптичні процеси [8, 15]. *In vivo* вплив НЧС на функціонування систем організму, особливо репродуктивної, є значно менш описаним. Такі дослідження як правило стосуються хронічного впливу наночастинок [13, 21].

Центральною регуляторною молекулою репродуктивної системи ссавців є кіспептин [5, 19]. Кіспептини – це родина RF-амідних білків, які секретуються нейронами аркуатного ядра гіпоталамусу та мають стимулюючий вплив на гонадоліберин-продукуючі нейрони [3]. Таким чином, інтенсифікація кіспептинергічної сигналізації між нейронами гіпоталамусу призводить до зростання рівня гонадоліберину в крові і, відповідно, до активізації органів статевих системи [5]. Ці особливості зумовлюють можливість використання кіспептину для корекції порушень процесу статевого дозрівання та зміни функціонального стану гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи [22]. Для специфічної активації рецепторів до кіспептину найчастіше використовують кіспептин-10 – десятиамінокислотний пептид, що характеризується швидкою та порівняно нетривалою дією. Як селективний

антагоніст найчастіше використовується кіспептин-234 (також відомий як пептид -234, P-234) [16].

Матеріали і методи

Для отримання наночастинок срібла розміром 10-15 нм готували два розчини. Перший містив нітрат аргентуму (I) в концентрації 4 ммоль/л та 0,5 ммоль/л поліфосфату натрію (ПФН) у якості стабілізатора. Другий розчин містив аскорбінову кислоту в концентрації 2 ммоль/л та 0,02 моль/л NaOH. Розчини змішували в рівних об'ємах та перемішували впродовж 10 хвилин. Отриманий розчин аналізували методом растрової електронної мікроскопії за допомогою растрового мікроскопа LMU Mira3 Tescan (Tescan a.s., Чеська республіка) при напрузі прискорення 5–20 кВ. Мікроскоп був обладнаний приставкою Oxford X-MAX 80 мм (Oxford Instruments, США) для енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії. Кінцева молярна концентрація наночастинок складала 2 ммоль/л (відповідає масовій концентрації 0,2 мкг/л). Розчин зберігали в темряві при кімнатній температурі.

Дослідження було проведено на 54 самцях білих нелінійних щурів масою 250-300 г. Вік тварин складав 6 місяців. Тварин утримували в умовах віварію на стандартному раціоні з вільним доступом до води і корму.

Методом рандомізації щурів було поділено на 9 груп по 6 тварин в кожній. Схему введення відповідних препаратів наведено у Таблиці 1. Для внутрішньоочеревинних введення використовували 0,9 % розчин натрію хлориду, 0,25 ммоль/л розчин поліфосфату натрію та 2 ммоль/л розчин НЧС. Препарати вводили впродовж 10 діб.

Для інтрацеребровентрикулярних введення використовували кіспептин-10 (метастин-(45-54)-амід, MerckKGaA, Німеччина) та пептид 234 (кіспептин-234-трифлюорацетат, Sigma, США). На 8 добу експерименту тварин наркотизували сумішшю кетаміну (8мг/100г маси тіла) та ксилазину (1 мг/100г маси тіла). Місце проведення ін'єкції визначали за топографічним атласом [17]. Препарати вводили в порожнину лівого шлуночка мозку в дозі 3 мкг/100г маси тіла [1] впродовж 3 діб.

Таблиця 1. Характеристика експериментальних груп тварин

№ п/п	Назва групи	Назва препарату	
		Внутрішньоочеревинне введення (1-10 доба експерименту)	Інтрацеребровентрикулярне введення (8-10 доба експерименту)
1	Контроль	0,9% NaCl	–
2	ПФН	0,25 ммоль/л поліфосфат натрію	–
3	НЧС	2 ммоль/л розчин наночастинок срібла	–
4	КП-10	0,9% NaCl	Кіспептин-10
5	P-234	0,9% NaCl	Пептид-234
6	ПФН+КП-10	0,25 ммоль/л поліфосфат натрію	Кіспептин-10
7	ПФН+P-234	0,25 ммоль/л поліфосфат натрію	Пептид-234
8	НЧС+КП-10	2 ммоль/л розчин наночастинок срібла	Кіспептин-10
9	НЧС+P-234	2 ммоль/л розчин наночастинок срібла	Пептид-234

На десяту добу експерименту тварин декапітували та брали лівий сім'яник для подальших досліджень. Орган фіксували розчином Буена, зневоднювали в спиртах та заливали в парафін за стандартними гістологічними методиками. Для мікроскопічних досліджень виготовляли зрізи товщиною 5-6 мкм, які забарвлювали гематоксиліном Бюмера та еозином. Гістологічні препарати аналізували на мікроскопі Olympus BX51 (Olympus, Японія), обладнаного цифровою фотокамерою Camedia C-5050 zoom і програмним забезпеченням Olympus DP Soft 3.2. Для оцінки морфофункціонального стану сім'яника вимірювали діаметр звивистих сім'яних каналців, а також площу поперечного перерізу ядер клітин Сертолі та клітин Лейдіга [1].

Отримані дані презентували як середне $\pm$ стандартна похибка середнього ($M \pm m$). Статистичну обробку даних виконували за допомогою програми Statistica 6.0. Характер розподілу даних визначали за допомогою W-

критерію Шапіро-Уїлка. Оскільки відмінностей від нормального розподілу не було знайдено, для відмінності між групами оцінювали за t-критерієм Стюдента. Різницю вважали достовірною за $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення.

При дослідженні зрізів сім'яника тварин контрольної групи було не було виявлено патологічних змін. Сперматогенний епітелій був добре розвинутим, у просвіті багатьох каналців були присутні сперматозоїди. Ядра клітин Сертолі мали трикутну або видовжену форму, чітко виражене ядрце та малу кількість гетерохроматину. На ядерній оболонці деяких клітин Сертолі були присутні інвагінації. Клітини Лейдіга мали помірно оксифільну цитоплазму та округле ядро з добре вираженим ядрцем та невеликою кількістю пристінкового гетерохроматину. Всі ці дані свідчать про нормальне проходження спермато- та стероїдогенезу. Морфометричні параметри контрольної групи наведено у Таблиці 2.

Таблиця 2. Морфометричні параметри сім'яників щурів

Назва групи	Діаметр звивистих сім'яних каналців, мкм	Площа поперечного перерізу ядер клітин Сертолі, мкм ²	Площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга, мкм ²
Контроль	282,83 $\pm$ 3,85	134,33 $\pm$ 2,72	50,69 $\pm$ 0,90
ПФН	282,13 $\pm$ 3,97	135,67 $\pm$ 2,89	50,90 $\pm$ 0,64
НЧС	273,17 $\pm$ 3,56*	126,35 $\pm$ 1,68*	45,90 $\pm$ 0,59*
КП-10	290,48 $\pm$ 3,89*	139,92 $\pm$ 2,18	55,27 $\pm$ 0,61*
P-234	271,75 $\pm$ 3,47*	130,10 $\pm$ 2,17	45,52 $\pm$ 0,51*
ПФН+КП-10	289,19 $\pm$ 2,44*	138,97 $\pm$ 2,40	58,45 $\pm$ 0,73*
ПФН+P-234	274,78 $\pm$ 3,98*	129,28 $\pm$ 2,12	45,22 $\pm$ 0,65*
НЧС+КП-10	271,32 $\pm$ 2,48*	127,80 $\pm$ 1,85*	47,34 $\pm$ 0,56*
НЧС+P-234	247,93 $\pm$ 2,80*#	121,79 $\pm$ 2,05*#	43,81 $\pm$ 0,57*#

Примітка: * – відмінності достовірні відносно групи "Контроль" при $p < 0,05$; # – відмінності достовірні відносно групи "НЧС" при $p < 0,05$.

Введення кіспептину на фоні ін'єкцій фізіологічного розчину призвело до достовірного зростання діаметру звивистих сім'яних каналців та площі поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга (Табл. 2). Ці клітини мали оксифільну цитоплазму, їхні ядра були округлими та світлими, пристінковий гетерохроматин часто не було помітно. Клітини Сертолі мали великі трикутні або полігональні світлі ядра з інвагінаціями каріолеми. Також відмічалась тенденція до збільшення площі поперечного перерізу клітин Сертолі, хоча встановлені відмінності не були достовірними. Ці дані свідчать про стимулюючий вплив кіспептину на функціонування репродуктивної системи, що узгоджується з існуючими літературними даними [16].

Інтрацеребровентрикулярне введення пептиду-234 призвело до протилежного ефекту: було виявлено достовірне зниження функціональної активності клітин Лейдіга та активності сперматогенезу. Клітини Лейдіга мали світлу цитоплазму, округле або овальне ядро з глибокими пристінковим гетерохроматину. У деяких звивистих каналцях було також виявлено ознаки дегенерації сперматоцитів I порядку, що є одним із найбільш ранніх проявів зниження рівня тестикулярного стероїдогенезу [18]. Пригнічуючу дію пептиду-234 на репродуктивну систему було також показано в дослідженнях інших авторів [7, 12].

Ін'єкції розчину поліфосфату натрію як при поодинокому введенні, так і в комбінації з внутрішньошлуночко-

вим введенням фармакологічних препаратів не призвели до розвитку достовірних морфометричних та морфологічних змін, порівнюючи з відповідними групами, яким вводили фізіологічний розчин. Це свідчить про відсутність значущих ефектів стабілізатора наночастинок на функціонування сім'яників щурів.

Введення колоїдного розчину срібла призвело до достовірного зниження всіх виміряних морфометричних параметрів. Так, діаметр звивистих сім'яних каналців становив 273,17 $\pm$ 3,56 мкм (282,83 $\pm$ 3,85 мкм в контрольній групі), площа поперечного перерізу ядер клітин Сертолі – 126,35 $\pm$ 1,68 мкм² (134,33 $\pm$ 2,72 мкм² в контрольній групі), а площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга – 45,90 $\pm$ 0,59 мкм² (50,69 $\pm$ 0,90 мкм² в контрольній групі). Морфологічно це супроводжувалось підвищенням базофілії та гетерохроматинізації ядер, зниженням пінистості цитоплазми інтерстиціальних клітин, а також зміною форми ядер клітин Сертолі до більш округлої зі зменшенням інвагінацій ядерної оболонки (рис. 1). Не зважаючи на відсутність значних патогістологічних змін, у деяких каналцях були виявлені ознаки дегенерації сперматоцитів. Виявлені ознаки свідчать про пригнічення екзокринної та ендокринної функцій сім'яника. Враховуючи здатність наночастинок срібла спричиняти токсичні ефекти на окремі клітини [8], можна припустити, що виявлені нами зміни є результатом токсичного впливу наночастинок безпосередньо на інтерстиціальні клітини та сперматогенний епітелій.

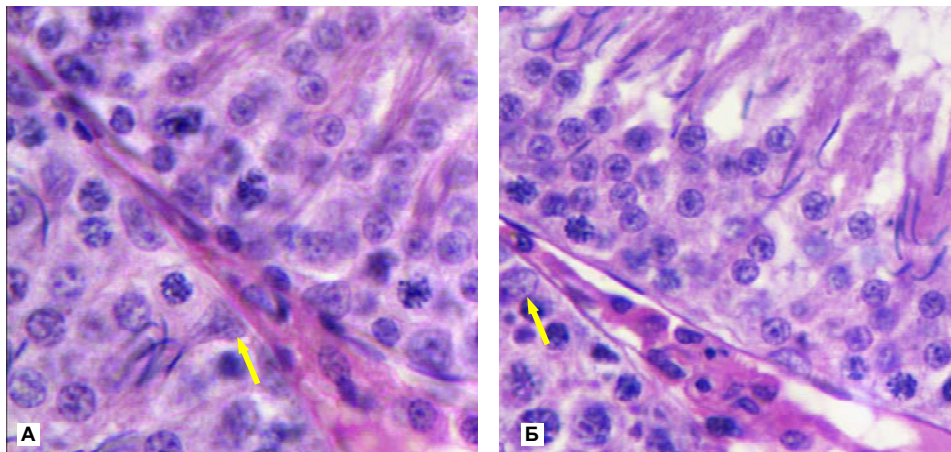


Рис. 1. Мікрофотографія звивистих сім'яних каналців щурів після введення фізіологічного розчину (А) та наночастинок срібла (Б). Стрілкою вказано на ядра клітин Сертолі (забарвлення гематоксиліном Бьюмера та еозином, 36. х400)

Стимуляція роботи статеві системи за допомогою кісспептину-10 на фоні ін'єкцій НЧС не призвела до достовірних змін відносно групи, якій вводили лише срібло. Відсутність відповіді на стимулюючий вплив може бути наслідком стресс-індукованих змін в сім'янику, в першу чергу в клітинах Лейдіга [15]. В той же час пригнічення роботи кісспептинергічної системи за умови введення НЧС призвело до достовірного зниження всіх морфометричних показників не тільки по відношенню до контролю, а й відносно тварин, яким вводили тільки розчин колоїдного срібла. Додатково відмічали появу в інтерстиціальній тканині клітин зі зморщеними гіперхромними ядрами, а також морфологічні зміни, аналогічні групі "НЧС". Аналізуючи ці дані, можна стверджувати, що пригнічення центрального компоненту гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи на фоні введення наночастинок срібла призводить до суттєвого пригнічення функціонування сім'яників щурів.

Висновки

Отримані результати свідчать про пригнічуючий вплив наночастинок срібла на функціональну активність сім'яників щурів, при чому цей ефект не вдалося компенсувати активацією гіпоталамічного регулятора роботи статеві системи. Виявлені зміни можуть бути пов'язані з цитотоксичною дією колоїдного срібла на клітини Лейдіга та компоненти сперматогенного епітелію, хоча встановлення точного механізму такого впливу потребує подальших досліджень.

Список використаних джерел

1. Морфологічні зміни в тестикулах щурів 24-місячного віку під впливом кісспептина на фоні блокади та активації альфа-адренорецепторів і при введенні мелатоніну / М. Матвієнко, А. Пустовалов, Н. Бузинська [та ін.] // Вісник проблем біології та медицини. – 2012. – Т. 95, № 2. – С. 170-173.
2. Прискока А.О. Дослідження гострої токсичності наночастинок срібла за внутрішньоочеревинного введення / А.О. Прискока // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – Т. 37, № 1. – С. 85-90.
3. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals / M. Lehman, C. Merkley, L. Coolen [et al.] // Brain Research. – 2010. – Vol. 1364. – P. 90-102.
4. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats / J. Lee, Y. Kim, K. Song [et al.] // Particle and Fibre Toxicology. – 2013. – Vol. 10, No 1. – P. 36.
5. Clarke H. Comprehensive review on kisspeptin and its role in reproductive disorders / H. Clarke, W. Dhillon, C. Jayasena // Endocrinology and Metabolism. – 2015. – Vol. 30, No 2. – P. 124-141.
6. Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test / J.-S. Hong, S. Kim, S. Lee [et al.] // Nanotoxicology. – 2014. – Vol. 8, No 4. – P. 349-362.
7. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist / R. Pineda, D. Garcia-Galiano, A. Roseweir // Endocrinology. – 2010. – Vol. 151, No 2. – P. 722-730.

8. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells / N. Asare, C. Instanes, W. Sandberg [et al.] // Toxicology. – 2012. – Vol. 291, No 1-3. – P. 65-72.
9. Distribution of silver nanoparticles in pregnant mice and developing embryos / C. Austin, T. Umbreit, K. Brown [et al.] // Nanotoxicology. – 2011. – Vol. 6, No 8. – P. 912-922.
10. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure / M. Zande, R. Vanderbriel, E. Doren [et al.] // ACS Nano. – 2012. – Vol. 6, No 8. – P. 7427-7442.
11. Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo / C. Ordzhonikidze, L. Ramaiyya, E. Egorova [et al.] // Acta naturae. – 2009. – Vol. 1, No 3. – P. 99-101.
12. GPR54-dependent stimulation of luteinizing hormone secretion by neurokinin B in prepubertal rats / P. Grachev, X. Li, Y. Lin // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, No 9. – P. 1-7.
13. Histopathological and ultra structural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration / M. Thakur, H. Gupta, D. Singh [et al.] // Journal of Nanobiotechnology. – 2014. – Vol. 12, No 1. – P. 42.
14. Lan Z. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier / Z. Lan, W.-X. Yang // Nanomedicine-UK. – 2012. – Vol. 7, No 4. – P. 579-596.
15. Male- and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse / J. Han, J.K. Jeong, S. Gurunathan [et al.] // Nanotoxicology. – 2015. – P. 1-13.
16. Matvienko M. Variety of functions and effects of kisspeptin / M. Matvienko, A. Pustovalov, N. Dzerzhinsky // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29, № 1. – P. 11-20.
17. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – 6th ed. – London : Academic Press, 2007. – 456 p.
18. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system / D. Creasy, A. Bube, E. Rijk [et al.] // Toxicologic Pathology. – 2012. – Vol. 40, No 6. – P. 40S-121S.
19. Sanchez-Garrido M., Metabolic control of puberty: roles of leptin and kisspeptins / M. Sanchez-Garrido, M. Tena-Sempere // Hormones and Behavior. – 2013. – Vol. 64, No 2. – P. 187-194.
20. Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles / Y. Lee, P. Kim, J. Yoon [et al.] // Nanotoxicology. – 2012. – Vol. 7, No 6. – P. 1120-1130.
21. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats / J. Gromadzka-Ostrowska, K. Dziendzikowska, A. Lankoff [et al.] // Toxicology Letters. – 2012. – Vol. 214, No 3. – P. 251-258.
22. Skorupskaitė K. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease / K. Skorupskaitė, J. George, R. Anderson // Human Reproduction Update. – 2014. – Vol. 20, No 4. – P. 485-500.
23. Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats / E. Melnik, Yu. Buzulukov, V. Demin [et al.] // Acta naturae. – 2013. – Vol. 5, No 3. – P. 107-115.

References.

1. Matvienko MG, Pustovalov AS, Buzynska NO, Dzerzhinsky ME. Morphofunctional changes in 24-month rat testes under kisspeptin influence against blockade and activation of alpha-adrenergic receptors and melatonin administration. BMIR, 2012;95(2):170-3. Ukrainian.
2. Pryskoka AO. Acute intraperitoneal toxicity study of silver nanoparticles. Pharmacology and Drug Toxicology, 2014;37(1): 85-90. Ukrainian.
3. Lehman M, Merkley C, Coolen L, Goodman R. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. Brain Res 2010;1364:90-102.
4. Lee J, Kim Y, Song K, Ryu H, Sung J, Park J, et al. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. Part Fibre Toxicol 2013;10:36.

5. Clarke H, Dhillon W, Jayasena C. Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrinol Metab* 2015;30:124–41.
6. Hong J-S, Kim S, Lee S, Jo E, Lee B, Yoon J, et al. Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. *Nanotoxicology* 2014;8:349–62.
7. Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, et al. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 2010;151:722–30.
8. Asare N, Instanes C, Sandberg W, Refsnes M, Schwarze P, Kruszewski M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 2012;291:65–72.
9. Austin C, Umbreit T, Brown K, Barber D, Dair B, Francke-Carroll S, et al. Distribution of silver nanoparticles in pregnant mice and developing embryos. *Nanotoxicology* 2011;6:912–22.
10. Zande M, Vandebriel R, Doren E, Kramer E, Rivera Z, Serrano-Rojero C, et al. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano* 2012;6:7427–42.
11. Ordzhonikidze CG, Ramaiya LK, Egorova EM, Rubanovich AV. Genotoxic effects of silver nanoparticles on mice in vivo. *Acta Naturae* 2009;1:99–101.
12. Grachev P, Li X, Lin Y, Hu M, Elsamani L, Paterson S, et al. GPR54-Dependent Stimulation of Luteinizing Hormone Secretion by Neurokinin B in Prepubertal Rats. *Plos One* 2012;7.
13. Thakur M, Gupta H, Singh D, Mohanty I, Maheswari U, Vanage G, et al. Histopathological and ultra structural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration. *J Nanobiotechnology* 2014;12:42.

14. Lan Z, Yang W-X. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier. *Nanomedicine-Uk* 2012;7:579–96.
15. Han J, Jeong J-K, Gurunathan S, Choi Y-J, Das J, Kwon D-N, et al. Male- and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology* 2015:1–13.
16. Matvienko MG, Pustovalov AS, Dzerzhinsky ME. Variety of functions and effects of kisspeptin. *Biopolymers and Cell* 2013;29:11–20.
17. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. San Diego: Elsevier Academic Press;2007.
18. Creasy D, Bube A, de Rijk E, Kandori H. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicologic Pathology* 2012;40:40S–121S.
19. Sanchez-Garrido M, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty: Roles of leptin and kisspeptins. *Horm Behav* 2013;64:187–94.
20. Lee Y, Kim P, Yoon J, Lee B, Choi K, Kil K-H, et al. Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology* 2012;7:1120–30.
21. Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, et al. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol Lett* 2012;214:251–8.
22. Skorupskaite K, George J, Anderson R. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human Reproduction Update* 2014;20:485–500.
23. Melnik E, Buzulukov Y, Demin V, Demin V, Gmshinski I, Tyshko N, et al. Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats. *Acta Naturae* 2013;5:107–15.

Надійшла до редколегії 29.02.16

В. Калиновский, асп., А. Пустовалов, канд. биол. наук, М. Держинский, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
Г. Гродзюк, канд. хим. наук, Н. Андришина, канд. хим. наук
ООО "Наномедтех", Киев

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА КИСПЕПТИН-ОПОСРЕДОВАННУЮ РЕГУЛЯЦИЮ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЕМЕННИКОВ КРЫС

Показано, что наночастицы серебра подавляют функционирование репродуктивной системы самцов крыс. При этом активация гипоталамического центра регуляции половой функции не имела стимулирующего воздействия на семенник. Полученные данные позволяют предположить, что токсическое действие наночастиц серебра связано с их непосредственным действием на семенники.
Ключевые слова: Наночастицы, серебро, киспептин, семенник.

V. Kalynovskyi, PhDstud., A. Pustovalov, PhD, M. Dzerzhynsky, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
G. Grodzuk, PhD, N. Andriushina, PhD
Nanomedtech-LLC, Kyiv

KISSPEPTIN-MEDIATED REGULATION OF THE MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF THE RAT TESTICLES UNDER THE EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES

It was shown that silver nanoparticles downregulate reproductive system of male rats. At the same time, activation of the hypothalamic sex-function regulatory center did not result in any stimulatory effect on testes. We suppose that toxicity of silver nanoparticles is due to their direct action on the testicles.
Key words: Nanoparticles, silver, kisspeptin, testis.

УДК 577.353.3

П. Вірич, асп., О. Шелюк, канд. біол. наук,
В. Мартинюк, д-р біол. наук, С. Чумаков, інж.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ОПТИЧНА СИСТЕМА РЕЄСТРАЦІЇ СКОРОЧЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ В ІЗОМЕТРИЧНОМУ РЕЖИМІ

Була розроблена оптична система реєстрації скорочення гладеньких м'язів в ізометричному режимі. Тестування системи проводили на гладеньком'язових смужках шлунку та саесит щура. Було перевірено можливість реєстрування розробленою оптичною системою спонтанної активності гладеньких м'язів. Отримані параметри м'язових скорочень відповідають літературним даним. Таким чином, розроблений оптико-механічний метод реєстрації сили та швидкості можна використовувати для запису ізометричних скорочень гладеньких м'язів шлунку та саесит щурів і, відповідно, для вивчення впливу різних ефекторів на їхню механокінетику.

Ключові слова: гладенькі м'язи, ізометричне скорочення, механокінетичні параметри.

Вступ. На сьогодні існують значні досягнення в з'ясуванні механізмів (іонних, молекулярних і мембранних) скоротливої активності м'язів, зокрема гладеньких [4-6]. Проте вивчення феноменологічних властивостей інтактного ГМ, зокрема кінетичних закономірностей процесу скорочення-розслаблення в ізометричному режимі, залишається вкрай необхідним [1, 2, 3]. По-перше, від-

стеження зміни напруження м'язового препарату в часі робить можливим визначення об'єктивних параметрів скоротливої відповіді (наприклад, амплітуда f_m та час t_m , за який досягається амплітудне значення сили скорочення, а також швидкості скорочення та розслаблення). Це, в свою чергу, створює підґрунтя для з'ясування особливостей впливу на скоротливу відповідь різнома-

нітних фізико-хімічних факторів, а також для об'єктивного кількісного порівняння динамічних властивостей різних м'язів, зокрема у випадку використання різноманітних біологічно-активних речовин (ацетилхоліну, оксиду азоту, норадреналіну, простагландинів, нейропептидів, АТФ, тромбоксану А₂, вазоактивного пептиду, субстанції Р, гістаміну тощо). По-друге, для вирішення однієї із фундаментальних проблем біофізики ГМ, яка стосується механізмів електро- та фармако механічного спряження, є важливим створення стабільної системи реєстрації скорочення гладеньких м'язів. У зв'язку з цим, основною метою даної роботи було розробити нову систему реєстрації на основі оптичного датчика сили скорочення.

Матеріали та методи. Тензометричні досліди проводили на препаратах гладеньких м'язів шлунку нелінійних білих щурів-самців, які перебували у стандартних умовах утримання та годівлі у віварії ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження". Середня вага тварин становила 240–260 г. Щурів декапітували, вилучали шлунок та саесит, промивали розчином Кребса. У ході приготування препаратів шар м'язів звільняли від серозної та слизової оболонок і нарізали гладеньком'язові смужки (середній розмір – 1,5–2 × 10 мм). Такі процедури, що проводилися при кімнатній температурі, дозволяють вилучити нервові пейсмейкери, що здатні впливати на скорочення. Крім того, не важливо з якого відділу шлунка було відібрано матеріал, так як основні нем'язові пейсмейкери видалено, а клітини Кахаля розміщені рівномірно по всьому м'язовому шарі.

У роботі використовували наступні розчини:

– фізіологічний розчин Кребса (мМ/л): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; NaHCO₃ – 15,5; NaH₂PO₄ – 1,2; MgCl₂ – 1,2; CaCl₂ – 2,5; глюкоза – 11,5 (pH 7,4);

– гіперкалієвий розчин містив K⁺ у концентрації 80 мМ. Його готували шляхом заміни у вихідному розчині Кребса необхідної частини іонів натрію на еквімолярну кількість K⁺ (pH 7,4);

– розчин карбахоліну (10 мкМ), для чого початково готували його концентрований водний розчин (з розрахунку додавання 1% розчину речовини до кінцевого об'єму), аліквоту якого вносили в розчин Кребса до одержання необхідної концентрації.

Реєстрацію механокінетичних кривих скорочення розслаблення проводили за допомогою модуля збору даних m-DAQ12 (HolitDataSystemsLtd., Україна) та програмного забезпечення PowerGraph Professional 3.3, статистична обробка здійснювалась програмою Origin 8.

Результати та обговорення. Сучасні технології дозволяють розробляти сенсори мініатюрних розмірів для реєстрації ряду величин, що включають силу, переміщення, прискорення, вологість, тиск, та інші з надзвичайною точністю. На основі таких приладів можливо розробити системи реєстрації сили скорочень гладеньких м'язів, які б мали компактні розміри та відповідали встановленим нормам.

Розрізняють два типи м'язового скорочення – ізотонічне, для реєстрації сили скорочення при фіксованій довжині, та ізометричне – лінійного переміщення м'язу за сталої сили скорочення.

Основною проблемою систем реєстрації сили скорочення, або тензометрії гладеньких м'язів є їх жорстка фіксація. В реальних експериментах повного знерухоження не можливо досягти і присутнє зміщення коливається в межах 10–50 мкм, що порівняно з довжиною

м'язової смужки (10–15 мм), не є суттєвим. Перші подібні системи базувались на механотронах та тензорезисторній технології.

Альтернативою даним системам є використання оптичної техніки, так званих оптичних пар, або оптоотронів. В основі конструкції лежить джерело світла з приймачем, що можуть працювати в різних діапазонах електромагнітного випромінювання – від інфрачервоного до короткохвильового спектру видимої області. Дана система володіє високою швидкодією, низьким температурним дрейфом, проста у застосуванні та має низьку вартість. На основі даного елементу є можливим розробка системи реєстрації надмалих переміщень затвору, який перекиватиме світловий потік між джерелом світла та фотоприймачем.

Виходячи з вищесказаного нами була розроблена оптична система реєстрації скорочення – розслаблення гладеньких м'язів в ізометричному режимі. В основі принципу її вимірювання сили скорочення лежить реєстрація надмалого (порядку десятка мікрон) відхилення пружної сталеві пластины (або стрижня), яке спостерігається у відповідь на силу, що розвивається при скороченні гладеньком'язової смужки. Остання фіксується за допомогою двох гачків – перший на пластині датчика, другий – на камері, адовжина препарату та сила його натягу контролюється за допомогою повзунків. Камера виготовлена з нейтрального органічного скла для уникнення вимивання в інкубуючий розчин побічних речовин.

Оптична система реєстрації базується на оптоотронній технології, що складається з джерела світла (білий світлодіод), і фотоприймача (фотодіод з максимумом чутливості до жовтого світла). Металева пружна пластина (або стрижень) у стані безсилового навантаження екранує потік світла від світлодіоду, на фотодіоді-приймачі в цей час реєструється темновий фотострум. Силове навантаження в діапазоні від 0 до 98 мН (10 г) призводить до відхилення пластинки і зміну світлового потоку від світлодіоду до фотодіоду. Фотострум, що виникає на фотоприймачі, підсилюється операційним підсилювачем з крутизною перетворення 1В/19,6 мН. Інтенсивність падаючого світла лінійно залежить від силового навантаження на пластину в діапазоні 0 – 10 г. Навантаження більше 100 мН призводить до нелінійної відповіді фотоприймача, що пов'язано з особливостями використовуваного матеріалу. Дана властивість вводить обмеження використання датчика лише у даному діапазоні. Погрішність вимірювання тестового навантаження 20 мН складає ± 0,02 мН (n=10), що становить 1 % від величини, що вимірюється. Дрейф темнового струму протягом 60 хвилин не перевищує 10 мВ, що відповідає навантаженню 0,3 мН. Реєстраційна система обладнана потенціометром, який дозволяє корегувати темновий фотострум до положення "нуль". Після зняття тестового навантаження в 20 мН (2 г) базова лінія повністю відновлюється. Інерційність системи реєстрації, що встановлюється по виходу фотоструму на стаціонарний рівень після прикладення тестового навантаження, складає порядку 5 мс, що є достатнім для вимірювання динаміки сили скорочення гладеньких м'язів. Проте, дана система є чутливою до температури навколишнього середовища. Але в діапазоні 19–25 °С похибка вимірювань не перевищує 5%.

Матеріал використаний для кріплення голок та для основи датчика – стрижень з високолегованої сталі, яка крім карбону має в своєму складі атоми вольфраму, молібдену, ванадію та кобальту, що забезпечує незмінну пружність та твердість в широкому діапазоні температур (до 200 °С). Основний внесок в температурний

дрейф вносять оптрон та допоміжні компоненти – резистори, конденсатори, підсилювачі та ін.

Камера для інкубування має розміри 70х70х70 мм з водним термостатом об'ємом 170 мл, над яким знаходиться камера реєстрації з розмірами 30х60х5 мм з гачками для фіксації смужок гладеньких м'язів на рівні 1 мм від дна та системою контролю їх натягу. Експери-

ментальна камера має вхідний та вихідний отвори для руху омиваючого розчину (37°C) зі швидкістю протікання 1,5 мл/хв. До порожнини, яка знаходилась під робочою камерою подавали нагріту воду від рідинного термостату. Схематичне представлення робочої установки для тензометричних досліджень подано на рис. 1.

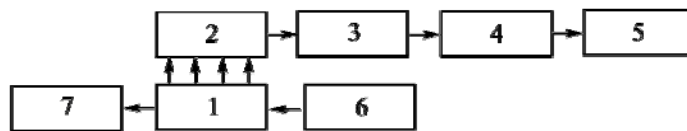


Рис. 1. Блок-схема пристрою для дослідження скоротливої активності гладеньком'язових смужок в ізометричних умовах:

1 – робоча камера, заповнена робочим розчином, з гладеньком'язовим препаратом, який закріплено на сталевих гачках;

2 – тензометричний датчик; 3 – підсилювач з електричним потенціометром; 4 – модуль збору даних (АЦП);

5 – комп'ютер з програмою-реєстратором PowerGraph 3.3.; 6 – набір робочих розчинів;

7 – перистальтичний насос

Фіксацію препарату проводили на хромованих голках, задаючи початкове навантаження близько 10 мН і залишали на 1 годину (до появи спонтанних скорочень постійної амплітуди і частоти та скорочень, викликаних гіперкалієвим розчином та карбахоліном, з постійними механокінетичними параметрами).

Тестування розробленої системи реєстрації скорочення – розслаблення гладеньких м'язів проводили на смужках шлунку та саесит щура. Для цього були зареєстровані скоротливі відповіді гладеньком'язових препаратів шлунку та кишечника (саесит) за умов дії різних активуючих факторів (K^+ -деполяризація (80 мМ), аплікація карбахоліном (10 мМ).

При проведенні експериментів в однакових умовах (гіперкалієвий розчин 80 мМ), були отримані ізометричні скорочення, які наведено на рис. 2А. Скорочення реєстрували на одному препараті в різні моменти часу протягом першої години після внесення препарату в робочу камеру (так зване "впрацювання" препарату).

Нормована швидкість скорочення гладеньком'язових смужок шлунку за стимуляції гіперкалієвим розчином становила $4,33 \pm 0,21 \text{ с}^{-1}$, амплітуда – $61 \pm 2,56 \text{ мН}$. Аналогічні показники для гладеньком'язових смужок сліпої кишки становили: $4,72 \pm 0,35 \text{ с}^{-1}$ та $65 \pm 4,2 \text{ мН}$.

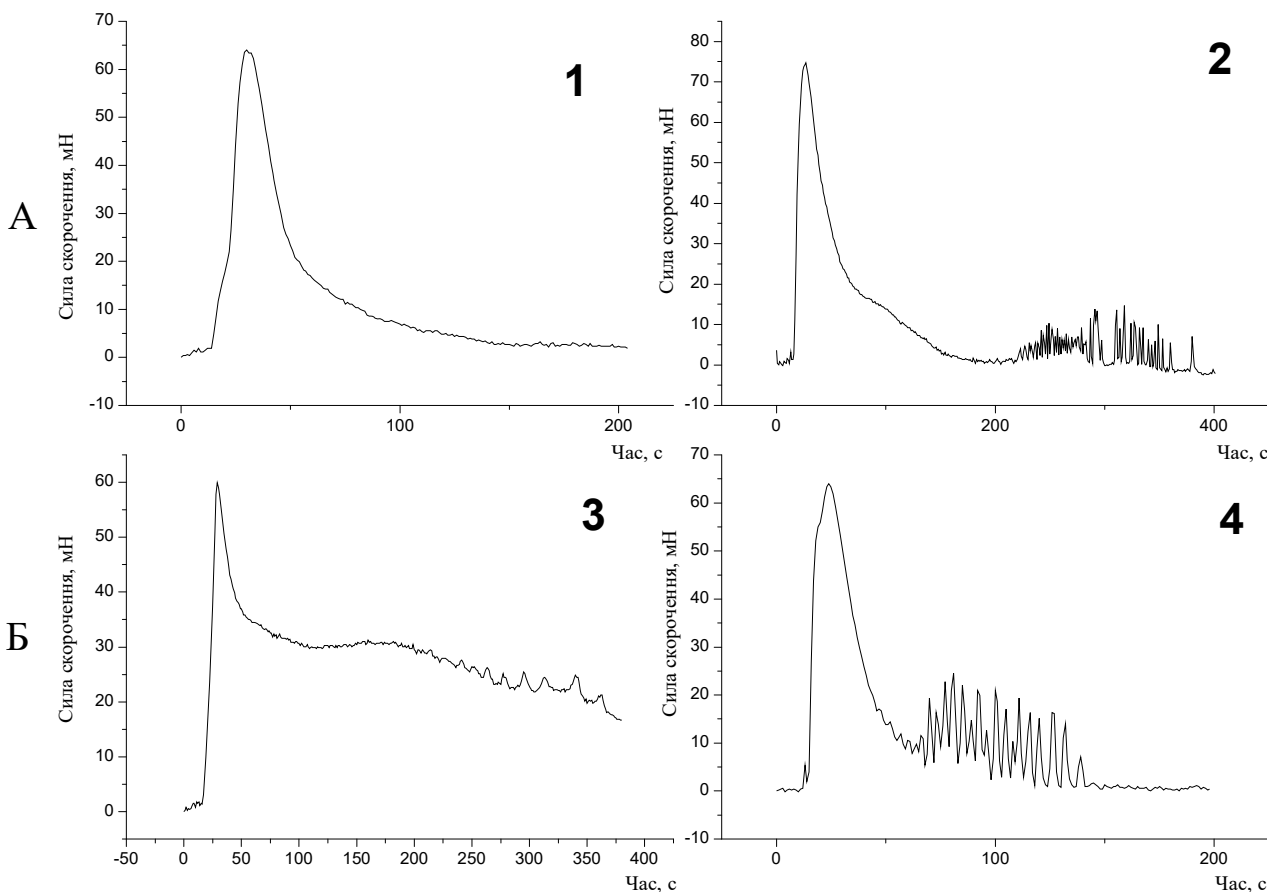


Рис. 2. Механокінетика ізометричних скорочень гладеньком'язових препаратів шлунку (1, 3) та саесит (2, 4), що були викликані аплікацією гіперкалієвого розчину (80 мМ) (А) та карбахоліну (Б)

З метою подальшого розширення сфери використання вищезазначеного методу реєстрації, були зареєстровані ізометричні скоротливі відповіді, що викликані стимуляцією карбохоліном (Рис. 2Б.). Отримані механокінетичні криві характеризувалися наступними кінетичними параметрами: нормована максимальна швидкість скорочення гладеньком'язових препаратів шлунку складала $5,43 \pm 0,24 \text{ c}^{-1}$, амплітуда $65 \pm 4 \text{ мН}$, для саесум – $6,06 \pm 0,29 \text{ c}^{-1}$ та $71 \pm 4 \text{ мН}$.

Таким чином, отримані параметри скорочень гладеньких м'язів відповідають літературним даним [3, 6, 7], що дозволяє використовувати розроблений метод вимірювання для реєстрації сили та швидкості скорочень гладеньких м'язів різних відділів шлунково-кишкового тракту.

Показником нормальної функціональної активності гладеньких м'язів являється їх спонтанна активність. Саме тому нами було перевірено можливість її реєстрування розробленою оптичною системою (Рис. 3).

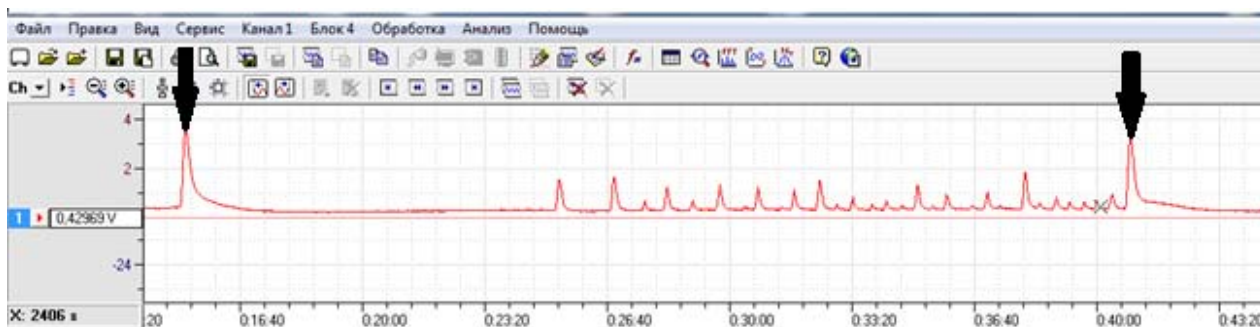


Рис.3. Спонтанна активність гладеньком'язового препарату при стимуляції гіперкалієвим розчином (моменти стимуляції показані стрілками)

Висновки. Таким чином, по-перше, незалежно від природи стимулу, який індукував скорочення (калієва деполяризація, карбохолін), отримані механокінетичні криві дуже добре відтворювалися. По-друге, значення таких механокінетичних параметрів, як нормована максимальна швидкість V_n та амплітуда відповідають літературним даним. Таким чином розроблений оптико-механічний метод реєстрації скорочення гладеньких м'язів є цілком придатним для реєстрації ізометричних скорочень гладеньких м'язів шлунку та саесум щурів і, відповідно, для вивчення впливу різних ефektorів на їхню механокінетику.

Список використаних джерел

1. A comparison of effects measured with isotonic and isometric recording: I. Concentration-effect curves for agonists / [R. Barlow, S. Bond, C. Grant et al.]. // British Journal of Pharmacology. – 2001. – N133. – P. 1081–1086.
2. A comparison of effects measured with isotonic and isometric recording: II. Concentration-effect curves for physiological antagonists / [R. Barlow, S. Bond, C. Grant et al.]. // British Journal of Pharmacology. – 2001. – N133. – P. 1087–1095.
3. Burduga T. V. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation / T. V. Burduga, S. A. Kosterin. // General Physiology and Biophysics. – 1991. – N10. – P. 589–598.
4. Sanders K. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review / Sanders. // Journal of Applied Physiology. – 2001. – N91. – P. 1438–1449.

5. Shuba M. F. Mechanisms of the inhibitory action of neurotransmitters on smooth muscles / M. F. Shuba, I. A. Vladimirova, I. B. Philippov. // Neurophysiology. – 2003. – N35. – C. 252–261.
6. Webb R. C. Smooth muscle contraction and relaxation / Webb. // American Physiology Society. – 2003. – N27. – P. 201–206.
7. Механокінетика "скорочення-розслаблення" кільцевого м'язу сліпої кишки (саесум) щурів // – 2006. – Т.14, № 3. – С. 63–75. / О. В. Онуфрійчук, О. В. Цимбалюк, М. С. Мірошніченко, С. О. Костерін. // Фізика живого. – 2006. – №3. – С. 63–75.

References

1. Barlow RB, Bond SM, Grant C, McQueen DC, Yaqoob Z. A comparison of effects measured with isotonic and isometric recording: I. Concentration-effect curves of oragonists. British Journal of Pharmacology 2001;133:1081-5.
2. Barlow RB, Bond SM, Grant C, McQueen DC, Yaqoob Z. A comparison of effects measured with isotonic and isometric recording: II. Concentration-effect curves of or physiological antagonists. British Journal of Pharmacology. 2001;133:1087-8.
3. Burduga TV, Kosterin SA. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. General Physiology and Biophysics. 1991;10:589-9.
4. Sanders K. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review. Journal of Applied Physiology 2001;91:1438-11.
5. Shuba MF, Vladimirova IA, Philippov IB. Mechanisms of the inhibitory action of neurotransmitters on smooth muscles. Neurophysiology. 2003;35:252-9.
6. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. American Physiology Society. 2003;27:201-5.
7. Onufriyuk OV, Tsybalyuk OV, Miroshnychenko MS, Kosterin S.O. [Mechanokinetic "contraction-relaxation" circular muscle of caecum rats]. Fizyka Zhivogo. 2006;3:63-12.

Надійшла до редколегії 31.05.16

П. Вирич, асп., О. Шелюк, канд. биол. наук, В. Мартынюк, д-р биол. наук, С. Чумаков, инж. Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОПТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА РЕГИСТРАЦИИ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ В ИЗОМЕТРИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ

Была разработана оптическая система регистрации сокращения гладких мышц в изометрическом режиме. Тестирование системы проводили на гладкомышечных полосках желудка и саесум крысы. Было проверено возможность регистрации разработанной оптической системой спонтанной активности гладких мышц. Полученные параметры мышечных сокращений соответствуют литературным данным. Таким образом, разработан оптико-механический метод регистрации силы и скорости можно использовать для записи изометрических сокращений гладких мышц желудка и саесум крыс и, соответственно, для изучения влияния различных эфektorов на их механокинетику.

Ключевые слова: гладкие мышцы, изометрическое сокращение, механокинетические параметры.

P. Virych, PhD Stud., O. Shelyuk, PhD., V. Martynyuk, Dr. of Sci., S. Chumakov, Eng. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE OPTICAL REGISTRATION SYSTEM ISOMETRIC CONTRACTION SMOOTH MUSCLE

The optical system registration of smooth muscle contraction in isometric mode was developed. Testing of system on smooth muscle strips of rat stomach and caecum was performed. It was tested the possibility of recording optical system spontaneous activity of smooth muscle. The resulting muscle contractions parameters correspond to the literature. Thus designed optical-mechanical method for detecting force and speed can be used for recording isometric contractions of smooth muscles of the stomach and caecum of rats and, therefore, to study the effect of different effectors their mechanokinetic.

Keywords: smooth muscle, isometric contractions, mechanokinetic parameters.

УДК 577.217.5

Н. Воробйова, асп., О. Корнелюк, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
Д. Ложко, мол. наук. співроб.
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

СТАБІЛЬНІСТЬ РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА AIMP1/p43 ЛЮДИНИ В НАНОКОМПОЗИТНОМУ КОМПЛЕКСІ З БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Досліджено стабільність рекомбінантного білка AIMP1/p43 – компонента аміноацил-тРНК-синтетазного комплексу вищих еукаріот у наноконкомпозитному комплексі з β -циклодекстрином. Показано, що у складі наноконкомпозитного комплексу температурна стабільність AIMP1/p43 суттєво підвищується. Локальний конформаційний перехід, пов'язаний з експонуванням залишку Trp271 на поверхні AIMP1/p43, спостерігається при 43°C, а у складі наноконкомпозитного комплексу – при 52°C. Стабілізація білка AIMP1/p43 у складі наноконкомпозитного комплексу відкриває можливість для подальших структурно-функціональних досліджень та його використання як нового біотехнологічного продукту в біомедицині.

Ключові слова: AIMP1/p43, β -циклодекстрин, стабілізація, флуоресцентна спектроскопія.

Вступ. Одним з провідних напрямів сучасної біотехнології є створення нових біомедичних препаратів на основі рекомбінантних білків [1]. Використання бактеріальних систем для експресії еукаріотних генів є простим, швидким, недорогим і надійним методом, який дозволяє отримати рекомбінантні білки у препаративних кількостях в нативному стані, що є необхідною умовою для їх впровадження в біотехнологічне виробництво. Однак, бактеріальні системи експресії мають ряд істотних недоліків, як наприклад, відсутність посттрансляційних модифікацій рекомбінантних білків та можлива висока агрегаційна здатність і формування тілець включення (inclusion bodies) внаслідок високого рівня експресії та неправильного фолдингу білків [11].

Дослідження механізму агрегації білків і механізмів, що їй запобігають, поряд з фундаментальним значенням має істотну практичну цінність для розробки підходів до терапії так званих конформаційних нейродегенеративних хвороб, зумовлених агрегацією білків. У клітинах агрегація білків може бути обумовлена різними процесами, насамперед, тепловим та окиснювальним стресом, причому шаперонна система запобігає агрегації. *In vitro* нативні білки можуть бути розгорнуті в результаті теплової денатурації, а також під дією денатуруючих агентів, таких як гуанідингідрохлорид або сечовина [3; 4]. Розгорнуті білки можуть взаємодіяти між собою, в основному, за участю експонованих гідрофобних поверхонь з утворенням амілоїдних або аморфних агрегатів [3; 4]. У зв'язку з цим дослідження механізмів агрегації білків та її пригнічення різними агентами природного і штучного походження є одним з головних напрямів сучасної молекулярної біотехнології.

Для зниження агрегаційної здатності білків, зокрема, використовують низькомолекулярні сполуки, такі як циклодекстрини (ЦД) та їхні похідні [12; 13]. Здатність ЦД пригнічувати агрегацію білків пояснюється їх властивістю зв'язуватися з залишками ароматичних амінокислот в ненативних (частково розгорнутих) формах білків.

Білок AIMP1/p43 (Aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1, proEMAP II) є обов'язковим компонентом мультиаміноацил-тРНКсинтетазного комплексу вищих еукаріотів [19]. Враховуючи, що білок AIMP1/p43 містить послідовність цитокіна EMAP II і ряд не досліджених до кінця властивостей, зокрема локалізацію білка AIMP1/p43 в клітинному ядрі [9; 15] та наявність у нього цитокінових активностей [16; 8], можна віднести даний білок до молекулярних об'єктів, які є перспективними продуктами сучасної біотехнології для наступного впровадження як нових терапевтичних білків. Слід зазначити, що на відміну від EMAP II, цей поліпептид є досить нестабіль-

ним, оскільки належить до природно неструктурованих білків [20; 5].

На сьогоднішній день просторова структура повнорозмірного білка AIMP1/p43 (312 а.з.) не встановлена, кристалографічна структура визначена тільки для N-кінцевого модуля (7-70 а.з.), який представляє собою α -спіральну ділянку [7] та для C-кінцевого модуля (147-312 а.з.) – цитокіна EMAP II [17]. Центральна ділянка (71-146 а.з.), яка з'єднує N-кінцевий та C-кінцевий модулі, є неструктурованою частиною білка з невідомою просторовою структурою. Для проведення структурних досліджень білка AIMP1/p43 методами рентгеноструктурної кристалографії та мультимірної ЯМР-спектроскопії необхідні препаративні кількості білка у стабільному розчинному стані.

В даній роботі для стабілізації структури білка AIMP1/p43 у розчині та запобіганню його агрегації використано β -циклодекстрин (β -ЦД). Молекула β -ЦД представляє собою гептамер залишків α -D-глюкози (рис.1) і успішно застосовується в сучасній фармакології в якості допоміжного агента, здатного знизити агрегацію білків, збільшити їх розчинність та підвищити стійкість до дії протеолітичних ферментів [6].

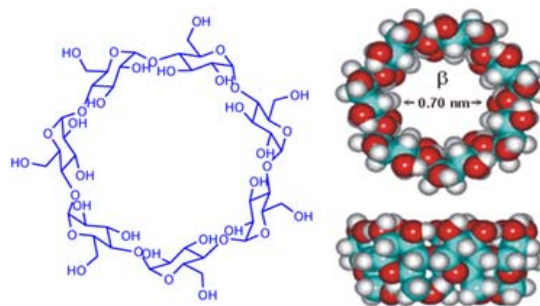


Рис.1. Хімічна будова молекули β -циклодекструну

Матеріали і методи

Експресія, виділення та очистка рекомбінантного білка AIMP1/p43 з клітин *E.coli*.

У роботі використано штам-продуцент рекомбінантних білків, отриманий на основі реципієнта *E.coli* BL21(DE3)pLysE. Клітини були трансформовані за загальноприйнятою методикою плазмідною конструкцією pET28b-p43, що містила ген, який кодує синтез цільового білка AIMP1/p43 під контролем промотора фага T7. Селективним маркером плазмиди pET28b є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотика канаміцину.

Фізико-хімічні властивості білка AIMP1/p43 проаналізовано за допомогою сервера ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>): молекулярна вага 35175.5 Да; ізоелектрична точка $pI = 8.62$; коефіцієнт екстинції AIMP1/p43 при довжині хвилі 280 нм – $9970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (0,29 мг/мл).

Штам-продуцент *E.coli* BL21(DE3)pLysE вирощували на середовищі Luria-Bertani (LB) з додаванням антибіотика канаміцина до кінцевої концентрації 30 мг/мл. Культуру *E.coli* інкубували при температурі 37°C та інтенсивному струшуванні (250 об/хв.) до досягнення нею оптичної густини 0,5–0,7 опт.од. Оптичну густину (OD_{600}) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр BioMate-5, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм.

Для індукції синтезу рекомбінантного білка до культурального середовища додавали індуктор ІПТГ (ізо-пропіл- β -тіогалактопіранозид, Sigma, США) до кінцевої концентрації 1,0 мМ та інкубували культуру при 28°C протягом 4 годин після індукції експресії.

Рекомбінантний білок отримували із супернатанту лізованих клітин *E.coli* методом метал-хелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA-агарозою (Qiagen, Germany). Аналіз бактеріальних білків проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах у 12% розділювальному гелі [10], використовуючи суміш маркерних білків виробництва Thermo Scientific (Литва). Гелі фарбували Coomassie blue R-250.

Концентрацію очищеного рекомбінантного білка AIMP1/p43 визначали спектрофотометрично, використовуючи коефіцієнти екстинції $9970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (0,29 мг/мл) при довжині хвилі 280 нм.

Методика флуоресцентних вимірювань.

Для дослідження взаємодії рекомбінантного білка AIMP1/p43 з β -ЦД проводили титрування AIMP1/p43 у буфері, який містив 50 мМ Na-фосфат, pH 7.5, 150 мМ NaCl. Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), обладнаному термостатованим кюветотримачем. Вимірювання проводили у кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Спектральна ширина щілин монохроматора при збудженні флуоресценції та її реєстрації становила 5–10 нм. Збудження флуоресценції проводили при 280 нм, реєстрацію флуоресценції – в діапазоні 300–400 нм під кутом 90° до напрямку пучка збуджувального світла.

Молекулярний докінг

Моделювання структури молекулярного комплексу AIMP1/p43 з β -циклодекстрином було проведено з використанням програмного забезпечення AutoDock Vina [18]. Для візуалізації та аналізу отриманих структур було використано програмне забезпечення UCSF Chimera [14] и MGLTools.

Результати та їх обговорення

Експресія, виділення та очистка рекомбінантного білка AIMP1/p43 з клітин *E.coli*.

Білок AIMP1/p43 було експресовано в клітинах *E.coli* BL21(DE3)pLysE, як описано вище. Після проведення бактеріальної експресії здійснювали афінну очистку рекомбінантного білка AIMP1/p43 металхелатуючою хроматографією на Ni-NTA-агарозі. В результаті очистки отримано препарат білка AIMP1/p43 високого ступеня чистоти (близько 95%, рис.2).

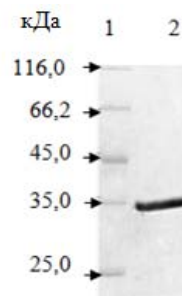


Рис. 2. Електрофоретичний контроль чистоти отриманого препарату AIMP1/p43.

1 – білкові маркери;

2 – препарат AIMP1/p43 після хроматографічної очистки

Дослідження взаємодії рекомбінантного білка AIMP1/p43 з β -циклодекстрином методом флуоресцентної спектроскопії.

Спектр власної триптофаної флуоресценції AIMP1/p43, обумовленої залишком Trp271, який локалізований в С-кінцевому EMAP II домені, має максимум при 333 нм (рис. 4). Слід зазначити, що максимум флуоресценції AIMP1/p43 є дещо зміщеним в короткохвильову область у порівнянні зі спектром флуоресценції вільного EMAP II – 335 нм [2]. При вивченні взаємодії AIMP1/p43 з β -циклодекстрином виявлено зменшення власної флуоресценції білка AIMP1/p43 при підвищенні концентрації β -циклодекстину (рис.3). На основі отриманих даних розрахована константа дисоціації (K_d) комплексу AIMP1/p43 з β -циклодекстрином, яка становить $37.9 \pm 3.2 \mu\text{M}$. Стехіометрія зв'язування β -циклодекстину з AIMP1/p43 становить згідно даним на рис.3 близько 1:1, що підтверджує формування специфічного комплексу.

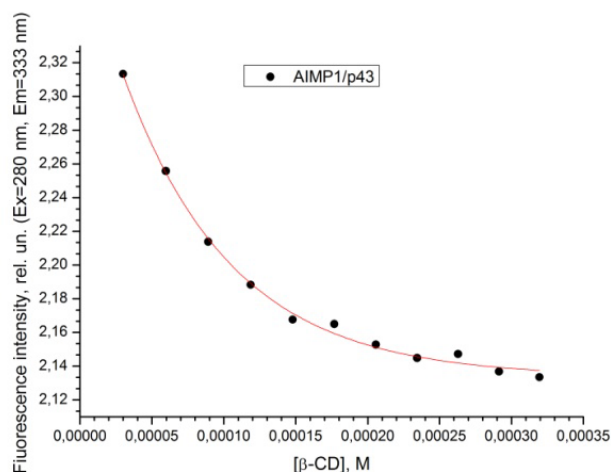


Рис. 3. Залежність інтенсивності флуоресценції AIMP1/p43 від концентрації β -циклодекстину в розчині.

Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,5.

Температура 25°C ; λ_{ex} 280 нм, λ_{em} 333 нм

При реєстрації спектрів флуоресценції AIMP1/p43 (рис. 4) в залежності від температури в діапазоні $23-63^\circ\text{C}$ виявлено зсув максимуму флуоресценції від 333 до 350 нм (рис.4, 5а), що відповідає максимуму флуоресценції триптофану в денатурованих білках. Це обумовлено тим, що при підвищенні температури в молекулі AIMP1/p43 спостерігається локальний конформаційний перехід, пов'язаний з експонуванням залишку Trp271 на поверхні білка. Температура локального конформаційного переходу в AIMP1/p43 становить

$43 \pm 1^\circ\text{C}$ (визначена як температура в точці напівпереходу між двома станами).

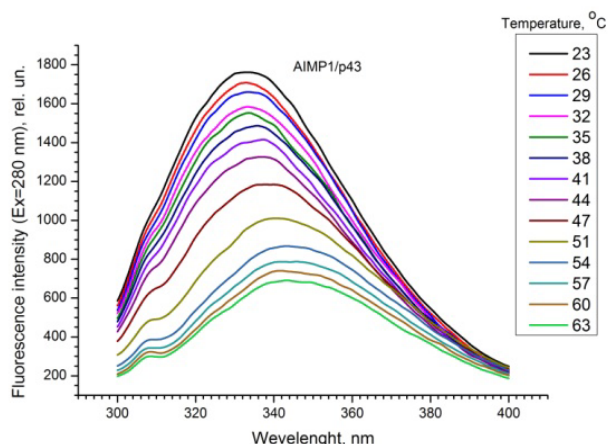


Рис. 4. Температурна залежність інтенсивності флуоресценції AIMP1/p43 в діапазоні $\lambda_{\text{EM}}=300\text{--}400$ нм. Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,5, λ_{EX} 280 нм

При дослідженні впливу β -ЦД на стабільність білкової глобули встановлено, що при підвищенні температури максимум емісії флуоресценції AIMP1/p43 зсувається лише до 345 нм, тоді як локальний конформаційний перехід в оточенні Trp271 спостерігається при $52 \pm 1^\circ\text{C}$ (рис. 5б), що свідчить про стабілізацію структури AIMP1/p43 в наноконкомпозитному комплексі.

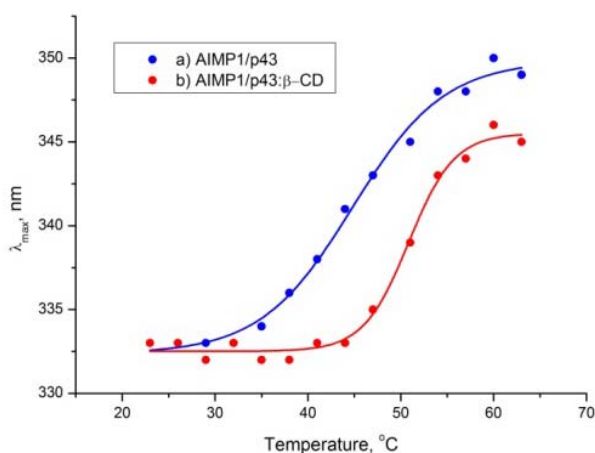


Рис.5. Температурна залежність максимуму емісії флуоресценції AIMP1/p43 у вільному стані(а) та в складі наноконкомпозитного комплексу з β -ЦД(б). Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,5

Молекулярний докінг.

Для молекулярного докінгу використано комп'ютерну модель просторової структури повнорозмірного AIMP1/p43 (неопубліковані дані).

Для встановлення сайту зв'язування β -циклодекстрину з білком AIMP1/p43 нами проведено комп'ютерне моделювання комплексу. AIMP1/p43 містить тільки 1 амінокислотний залишок Trp271, який є природним флуоресцентним зондом, чутливим до конформаційних змін в структурі молекули. Відомо, що циклодекстрини переважно зв'язуються з ароматичними амінокислотними залишками на поверхні білків, тому Trp271 є чутливим зондом для детекції утворення комплексу білка з циклодекстрином. Проведений аналіз доступності за-

лишку Trp271 молекулам розчинника в структурі AIMP1/p43 вказує на його 32,5% експонованість, що свідчить про можливість детекції взаємодії β -циклодекстрина в локальному оточенні флуорофора.

В результаті комп'ютерного моделювання молекулярного докінгу β -циклодекстрина з AIMP1/p43 (рис.6) встановлено, що зв'язування β -ЦД з білком відбувається в гідрофобній ділянці, де локалізований Trp271.

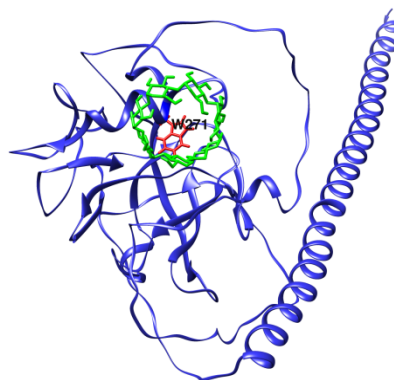


Рис.6. Комп'ютерне моделювання комплексу β -циклодекстрина з AIMP1/p43. Зеленим кольором позначений β -циклодекстрин, червоним – залишок Trp271

Аналіз структури комплексу β -циклодекстрина з AIMP1/p43 за допомогою програми AutoDock Vina показав, що афінність зв'язування β -циклодекстрина (ΔG_{Free}) з білком становить близько -5.1 ккал/моль.

Висновки.

Встановлено, що β -циклодекстрин специфічно зв'язується з рекомбінантним білком AIMP1/p43 у розчині, причому найбільш вірогідним сайтом зв'язування є оточення частково експонованого залишку Trp271, локалізованого у заглибині на поверхні AIMP1/p43 поруч з функціонально важливим лізин-багатим кластером. Білок AIMP1/p43 у складі отриманого наноконкомпозитного комплексу в розчині є суттєво більш стабільним, ніж у вільному стані. Це відкриває можливості подальших структурно-функціональних досліджень AIMP1/p43 та його використання як нового біотехнологічного продукту в біомедицині.

Подяки.

Автори висловлюють подяку м.н.с. Козлову О.В. за надання препарату β -циклодекстрина.

Список використаних джерел

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / Б. Глик, Дж. Пастернак. М.: Из-во Мир, 2002. – 589 с.
2. Кордиш М. О. Локальний конформаційний перехід флуорофора Trp125 в цитокіні ЕМАР II, індукований фізіологічною температурою / М.О. Кордиш, О.Л. Дубровський, О.І. Корнелюк // Фізика живого. – 2005. – Т. 13, №1. – С. 79-85.
3. Маркосян К. А. Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агресом / К. А. Маркосян, Б. И. Курганов // Биохимия. – 2004. – №69. – С. 1196–1212.
4. Панасенко О. О. Структура и свойства малых белков теплового шока / О. О. Панасенко, О. В. Ким, Н. Б. Гусев // Успехи биол. химии. – 2003. – №43. – С. 59–98.
5. Dyson H. J. Intrinsically unstructured proteins and their functions / H. J. Dyson, P. E. Wright // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. –2005. – Vol. 6, N 3. – P. 197–208.
6. Fink A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid / A. L. Fink // Folding Dis. – 1998. – № 3. – P. R9–R23.
7. Fu Y. Structure of the ArgRS-GlnRS-AIMP1 complex and its implications for mammalian translation / Y. Fu, Y. Kim, K.S. Jin, H.S. Kim [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2014. – Vol. 111, N 42. – P. 15084–15089.
8. Ivakhno S. S. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis / S. S. Ivakhno, A. I. Kornelyuk // Exp. Oncol. – 2004. – Vol. 26, N 4. – P. 250–255.

9. Ivanova Iu. L. Comparative study of localization of tryptophanyl-tRNA-synthetase and components of high molecular weight aminoacyl-tRNA-synthetase complex in animal cells / Iu. L. Ivanova, N. E. Cherni, V. I. Popenko, [et al.] // Mol. Biol. – 1993. – Vol. 27, N 3. – P. 666–684.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685.
11. Murphy R. M. Protein Misfolding and Aggregation / R. M. Murphy, B. S. Kendrick // Biotechnol. Prog. – 2007. – N 23. – P. 548–52.
12. Nomura Y. Thermoresponsive controlled association of protein with a dynamic nanogel of hydrophobized polysaccharide and cyclodextrin: heat shock protein-like activity of artificial molecular chaperon / Y. Nomura, Y. Sasaki, M. Takagi, T. Narita [et al.] // Biomacromolecules. – 2005. – N 6. – P. 447–452.
13. Otzen D. E. Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation / D. E. Otzen, B. R. Knudsen, F. Aachmann, K. L. Larsen [et al.] // Protein Sci. – 2002. – N 11. – P. 1779–1787.
14. Pettersen E. F. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis / E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G.S. Couch // J Comput Chem. – 2004. – Vol. 25, N 13. – P. 1605–1612.
15. Popenko V. I. Compartmentalization of certain components of the protein synthesis apparatus in mammalian cells / V. I. Popenko, J. L. Ivanova, N. E. Cherny, V. V. Filonenko [et al.] // Eur. J. Cell. Biol. – 1994. – Vol. 65, N 1. – P. 60–69.
16. Quevillon S. The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine / S. Quevillon, F. Agou, J.-C. Robinson, M. Mirande // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, N 51. – P. 32573–32579.
17. Renault L. Structure of the EMAPII domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry / L. Renault, P. Kerjan, S. Pasqualato, J. [et al.] // EMBO J. – 2001. – Vol. 20, N 3. – P. 570–578.
18. Trott O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. / O. Trott, A. J. Olson. // Journal of Computational Chemistry. – 2010. – N 31. – P. 455–461.
19. Wolfe C. L. Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII / C. L. Wolfe, J. A. Warrington, S. Davis, S. Green, M. T. Norcum // Protein Sci. – 2003. – Vol. 12, N 10. – P. 2282–2290.
20. Wright P. E. Intrinsically unstructured proteins: Reassessing the protein structure-function paradigm / P. E. Wright, H. J. Dyson // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 293, N 2. – P. 321–331.
4. Panasenکو OO, Kim OV, Gusev NB. [The structure and properties of small heat shock proteins]. The success of biol. chemistry. 2003;(43):59–98. Russian
5. Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005;6(3):197–208.
6. Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Folding Dis. 1998;(3):R9–R23.
7. Fu Y, Kim Y, Jin KS, Kim HS, [et al.] Structure of the ArgRS-GlnRS-AIMP1 complex and its implications for mammalian translation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(42):15084–9
8. Ivakhno SS, Kornelyuk AI. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis. Exp. Oncol. 2004;26(4):250–5.
9. Ivanova IuL, Cherni NE, Popenko VI, Filonenko VV, Vartanian OG. Comparative study of localization of tryptophanyl-tRNA-synthetase and components of high molecular weight aminoacyl-tRNA-synthetase complex in animal cells. Mol. Biol. 1993;27(3):666–84.
10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680–5.
11. Murphy RM, Kendrick BS. Protein Misfolding and Aggregation. Biotechnol. Prog. 2007(23):548–52.
12. Nomura Y, Sasaki Y, Takagi M, Narita T, [et al.] Thermoresponsive controlled association of protein with a dynamic nanogel of hydrophobized polysaccharide and cyclodextrin: heat shock protein-like activity of artificial molecular chaperon. Biomacromolecules. 2005;(6):447–52.
13. Otzen DE, Knudsen BR, Aachmann F, Larsen KL, [et al.] Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation. Protein Sci. 2002;(11):1779–87.
14. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem. 2004;25(13):1605–12.
15. Popenko V I, Ivanova JL, Cherny NE, Filonenko V V, [et al.] Compartmentalization of certain components of the protein synthesis apparatus in mammalian cells. Eur. J. Cell. Biol. 1994;65(1): 60–9.
16. Quevillon S, Agou F, Robinson J-C, Mirande M. The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. J. Biol. Chem. 1997;272(51):32573–9.
17. Renault L, Kerjan P, Pasqualato S, [et al.] Structure of the EMAPII domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry. J. 2001;20(3):570–8.
18. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. Journal of Computational Chemistry. 2010(31):455–61.
19. Wolfe CL, Warrington JA, Davis S, Green S, Norcum MT. Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII. Protein Sci. 2003;12(10):2282–90.
20. Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically unstructured proteins: Reassessing the protein structure-function paradigm. J. Mol. Biol. 1999;293(2):321–31.

References

1. Glik B. [Molecular Biotechnology. Principles and application]. M. World; 2002. 589 p. Russian
2. Kordysh MO, Dubrovskyy OL, Kornelyuk AI. [Local conformational transition of Trp125 fluorophore in cytokine EMAP II, induced by physiological temperature]. Physics of life. 2005; 13(1):79–85. Ukrainian
3. Makrosyan KA, Kurganov BI. [The folding, misfolding and aggregation of proteins. The formation of inclusion bodies and aggregates]. Biochemistry. 2004;(69):1196–1212. Russian

Н. Воробьева, асп., А. Корнелюк, чл.-кор. НАН Украины, д-р биол. наук, проф. Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина, Д. Ложко млад. науч. сотр. Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

СТАБІЛЬНІСТЬ РЕКОМБІНАНТНОГО БЕЛКА AIMP1/P43 ЧЕЛОВЕКА В НАНОКОМПЗИТНОМУ КОМПЛЕКСІ С БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Исследована стабільність рекомбінантного белка AIMP1/p43 – компонента аміноацил-тРНК-синтетазного комплексу вищих заукариот в нанокмпозитному комплексі з β-циклодекстрином. Показано, що в складі нанокмпозитного комплексу температурна стабільність AIMP1/p43 суттєво підвищується. Локальний конформаційний перехід, пов'язаний з експонуванням остатка Trp271 на поверхності AIMP1/p43, спостерігається при 43°C, а в складі нанокмпозитного комплексу – при 52°C. Стабілізація белка AIMP1/p43 в складі нанокмпозитного комплексу відкриває можливість для подальших структурно-функціональних досліджень і його використання як нового біотехнологічного продукту в біомедицині.

Ключові слова: AIMP1/p43, β-циклодекстрин, стабілізація, флуоресцентна спектроскопія.

N. Vorobyova, PhD stud., A. Kornelyuk, professor, Dr. Sci., Corresponding Member of NASU Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine, D. Lozhko, research assistant Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Kyiv

STABILITY OF HUMAN RECOMBINANT AIMP1/P43 PROTEIN IN NANOCOMPOSITE COMPLEX WITH BETA-CYCLODEXTRIN

Stability of the recombinant AIMP1/p43 protein – component of aminoacyl-tRNA synthetase complex of higher eukaryotic – in nanocomposite complex with β-cyclodextrin was investigated. A significant increase in thermal stability AIMP1/p43 in the composition of nanocomposite complex was shown. The local conformational transition associated with the exposure of Trp271 residue on the AIMP1/p43 surface was observed at 43°C, but in the nanocomposite complex it was observed at 52°C. Stabilization of AIMP1/p43 protein in nanocomposite complex provides opportunities for further structural and functional studies and its use as a new biotechnology product in biomedicine.

Key words: AIMP1/p43, β-cyclodextrin, stabilization, fluorescence spectroscopy.

Надійшла до редколегії 30.03.16

УДК 616.21-002-006: 616-005.1-08.001.8

Ю. Клись, наук. співроб., С. Верьовка, д-р біол. наук
ДУ "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України", Київ,
Т. Галенова, канд. біол. наук, Т. Вовк, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ФАКТОРИ РИЗИКУ ГЕМОСТАТИЧНОГО ДИСБАЛАНСУ У ХВОРИХ НА ЗАПАЛЬНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ТА НОВОУТВОРЕННЯ ЛОР-ОРГАНІВ

Проведено порівняльне дослідження компонентів системи гемостазу у хворих на запальні захворювання та новоутворення ЛОР-органів з метою з'ясування їх ролі в розвитку патологічного процесу та інформаційної цінності щодо перебігу захворювання. Досліджено показники протромбінового пулу, вмісту тканинного активатора плазміногену, інгібітора активатора плазміногену PAI-1 та фактора фон Віллебранда у хворих з запальними захворюваннями та новоутвореннями ЛОР-органів з оцінкою відмін від показників здорових донорів та залежно від виду та стадії захворювання. Доведено інформаційну цінність досліджуваних показників та залежність виявлених відмін від виду та стадії захворювання. Виявлені відміни від норми свідчать про глибокі порушення функціонування гемостатичної системи за досліджуваних захворювань. Отримані дані видаються перспективними для комплексної оцінки стану хворих на запальні захворювання та новоутворення ЛОР-органів.

Ключові слова: запалення, новоутворення, гемостатична система.

Вступ. Стрімке поширення онкологічних захворювань становить одну з найактуальніших проблем сучасної медицини. Особливе місце серед них посідають злоякісні новоутворення верхніх дихальних шляхів, що становлять 18-20 % від загальної онкопатології. Рак гортані займає першість серед злоякісних пухлин верхніх дихальних шляхів, сягаючи 65–70 %. Пухлини слизової оболонки порожнини носа та біляносових пазух 0,2–5 % від загальної кількості онкозахворювань [1]. Подібно до багатьох захворювань, раннє виявлення онкопатології становить вагомий запоруку успішного лікування. Однак онкологічний процес рідко виявляється на ранніх стадіях розвитку: серед первинно виявлених випадків захворюванням рак гортані I стадії виявляється у 10,6 %, тоді як поглиблений процес – злоякісне новоутворення III і IV стадій – діагностуються у 46,8 % і 17 % хворих відповідно [2].

Відомо, що злоякісний процес не виникає в незмінному епітелії, його розвитку передують ряд послідовних трансформацій епітеліальних клітин слизової оболонки. Тому на сьогодні в окрему групу виділено так звані передракові захворювання, що відповідають патологічним процесам, котрі обумовлюють готовність тканини до злоякісної трансформації. До подібних захворювань належать (хронічний гіперпластичний ларингіт, папіломатоз гортані, дискератоз та ін.), причому показано, що в 60 % випадків рак гортані розвивається саме на їх основі протягом від 6 місяців до 7 років. Виникнення передракових захворювань і раннього раку гортані тісно пов'язані з тривалим існуванням хронічних запальних процесів, що індукуються і підтримуються рядом етіологічних чинників, перш за все – патогенною мікрофлорою та пошкоджуючими факторами зовнішнього середовища [3].

Відомо, що клінічні прояви онкопатології відповідають глибоко запущеним порушенням молекулярних та клітинних процесів. Це зумовлює інтенсивні пошуки маркерів, придатних для ранньої діагностики захворювання. Нажаль, не зважаючи на інтенсивні пошуки, якогось універсального маркера онкологічних процесів не виявлено. Тому видається за доцільне комплексне визначення кількох маркерів, що дають можливість виявити патогенний процес на якомого ранній стадії, оцінити ступень його розвитку та ризик рецидиву та метастазування. Подібні неспецифічні онкологічні маркери здатні проявляти себе на ранній стадії онкогенезу, при формуванні диспластичних змін слизової оболонки, значно випереджаючи морфологічні зміни. Тобто існує можливість отримання додаткових інформативних критеріїв для формування груп осіб підвищеного онкологічного ризику. Так, на основі відомих даних про біологічні механізми прогресії та трансформації передракових

захворювань у злоякісний процес ведуться пошуки прогностичних біохімічних та молекулярно-генетичних показників запальних захворювань та новоутворень, зокрема – ЛОР-органів [4-10]. Відомо, що ферменти системи гемостазу окрім забезпечення відповідних ланок систем зсідання та фібринолізу відіграють значну роль в процесах інвазії пухлин та метастазуванні, імунологічних і запальних процесах, алергічних реакціях. Не менш важливим видається дослідження рівнів відповідних інгібіторів, оскільки за порушення протейназо-інгібіторного балансу відбувається активація нефункціонального протеоліза. Відомо, що підвищений рівень активності серинових протеїназ та зменшення вмісту їх інгібіторів позитивно корелюють з метастатичним потенціалом пухлин різного типу і локалізації, агресивністю пухлин та несприятливим прогнозом перебігу захворювання [11-14]. При цьому особливої уваги заслуговують компоненти фібринолітичної системи, такі, як плазмін (К.Ф.3.4.21.7) та його профермент плазміноген, активатори плазміногену урокіназного (uPA) (К.Ф.3.4.21.73) та тканинного типу (tPA) (К.Ф.3.4.21.68), інгібітори активаторів плазміногену типу I, II або III (PAI-1, -2, -3), α2-антиплазміну та α1-інгібітор протеїназ. Доведено їх участь в запальних реакціях, ангіогенезі, міграції клітин, рості пухлин, інвазії та метастазуванні. Відомо, що показники uPA та PAI-1 значно збільшуються при розвитку пухлин різних типів і локалізації, при чому підвищення їх рівня пов'язано з прогресією пухлини та несприятливим прогнозом розвитку злоякісного захворювання [15-18].

Не меншої уваги заслуговує тромбін (К.Ф.3.4.21.5) – ключовий фермент системи зсідання крові. Встановлено його участь в процесах ембріонального розвитку, ангіогенезу, регенерації органів та патофізіологічних процесах: гострих і хронічних запальних процесах, онкогенезі. Участь тромбіну в патофізіологічних процесах значною мірою опосередкована його здатністю діяти на рецептори, активовані протеїназами (PARs). Наявність подібних рецепторів показана в клітинах імунної системи та у багатьох типів пухлинних клітин, що, імовірно, корелює з розвитком метастазів. Припускають існування щонайменше шести сигнальних механізмів, задіяних в процесах інвазії та метастазування за участі взаємодій PARs – тромбін [19-22].

Серед числених компонентів зсідальної системи особливе місце посідає фактор фон Віллебранда (vWF). Його участь у формуванні тромба полягає, з одного боку, в опосередкування адгезії тромбоцитів до компонентів екстрацелюлярного матриксу, з другого ж боку його задіяно в стабілізації прокоагулянтного фактора VIII, необхідного для нормального утворення тромбіну [23]. З дефіцитом фактора фон Віллебранда по-

в'язана низка специфічних за характером розвитку кровотеч, однак не менш тяжкі наслідки пов'язані з його підвищеним рівнем. Підвищення рівню vWF відбувається за ендотеліальних дисфункцій [24]. Тож визначення його рівня може виявитись інформативним для оцінки функціонування системи зсідання крові, в першу чергу – її судинної складової.

Метою даного дослідження було визначення вмісту tPA, PAI-1, фактора фон Віллебранда та протромбінового пула в плазмі крові хворих із запальними, доброякісними, передраковими та злоякісними захворюваннями верхніх дихальних шляхів.

Об'єкт та методи досліджень. Під спостереженням перебували 42 пацієнта із захворюванням ЛОР-органів. До першої групи увійшли 11 осіб із декомпенсованою формою хронічного тонзиліту. Доброякісні новоутворення порожнини носа і навколоносових пазух було виявлено у 11 пацієнтів. Третю групу склали 10 пацієнтів із передраковими захворюваннями гортані – хронічним гіперпластичним ларингітом чи папіломатозом. У 10 хворих було виявлено злоякісні новоутворення гортані або пухлини носа та біляносових пазух III стадії. Контрольну групу склали 6 практично здорових людей (донорів).

Досліджувані показники визначалися у бідній на тромбцити плазмі, одержаній зі свіжої цитратної крові шляхом центрифугування протягом 20-ти хв в центрифугі ОПН-8 при частоті обертання 4000 об/хв. Отриману плазму заморожували та зберігали до аналізу при -25°C .

Рівні тканинного активатора плазміногену, інгібітора активаторів плазміногену 1 типу, фактора фон Віллебранда та молекул протромбінового походження визначали у плазмі крові методом імуноферментного аналізу, який

проводили за стандартною методикою для розчинних білків [25]. Плазму крові розводили 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,4 у співвідношенні 1:100 та інкубували у комірках планшетів за 37°C протягом 60 хв. Для видавлення реагентів, що не зв'язалися, використовували 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4. Блокування неспецифічних місць зв'язування проводили 5% розчином знежиреного молока протягом ночі. Первинні (Millipore, USA) та вторинні (Bio-Rad, USA) антитіла готували відповідно до рекомендацій виробника, інкубацію проводили за 37°C протягом 60 хв. Візуалізацію реакції проводили субстратом для лужної фосфатази за 37°C протягом 60 хв. Оптичне поглинання вимірювали за довжин хвилі 405 нм та 492 нм на мікроридері BioTek Instruments.

Отримані дані було обчислено методом варіаційної статистики. Різниця вважалась достовірною при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати дослідження вмісту tPA, PAI-1, vWF та протромбінового пула в плазмі крові хворих досліджуваних груп наведено в табл.1. Як видно із даних таблиці, вміст протромбінового пула в плазмі крові хворих на тонзиліт і доброякісні новоутворення носа і біляносових пазух був на рівні контрольних значень. У пацієнтів із передраковими захворюваннями гортані він був дещо підвищеним порівняно із значеннями контрольної групи, тоді як в плазмі крові хворих із злоякісними новоутвореннями вміст протромбінового пула був збільшений у 1,9 рази на статистично вірогідному рівні. Таблиця 1. Вміст протромбінового пула, PAI-1, tPA та vWF в плазмі крові хворих на тонзиліт, доброякісні, передракові та злоякісні захворювання верхніх дихальних шляхів.

Досліджувані групи	Протромбіновий пул, ум. од./мл	PAI-1 ум. од./мл	tPA, ум. од./мл	vWF, ум. од./мл
Злоякісні новоутворення носа і приносових пазух	$0,585 \pm 0,049$ $p < 0,001$	$0,434 \pm 0,121$ $p < 0,01$	$0,074 \pm 0,003$ $p < 0,01$	$0,076 \pm 0,004$ $p < 0,05$
Передракові захворювання гортані	$0,402 \pm 0,061$	$0,368 \pm 0,078$ $p < 0,01$	$0,075 \pm 0,004$ $p < 0,01$	$0,069 \pm 0,002$ $p < 0,001$
Доброякісні новоутворення носа	$0,293 \pm 0,027$	$0,25 \pm 0,069$ $p < 0,05$	$0,069 \pm 0,002$	$0,063 \pm 0,002$ $p < 0,001$
Тонзиліт	$0,323 \pm 0,028$	$0,296 \pm 0,058$ $p < 0,01$	$0,063 \pm 0,002$	$0,069 \pm 0,004$ $p < 0,001$
Донори	$0,301 \pm 0,018$	$0,074 \pm 0,002$	$0,059 \pm 0,001$	$0,028 \pm 0,002$

Примітка: p – показник вірогідності різниці досліджуваного показника між групами хворих та контролем.

Рівень PAI-1 був значно підвищеним в плазмі крові пацієнтів усіх досліджуваних груп. У хворих на хронічний тонзиліт та доброякісні новоутворення носа і біляносових пазух він був достовірно підвищеним у 4 ($p < 0,01$) та 3,4 ($p < 0,05$) рази відповідно. При передракових захворюваннях носа і біляносових пазух PAI-1 знаходився на вірогідно вищому рівні (у 5 разів) порівняно зі значеннями умовно здорових людей, а в групі зі злоякісними новоутвореннями верхніх дихальних шляхів ступінь підвищення рівня цього інгібітора сягав збільшення у 5,9 рази на рівні тенденції щодо контрольних значень.

При дослідженні вмісту tPA з'ясувалося, що в плазмі крові хворих на хронічний тонзиліт та доброякісні новоутворення носа його рівень майже не відрізнявся від значень контрольної групи, на відміну від пацієнтів із передраковими та злоякісними захворюваннями ЛОР-органів, у яких він достовірно був вищим, ніж у донорів.

Аналіз дослідження рівня vWF показав його достовірне збільшення в плазмі крові всіх хворих у більше, ніж 2,3 рази. Враховуючи залежність рівню vWF від нормального функціонування ендотеліальних клітин, можна обгрунтовано припустити істотні порушення функціонування судинної ланки системи гемостазу.

Отримані дані добре узгоджуються з літературними даними щодо комплексної участі різноманітних компонентів системи гемостазу в перебізі онкологічних, передракових та запальних захворювань [11, 26]. Виявлені в даній роботі відміни істотно розширюють наші уявлення про молекулярні порушення, пов'язані з відповідними захворюваннями і становлять безсумнівний інтерес щодо з'ясування їх інформаційної цінності в якості діагностично-прогностичних показників. На підставі отриманого експериментального матеріалу можна зробити наступні висновки:

Висновки.

1. Вміст протромбінового пула та tPA у хворих на хронічний тонзиліт та доброякісні новоутворення носа знаходився в межах контрольних значень, при передракових та злоякісних захворюваннях ЛОР-органів він був вищим, ніж у групі донорів.

2. Рівні PAI-1 та vWF були значно підвищеними в плазмі крові хворих всіх досліджуваних груп у порівнянні до показників контрольної групи.

3. Зміни досліджуваних показників є більш вираженими в групі хворих із передраковими та злоякісними захворюваннями верхніх дихальних шляхів порівняно

до пацієнтів на запальні та доброякісні захворювання ЛОР-органів.

4. Досліджувані показники у складі комплексного визначення компонентів системи гемостазу можуть бути використані як додаткові інформаційні критерії для формування груп хворих підвищеного онкологічного ризику.

Список використаних джерел

1. Пачес А.И. Опухоли головы и шеи / А.И. Пачес. – М., 2000. – 480 с.
2. Кондакова И.В. Оценка внеклеточного и внутриклеточного протеолиза при предопухолевых и опухолевых заболеваниях гортани / И.В. Кондакова, Г.В. Какурина, Л.В. Спирина [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 45-50.
3. Черемисина О.В. Возможности эндоскопической диагностики предопухолевых заболеваний и рака гортани в современной онкологии / О.В. Черемисина, Е.Л. Чойнзонов // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – №3 (23). – С. 5-9.
4. Махов В.А. Патогенетическое значение острофазовых белков и провоспалительных цитокинов в диагностике предраковых заболеваний и рака гортани : автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.16 / Махов Владимир Александрович; ГОУВПО "Новосибирская государственная медицинская академия". – Н., 2004. – 24с.
5. Осипов В.Д. Роль неспецифических опухолевых маркеров и клинико-морфологических показателей в диагностике и лечении предрака а раннего рака гортани гортани: автореф. дис. д-ра мед. наук: 14.00.14 / Осипов Виктор Дмитриевич; – Научно-исследовательский институт онкологии Томского научного Центра СО РАМН. – Т., 2006. – 24 с.
6. Клишо Е.В. Прогностическая значимость протеаз у больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи / Е.В. Клишо, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – №2 (116). – С. 82-91.
7. Шилова О.Ю. Молекулярно-генетические методы прогноза и течения рака гортани / О.Ю. Шилова, Л.Н. Уразова // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – №5 (41). – С. 64-70.
8. Jeannon J.-P., Soames J.V., Aston V., Stafford F.W., Wilson J.A. Molecular markers in dysplasia of the larynx: expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p21, p27 and p53 tumour suppressor gene in predicting cancer risk // Clin. Otolaryngol. – 2004. – Vol. – P. 698-704.
9. Bradford C. Biomarkers in Advanced Larynx Cancer / C. Bradford, B. Kumar, E. Bellile [et al.] // Laryngoscope. – 2014. – Vol. 124. – P. 179-187.
10. Kumar B. Expression of p53 and Bcl-xL as predictive markers for larynx preservation in advanced laryngeal cancer / Kumar B., Cordell K., D'Silva N. [et al.] // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2008. – 134(4). – P. 363-369.
11. Rakashanda S. Role of proteases in cancer: A review / Rakashanda S., Rana F., Rafiq S. [et al.] // Biotechnology and Molecular Biology Review. – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. 90-101.
12. Вовчук И.Л. Роль сериновых протеиназ и их эндогенных ингибиторов при неопластической трансформации / Вовчук И.Л. // Лабораторна діагностика. – 2010. – Т. 4 (54). – С. 52-59.
13. Deskur A. Selected hemostatic parameters in patients with pancreatic tumors / A. Deskur, D. Salata, M. Budkowska [et al.] // Am J Transl Res. – 2014. – Vol. 6, №6. – P. 768-776.
14. Foidart J.-M. Proteases and their inhibitors in cancer metastasis / Foidart J.-M., Muschel R. // Kluwer Academic Publishers, New York 2004. – 263 c.
15. Stillfried G. Plasminogen binding and activation at the breast cancer cell surface: the integral role of urokinase activity / Stillfried G., Saunders D., Ranson M. // Breast Cancer Research. – 2007. – Vol 9, No 1. – P. 1-11.
16. Lee C.-C. Plasminogen activator inhibitor-1: the expression, biological functions, and effects on tumorigenesis and tumor cell adhesion and migration / C.-C. Lee, T.-S. Huang // J. Cancer Mol. – 2005. – 1(1). – P.25-36.
17. Kwaan H. The role of plasminogen-plasmin system in cancer / H. Kwaan C, B. McMahon // Cancer Treat Res. – 2009. – Vol. 148. – P.43-66.
18. Didiasova M. From Plasminogen to Plasmin: Role of Plasminogen Receptors in Human Cancer / Didiasova M, Wujak L, Wygrecka M [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – №15. P. 21229-21252.
19. Danckwardt S. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond / S. Danckwardt, M. Hentze, A. Kulozik // J Mol Med. – 2013. – Vol. 91. – P.1257-1271.
20. Chen D. Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation / D. Chen, A. Dorling // J Thromb Haemost. – 2009. – Vol 7. – P. 122-126.
21. Maragoudakis M. Thrombin: Physiology and Disease / M. Maragoudakis, N. Tsopanoglou // N. Y. – 2009. – 272 p.
22. Wang X. Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation / X. Wang, E. Wang, J. Kavanagh [et al.] // Journal of Translational Medicine. – 2005. – Vol.3. – P. 1-20.
23. Волков Г.Л. Современные представления о системе гемостаза / Волков Г.Л., Платонова Т.Н., Савчук А.Н. [и др.]. – К., 2005. – 296 с.
24. Wieberdink R.G. High von Willebrand factor levels increase the risk of stroke: the Rotterdam study / R.G. Wieberdink, M.C. van Schie, P.J. Koudstaal [et al.] // Stroke. – 2010. – Vol. 41(10). – P.2151-2156.

25. Harlow E. Antibodies / Ed Harlow, D. Lane. – N. Y., 1988. – 1160 p.
26. Айсина Р.Б. Структура и функции системы плазминоген/плазмин / Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И. // Биоорганическая химия. – 2014. – Т. 40(6). – С.642-657

References

1. Paches AI. Tumors of the head and neck. 4th ed. Moskva: Medicina; 2000. 480 p.
2. Kondakova IV, Kakurina GV, Spirina LV, Cheremisina OV, Pankova OV, Menshikov YK. Assessment of extracellular and intracellular proteolysis in pretumor and tumor diseases of the larynx. Sibirskij oncol zhurn. 2014; 3: 45-50. Russian.
3. Cheremisina OV, Chojnzonov EL. Potentials of endoscopic diagnosis of precancer diseases and cancer of the larynx. Sibirskij oncol zhurn. 2007; 3 (23): 5-9. Russian.
4. Makhov VA. Pathogenetic significance of acute-phase proteins and proinflammatory cytokines in the diagnosis of precancerous diseases and cancer of the larynx [dissertation]. Novosibirsk: GOUVPO "Novosibirskaja gosudarstvennaja medicinskaja akademija"; 2004. Russian.
5. Osipov D V. The role of nonspecific tumor markers and clinicomorphological parameters in the diagnosis and treatment of precancer and early cancer of the larynx [dissertation]. Tomsk: Nauchno-issledovatel'skij institut onkologii Tomskogo nauchnogo Centra SO RAMN. Research of y scientific Centre SB RAMS; 2006. Russian.
6. Klishe EV, Kondakova IV, Chojnzonov EL, Vasiljeva OS. Prognostic significance of proteases in head and neck squamous cell carcinoma patients. Bulletin SO RAMN. 2005; 2 (116):82-91. Russian.
7. Shilova OYu, Urazova LN. Molecular-genetic methods of laryngeal cancer prognosis. Sibirskij oncol zhurn. 2010; 5 (41): 64-70. Russian.
8. Jeannon J.-P., Soames J.V., Aston V., Stafford F.W., Wilson J.A. Molecular markers in dysplasia of the larynx: expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p21, p27 and p53 tumour suppressor gene in predicting cancer risk. Clin. Otolaryngol. 2004; 29(6):698-704.
9. Bradford CR, Kumar B, Bellile E, Lee J, Taylor J, D'Silva N at al. Biomarkers in Advanced Larynx Cancer. Laryngoscope. 2014; 124(1):179-87.
10. Kumar B, Cordell KG, D'Silva N, Prince ME, Adams ME, Fisher SG at al. Expression of p53 and Bcl-xL as predictive markers for larynx preservation in advanced laryngeal cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2008; 134(4):363-9.
11. Rakashanda S, Rana F, Rafiq S, Masood A and Amin Sh. Role of proteases in cancer: A review. Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 2012; 7(4):90-101.
12. Vovchuk I. L. The role of serine proteinases and their endogenous inhibitors during neoplastic transformation. Laboratorna diagnostika. 2010; 4 (54):52-59. Russian.
13. Deskur A., Salata D., Budkowska M., Dolegowska B., Starzyńska T., Błogowski W. Selected hemostatic parameters in patients with pancreatic tumors. Am J Transl Res 2014;6(6):768-776.
14. Foidart J.-M, Muschel R. Proteases and their inhibitors in cancer metastasis. New York: Kluwer Academic Publishers; 2004; 263 p.
15. Stillfried G, Saunders D, Ranson M. Plasminogen binding and activation at the breast cancer cell surface: the integral role of urokinase activity. Breast Cancer Res. 2007; 9(1):1-11.
16. Lee C-C, Huang T-S. Plasminogen activator inhibitor-1: the expression, biological functions, and effects on tumorigenesis and tumor cell adhesion and migration. J Cancer Mol. 2005; 1(1):25-36.
17. Kwaan H, McMahon B. The role of plasminogen-plasmin system in cancer. Cancer Treat Res. 2009; 148: 43-66.
18. Didiasova M, Wujak L, Wygrecka M. From Plasminogen to Plasmin: Role of Plasminogen Receptors in Human Cancer. Int J Mol Sci. 2014; 15:21229-21252.
19. Danckwardt S, Hentze M, Kulozik A. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. J Mol Med. 2013; 91:1257-1271.
20. Chen D, Dorling A. Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation. J Thromb Haemost. 2009; 7:122-126.
21. Maragoudakis M, Tsopanoglou N. Thrombin: Physiology and Disease. New York: Springer Science + Business Media, LLC; 2009. 272 p.
22. Wang X, Wang E, Kavanagh J. Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. J Transl Med. 2005; 3: 1-20.
23. Volkov GL, Platonova TN, Savchuk AN, Gornitskaya OV, Chernyshenko TM, Krasnobryzhaya EN. Modern conceptions of hemostasis system. Kiev – Naukova dumka. 2005; 296 p. Russian.
24. Wieberdink RG, Schie MC, Koudstaal PJ. High von Willebrand factor levels increase the risk of stroke: the Rotterdam study. Stroke. 2010; 41(10): 2151-2156.
25. Harlow E, Lane D. Antibodies. 1th ed. New York: 1988. CSHL Press; 1160 p.
26. Aisina RB, Mukhametova LI [Structure and functions of plasminogen / plasmin system]. Bioorganic chemistry. 2014; 40(6) : 642-657. Russian.

Надійшла до редколегії 31.05.16

Ю. Клысь, науч. сотр., С. Веревка, д-р биол. наук
 ГУ "Институт отоларингологии имени проф. А.С. Коломийченко НАМН Украины", Киев,
 Т. Галенова, канд. биол. наук, Т. Вовк, канд. биол. наук
 Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ФАКТОРЫ РИСКА ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО ДИСБАЛАНСА У БОЛЬНЫХ НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И НОВООБРАЗОВАНИЯ ЛОР-ОРГАНОВ

Проведено сравнительное исследование компонентов системы гемостаза при воспалительных заболеваниях и новообразованиях для выявления их роли в развитии патологического процесса и информативной ценности в отношении протекания заболевания. Исследованы показатели протромбинового пула, содержания тканевого активатора плазминогена, ингибитора активатора плазминогена PAI-1 и фактора фон Виллебранда при воспалительных заболеваниях и новообразованиях ЛОР-органов с оценкой отличий от показателей здоровых доноров и в зависимости от вида и стадии заболевания. Доказано информационную ценность исследовавшихся показателей и зависимость выявленных отличий от вида и стадии заболевания. Обнаруженные отличия от нормы свидетельствуют о глубоких нарушениях функционирования гемостатической системы при исследовавшихся заболеваниях. Полученные данные представляются перспективными для комплексной оценки состояния больных при воспалительных заболеваниях и новообразованиях ЛОР-органов.

Ключевые слова: воспаление, новообразования, гемостатическая система.

Yu. Klysi^{*}, researcher., S. Verevka, Dr.Sc.
 National Academy of Medical Sciences of Ukraine prof. O.S. Kolomiychenko Institute of otolaryngology, Kyiv,
 T. Galenova, PhD., T. Vovk, PhD.
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

RISK FACTORS FOR HEMOSTATIC IMBALANCE IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY DISEASES AND NEOPLASMS OF ENT ORGANS

To undertake a comparative study of some components of haemostatic system in patients with inflammatory diseases and tumors of URT for clarification of their role in pathologic process and for reveal of their informative value for evaluation of the pathologic process' flow. The indices of prothrombine pool, content of tissue activator of plasminogen, inhibitor of plasminogen's activator PAI-1, and von Willebrandt factor were tested in groups of patients with inflammatory diseases and tumors of URT-organs in contrast of the same ones in the group healthy donors as well as dependently to the kind and stage of disease. The informative value of all the tested indices as well as their dependence of the kind and the stage of disease were proved. Their differences from the norm prove for deep alterations in haemostatic system's functioning at considered diseases. Obtained data seems to be promising for complex evaluation of the state of patients with inflammatory diseases and tumors of URT-organs.

Key words: inflammations, tumors, haemostatic system.

УДК 577.112.7:612.115

T. Katrui, PhD-student, O. Savchuk, DSc.
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

PLATELETS AGGREGATION UNDER INFLUENCE OF THE IMMUNOGLOBULIN CLASS G SEPARATED FROM THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE

Ischemic stroke provoke irreversible changes in the organism and fully recovery was not observed. Some reactivity of the haemostasis system were showed during the acute phase of ischemic stroke as well as post few year. The idea was explored that specific autoantibody generated in the bloodstream during the acute phase and their existence in bloodstream past one year could provoke disease repetition. Fractions of immunoglobulin class G were separated: from the blood plasma of healthy donors, patients with atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke in acute phase of disease and the analogical fractions from the same patients one year past acute phase. The influence of the separated fractions on the process of ADP-induced healthy donor's platelets aggregation was observed. It was showed that impact of immunoglobulin class G was characterized by one-wave irreversible ADP-induced platelet aggregation. The maximum aggregation was showed under influence of IgG fraction separated from the patients with AIS. This influence was on the 15 % more intensive in comparison with influence of IgG fraction separated from the healthy donors. One year past disease all tested IgG fractions provoked inhibition of platelets aggregation up to 25 %. The maximum inhibition of ADP-dependent healthy donor's platelets aggregation was provided by fraction separated from the patients with AIS one year past acute phase.

Key words: ischemic stroke, IgG, platelets aggregation.

Introduction. Every disease that hit our organism leaves some proteins that continuously circulate in the bloodstream after each postponed disease. In addition, these proteins theoretically could play specific role during the illness emergence or development of complications. The most common of such specific proteins is immunoglobulin class G.

In certain cases, immunoglobulins class G can be realized as autoantibodies [12]. In previous research we have shown that IgG, which appear in the bloodstream after stroke, are able to induce releasing of the proteins, fragments and protein complexes from the granules of the platelets [6]. Hence interaction between IgG and platelets surface causes modulation of the cellular response [7-9].

At the same time, stroke is one of the most pressing health and social problem which require urgent solution [4]. Full recovery of patients after stroke was not observed [11]. It is obvious that certain molecules or mechanisms exist that may be the reason for the disease recurrence or further complications. It is known that the leading mechanism of ischemic stroke realization correlated with

hemostatic profile. Activation of blood clotting and thrombus formation were observed after stroke attack [3, 8, 14]. The origin of the primary thrombus formation is platelet's ability to aggregate [5].

Given the above, investigation of the potential impact of IgG, formed in the bloodstream after suffering a stroke, on the platelet aggregation process is of utmost importance. Moreover, as known IgG circulate in the bloodstream in higher concentrations for a long time after disease. This fact provide importance to to investigate and compare their effects on platelets aggregation ability in the acute stroke as well year past acute phase of ischemic stroke. That was the purpose of current work.

Materials and methods. Blood plasma samples were taken from 236 patients (66 patients with atherothrombotic ischemic stroke and 56 patients with cardioembolic ischemic stroke during the acute phase of disease; 57 patients with atherothrombotic ischemic stroke and 57 patients with cardioembolic ischemic stroke one year past acute phase of stroke) and 35 healthy donors. Average age of patients was 72±8 years. Patients were hospitalized in neurological

© Katrui T., Savchuk O., 2016

department of the Hospital №4 (Kyiv, Ukraine). The diagnosis of ischemic stroke was confirmed through computed tomography or magnetic resonance imaging. On the first day of admission to hospital, all patients received aspirin 325 mg orally, then the daily 100 mg aspirin. From the second day of hospital stay, patients received low molecular weight heparin in prophylactic dose. All donors and patients or their relatives had been warned about the conduct of clinical research and provide written agreement to participate in it. Current experiment was approved by the ethics committee from ESC "Institute of Biology", Ukraine.

Blood samples were collected from the cubital vein with the addition of sodium citrate (38 g/l) in the final correlation 9:1. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of stabilized blood at 300 g for 10 min at 20 °C. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained by further centrifugation of PRP at 1500 g for 30 min at 20 °C.

IgG was separated by affinity chromatography on protein A Sepharose [10,12]. Quality of immunoglobulin fractions was controlled by disk-electrophoresis in 10% PAGE with SDS-Na [6,7]. All separated fractions of IgG were lyophilized by (LyoQuest, Spain) and dissolved in the 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.13 M NaCl, pH 7.4 and brought to a working concentration 250 mkg/ml [6, 7].

Platelet aggregation was measured during the first 2 hours of blood collected from the healthy donors on the photo-optical aggregometer AT-02 (Medtech, Belarus) *in vitro*. As PRP platelets in concentration 230-250 000 cells/ μ l was used. PRP from the healthy donors was incubated with tested fractions in a cuvette for 1 min at 37°C with constant stirring (500 rpm). As platelets aggregation inducer ADP in final concentration 2.5 mM was used. Aggregation analysis was performed according to the manufacturer instructions. Kinetics of the platelets aggregation was assayed during 5 minutes after addition of the aggregation inducer. Control platelet aggregation was carried out. Which instead tested molecules (IgG & peptide pool) equal volume of 0.05 M Tris-HCl buffer

containing 0.13 M NaCl, pH 7.4 was added. All similar manipulations were conducted with a control sample as with an experimental samples.

Statistical processing of the results was performed using software Statistica 7. Value changes were considered significant at $P < 0.05$. Statistical processing and analysis of electrophoregrams was performed by the scanning of the computer program TotalLab 2. 01.

Results and discussions. Fractions of immunoglobulin class G and were extracted from: plasma of healthy donors; plasma of patients with atherothrombotic ischemic stroke (AIS) and cardioembolic ischemic stroke (CIS) in acute phase of the disease; and plasma of the same patients past one year of acute phase of the disease.

Details of IgG fractions separations concentrations and characterization had provided in our previous research [6, 7].

Then incubation of the tested IgG fractions with the PRP obtained from the healthy donors was performed. The effect of each tested IgG fractions on the ADP-dependent healthy donors platelets aggregation was evaluated. Aggregatograms were compared with the control platelet aggregation which include equal volume of 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.13 M NaCl, pH 7.4 instead of tested fractions.

IgG fraction obtained from the healthy donor's blood plasma did not influenced tested process meaningful and was similar to the result of the control aggregation (Table 1).

Spontaneous aggregation. The addition to the donors PRP of the majority fractions has not provoked spontaneous aggregation. This indicates an absence of initial activation of platelets, which were separated from the blood of healthy donors. However, it has been shown that after addition of IgG fractions separated from the blood plasma of patients with AIS as well as with CIS one year past acute phase the rate spontaneous aggregation was equal up to 5%.

One-wave irreversible aggregation was observed after incubation of each explored fractions with the donor's platelets rich plasma (figure 1).

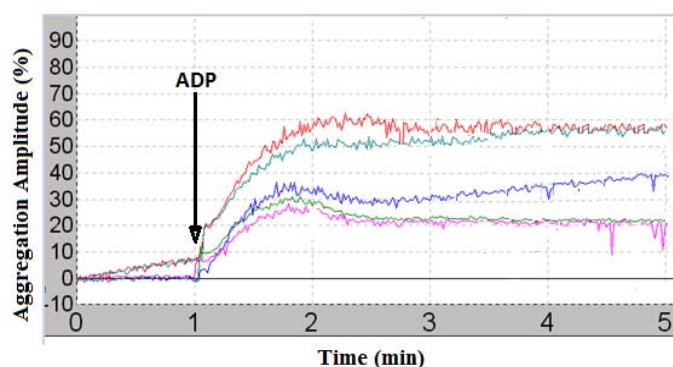


Fig.1. Typical platelets aggregation amplitude under the influence of IgG separated from the blood plasma of:

1. Healthy donors (n = 35)
2. Patients with CIS in acute phase (n = 56)
3. Patients with AIS in acute phase (n = 66)
4. Patients with AIS one year past acute phase (n = 57)
5. Patients with CIS one year past acute phase (n = 57)

The maximum amplitude of platelet aggregation which were influence of the IgG fractions separated from the plasma of patients in acute phase of both stroke subtypes was in average on 15% higher comparengly with the control sample. Donor's PRP incubation with the IgG fractions separated from blood plasma of patients one year past acute phase of stroke provoke maximum amplitude of platelet aggregation that was on the 26% for AIS and on the 20% for CIS lower comparengly with a control sample.

The rate of platelet aggregation after incubation of donor's PRP with the IgG fractions separated from the blood plasma of patients with AIS as well as CIS was slightly increased compared with the control aggregators. However according to the timing the rate of platelets aggregation was on the 8% per minutes higher after adding of IgG fraction separated from the patients with stroke one year past acute phase in comparison with the same effect of the IgG fraction separated from the acute stroke patients (Table 1).

Table 1. The rate and maximum amplitude of ADP-dependent platelet aggregation after incubation of the healthy donor's platelets with the tested IgG fractions

IgG fraction separated from the blood plasma of	Maximum amplitude of platelet aggregation, %	Platelet aggregation rate, %/sec
Healthy donors	42,3 ± 8,2	43,3 ± 3,1
Patients with acute AIS	63,6 ± 5,6*#	46,6 ± 6,1*#
Patients with acute CIS	61,1 ± 5,2*#	
Patients with past one year stroke AIS	51,8 ± 10,4*	54,0 ± 5,5*
Patients with past one year stroke CIS	48,4 ± 11,5*	

* P<0.05 in comparison with aggregation amplitude and the platelet aggregation rate under the influence of IgG separated from the blood plasma of healthy donors.

P<0.05 The aggregation amplitude and the rate of platelet aggregation under influence of IgG separated from the blood plasma of patients with AIS and CIS in acute phase in comparison with same parameters past one year after acute phase of ischemic stroke.

Moreover, IgG fraction separated from the plasma of patients with AIS activated donor's platelet aggregation process an average on 5% more intensive comparatively to the IgG fraction separated from plasma of patients with CIS in the acute phase of stroke as well as one year past acute phase.

Results could be an evidence of the potentially different immunoglobulin fractions formation in the bloodstream of the patients with different pathology. Previously it was proved that cardioembolic and atherothrombotic ischemic subtypes of stroke involve different response of hemostasis system [1-4].

Conclusion. The results shows that atherothrombotic and cardioembolic ischemic subtypes of acute stroke accompanied by increased concentrations of immunoglobulin class G. But concentration of IgG for the patients one year past acute phase is close to IgG concentration of healthy donors. All investigated IgG fractions separated from the stroke patients are able to influence certain parts of the hemostasis system instead of IgG fraction separated from the blood plasma of healthy donor which effect was close to zero. In particular IgG separated from the plasma of patients with AIS and CIS in the acute phase have caused the activation of ADP-induced healthy donor's platelets aggregation. In contrast, IgG separated from the plasma of patients with AIS and CIS one year past acute phase have caused inhibition of healthy donor's platelets aggregation.

References

- Burlova-Vasylieva M. The appearance of molecules of prothrombin origin in blood upon development of atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke / Raksha N, Torgalo E, Savchuk O. // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine. – 2014. Vol. 3, N 68. – P.57-60.
- Burlova-Vasylieva M. Polymorphisms in FII, FV and PAI-1 genes in Ukrainian patients with atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke / Kravchenko N, Savchuk O. // European Journal of Human Genetics. – 2014. Vol. 22, N 1. – P.411.
- Hirsch, Jack. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. // 1983. Jan. Vol. 197, N 1. – P.116–117.
- Hoyert D. National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System. / Land Xu J. // – 2012. Vol. 61, N 6. – P.1-52.
- Jenne, C. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. / Urrutia R., Kubes P. // International journal of laboratory hematology. – 2013. Vol.35, N 3. – P. 254-261.
- Katrii T. B. Influence of IgG Separated from Blood Plasma of Patients with Ischemic Stroke on the Process Platelet's Proteins Secretion. / Vovk T. B., Kravchenko N. K., Savchuk O. M., Ostapchenko L. I. // International Journal of Chemical and Biomolecular Science. – 2015. P. 278-283.
- Katrii T.B. The influence of immunoglobulin class G from blood plasma of patients with stroke on the activity of some parameters of hemostasis system. / Kravchenko N.K., Vovk T.B., Ostapchenko L.I., Savchuk O.M. // Journal Blood Coagulation & Fibrinolysis. – 2016. Forthcoming/
- Martin J. The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B2 production and megakaryocyte nuclear DNA concentration. / Shaw T., Heggie J. // Thrombosis research. – 1983. Vol.32, N 5. – P. 443-460.

- Negru T. Survey on some aspects of immunologic reactivity in old age. / Ghiea V, Diaconu V. // Rom J Physiol. – 1995. Vol.32.1. – P.125-36.
- Hockfield S. Selected methods for antibody and nucleic acid probes. / Carlson S, Evans C. // – 1993. Vol.1. – P.679.
- Shuaib A. The past future of neuroprotection in cerebral ischemic stroke. / Hussain M. // Eur. Neurol. – 2008. Vol. 59. – P. 41-43.
- Vovk T. Characteristic of autoimmune antibodies to components of hemostasis, which are producing in blood flow during systemic lupus erythematosus. / Savchuk O, Ostapchenko L. // Physics of life. – 2010. Vol. 18, N 3. – P.59-63.
- Xu J. Relationship between autoantibody to the angiotensin II-1 receptor and cardiovascular manifestations of Graves disease. / Zhao L, Xiang G, Xu C. // Exp Clin Endocrinol Diabetes. – 2014. Vol. 122, N 4. – P.254.
- Woodward M. Associations of inflammatory and haemostatic variables with the risk of recurrent stroke. / Lowe G.D., Campbell D.J. [et al.] // Stroke. – 2005. Vol. 36. – P 2143–2147.
- Burlova-Vasylieva M, Raksha N, Torgalo E, Savchuk O. The appearance of molecules of prothrombin origin in blood upon development of atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine. 2014;(3.68):57-60. English.
- Burlova-Vasylieva M, Kravchenko N, Savchuk O. Polymorphisms in FII, FV and PAI-1 genes in Ukrainian patients with atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke. European Journal of Human Genetics. 2014; (22.1):411. ISSN: 0975-8585. English.
- Hirsch, Jack. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 1983 Jan; 197(1): 116–117. PMID: PMC1352865. English.
- Hoyert D., Land Xu J. National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System. 2012; 61(6). P. 1-52. English.
- Jenne, C, Urrutia R., Kubes P., Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. International journal of laboratory hematology. 2013; (35.3): 254-261. DOI: 10.1111/ijlh.12084. English.
- Katrii T. B., Vovk T. B., Kravchenko N. K., Savchuk O. M., Ostapchenko L. I. Influence of IgG Separated from Blood Plasma of Patients with Ischemic Stroke on the Process Platelet's Proteins Secretion. International Journal of Chemical and Biomolecular Science. 2015; 278-283. English.
- Katrii T.B., Kravchenko N.K., Vovk T.B., Ostapchenko L.I., Savchuk O.M. The influence of immunoglobulin class G from blood plasma of patients with stroke on the activity of some parameters of hemostasis system. Journal Blood Coagulation & Fibrinolysis. Jen Forthcoming 2016; Doi: 10.1093/MBC.0000000000000497. PMID: 26825622. English.
- Martin, J, Shaw T., Heggie J., "The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B2 production and megakaryocyte nuclear DNA concentration. Thrombosis research. 1983; (32.5): 443-460. English.
- Negru T, Ghiea V, Diaconu V. Survey on some aspects of immunologic reactivity in old age. Rom J Physiol. 1995; 32(1-4). 125-36. English.
- Hockfield S, Carlson S, Evans C. Selected methods for antibody and nucleic acid probes. 1993; (1): 679. English.
- Shuaib A, Hussain M. The past future of neuroprotection in cerebral ischemic stroke. Eur. Neurol. 2008; (59):41-43. English.
- Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. Characteristic of autoimmune antibodies to components of hemostasis, which are producing in blood flow during systemic lupus erythematosus. Physics of life. 2010; (18.3):59-63. Ukrainian.
- Xu J, Zhao L, Xiang G, Xu C. Relationship between autoantibody to the angiotensin II-1 receptor and cardiovascular manifestations of Graves disease. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2014; 122(4). 254-8. English.
- Woodward M., Lowe G.D., Campbell D.J. et al. Associations of inflammatory and haemostatic variables with the risk of recurrent stroke. Stroke. 2005; (36). 2143–2147. English.

Надійшла до редколегії 09.06.16

Т. Катрий, асп., А. Савчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

АГРЕГАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ.

Статья посвящена изучению АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов здоровых доноров после инкубации с иммуноглобулинами класса G, которые были выделены из плазмы крови больных атеротромботическим и кардиоэмболическим подтипами ишемического инсульта в острый период болезни и через год после перенесенной острой фазы, а также с плазмы крови практически здоровых доноров. В ходе работы было показано, что атеротромботический и кардиоэмболический подтипы ишемического инсульта сопровождаются увеличением концентрации иммуноглобулинов класса G. При этом концентрация которых через год после перенесенной острой фазы соответствует показателю практически здоровых доноров. Кроме того IgG имеют способность влиять на определенные звенья системы гемостаза как в острой фазе заболевания так и через год. В частности для IgG полученных из плазмы крови больных как АИИ так и КИИ в острой фазе характерным была активация АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов здоровых доноров. В свою очередь IgG полученные из плазмы крови больных АИИ и КИИ через год после острой фазы проявили противоположный эффект, то есть ингибирование АДФ-зависимой агрегационной способности тромбоцитов здоровых доноров.

Ключевые слова: ишемический инсульт, IgG, агрегация тромбоцитов.

Т. Катрий, асп., О. Савчук, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

АГРЕГАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ ТРОМБОЦИТІВ ПІД ДІЄЮ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ КЛАСУ G ОТРИМАНИХ ІЗ ПЛАЗМИ КРОВІ ХВОРИХ НА ІШЕМІЧНИЙ ІНСУЛЬТ

Стаття присвячена вивченню АДФ-залежній агрегації тромбоцитів здорових донорів після інкубації з імуноглобулінами класу G, які були виділені з плазми крові хворих атеротромботичним і кардіоемболічним підтипами ішемічного інсульту в гострий період хвороби і через рік після перенесеної гострої фази, а також з плазми крові практично здорових донорів. В ході роботи було показано, що атеротромботичний і кардіоемболічний підтипи ішемічного інсульту супроводжується збільшенням концентрації імуноглобулінів класу G. При цьому концентрація яких через рік після перенесеної гострої фази відповідає показнику практично здорових донорів. Більш того IgG мають здатність впливати на певні ланки системи гемостазу як в гострій фазі захворювання так і через рік після перенесеної гострої фази. Зокрема для IgG отриманих з плазми крові хворих як АІІ так і КІІ в гострій фазі характерним була активація АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів здорових донорів. У свою чергу IgG отримані з плазми крові хворих АІІ і КІІ через рік після гострої фази проявили протилежний ефект, тобто інгібування АДФ-індукованої агрегаційної здатності тромбоцитів здорових донорів.

Ключові слова: ішемічний інсульт, IgG, тромбоцитарна активність.

УДК 578.81, 578.85/86

О. Андрійчук, канд. біол. наук, А. Голубенко, канд. біол. наук,
Г. Коротєєва, канд. біол. наук, О. Перегудова, пров. інж., В. Поліщук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗБУДНИКІВ ЗМІШАНОЇ ІНФЕКЦІЇ ОРХІДНИХ В КОЛЕКЦІЇ БОТАНІЧНОГО САДУ ІМ. АКАД. О.В. ФОМІНА

Проведено виявлення та ідентифікація збудників інфекційних хвороб орхідних в колекції захищеного ґрунту ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Описані симптоми інфікованих рослин. Встановлено наявність змішаної інфекції, обумовленої вірусними та бактеріальними агентами.

Ключова слова: орхідеї, інфекційні хвороби орхідей, віруси орхідей, фаготерапія.

Вступ. Тропічні та субтропічні види орхідних культивуються в багатьох країнах світу і є однією з провідних ланок сучасного квітникарства. В Україні більшість тропічних орхідних вирощується в умовах захищеного ґрунту в колекціях ботанічних садів та приватних господарствах. Проте, вірусні захворювання орхідних значно впливають на декоративні якості квітів, призводять до зменшення видового різноманіття колекцій та, відповідно, до зниження їх колекційної та комерційної цінності [10/9].

Нині описано близько 50 вірусів, здатних інфікувати представників родини *Orchidaceae* Juss. Серед них віруси мозаїки цимбідіуму (*Cymbidium mosaic virus*, *CymMV*) та кільцевої плямистості одонтогლოსуму (*Odontoglossum ringspot virus*, *ORSV*) є найбільш актуальними [14/14]. Передача цих вірусів відбувається виключно в умовах захищеного ґрунту, в основному, при вегетативному розмноженні або механічно. Чим старше вік рослини, що утримується в теплиці, тим більше ймовірність її ураження вірусними патогенами. Однієї інфікованої рослини достатньо для перезараження рослин усієї колекції, навіть при вирощуванні особин, первинно перевірених на наявність вірусів. Крім того, вірусні інфекції можуть призводити до зниження стійкості рослин до "вторинного" ураження іншими хворобами.

Крім вірусів, збудниками інфекційних хвороб у орхідних є гриби та бактерії. Серед грибкових уражень найбільшого значення має коренева гниль (фітум, різоктонія), трахеомікози, плямистість (борошниста роса, іржа, сіра та коричнева гниль, септоріоз, стангоспороз, філlostиктоз, церкоспороз) [9/8]. Бактеріальні інфекції розвиваються внаслідок проникнення бактерій крізь пошкоджені тканини ослабленої рослини та порушують нормальний перебіг фізіологічних процесів. Найпоширенішими бактеріальними хворобами орхідних є гниль, плямистість, некрози, що призводить до часткової або повної загибелі рослин [5, 12/ 1, 11].

Мета дослідження – вивчення етіологічних причин захворювань орхідних в колекції захищеного ґрунту ботанічного саду імені О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Матеріали і методи. Об'єктами нашого дослідження були тропічні орхідні з візуальними ознаками ураження (рис. 1), відібрані в колекції ботанічного саду імені О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Обстеження на наявність патогенів проводили серед зразків орхідних: *Cymbidium hybridum*, *Miltoniopsis* sp., *Calanthe vestita*, *Laelia* sp., *Stanhopea tigrina*, *Paphiopedilum* sp., *Phalidata*

concoidea, *Dendrobium moschatum*, *Phalaenopsis hybrida*, *Vanda tricolor*, *Dendrobium delicatum*, *Zygopetalum mackayi*, *Epidendron* sp., *Dendrobium kingianum*, *Coelogyne flaccida*, *Xylobium squalens*, *Dendrobium* sp., *Dendrobium* sp., *Miltoniopsis* sp., *Oncidium sphacelatum*, *Phalaenopsis* sp.

Віруси ідентифікували методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) в модифікації DAS-ELISA з сироватками до *СумMV* та *ORSV* (Prime Diagnostics, Нідерланди) за рекомендацією виробників тест-систем.

Концентрацію та очищення вірусних препаратів проводили за стандартними методиками [8/5]. Морфологію віріонів вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії за допомогою електронного мікроскопу JEOL-1400 (Японія), при інструментальному збільшенні 40000 та 60000. Препарати контрастували 2% водним розчином уранілацетату.

Для вирощування бактерій та титрування фагів використовували готові комерційні агаризовані поживні середовища на основі рибного гідролізату (виробник – Оболенськ, ГРМ-агар, ГРМ-бульйон). Концентрування та очистку фагів проводили методами високошвидкісного центрифугування у градієнті густини CsCl.

Для виділення бактеріофагів були використані зразки рослин родини *Orchidaceae* з симптомами бактеріального ураження – плямистість, некрози, гнилі, зів'янення та пожовтіння листя. Фаги виділяли шляхом прямого висіву. Титри визначали в бляшкоутворюючих одиницях в мл (БУО/мл) методом двошарового агару по Грація. Концентровані препарати фагів аналізували за допомогою методу електронної мікроскопії.

Чисті лінії бактеріофагів отримували шляхом шестикратного пасування з використанням методу виколювання окремих негативних колоній. Отримані ізоляти фагів використовували надалі для напрацювання їх в препаративних концентраціях та об'ємах.

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили за параметричними критеріями нормального розподілу, стандартне відхилення середніх значень – за загальноприйнятою методикою з використанням

комп'ютерної програми управління базами даних MS EXCEL 2000 [3/7].

Результати та їх обговорення. Симптоми, які з'являються на орхідних, внаслідок вірусної інфекції, не є характерними при ураженні конкретним вірусом. Хоча попередньо, за такими специфічними ознаками ураження, як кільцева плямистість, мозаїка та некрози, можна діагностувати вірусну інфекцію, проте ідентифікувати вірус не можливо.

Симптоми, які викликаються кожним індивідуальним вірусом, у значній мірі залежать від виду орхідних, штаму вірусу та факторів оточуючого середовища (температури, інтенсивності освітлення та ін.). Іноді рослини, уражені вірусами, можуть взагалі не проявляти видимих ознак ураження [2/6]. Крім того, такі фактори як незбалансованість елементів мінерального живлення, їх нестача, висока інтенсивність освітлення, інвазії комахами та кліщами, бактеріальні та грибні ураження чи генетичні порушення можуть викликати симптоми, схожі із симптомами вірусної інфекції. Тому діагноз "вірусна інфекція" повинен бути підтверджений специфічними методами діагностики та ідентифікації вірусів.

При проведенні візуального обстеження орхідних ботанічного саду ім. О.В. Фоміна Київського національного університету на листках рослин були виявлені мозаїчні, хлоротичні та некротичні симптоми. Симптоми мозаїки на листках представляли собою чергування світлих та темно-зелених ділянок, які утворювали мозаїчний візерунок (рис. 1 А). Симптоми некротичної або кільцевої плямистості полягають в утворенні на листовій пластинці дрібних (0,5–2 мм) та середнього розміру (2–4 мм) чорних некрозів округлої та овальної форми, іноді оточених вузькою облямівкою (рис.1 В). Досить поширеним симптомом було пожовтіння листової пластинки в комбінації з утворенням крайових некрозів. Симптоми мозаїки та кільцеві некрози можуть виникати на рослинах під впливом *СумMV* та *ORSV* [7/3].



А

В

Рис. 1. Вірусоподібні симптоми та бактеріальне ураження у рослин орхідних колекції БС ім. акад. О.В. Фоміна:

А – мозаїка і некрози на листках *Cymbidium hybridum* hort.;

В – хлорози і некрози на листках *Phalaenopsis* sp.

Для детекції антигенів *СумMV* та *ORSV* у зразках рослин орхідних ботанічного саду ім. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка було проведений ІФА, з відповідними антисироватками (рис.2).

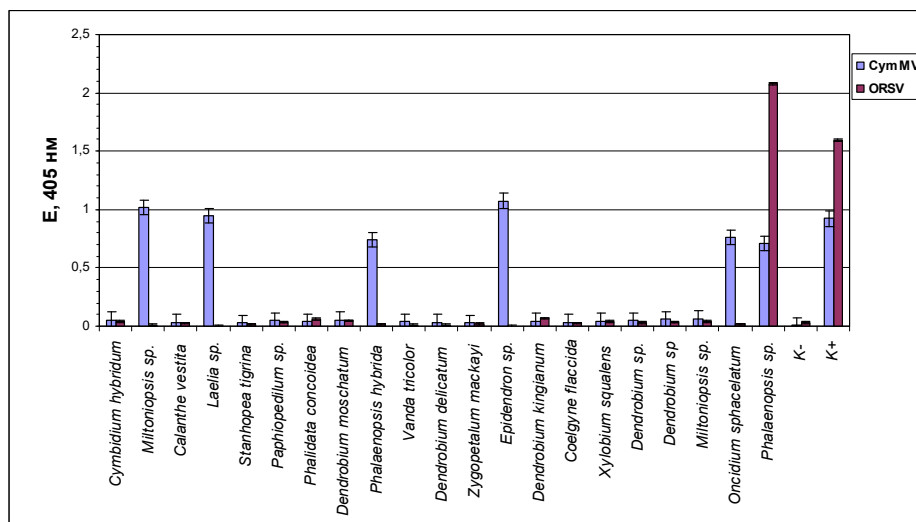


Рис. 2. Виявлення антигенів *CymMV* та *ORSV* у рослинах орхідних колекції ботанічного саду імені О.В. Фоміна

У результаті тестування зразків орхідних (рис. 2) було встановлено наявність антигенів *CymMV* в зразках рослин *Miltoniopsis* sp., *Laelia* sp., *Phalaenopsis hybrida*, *Epidendron* sp. та *Oncidium sphacelatum*. Слід відмітити, що моноінфекція *ORSV* у досліджуваних зразках виявлена не була. Змішана інфекція *CymMV*+*ORSV* була детектована у рослин *Phalaenopsis* sp.

Морфологічні особливості вірусів визначали методом трансмісійної електронної мікроскопії шляхом негативного контрастування концентрованих вірусомісних препаратів.

Електронномікроскопічні дослідження показали, що у препаратах, виділених із рослин роду *Phalaenopsis* колекції Ботанічного саду О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка, спостерігали два типи віріонів з різною морфологією: паличкоподібні та ниткоподібні (рис. 3). Результати вимірювання довжин вірусних часток показали, що ниткоподібні частки мають розмір 480-540 нм, паличкоподібні – 280-350 нм.

Паличкоподібний вірус, електронномікроскопічне зображення якого представлено на рисунку 3, за морфологічними показниками подібний до *ORSV*, а ниткоподібний – до *CymMV* [13/12].

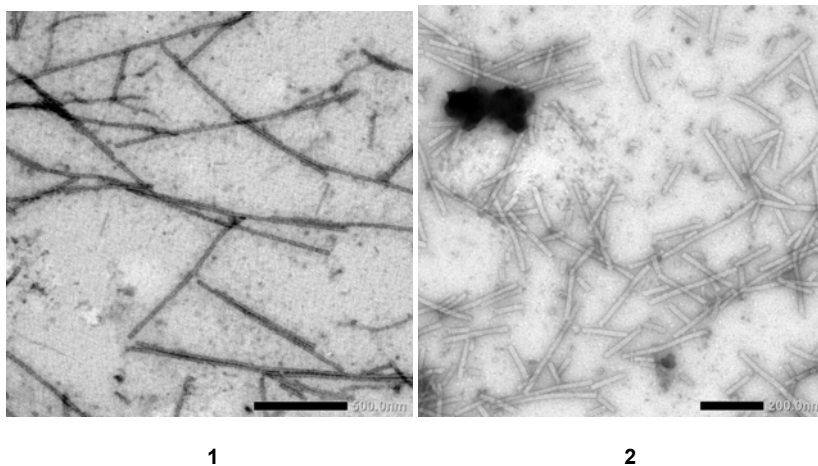


Рис. 3. Електронномікроскопічне зображення часток *CymMV* (1) та *ORSV* (2), виділених із рослин орхідних роду *Phalaenopsis*

Оскільки при обстеженні рослин орхідних методом ІФА з антисироватками до *ORSV* та *CymMV* була відмічена позитивна реакція, то порівняння результатів ІФА та електронномікроскопічних даних дають підставу стверджувати, що орхідні колекції НБС ім. О.В. Фоміна КНУ імені Тараса Шевченка були інфіковані *CymMV* та *ORSV*.

У орхідей, що було обстежені на наявність вірусних патогенів, крім вірусоподібних симптомів нами були відмічені симптоми бактеріального ураження, тому надалі було проведено фаготипування збудників бактеріозів орхідей.

Ураження були загальними, що викликали загибель всієї рослини або окремих його частин; місцеві: які обмежуються захворюванням окремих частин або органів

рослини, а також проявлялися на паренхімних тканинах (паренхіматозні хвороби – гнилі, плямистості, опіки); а також носили змішаний характер. При загальній інфекції спостерігалось в'янення рослини, яке може бути викликано двома причинами: закупоркою судин (судинне в'янення) або токсичною дією бактерій на тканини рослини.

На розвиток бактеріального захворювання рослин вказує поява плямистості. На відміну від грибкових уражень листя, плями, викликані бактеріями, не мають чітких границь. Такі плями дуже швидко збільшуються в розмірах, а саме листя сохне і жовтіє. Вологі умови утримання рослин тільки сприяють швидкому поширенню хвороби.

При плямистості, що викликана бактеріями, на листках можна побачити змертвілі ділянки у вигляді плям. Саме такі симптоми й були виявлені на рослинах орхідей.

На листках рослин спостерігали плямистість (коли плями підсихали, набували бурий та чорний колір), некрози, гнилі. Такі симптоми викликають бактерії роду *Pseudomonas* – нефлюоресціюючі псевдомонади (*P. cepacia*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*), які синтезують пектолітичні ферменти та целюлази [4/4].

Бактерії роду *Xanthomonas* викликають гниль та плямистість. Представники роду *Erwinia* надзвичайно небезпечні для рослин, часто стають причиною епіфітотій. Ці бактерії викликають гнилі, зів'янення листя, опіки, хвороби судин рослин тощо [1/13].

Патогенність бактерій роду *Pectobacterium* пов'язана зі здатністю продукувати пектолітичні ферменти, які спричиняють м'які гнилі.

Культури рослин, які вирощують в промислових масштабах, утворюють моновидові та багаточисельні угруповання, їх вирощують на незначних за площею територіях у оптимізованих умовах. Місця культивування рослин слугують екологічними нішами для фітопатогенних бактерій. При потрапленні збудників фітобактеріозів у моновидові рослинні популяції відбувається швидке поширення бактерій між організмами-хазяями, зупинити яке складно. При культивуванні рослин у захищеному ґрунті ситуація ускладнюється, адже вегетація рослин в теплицях та парниках триває упродовж усього року і явище сезонності, яке лімітує активність фітопатогенних бактерій у відкритому ґрунті, в умовах тепличних господарств відсутнє.

Для боротьби із збудниками фітобактеріозів використовують широкий спектр хімічних та біологічно активних сполук. Проте фітопатогенні бактерії під впливом вищезгаданих чинників набувають до них резистентності.

Із розвитком біологічних методів боротьби на зміну хімікатам та антибіотикам прийшли біологічні методи боротьби, що базуються на природних механізмах протидії рослин і їх мікробного оточення патогенами. Бактеріофаги, як природні компоненти мікробних угруповань,

можуть бути використані як ефективні протимікробні агенти. Фаги можуть бути ефективними протибактеріальними агентами, які допоможуть подолати хвороби, збудниками яких є фітопатогенні бактерії, стримати їх поширення та розповсюдження у нові осередки [6/2].

Для дослідження фагів на наявність біологічної активності використовували зразки уражених бактеріальними хворобами рослин орхідей. Ізоляти фагів із зразків були виділені до сімнадцяти індикаторних культур фітопатогенних бактерій *Pectobacterium carotovorum* 9014, *Dickeya solani* 2222, *Dickeya dianthicola* 980, *Dickeya dodonti* 2120, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 1949, *Pectobacterium atrosepticum* 1602, *Xanthomonas fragariae* 3057, *Pectobacterium carotovorum* 9014, *Pectobacterium carotovorum* 8923, *Pectobacterium carotovorum* 7201, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 7694, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 7749, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 7750, *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325, *Erwinia carotovora* 216, *Pseudomonas syringae* pv. *atropfaciens* 1025.

За допомогою індикаторних бактерій було отримано негативні колонії фагів різного розміру, що може вказувати на неоднорідність вірусних часток даних бактеріофагів.

Для подальших досліджень було проведено 6 пасажів для чотирьох фагів з високою літичною активністю.

Для фагів, як для біологічного об'єкту, характерною особливістю є пристосування до умов навколишнього середовища. Значна кількість природних і штучно створених факторів прямо та опосередковано впливають як на організм хазяїна так і фагів. Кожен фаг має коло природних хазяїв, іноді досить широке, а іноді, вузько специфічне. Тому, при вивченні репродукції вірусів бактерій в природних екосистемах важливим є визначення спектру літичної активності та ефективності їх репродукції.

Для визначення кола хазяїв ізолятів було проведено дослідження спектру літичної активності фагів на 13 штаммах фітопатогенних бактерій (табл. 1).

Таблиця 1. Спектр літичної активності фагів фітопатогенних бактерій

Зразки ізолятів фагів	1	2	3	4	6	7	8	10
Індикаторні бактерії								
<i>P. polytuxa</i> 9034	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>D. solani</i> 2222	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 8646	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>atropfaciens</i> 1025	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>atropfaciens</i> 1025	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>beticola</i> 7325	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. carotovora</i> 216	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> 7750	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> 7749	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. carotovorum</i> 8923	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> 8573	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 1949	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. fragariae</i> 3057	-	-	-	-	-	-	-	-

Виявлено, що серед восьми перевірених зразків шість проявляють літичну активність до штамів різних родів фітопатогенних бактерій (зразок № 1, 2, 6, 7, 8, 10), в той час як два ізоляти виявились моновалентними (зразки № 3, 4) – проявляли літичну активність лише до одного бактеріального штаму.

Після проведення пасажів для подальшої роботи було відібрано зразок для накопичення: зразок № 3, що виділено з зразку гнилі ураженої рослини орхідей

роду *Phalaenopsis hybr.*, виділеного на чутливій бактерії *Pseudomonas fluorescens* 8573. Для цього було використано метод інтенсивної аерації у рідкому поживному середовищі. Після накопичення проводили очистку та концентрацію фагів методом диференційного центрифугування.

Після накопичення препарати були нанесенні на сітку з формваровою плівкою–підкладкою для проведення електронної мікроскопії.

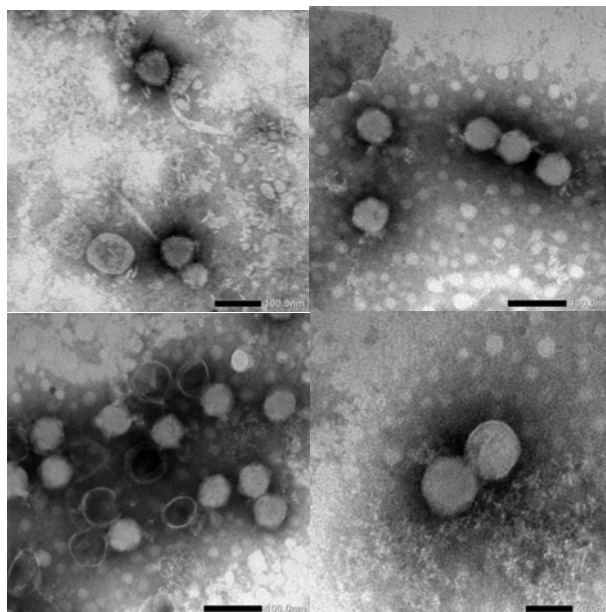


Рис. 4 Бактеріофаги виділені зі зразку гнилі ураженої рослини орхідеї роду *Phalaenopsis*, на чутливій бактерії *Pseudomonas fluorescens* 8573 та *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325

Електронномікроскопічні дослідження показали, що фаги, виділені до чутливої бактерії *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325, мають ізометричні головки та короткі хвостові відростки, а отже можуть бути віднесені до родини *Podoviridae*, С1-морфотипу, порядку *Caudovirales*, в той час як фаги, виділені на *Pseudomonas fluorescens* 8573- мають ізометричні голівки та довгі хвостові відростки, і можуть бути віднесені до родини *Siphoviridae*, В1-морфотипу, порядку *Caudovirales* (рис. 4).

При розгляданні критеріїв, які використовують для диференціації фагів, визначення морфологічної будови дозволить віднести віруси до відомих морфологічних типів.

Визначення розмірів даних віріонів дозволяє говорити про їх неоднорідність. Між ними спостерігалась різниця як у розмірі часток та розмірі хвостових відростків.

Використання незалежних методів: електронної мікроскопії та визначення кола хазяїв дало можливість ідентифікувати та дослідити бактеріофаги, виділені з ізолятів зразків орхідей з патологіями бактеріальної етіології, і показати їх перспективність їх використання для лікування хвороб бактеріальної етіології (бактеріальних інфекцій) рослин родини *Orchidaceae*. Враховуючи властивості бактеріофагів, визначені в даній роботі можна припустити, що вони є вдалим кандидатами для створення активних біопрепаратів.

Колекції тропічних орхідних захищеного ґрунту в ботанічних садах України збираються впродовж багатьох років та містять нетестовані на вірусносієвість рослини, тобто не відбувається вибраковка уражених рослин [11/10]. Ймовірно, що саме вірусна інфекція (*CymMV* та *ORSV*) у орхідей створює підґрунтя для вторинного ураження патогенними бактеріями та грибами. Саме тому лише комплексний підхід – дотримання правил карантину, технологій утримання культур, гідро- та терморежиму, використання безвірусного посадкового матеріалу, регулярне тестування рослин колекцій на наявність патогенів вірусної етіології, утримання нових рослин певний час в умовах карантину при надходженні їх в колекції, знищення шкідників, використання фагових препаратів для терапії бактеріозів, дозволить запобігти значним втратам в колекціях та сприяти збереженню видового складу колекцій орхідей захищеного ґрунту.

Висновки. Проведено обстеження колекції рослин орхідних НБС ім. О.В. Фоміна КНУ імені Тараса Шевченка. Встановлено, наявність змішаної інфекції у рослин, обумовленої вірусними та бактеріальними патогенами. Ідентифіковано бактеріофаги, виділені з ізолятів зразків орхідей з патологіями бактеріальної етіології, і показано перспективність їх використання для лікування бактеріальних хвороб рослин родини *Orchidaceae*.

Список використаної літератури

1. Воронкевич И.В. Выживаемость фитопатогенных бактерий в природе / И.В. Воронкевич. – М.: Наука, 1974. – 270 с.
2. Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусных растений / Р.В. Гнутова. – М.: Наука, 1993. – 301 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. – [3-е изд., перераб. и доп.] / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
4. "Микроорганизмы – возбудители болезней растений" (справочник) / [В.И. Билай, Р.И. Гвоздяк, И.Г. Скрипаль та ін.]. – К.: Наукова думка, 1988. – 552 с.
5. Abdullah H. Etiology of Bacterial Soft Rot of Orchids/ H. Abdullah, S. Kadzimir // Pertanika J. Trop. Agric. Sci. – 1993. – N 16(1). – P.1–4.
6. Adhya S. The road to phage therapy / S. Adhya, C. Merrill // Nature. – 2006. – N 443. – P. 754 – 755.
7. Ajjikuttira P. Molecular Biology of Two Orchid Infecting Viruses: Cymbidium mosaic potexvirus and Odontoglossum ringspot tobamovirus / P. Ajjikuttira, S.M. Wong // In: Kull T, Arditti J., Wong S.M. Orchid Biology: Reviews and Perspectives X. Dordrecht, Springer. – 2009. – P.252–270.
8. Frowd I. A. Physical, chemical and serological properties of Cymbidium mosaic virus/ I.A. Frowd, I.M. Tremaine // Phytopathology. – 1977. – Vol. 67., N 1. – P.43–49.
9. Matsubara T. Fungal Isolate "KMI" Is a New Type of Orchid Mycorrhizal Fungus/ T. Matsubara, M. Yoneda, T. Ishii // American Journal of Plant Sciences. – 2012. – N. 3. – P.1121–1126.
10. Pearson M.N. Further observations on the effects of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus on the growth of Cymbidium orchids/ M.N. Pearson, J.S. Cole // J. Phytopath. – 1991. – Vol.131. – P.193–198.
11. Polischuk V. Spreading of virus infection in the orchid collection in Ukraine/ V. Polischuk, G. Korotyeyeva, A. Lavrentyeva [et al.] // Plant science. Sofia. – 2007. – Vol. XLIV, N 3. – P.213–216.
12. Robert T. Effect of rouging on Erwinia soft rot in commercial production with two *Phalaenopsis* / T. Robert, J.R. McMillan, A. Palmeteer, W. Vendrame // Plants per Pot. Proc. Fla. State Hort. Soc. – 2007. – Vol.120. – P. 353 – 355.
13. Toussaint A. Electron microscopic observation of two Cymbidium viruses: ORSV and CMV/ A. Toussaint, A. Rassel // Parasitica. – 1982. – Vol. 48., N 3. – P.132–137.
14. Zettler F.W. Viruses of orchids and their control/ F.W. Zettler, G.C. Wisler, M.S. Elliot [et al.] // Plant disease. – 1990. – Vol.74., N 9. – P.621–626.

References

1. Abdullah H, Kadzamil S. Etiology of Bacterial Soft Rot of Orchids Pertanika. J. Trap. Agric. Sci. 1993; 16(1):1–4. English.
2. Adhya S, Merrill C The road to phage therapy. Nature. 2006. 443: 754-5. English.
3. Ajikuttira P, Wong SM. Molecular Biology of Two Orchid Infecting Viruses: Cymbidium mosaic potexvirus and Odontoglossum ringspot tobamovirus. In: Kull T, Arditti J, Wong S.M. Orchid Biology: Reviews and Perspectives X. Dordrecht, Springer; 2009. p. 252–270.
4. Bilaj VI, Gvozdzak RI, Skripal' IG "Mikroorganizmy – vzbuditeli boleznej rastenij" (sparavochnik) [The microorganisms – causative agents of plant diseases "(reference). Kiev: naukova dumka, 1988.
5. Frowd IA, Tremaine IM. Physical, chemical and serological properties of Cymbidium mosaic virus Phytopathology. 1977; 67(1):43-9. English.
6. Gnutova RV Serologija i imunohimija virusov rastenij [Serology and Immunochemistry of plant viruses] Moscow: Nauka, 1993.
7. Lakin GF Biometrija [Biometrics] 3-d ed. Moscow: Vysshaja shkola, 1980.
8. Matsubara T, Yoneda M, Ishii T Fungal Isolate "KMI" Is a New Type of Orchid Mycorrhizal Fungus. American Journal of Plant Sciences. 2012; 3:1121–6. English.
9. Pearson MN, Cole JS Further observations on the effects of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus on the growth of Cymbidium orchids. J. Phytopath. 1991; 131: 193-8. English.
10. Polischuk V, Korotyeyeva G, Lavrentyeva A, Bysov A. Spreading of virus infection in the orchid collection in Ukraine. Plant science. Sofia. 2007; XLIV(3):213–6. English.
11. Robert T, McMillan JR, Palmeter A, Vendrame W. Effect of rouging on Erwinia soft rot in commercial production with two *Phalaenopsis*. Plants per Pot. Proc. Fla. State Hort. Soc. 2007; 120: 353 – 5. English.
12. Toussaint A, Rassel A. Electron microscopic observation of two Cymbidium viruses: ORSV and CMV. Parasitica. 1982; 48(3):132–7. English.
13. Voronkevich IV Vyzhivaemost' fitopatogennykh bakterij v prirode [Survival of pathogenic bacteria in the environment] Moscow: Nauka, 1974.
14. Zettler FW, Wisler GC, Elliot MS, Wong SM. Viruses of orchids and their control. Plant disease. 1990; 74(9): 621–6. English.

Надійшла до редколегії 09.06.16

Е. Андрийчук, канд. биол. наук, А. Голубенко, канд. биол. наук, А. Коротеєва, канд. биол. наук, А. Перегудова, пров. инж., В. Полищук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СМЕШАННОЙ ИНФЕКЦИИ ОРХИДНЫХ В КОЛЛЕКЦИИ БОТАНИЧЕСКОГО САДА ИМ. АКАДЕМ. А.В. ФОМИНА

Проведено выявление и идентификация возбудителей инфекционных болезней орхидных в коллекции защищенного грунта ботанического сада им. акад. А.В. Фомина Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Описаны симптомы инфицированных растений. Установлено наличие смешанной инфекции, обусловленной вирусными и бактериальными агентами.

Ключевые слова: орхидеи, инфекционные болезни орхидей, вирусы орхидей, фитоотерапия.

O. Andriychuk, PhD, A. Golubenko, PhD, G. Korotyeyeva, PhD, O. Peregudova, Lead engeneer, V. Polischuk, Dr.Sci
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

IDENTIFICATION OF INFECTIOUS AGENT OF MIXED INFECTIONS IN ORCHID COLLECTION OF FOMIN'S BOTANICAL GARDEN

Screening of Orchidaceae on virus diseases in the collection of Fomin's Botanical garden of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine has been conducted. The symptoms of infected plants are described. The presence of mixed infections caused by viral and bacterial agents are defined.

Key words: orchids, infectious diseases of orchid, orchid virus.

UDC 612.352.2

D.Voieikova, PhD stud., L. Stepanova, PhD, T.Beregova, DSc, L.Ostapchenko, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
M. Kondro, PhD,
Danila Galitsky Lviv National Medical University, Ukraine, Lviv

PHOSPHOLIPID COMPOSITION IN THE INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE OF RAT HEPATOCYTES UNDER THE DEVELOPING OF DIFFERENT TYPES OF STEATOHEPATOSIS

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) or steatohepatosis has recently become widespread, but its pathogenesis has not been thoroughly understood for today. Most scientists have appropriated a central role in the mechanisms of its development to mitochondria and so-called "mitochondrial dysfunction," which is observed in most animal models and in most patients. The aim of this work was to determine phospholipid composition of inner mitochondrial membrane of rat hepatocytes under diet-induced and glutamate-induced steatohepatosis, as well as to compare the data about developing steatohepatosis of different types. Obtained data indicate the disruption of normal functional state of the inner mitochondrial membrane under the conditions of diet-induced and glutamate-induced steatohepatosis. Amount of oxidized forms of the major phospholipids including cardiolipin, indicates the increasing oxidative stress under the conditions of both steatohepatosis types.

Key words: steatohepatosis, mitochondria, "mitochondrial dysfunction" phospholipids oxidative stress.

INTRODUCTION.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) or steatohepatosis has become more widespread in human population and it is often accompanied by pathological disorders of other organs and systems. The combination of obesity with the development of type 2 diabetes affects liver badly. There is a rapid decline in metabolic and functional activity that results in cancer development [11, 16].

The pathogenesis of steatohepatosis has not been clearly understood for today. But most scientists appropriate a central role in the mechanism of NAFLD developing to mitochondria and to "mitochondrial dysfunction" which is observed in most animal models and

in most patients. The main characteristics of "mitochondrial dysfunction" are the disruption in complexes of electron transport chain (ETC, respiratory chain), the decrease of oxidative phosphorylation and the development of oxidative stress, as well as the changes in the level of β -oxidation and in the Krebs cycle functioning [5, 6, 16, 17].

Recent studies have shown that experimental animals have suffered from steatohepatosis of different degrees of severity under the conditions of various types of high-calorie diets (HCD) even without weight excess [1, 3, 14]. Also, there has been established the direct effect of excessive income of carbohydrates and lipids on the phospholipid composition not only of plasma membrane,

but also on the composition of inner mitochondrial membrane in different diets [2, 14, 15]. L-monosodium glutamate (MSG) is one of the most popular nutritional supplements which causes steatohepatosis and associated obesity. It is also characterized by the development of "mitochondrial dysfunction", which is similar in certain parameters to diet-induced steatohepatosis [8, 9, 10]. But, changes in phospholipid composition of inner mitochondrial membrane under glutamate-induced steatohepatosis have not been studied.

The aim of this work was to determine phospholipid composition of inner mitochondrial membrane of rat hepatocytes under diet-induced and glutamate-induced steatohepatosis and to compare data about steatohepatosis developing of different types.

MATERIALS AND METHODS.

The experiments were performed on non-linear white male rats. Steatosis was performed in two ways: by keeping on high-caloric diet (HCD) # C11024 and by neonatal subcutaneous injection of MSG. 20 rats of 180-200g were taken and divided into two groups before the start of the experiment. HCD #C 11024 (Research Diabetes, New Brunswick, NJ) consisted of a standard feed (47%), condensed milk (44%), corn oil (8%) and starch (1%). This diet induces the development of steatosis in mice and rats [14]. The rats of the first group were kept on a standard feed with free access to water. The rats of the second group were kept on diet # C 11024 with free access to water. Both groups of animals were kept for 20 weeks.

Earlier studies demonstrated the development of steatosis under glutamate-induced visceral obesity [8, 9]. Newborn rats were divided into two groups. The first group was injected subcutaneously by MSG in a dose of 4 mg/kg dissolved in isotonic saline in amount of 8 ml/g body weight on the 2, 4, 6, 8 and 10 days of life. The second group was injected subcutaneously with isotonic saline in amount of 8

ml/g weight in the same period. Rats of both groups were kept on a standard feed and with free access to water during 4 months of life.

A well-known non-enzymatic method for selection hepatocytes fractions (by Petrenko O. et al. [4]) was modified. Fractions of inner mitochondrial membrane were separated using gradual ultracentrifugation [13]. Extraction of lipids was performed by a method of Folch et al. with modifications [12]. Phospholipids separation was performed by thin layer chromatography [3].

RESULTS AND DISCUSSION.

Phospholipid compositions of inner mitochondrial membrane have been changed under diet-induced steatohepatosis (tab. 1). A small percentage increase of cardiolipin content since the 3-d week of keeping on a diet was established compared to the control group of animals that were kept on a standard diet. The content of cardiolipin in rats with glutamate-induced steatohepatosis also increased by 1.5 times ($p < 0.01$) compared with the control group (tab. 2). It may indicate the similar mechanisms of developing steatohepatosis of different types which is accompanied by the attraction of inner mitochondrial membrane. One of the main functions of cardiolipin is the interaction with ETC complexes. Thus, cardiolipin provides a normal functional activity of the respiratory chain. Free radical oxidation affects the fatty acid composition of this phospholipid, thereby, reducing the affinity for ETC complexes. The result of such changes is the reduced activity of I, III and IV ETC complexes. Published data show that cardiolipin amount can rise only under conditions of oxidative stress, such as by increasing the number of oxidized cardiolipin forms [5, 7, 15, 17]. Its total content increases in the membrane, but, at the same time, non-oxidized cardiolipin amount decreases, which was observed in animals with diet-induced and glutamate-induced steatohepatosis [6, 7, 9, 17].

Table 1. Amount of phospholipids in the inner mitochondrial membrane rat hepatocytes under conditions of diet-induced steatohepatosis (n=10, M±m)

Group	3 week	10 week	12 week	15 week
Cardiolipin (%)				
Control	17,92±1,65	17,06±1,79	18,91±1,51	19,10±0,18
HCD	22,01±1,85*	18,77±3,61	22,52±1,13*	26,37±0,16*
Phosphatidylcholine (%)				
Control	34,53±2,43	33,09±3,01	33,71±0,84	34,07±0,38
HCD	28,90±1,08*	35,48±3,76	32,92±1,19	33,18±0,21
Phosphatidylethanolamine (%)				
Control	31,32±1,48	30,98±3,97	28,08±2,05	31,32±0,30
HCD	24,93±0,42*	29,73±2,22	25,83±1,33	27,04±0,31
Phosphatidylinositol and Phosphatidylserine (%)				
Control	11,46±2,17	13,09±4,38	11,99±1,44	11,50±0,80
HCD	15,67±1,04*	10,28±2,11*	12,95±1,37	9,60±0,45*
Sphingomyelin (%)				
Control	3,09±0,029	4,15±0,03	4,86±0,08	2,50±0,64
HCD	5,54±3,82**	3,02±4,17*	3,13±3,86*	1,15±2,09***
Oxidized phosphatidylcholine (%)				
Control	1,27±0,011	1,27±0,019	0,98 ±0,05	1,06±0,02
HCD	2,46±0,98***	2,28±1,75**	1,98±0,17***	1,90±0,05**
Oxidized phosphatidylethanolamine (%)				
Control	0,41±0,03	0,36±0,04	0,47±0,03	0,45±0,05
HCD	0,49±0,015*	0,44±0,07*	0,67±0,05**	0,76±0,019**

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ – vs. control group

Table 2. Amount of phospholipids in the inner mitochondrial membrane rat hepatocytes under conditions of glutamate-induced steatohepatosis (n = 10, M ± m)

Control group	MSG group
Cardiolipin (%)	
18,86±0,94	28,56±1,43**
Phosphatidylcholine (%)	
33,48±2,81	19,63±0,88**
Phosphatidylethanolamine (%)	
30,59±2,13	22,18±0,86*
Phosphatidylinositol and Phosphatidylserine (%)	
12,37±1,02	11,42±0,75
Sphingomyelin (%)	
3,21 ±0,51	5,84 ±1,10**
Oxidizephosphatidylcholine(%)	
1,13 ±0,12	10,39 ±0,87***
Oxidazephosphotidylethanolamine (%)	
0,36 ±0,029	1,98 ±0,17***

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 – vs. control group

The amount of phosphatidylcholine in the inner mitochondrial membrane decreased a little under the conditions of modified diet, but only at the 3rd week. But we observed a significant increase in its oxidized form – oxidizephosphatidylcholine. Thus, the content of oxidized forms was increased by 1.9 times (p <0.001) since the 3-d week of keeping HCD. The greatest increase, by 2 times (p <0.001) was observed at the 12th week compared to animals that were kept on a standard diet. A similar pattern is observed in the content of phosphatidylethanolamine and in its oxidized form – oxidazephosphotidylethanolamine. A small reduction of phosphatidylethanolamine was observed only at the 3rd week without significant changes until the end of keeping animals on the HCD. On the contrary, oxidazephosphotidylethanolamine content increased a little starting from the 3rd week, with maximal increase by 1.7 times (p <0.01) at the 15th week compared to the control group. The content of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and of their oxidized forms has similarly been changed under the conditions of glutamate-induced steatohepatosis. Thus, the amount of phosphatidylcholine has decreased by 1.7 times (p <0.01), and the amount of phosphatidylethanolamine has decreased by 1.4 times (p <0.05). At the same time phosphatidylcholine content has increased by 4.5 times (p <0.001), and oxidazephosphotidylethanolamine content has increased by 9.2 times (p <0.001) under MSG neonatal injection. The obtained data have shown the similarity of contents changes of these two phospholipids and their oxidized form, as well as a bigger level of oxidative stress development under glutamate-induced steatohepatosis. Normally, a small amount of oxidizephosphatidylcholine and oxidazephosphotidylethanolamine is observed in the inner mitochondrial membrane, therefore, the increasing content of oxidized products is one of the results of oxidative stress developing [2, 5, 7, 16].

The development of diet-induced steatohepatosis has shown also changes in the amount of minor components of inner mitochondrial membrane. The percentage amount of phosphatidylinositol and phosphatidylserine mixtures increased by 1.4 times (p <0.05) at the 3rd week of keeping on modified diet, but starting from the 10th week we have observed a slight decrease in this index relative to the control. The amount of sphingomyelin was changing similarly; at first, it increased by 2 times at the 3rd week (p <0.01) and then, it decreased by 1.4 times (p <0.05) at the 10th week; by 1.5 times (p <0.01) at the 12th week and 2.2 times (p <0.001) at the 15th weeks. The total amount of phosphatidylinositol and phosphatidylserine has

not significantly changed in rats with glutamate-induced steatohepatosis; and amount of sphingomyelin has increased by 1.8 times (p <0.01) relative to controls. Having analyzed the published data and summarized the results, we assume that the changes in the content of minor phospholipids result from the breached ratio of total phospholipid content and they do not have functional effects on inner mitochondrial membrane [3]. The only additional effect of the complex changes of phospholipid composition is to reduce fluidity of inner mitochondrial membrane which makes additional destabilizing effect on a normal functional activity not only of membranes but of mitochondria in general.

CONCLUSIONS

Received data about the lipid composition of the inner mitochondrial membrane under the conditions of diet-induced and glutamate-induced steatohepatosis indicate the disturbance of its normal functional state. The increase of oxidized forms of major phospholipids including cardiolipin proves the development of oxidative stress under the conditions of both types of steatohepatosis. Also, it was found that the amount of oxidized forms of the major phospholipids in the membrane is significantly increased by the injection (administration) of MSG, which allows concluding about the greater level of the oxidative stress development under the conditions of glutamate-induced steatohepatosis.

Список використаних джерел

1. Aoun M., Feillet-Coudray C., Fouret G., et al. Rat liver mitochondrial membrane characteristics and mitochondrial functions are more profoundly altered by dietary lipid quantity than by dietary lipid quality: effect of different nutritional lipid patterns. *Br J Nutr.* 2012; 107 (5): 647-659.
2. Monteiro JP, Oliveira PJ, Jurado AS Mitochondrial lipid remodeling in pathophysiology: A new target for diet and therapeutic interventions. *Prog Lipid Res.* 2013; 52(4): 513-528.
3. Goncalves IO, Maciel E, Passos E et al. Exercise alters liver mitochondria phospholipidomic profile and mitochondrial activity in non-alcoholic steatohepatitis. *The Inter. J. of Biochem. And C. Biol.* 2014; 54: 163-173.
4. Petrenko AY. Isolation of rat hepatocytes no enzymatic method: detoxification and respiratory activity. *Biochemistry.* 1991; 56(9): 1647 – 1650.
5. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM et al. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(39): 14205-14218.
6. Pessayre D Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease // *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 23(3): S20-S27.
7. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM Role of oxidative stress in pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(1): 59-69.
8. Kondro M, Mykhalchysyn G, Bodnar P, et al. Metabolic profile and morpho-functional state of the liver in rats with glutamate-induced obesity. *Curr Iss Pharm Med Sci.* 2013; 26(4): 379–381.
9. Quines CB, Rosa SG, Chagas MN et al. Homeostatic effect of p-chloro-diphenyl diselenide on glucose metabolism and mitochondrial

function alterations induced by monosodium glutamate administration to rats. *Amino Acids*. 2016; 48(1): 137-148.

10. Oliveira ML, Ishii-Iwamoto EL, Yamamoto NS et al. Liver mitochondrial function and redox status in an experimental model of non-alcoholic fatty liver disease induced by monosodium L-glutamate in rats. *Exp Mol Path*. 2011; 91: 687-694.

11. Gusdon AM, Song K, Qu S Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria – centric perspective. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 1-20.

12. Folch J, Leez M, Stanley GH A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226(2): 497-501.

13. Ardail D, Privat JP, Erget-Charlier M et al. Mitochondrial contact sites. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 18797-18802.

14. Kakimoto P.A., Kowaltowski A.J. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Red Biol*. 2016; 8: 216-225.

15. Feillet-Coudray C, Fouret G, Casas F et al. Impact of high dietary lipid intake and related metabolic disorders on the abundance and acyl composition of the unique mitochondrial phospholipid, cardiolipin // *J Bioenerg Biomemb*. 2014; 46: 447-457.

16. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP et al. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(2): 193-199.

17. Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I et al. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver. Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Bioch Biophys Acta*. 2007; 1767: 1260-1267.

References

1. Aoun M. Rat liver mitochondrial membrane characteristics and mitochondrial functions are more profoundly altered by dietary lipid quantity than by dietary lipid quality: effect of different nutritional lipid patterns / M. Aoun, C. Feillet-Coudray, G. Fouret [et al.] // *British Journal of Nutrition*. – 2012. – Vol. 107, N 5. – P. 647-659.

2. Monteiro J.P. Mitochondrial lipid remodeling in pathophysiology: A new target for diet and therapeutic interventions / J.P. Monteiro, P.J. Oliveira, A.S. Jurado // *Progress in Lipid Research*. – 2013. – Vol. 52, N 4. – P. 513-528.

3. Goncalves I.O. Exercise alters liver mitochondria phospholipidomic profile and mitochondrial activity in non-alcoholic steatohepatitis / I.O. Goncalves, E. Maciel, E. Passos [et al.] // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2014. – Vol. 54. – P. 163-173.

4. Петренко А. Ю. Выделение гепатоцитов крыс не ферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности / А. Ю. Петренко, А. Н. Сукач, А. Д. Росляков // *Биохимия*. – 1991. – Т. 56, № 9. – С. 1647 – 1650.

5. Paradies G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease / G. Paradies, V. Paradies,

F.M. Ruggiero [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20(39). – P. 14205-14218.

6. Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2007. – Vol. 22. – P. S20-S27.

7. Rolo A.P. Role of oxidative stress in pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis / A.P. Rolo, J.S. Teodoro, C.M. Palmeira // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2012. – Vol 52. – P. 59-69.

8. Kondro M. Metabolic profile and morpho-functional state of the liver in rats with glutamate-induced obesity / M. Kondro, G. Mykhalchysyn, P. Bodnar, N. Kobylak, T. Falalyeyeva // *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. – 2013. – Vol. 26(4). – P. 379–381.

9. Quines C.B. Homeostatic effect of p-chloro-diphenyl diselenide on glucose metabolism and mitochondrial function alterations induced by monosodium glutamate administration to rats / C.B. Quines, S.G. Rosa, M.N. Chagas [et al.] // *Amino Acids*. – 2016. – Vol. 48(1). – P. 137-148.

10. Oliveira M.L. Liver mitochondrial function and redox status in an experimental model of non-alcoholic fatty liver disease induced by monosodium L-glutamate in rats / M.L. Oliveira, E.L. Ishii-Iwamoto, N.S. Yamamoto [et al.] // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2011. – Vol. 91. – P. 687-694.

11. Gusdon A.M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and therapeutics from a mitochondria – centric perspective / A.M. Gusdon, K. Song, S. Qu // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1-20.

12. Folch J. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues / J. Folch, M. Leez, G.H. Stanley // *Journal of Biological Chemistry*. – 1957. – Vol. 226, N 2. – P. 497-501.

13. Ardail D. Mitochondrial contact sites / D. Ardail, J.P. Privat, M. Erget-Charlier [et al.] // *The Journal of Biochemistry*. – 1990. – Vol. 265. – P. 18797-18802.

14. Kakimoto P.A. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance / P.A. Kakimoto, A.J. Kowaltowski // *Redox Biology*. – 2016. – Vol. 8. – P. 216-225.

15. Feillet-Coudray C. Impact of high dietary lipid intake and related metabolic disorders on the abundance and acyl composition of the unique mitochondrial phospholipid, cardiolipin / C. Feillet-Coudray, G. Fouret, F. Casas [et al.] // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2014. – Vol. 46. – P. 447-457.

16. Wei Y. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction / Y. Wei, R.S. Rector, J.P. Thyfault [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 14(2). – P. 193-199.

17. Petrosillo G. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver. Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin / G. Petrosillo, P. Portincasa, I. Grattagliano [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2007. Vol. 1767. – P. 1260-1267.

Надійшла до редколегії 09.06.16

Д.Восійкова, асп., Л. Степанова, канд. біол. наук, Т. Берегова, д-р біол. наук., Л. Остапченко, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,

М. Кондро, канд. мед. наук

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів

ФОСФОЛІПІДНИЙ СКЛАД ВНУТРІШНЬОЇ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ МЕМБРАНИ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ СТЕАТОГЕПАТОЗУ РІЗНОЇ ЕТІОЛОГІЇ

Неалкогольна жирова хвороба печінки (НЖХП) або стеатогепатоз останнім часом набуває широкого поширення, але його патогенез на сьогодні досконально не встановлений. Більшість вчених відводять центральну роль в механізмах його розвитку саме мітохондріям і так званій "мітохондріальній дисфункції", яка спостерігається на більшості тваринних моделей та у більшості пацієнтів. Метою роботи стало визначення фосфоліпідного складу внутрішньої мітохондріальної мембрани гепатоцитів щурів за умов діст-індукованого та глутамат-індукованого стеатогепатозу та порівняння даних щодо розвитку стеатогепатозу різної етіології. Отримані дані вказують на порушення нормального функціонального стану внутрішньої мітохондріальної мембрани за умов як діст-індукованого так і глутамат-індукованого стеатогепатозу. Підвищується вміст окислених форм основних фосфоліпідів, в тому числі і кардіоліпіну, що вказує на розвиток окисного стресу за умов розвитку обох типів стеатогепатозу. Також, встановлено, що саме за умов введення ГН відносний вміст окислених форм підвищується більшою мірою, ніж за умов діст-індукованого стеатогепатозу.

Ключові слова: стеатогепатоз, мітохондрія, "мітохондріальна дисфункція", фосфоліпіди, окисний стрес.

Д. Воейкова, асп., Л. Степанова, канд. біол. наук, Т. Береговая, д-р биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,

М. Кондро, канд. мед. наук

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Львов, Украина

ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ВНУТРЕННЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ СТЕАТОГЕПАТОЗУ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Неалкогольная жировая болезнь печени (НЖБП) или стеатогепатоз широко распространена среди человеческой популяции, но его патогенез до сих пор детально не установлен. Большинство ученых отводят центральную роль в механизмах его развития именно митохондриям и так называемой "митохондриальной дисфункции", которая наблюдается на большинстве животных моделей и у большинства пациентов. Целью работы стало определение фосфолипидного состава внутренней митохондриальной мембраны гепатоцитов крыс в условиях диет-индуцированного и глутамат-индуцированного стеатогепатоза и сравнения данных о развитии стеатогепатоза различной этиологии. Полученные данные указывают на нарушение нормального функционального состояния внутренней митохондриальной мембраны в условиях как диет-индуцированного так и глутамат-индуцированного стеатогепатоза. Повышается содержание окисленных форм основных фосфолипидов, в том числе и кардиолипина, что указывает на развитие окислительного стресса в условиях развития обоих типов стеатогепатоза. Также установлено, что именно в условиях введения ГН относительное содержание окисленных форм повышается в большей степени, чем при диет-индуцированного стеатогепатоза.

Ключевые слова: стеатогепатоз, митохондрия, "митохондриальная дисфункция", фосфолипиды, окислительный стресс.

УДК 616.211/232-006:612.015

Ю. Бурлака, наук. співроб., Н. Гринь, наук. співроб.,
О. Голобородько, ст. наук. співроб., канд. біол. наук, С. Верьовка, д-р біол. наук
Державна Установа "Інститут отоларингології імені проф. О.С. Коломійченка НАМН України", Київ

ДОСЛІДЖЕННЯ АГРЕГАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ У ХВОРИХ НА РАК ГОРТАНІ

Проведено порівняння показників агрегації еритроцитів у хворих на рак гортані порівняно з такими в контрольній групі (умовно здорові особи). Встановлено, що у хворих на рак гортані з II-ю і III-ю стадіями пухлинного процесу на тлі підвищення ступеня та часу агрегації відносно відповідних контрольних даних, відбувається одночасне зниження її швидкості. Крім того, проведене дослідження виявило підвищення рівнів молекул середньої маси та фібриногену в плазмі крові хворих: більш суттєві їх порушення спостерігались при III-й стадії онкологічного процесу, ніж при II-й. Вміст сіалових кислот був збільшеним при II-й і III-й стадіях раку гортані в однаковому ступені в порівнянні з контрольним показником. Встановлено різноспрямовані зміни основних параметрів агрегатограм еритроцитів. Найбільш значні порушення ступеня агрегації відмічаються при II-й стадії онкологічного процесу. Зростання рівнів молекул середньої маси, фібриногену та сіалових кислот в плазмі крові хворих на рак гортані вказує на наявність в них метаболічної інтоксикації та гострої фази запалення, ступінь вираженості яких в певній мірі залежить від стадії захворювання.

Ключові слова: рак гортані, еритроцити, агрегація, молекули середньої маси, фібриноген, сіалові кислоти.

Вступ.

Здатність еритроцитів взаємодіяти один з одним була описана ще в XVIII столітті, хоча і не привертала особливої уваги тривалий час. Інтерес до агрегації еритроцитів стимулювали клінічні спостереження, що відкрили пов'язані з нею порушення кровотоку на рівні мікросудин [22]. Відомо, що на агрегаційні властивості клітин крові можуть впливати як плазмові, так і клітинні фактори [7]. Показано, що гіперагрегація еритроцитів і пов'язане з нею підвищення в'язкості крові спостерігається при захворюваннях найрізноманітнішого генезу [22,27,38].

В даний час приділяється значна увага агрегації, пластичності червоних кров'яних клітин та їх руху на рівні мікроциркуляції [19,21]. Порушення реологічних властивостей крові, здатності еритроцитів до агрегації та деформації вважають новими факторами ризику виникнення ішемічної хвороби [26,33]. Вивчали також здатність до деформації і щільність еритроцитів у хворих з аутоімунною гемолітичною анемією [20]. І хоча агрегаційні властивості еритроцитів в останні роки привертають все більше уваги досі відсутня визначеність в питанні щодо її механізмів. Однак дослідження агрегаційної активності еритроцитів вважають за необхідне для додаткової діагностики розладів мікроциркуляції і проведення своєчасної ефективної терапії [8].

Загальновідомо, що активація протеолізу призводить до збільшення кількості молекул середньої маси у крові при захворюваннях найрізноманітнішого генезу [7]. Молекули середньої маси впливають на діяльність всіх систем і органів через те, що своєю будовою вони близькі до регуляторних пептидів. У їх складі виявлені речовини, що мають високу біологічну активність: інгібітори клітинної проліферації і бласттрансформації лімфоцитів, фагоцитозу і гемопоезу, інгібітори амінокислотного транспорту, синтезу гемоглобіну та ін. [11]. Однак, незважаючи на численні дослідження, присвячені ендогенній інтоксикації, яка є невід'ємним супутником онкологічного процесу і призводить до зниження здатності еритроцитів до деформації з подальшим порушенням гемореології, залишається невідомим, якою мірою молекули середньої маси впливають на агрегацію клітин крові при онкологічних захворюваннях [5].

З даних літератури відомо, що концентрація сіалових кислот підвищується при наявності різноманітної онкологічної патології: множинної злоякісної мієломи [29], злоякісних пухлин легень та прямої кишки, лейкемії [35], раку ротової порожнини [39], меланоми [36], карциноми, саркоми, лімфоми [30,44] та ін. В зв'язку з тим, що сіалові кислоти можна розглядати як гострофазовий реагент (індикатор або маркер) раку, визначення їх рівня використовували з різним ступенем специфіч-

ності для характеристики стадії пухлинного процесу, контролю розвитку пухлини після терапії, передбачення можливості її рецидивування та метастазування, особливо в поєднанні з іншими маркерами пухлинного процесу, зокрема з гострофазовим білком – фібриногеном, концентрація якого, згідно даних літератури, підвищується у відповідь на запалення і пошкодження тканин. Він бере безпосередню участь в адгезії та агрегації тромбоцитів з пухлинними клітинами, сприяє формуванню тромбоцитарно-пухлинних агрегатів, а отже, і прогресуванню онкологічного захворювання при гематогенному розповсюдженні цих агрегатів [6,37]. Крім того, є свідчення, що фібриноген сприяє формуванню еритроцитарних агрегатів, утворюючи містки між окремими еритроцитами [17]. Згідно результатів наших попередніх досліджень, він також в неоднаковій мірі реагує на наявність різної патології ЛОР-органів [3].

Мета роботи – дослідження агрегаційної функції еритроцитів, а також рівнів молекул середньої маси, сіалових кислот та фібриногену для визначення інформативності цих показників у хворих на рак гортані.

Об'єкт та методи досліджень. Було обстежено 35 пацієнтів ДУ "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України" (м. Київ). У дослідженні були лише чоловіки з первинними злоякісними новоутвореннями гортані, віком від 45 до 65 років (середній вік складав 55 років). З них у 18 пацієнтів діагностовано плоскоклітинний ороговілий рак гортані II-ої стадії ($T_2N_0M_0$), а у 17 – III-ої стадії ($T_3N_0M_0$). Контрольну групу склали 20 умовно здорових людей. Всі групи були рандомізовані за віком та статтю.

Агрегацію еритроцитів досліджували на фотооптичному агрегометрі AP2110 "Солар" (Білорусь). Кров для дослідження отримували з локтєвої вени широкою голкою в пластикові пробірки з антикоагулянтом 3,8% натрію цитратом у співвідношенні 9:1 зранку натщесерце. Об'єктами дослідження була збіднена на тромбоцити плазма крові та суспензія еритроцитів. Для отримання суспензії еритроцитів з 1 мл цитратної крові їх тричі відмивали 0,9% розчином натрію хлориду після додавання до 1 мл цитратної крові 9 мл 0,9% розчину натрію хлориду. Після третього відмивання і видалення супернатанта відбирали 0,01 мл еритроцитарної маси і вносили її в 10 мл 0,9% розчину натрію хлориду. В якості індуктора агрегації еритроцитів ми використовували альціановий синій, що, як відомо, має здатність зв'язуватися з гліколіпідами і глікопротеїдами мембрани еритроцитів, тим самим викликаючи їх агрегацію [23]. Вихідна концентрація його становила 5 мг в 10 мл 0,9% розчину натрію хлориду. Реєстрували: ступінь агрегації (%) – максимальний рівень світлопропускання плазми

© Бурлака Ю., Гринь Н., Голобородько О., Верьовка С., 2016

крові після внесення індуктора агрегації; швидкість агрегації (%/хв) – зміна світлопропускання плазми крові після внесення індуктора агрегації; час агрегації (хв) – час досягнення максимального ступеня агрегації [10,12,23,24]. Збіднену на тромбоцити цитратну плазму отримували шляхом центрифугування цитратної крові при частоті обертання 4000 об/хв протягом 20 хв. Вміст молекул середньої маси визначали в безбілковій фракції плазми крові в спектрофотометрі СФ-26 і виражали його в умовних одиницях (ум.од.), що дорівнюють оптичній густині розчину, яка вимірюється при довжині хвилі 254 нм [9]. Також в безбілкових центрифугатах плазми після гідролізу сіалоглікопротеїдів визначали рівень сіалових кислот за інтенсивністю їх кольорової реакції з оцето-сірчано-кислим реактивом при нагріванні. Його виражали в ум.од. оптичної густини, яка реєструвалася при довжині хвилі 510 нм в спектрофотометрі СФ-26 [16]. Для визначення концентрації фібриногену в плазмі крові використовували метод, розроблений В.О. Белі-

цером та співавт. [13]. Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням t-критерія Ст'юдента, достовірною вважали різницю $p < 0,05$ [15].

Результати та їх обговорення.

Результати дослідження ступеня, швидкості та часу агрегації еритроцитів у хворих на рак гортані представлені в табл. 1. Виявлено підвищення максимального ступеня агрегації еритроцитів як при II-й, так і при III-й стадії онкологічного процесу, відносно контрольної групи відповідно у 1,7 та 1,4 рази ($p < 0,02$ і $0,001$). Тобто, у хворих на рак гортані можна відмітити більш суттєве порушення цього показника при II-й стадії захворювання. Швидкість агрегації еритроцитів у хворих на II-у і III-ю стадію раку гортані вірогідно знижується відповідно до $(25,88 \pm 2,94)$ та $(22,57 \pm 1,96)$ проти $(33,65 \pm 2,14)$ в контролі ($p < 0,05$ і $0,001$). Час початку максимального ступеня агрегації еритроцитів в обох групах хворих достовірно збільшувався порівняно з контролем в середньому у 1,5 рази ($p < 0,05$).

Таблиця 1. Кількісні параметри агрегатограм у здорових осіб та у хворих на рак гортані

Групи	Параметри агрегатограм		
	Ступінь агрегації, %	Швидкість агрегації, %/хв	Час, хв
Умовно здорові люди	$31,83 \pm 3,21$	$33,65 \pm 2,14$	$5,96 \pm 1,45$
Хворі на рак гортані II-ї ст.	$54,76 \pm 3,75$ $p < 0,001$	$25,88 \pm 2,94$ $p < 0,05$	$9,22 \pm 0,12$ $p < 0,05$
Хворі на рак гортані III-ї ст.	$45,07 \pm 4,70$ $p < 0,02$	$22,57 \pm 1,96$ $p < 0,001$	$9,07 \pm 0,15$ $p < 0,05$

Примітка: p – вірогідність різниці між відповідними показниками у хворих і умовно здорових людей

Таблиця 2. Вміст фібриногену, молекул середньої маси та сіалових кислот в плазмі крові у здорових осіб та у хворих на рак гортані

Групи	Показники		
	Молекули середньої маси, $E_{254 \text{ нм}}$	Фібриноген, г/л	Сіалові кислоти, $E_{510 \text{ нм}}$
Умовно здорові люди	$0,135 \pm 0,003$	$2,2 \pm 0,1$	$0,120 \pm 0,005$
Хворі на рак гортані II-ї ст.	$0,145 \pm 0,005$ $p > 0,05$	$3,0 \pm 0,2$ $p < 0,01$, $p_1 < 0,01$	$0,160 \pm 0,016$ $p < 0,05$
Хворі на рак гортані III-ї ст.	$0,160 \pm 0,009$ $p < 0,01$	$3,8 \pm 0,6$ $p < 0,02$	$0,150 \pm 0,012$ $p < 0,05$

Примітка: p – вірогідність різниці між відповідними показниками у хворих і умовно здорових людей

p_1 – вірогідність різниці між відповідними показниками у хворих з II-ю та III-ю стадіями раку гортані

Як видно з таблиці 2, підвищення рівня молекул середньої маси в плазмі крові хворих на II-у стадію раку гортані мало характер тенденції, а при III-й стадії зростання цього показника в 1,1 рази було достовірним ($p < 0,01$). Рівень фібриногену у пацієнтів достовірно підвищувався: при II-й стадії раку гортані в 1,4 рази ($p < 0,01$), а при III-й – 1,7 рази ($p < 0,02$). Тобто, його вміст збільшувався по мірі прогресування пухлинного процесу. Різниця між цим показником у пацієнтів з II-ю та III-ю стадіями онкологічного захворювання була достовірною ($p_1 < 0,01$). Було відмічено також вірогідне підвищення вмісту сіалових кислот відносно його контрольної величини при II-й та III-й стадіях раку гортані практично в однаковому ступені в 1,3 та 1,2 рази відповідно ($p < 0,05$).

З даних літератури відомо, що підвищення агрегаційної здатності еритроцитів при розвитку злоякісної пухлини може бути обумовлено змінами структурно-функціонального стану їх мембран і величини ξ -потенціалу, що спричиняє розвиток порушень мікрореології крові і тканинної гіпоксії у хворих онкологічного профілю [24]. Показано також, що різка активація протеолізу призводить до збільшення кількості молекул середньої маси в крові хворих [7]. При патологічних станах, включаючи онкологічні захворювання, їх

концентрація стає достовірно вище нормальних значень [4,25]. У нашому дослідженні було виявлено незначне збільшення рівня даної фракції молекул середньої маси в плазмі крові, що можливо, пов'язано з їх перерозподілом між плазмою крові та еритроцитами. Взагалі їх визначення вважається універсальним біохімічним маркером ендотоксемії, котра займає одне з провідних місць в структурі клінічних проявів пухлинної хвороби [14].

Одержані нами дані, щодо збільшення рівня фібриногену у хворих на рак гортані з III-ю стадією в більшій мірі ніж при II-й узгоджується з даними літератури стосовно того, що рівень фібриногену в плазмі крові підвищується по мірі росту пухлини, її прогресування і метастазування [32,34,37,43,45.]. Виявлена фібриногенемія може бути викликана прямою активацією згортання крові, яка пов'язана з індукцією тромбіну пухлинними прокоагулянтами. Збільшення його рівня у хворих злоякісними новоутвореннями може також виникати внаслідок розвитку запальної реакції у відповідь на ріст пухлини [28]. Крім того, вважають, що пухлинні клітини самі можуть бути джерелом фібриногену [40]. Через взаємодію з фактором росту фібробластів-2 (FGF-2) та судинно-ендотеліальним фактором росту (VEGF) фіб-

риноген бере участь у процесах ангиогенезу і пухлинного росту [18,40,41.]. Спільно з тромбоцитами він сприяє утворенню пухлинних мікротромбів, реалізуючи ефект фізичного бар'єру, що перешкоджає впливу моноцитів, лейкоцитів і натуральних кілерів на пухлинні клітини. Захищаючи пухлинні клітини від механічного та імунного ушкодження, фібриноген тим самим підсилює їх метастатичний потенціал [6].

В результаті наших досліджень було показано підвищення концентрації сіалових кислот в плазмі крові у хворих з II-ю та III-ю стадіями раку гортані. Спираючись на дані літератури можна зробити припущення, що в основі цього явища лежить скидання сіалогліколіпідів з поверхні еритроцитів, що призводить до їх накопичення в крові. Аналізуючи отримані результати є всі підстави припускати, що в цих умовах на еритроцитах відбувається зниження кількості негативних зарядів, які експоновані на їх поверхні і відповідають за перебування клітин в дезагегованому стані. В основі цього явища, може бути недостатність в них сіалових кислот, що забезпечує надмірну здатність еритроцитів до агрегації. Як було показано у ряді досліджень видалення сіалових кислот з поверхні мембрани призводить до спонтанної або індукованої їх агрегації білками з великою молекулярною масою [31,42]. Відомо також, що злоякісна трансформація клітин супроводжується порушеннями біосинтезу сіалогліколіпідів, що призводить до накопичення в клітинних мембранах їх окремих видів зі зміненою структурою. Для деяких пухлин їх скидання з поверхні клітин носить вибіркового характер і призводить до їх накопичення в біологічних рідинах і крові хворих [1].

Висновки.

1. У хворих на рак гортані з II-ю і III-ю стадіями пухлинного процесу спостерігаються різноспрямовані зміни основних параметрів агрегатограм еритроцитів: на тлі підвищення ступеня та часу агрегації відносно відповідних контрольних даних, відбувається одночасне зниження її швидкості. Найбільш суттєве зростання ступеня агрегації відмічається при II-й стадії захворювання.
2. Проведене дослідження показало підвищення рівнів молекул середньої маси та фібриногену в плазмі крові хворих: в більшій мірі їх порушення спостерігались при III-й стадії онкологічного процесу ніж при II-й.
3. Вміст сіалових кислот був збільшеним при II-й і III-й стадіях раку гортані в однаковому ступені в порівнянні з контрольним показником.
4. Зростання рівнів молекул середньої маси, фібриногену та сіалових кислот в плазмі крові хворих на рак гортані вказує на наявність в них метаболічної інтоксикації та гострої фази запалення, ступінь вираженості яких в певній мірі залежить від стадії захворювання.
5. Визначення вмісту сіалових кислот в поєднанні з рівнем фібриногену може бути додатковим критерієм оцінки тяжкості пухлинного процесу.

Список використаних джерел

1. Бассалык Л.С. Динамика изменений уровня и профиля сиалогликолипидов в тканях и биологических жидкостях больных с опухолями яичников / Л.С. Бассалык, К.П. Лактионов, М.Е. Травников [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 1993. – Т.4, №5. – С. 54-59.
2. Вершинина С.И. Агрегационные свойства эритроцитов при хронических рецидивирующих инфекциях / С. И. Вершинина, И. А. Новикова // Проблемы здоровья и экологии. – 2012. – № 1. – С. 44-48.
3. Голобородько О.П. Дослідження компонентів протеолітичної, коагуляційної та фібринолітичної системи плазми крові пацієнтів з різною патологією ЛОР-органів / О.П. Голобородько, О.Й. Кизим, Ю.Г. Клись [та ін.] // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2010. – № 5. – С. 34-39.
4. Горошинская И.А. Влияние аутоиммунотерапии на показатели эндогенной интоксикации, свободнорадикального окисления и состояния мембран у больных с рецидивами рака яичников / И.А. Горошинская, Л.Ю. Голотина, А.А. Бирюкова [и др.] // Российский онкологический журнал. – 2007. – № 2. – С. 27-31.

5. Гунина Л.М. Роль изменений структурно функционального состояния мембраны эритроцита в развитии анемии у больных раком желудка / Л. М. Гунина, А.П. Кабан, В.Б. Коробко // Онкология. – 2000. – №4(2). – С.35-40.
6. Данилов, И.П. Роль гемостаза в метастазировании опухолевых клеток / И.П. Данилов // Здоровоохранение. – 2005. – № 8. – С. 21–22.
7. Егорихина М.Н. Роль среднемолекулярных пептидов в агрегации клеток крови в острые периоды ожоговой болезни / М.Н. Егорихина, Г.Я. Левин // СТМ. – 2011. – №1. – С.126-130.
8. Ермоленко С.П. Показатели обратимой агрегации эритроцитов у новорожденных детей от матерей с хронической плацентарной недостаточностью / С.П. Ермоленко // Сибирский медицинский журнал. – 2010. – Т.25, № 4, Вып. 2. – С. 78-80.
9. Жаденов И.И. Способ определения эндогенной интоксикации / И.И. Жаденов, Е.В. Карякина, С.В. Белова, В.И. Горячев // Патент RU 2193780 C1 G 01N33/68, G 01N33/48. Заявл. 26.04.2001, Оpubл. 27.11.2002
10. Инструкция по определению агрегационной активности тромбоцитов на анализаторе AP 2110 (Под ред. Чещевик М.А.) – Минск. – 1995. – 22 с.
11. Карякина Е.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) / Е.В. Карякина, С.В. Белова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – №3. – С. 3-7.
12. Люсов В.А. К методу определения агрегации тромбоцитов и эритроцитов. / В.А. Люсов, Ю.Б. Белоусов, М.П. Савенков // Лаб. дело – 1976. – № 8. – С. 463-468.
13. Методы определения фибриногена и компонентов фибринолиза плазмы крови человека. Методические рекомендации (Под ред. Белицер В.А., Варецкая Т.В., Веремеенко К.Н. и др.) – Киев. – 1983. – 20 с.
14. Неродо Г.А. Изучение синдрома эндогенной интоксикации у больных раком шейки матки с метастазами и без метастазов / Г.А. Неродо, И.А. Горошинская, Е.А. Калабанова, П.С. Качесова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2005. – № 5. – С. 64–67.
15. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований / И.А. Ойвин // Пат. физиол. – 1960. – № 4. – С. 76-85.
16. Определение сиаловых кислот. Методические указания к лабораторным работам по клинической биохимии (Под ред. Панченко Н.И.). – Харьков. – 1991. – 26 с.
17. Петров В.В. Морфо-функциональные особенности эритроцитов при травматических носовых кровотечениях / В.В. Петров. // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 9. – С. 88.
18. Принькова Т.Ю. Значение исследования показателей оценки гемостатического потенциала крови (фибриногена, фактора Виллебранда и D-димеров) как потенциальных лабораторных критериев распространенности и дифференцировки опухоли при раке тела матки / Т.Ю. Принькова, В.И. Прохорова, Т.П. Цырусь [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2012. – № 3. – С. 112–120.
19. Пчелинцева Т.А. Морфометрическая характеристика эритроцитов периферической крови у пациентов с тромбозом крупных артерий нижних конечностей / Т.А. Пчелинцева, О.И. Лопырева, Р.Н. Шишина // Казанский медицинский журнал. – 2011. – Т.92, № 4. – С. 475-478.
20. Розенберг Ю.М. Деформируемость и плотность эритроцитов больных аутоиммунной гемолитической анемией в разные периоды течения болезни / Ю.М. Розенберг, Е.С. Шурхина, В.М. Нестеренко [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2001. – № 3(7). – С. 33-39.
21. Рязанцева Н.В. Типовые изменения обратимой агрегации эритроцитов при патологических процессах разного генеза / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Е.А. Степовая [и др.] // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2004. – №1. – С. 33-36.
22. Соколова И.А. Агрегация эритроцитов: некоторые вопросы и гипотезы. / И.А. Соколова, С.Ю. Рыкова, А.А. Шахназаров [и др.] // Российский журнал биомеханики. – 2011. – Т.15, №1 (51). – С. 7-22.
23. Спасов А.А. Изучение агрегации эритроцитов на лазерном агрегометре / А.А. Спасов, О.В. Островский, А.Н. Дегтярев, А.Ф. Кучерявенко // Коагулология – 2008. – Т.73, № 7. – С. 21-23.
24. Степовая Е.А. Обратимая агрегация эритроцитов у онкологических больных / Е.А. Степовая, Н.Ю. Часовских, В.В. Новицкий [и др.] // Клин. лабор. диагностика. – 1998. – № 6. – С. 21-22.
25. Шалашная Е.В. Исследование влияния химиопрепаратов на уровень эндогенной интоксикации, интенсивность свободнорадикального окисления и мембранный аппарат клеток крови больных с рецидивами рака шейки матки в опытах *in vitro* / Е.В. Шалашная, И.А. Горошинская, Г.А. Неродо [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – Т.26, № 2. – С. 50-54.
26. Якусевич В.В. Модификация реологических свойств крови у больных ишемической болезнью сердца с гиперхолестеринемией при лечении симвастатином / В.В. Якусевич, А.В. Муравьев, Л.Г. Суrowая // Кардиоваскул. терап. и профилактика. – 2002. – № 4. – С. 41-46.
27. Adams B.D. Myeloproliferative disorders and the hyperviscosity syndrome / B.D. Adams, R. Baker, J.A. Lopez, S. Spencer // Emergency Medicine Clinics of North America. – 2009. – Vol.27, №3. – P. 459-476.
28. Coussens L.M. Inflammation and cancer / L.M. Coussens, Z.Werb // Nature. – 2002. – Vol 420. – P. 860-867.
29. Crook M.A. Serum sialic acid in patients with multiple myeloma / M.A. Crook, S. Couchman, P. Tutt // Br. J. Biochem. Sci. – 1996 – Vol.53, №3. – P. 185-186.

30. Cylwik K.B. Diagnostic value of total and lipid-bound sialic acid in malignancies. / K.B. Cylwik, L. Chrostek, M. Szmikowski // *Pol. Merkur. Lekarski*. – 2005. – Vol.19, № 110. – P. 237-241.

31. Durocher J.R. Role of sialic acid in erythrocyte survival / J. R. Durocher, Robert C. Payne, and Marcel E. Conrad // *Blood*. – 1975. – Vol. 45. – P. 11-20.

32. Jones J.M. Plasma fibrinogen and serum C-reactive protein are associated with non-small cell lung cancer / Jones J.M. [et.al] // *Lung Cancer*. – 2004. – Vol 53. – P. 97-101.

33. Labios M. Effects of modified fibrin (Binivas Retard) on hemorheological alterations in hyperlipidemic patients / M. Labios, M. Martinez, A. Vaya [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 1999. – Vol.1, № 2. – P. 79-85.

34. Lee J.H. Preoperative plasma fibrinogen levels in gastric cancer patients correlate with extent of tumor / J.H. Lee [et.al] // *Hepatogastroenterology*. – 2004. – Vol 51. – P. 1860-1863.

35. Liang X.H Detection of serum sialic acid in three kinds of malignant tumor and its clinical significance / X.H. Liang, X.M. Liang, B. Yi // *Hunan Yi Ke Da-Xue Xue BAO*. – 2003. – Vol.28, № 1. – P. 65-66.

36. Mutysik A. The level of total sialic acid, alfa-antitrypsin, ceruloplasmin in the serum of patients with choroidal melanoma / A. Mutysik, J. Toczolowski, M. Starzycka [et al.] // *Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowska Med.* – 2002. – Vol.57, № 1. – P. 238-244.

37. Palumbo J.S. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells / J.S. Palumbo [et.al] // *Blood*. – 2000. – Vol 96. – P. 3302-3309.

38. Rampling M.W. Hyperviscosity as a complication in a variety of disorders / M.W. Rampling // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2003. – Vol.29, №5. – P. 459-465.

39. Raval G.N. Patel D.D., Parekh L.Y. et al. Evaluation of serum sialic acid, sialtransferase and sialo-proteins in oral cavity cancer / G.N. Raval, D.D. Patel, L.Y. Parekh [et al.] // *Oral. Dis.* – 2003. – Vol.9, № 3. – P. 119-128.

40. Sahni A. Fibrinogen synthesized by cancer cell augments the proliferative effect of fibroblasts growth factor-2 (FGF-2) / A. Sahni [et.al] // *J. Thromb. Haemost* – 2008. – Vol 6. – P. 176-183.

41. Sahni A. FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis / A. Sahni [et.al] // *Blood* – 2006. – Vol 107. – P. 126-131.

42. Seaman G.V.F. Red cell agins. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes / G.V.F. Seaman, R.J. Knox, F.J. Nordt, D.H. Regan // *Blood*. – 1977. – Vol. 50. – P. 1001-1011.

43. Seebacher V. The prognostic value of plasma fibrinogen levels in patients with endometrial cancer: a multi-centre trial / V. Seebacher [et.al] // *British Journal of Cancer*. – 2010. – Vol 102. – P. 952-956.

44. Simmich T. Sialic acid – an acute phase reactant and concomitant of tumors / T. Simmich, A. Dehne, N. Laube, K.H. Frank // *Z. Med. Zab. Diagn.* – 1991. – Bd.32, № 3-4. – S. 188-192.

45. Takeuchi H. Pretreatment plasma fibrinogen level correlates with tumor progression and metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus / H. Takeuchi [et.al] // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2007. – Vol 22. – P. 2222-2227.

References

1. Bassalyk L.S. Dynamics of changes in the level and profile sialoglycolipids in tissues and biological fluids of patients with ovarian tumors / L.S. Bassalyk, K.P. Laktionov, M.E. Travnikov [et al.] // *Bulletin of the RCRC. N.N. Blokhin*. – 1993. – Vol.4, №5. – P. 54-59.

2. Vershinina S.I. Aggregating properties of erythrocytes in chronic recurrent infections / S.I. Vershinina, I.A. Novikov // *Health and environmental problems*. – 2012. – № 1. – P. 44-48.

3. Goloborodko O.P. Research proteolytic components, coagulation and fibrinolytic systems of blood plasma in patients with different pathologies of otolaryngology / O.P. Goloborodko, O.I. Kizim, Yu.G. Klys [et al.] // *J. ear, nose and throat diseases*. – 2010. – № 5. – P. 34-39.

4. Goroshinskaya I.A. Influence autolohimioterapii on parameters of endogenous intoxication, free radical oxidation and the state of the membranes in patients with recurrent ovarian cancer / I.A. Goroshinskaya, L.Y. Golovina, A.A. Biryukova [et al.] // *Russian Journal of Oncology*. – 2007. – № 2. – P. 27-31.

5. Gunina L.M. The role of structural changes in the functional state of erythrocyte membranes in the development of anemia in patients with gastric cancer / L.M. Gunina, A.P. Kaban, V.B. Korobko // *Oncology*. – 2000. – №4(2). – P.35-40.

6. Danilov I.P. The role of hemostasis in the metastasis of tumor cells / I.P. Danilov // *Healthcare* – 2005. – № 8. – P. 21-22.

7. Egorihina M.N. The role of average weight molecules in the aggregation of blood cells in the acute phase of burn disease / M.N. Egorihina, G.Y. Levin // *STM*. – 2011. – №1. – P.126-130.

8. Ermolenko, S.P. Indicators reversible aggregation of erythrocytes in newborns from mothers with chronic placental insufficiency / S.P. Ermolenko // *Siberian Journal of Medicine*. – 2010. – T.25, № 4, Vol.2. – P. 78-80.

9. Gadenov I.I. A method for determining endogenous intoxication / I.I. Gadenov, E.V. Karjakina, S.V. Belova, V.I. Goryachev // *Patent RU 2193780 C1 G 01N33 / 68, G 01N33 / 48*. Stated. 26.04.2001, Publ. 27.11.2002.

10. Instructions for determining the platelet aggregation activity analyzer AP 2110 (Ed. Cheshevich M.A.) – Minsk. –1995. – 22 p.

11. Karjakina E.V. The average weight molecules as an integral component of metabolic disorders (review) / E.V. Karjakina, S.V. Belova // *Clinical Laboratory Diagnostics*. – 2004. – №3. – P. 3-7.

12. Lucov V.A. The method of determining the erythrocyte and platelet aggregation. / V.A. Lucov, Y.B. Belousov, M.P. Savenkov // *Lab. deal*. – 1976. – № 8. – P. 463-468.

13. Methods for determination of fibrinogen and fibrinolytic components of human blood plasma. Guidelines (Ed. Belitsker V.A. Varettskaya T.V., Veremeyenko K.N. et al.) – Kiev. – 1983. – 20 p.

14. Nerodo G.A. The study of endogenous intoxication syndrome in patients with cervical cancer with metastasis and without metastasis / G.A. Nerodo, I.A. Goroshinskaya, E.A. Kalabanova, P.S. Kachesova // *International Journal of Applied and Basic Research*. – 2005. – № 5. – P. 64-67.

15. Oyvin I.A. Statistical analysis of experimental results / I.A. Oyvin // *Pat. Fiziol.* – 1960. – № 4. – P. 76-85.

16. Determination of sialic acids. Methodical instructions for laboratory work in Clinical Biochemistry (Ed. Panchenko N.I.). – Kharkiv. – 1991. – 26 p.

17. Petrov V.V. Morphological and functional features of erythrocytes in traumatic epistaxis / V.V. Petrov. // *The successes of modern science*. – 2005. – № 9. – P. 88.

18. Prinkova T.Yu. The value of the study of indicators of blood hemostatic capacity assessment (fibrinogen, von Willebrand factor, and D-dimer) as a potential laboratory criteria and prevalence of tumor differentiation in cancer of the body uterus / T.Yu. Prinkova, V.I. Prokhorov, T.P. Tsyrus [et al.] // *Laboratory diagnosis. Eastern Europe*. – 2012. – № 3. – P. 112-120.

19. Pchelintseva T.A. Morphometric characteristics of erythrocytes of peripheral blood in patients with thrombosis of major arteries of the lower extremities / T.A. Pchelintseva, O.I. Lopyreva, R.N. Shishina // *Kazan. Med. Journal*. – 2011. – Vol.92, № 4. – P. 475-478.

20. Rosenberg Y.M. Deformability and the density of erythrocytes of patients with autoimmune hemolytic anemia in different periods of the disease / Y.M. Rosenberg, E.S. Shurhina, V.M. Nesterenko [et al.] // *Thrombosis, hemostasis and rheology*. – 2001. – №3(7). – P. 33-39.

21. Ryazantseva N.V. Typical changes of reversible aggregation of erythrocytes in pathological processes of different genesis / N.V. Ryazantseva, V.V. Novitsky, E.A. Stepovaya [et al.] // *Bull Experiment. biol. and medicine*. – 2004. – №1. – P. 33-36.

22. Sokolova I.A. Aggregation of erythrocytes: some questions and hypotheses. / I.A. Sokolova, S.Y. Rykova, A.A. Shakhnazarov [et al.] // *Russian Journal of Biomechanics*. – 2011. – Vol.15, №1(51). – P. 7-22.

23. Spasov A.A. The study of aggregation of erythrocytes on laser aggregometer / A.A. Spasov, O.V. Ostrovsky, A.N. Degtyarev, A.F. Kucheryavenko // *Coagulology* – 2008. – Vol.73, №7. – P. 21-23.

24. Stepovaya E.A. Reversible aggregation of erythrocytes in cancer patients / E.A. Stepovaya, N.Y. Chasovskikh, V.V. Nowicki [et al.] // *Clin.Lab.diagnostics*. – 1998. – № 6. – P. 21-22.

25. Shalashnya E.V. Investigation of the effect of chemotherapy on the endogenous level of toxicity, the intensity of free radical oxidation and membrane device blood of patients with recurrent cervical cancer cells in tests *in vitro* / E.V. Shalashny, I.A. Goroshinskaya, G.A. Nerodo [et al.] // *Siberian Journal of Oncology*. – 2008. – Vol.26, №2. – P. 50-54.

26. Yakusevich V.V. Modification of rheological properties of blood in patients with coronary heart disease and in the treatment of hypercholesterolemia by simvastatin / V.V. Yakusevich AV Murav'ev, L.G. Surovaya // *Cardiovascular therapy and prevention*. – 2002. – № 4. – P. 41-46.

27. Adams B.D. Myeloproliferative disorders and the hyperviscosity syndrome / B.D. Adams, R. Baker, J.A. Lopez, S. Spencer // *Emergency Medicine Clinics of North America*. – 2009. – Vol.27, №3. – P. 459-476.

28. Coussens L.M. Inflammation and cancer / L.M. Coussens, Z.Werb // *Nature*. – 2002. – Vol 420. – P. 860-867.

29. Crook M.A. Serum sialic acid in patients with multiple myeloma / M.A. Crook, S. Couchman, P. Tutt // *Br. J. Biochem. Sci.* – 1996 – Vol.53, №3. – P. 185-186.

30. Cylwik K.B. Diagnostic value of total and lipid-bound sialic acid in malignancies. / K.B. Cylwik, L. Chrostek, M. Szmikowski // *Pol. Merkur. Lekarski*. – 2005. – Vol.19, № 110. – P. 237-241.

31. Durocher J.R. Role of sialic acid in erythrocyte survival / J. R. Durocher, Robert C. Payne, and Marcel E. Conrad // *Blood*. – 1975. – Vol. 45. – P. 11-20.

32. Jones J.M. Plasma fibrinogen and serum C-reactive protein are associated with non-small cell lung cancer / Jones J.M. [et.al] // *Lung Cancer*. – 2004. – Vol 53. – P. 97-101.

33. Labios M. Effects of modified fibrin (Binivas Retard) on hemorheological alterations in hyperlipidemic patients / M. Labios, M. Martinez, A. Vaya [et al.] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 1999. – Vol.1, № 2. – P. 79-85.

34. Lee J.H. Preoperative plasma fibrinogen levels in gastric cancer patients correlate with extent of tumor / J.H. Lee [et.al] // *Hepatogastroenterology*. – 2004. – Vol 51. – P. 1860-1863.

35. Liang X.H Detection of serum sialic acid in three kinds of malignant tumor and its clinical significance / X.H. Liang, X.M. Liang, B. Yi // *Hunan Yi Ke Da-Xue Xue BAO*. – 2003. – Vol.28, № 1. – P. 65-66.

36. Mutysik A. The level of total sialic acid, alfa-antitrypsin, ceruloplasmin in the serum of patients with choroidal melanoma / A. Mutysik, J. Toczolowski, M. Starzycka [et al.] // *Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowska Med.* – 2002. – Vol.57, № 1. – P. 238-244.

37. Palumbo J.S. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells / J.S. Palumbo [et.al] // Blood. – 2000. – Vol.96. – P. 3302-3309.

38. Rampling M.W. Hyperviscosity as a complication in a variety of disorders / M.W. Rampling // Seminars in Thrombosis and Hemostasis. – 2003. – Vol.29, №5. – P. 459-465.

39. Raval G.N. Patel D.D., Parekh L.Y. et al. Evaluation of serum sialic acid, sialtransferase and sialo-proteins in oral cavity cancer / G.N. Raval, D.D. Patel, L.Y. Parekh [et.al] // Oral. Dis. – 2003. – Vol.9, № 3. – P. 119-128.

40. Sahni A. Fibrinogen synthesized by cancer cell augments the proliferative effect of fibroblasts growth factor-2 (FGF-2) / A. Sahni [et.al] // J. Thromb. Haemost. – 2008. – Vol.6. – P. 176-183.

41. Sahni A. FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis / A. Sahni [et.al] // Blood – 2006. – Vol.107. – P. 126-131.

42. Seaman G.V.F. Red cell agins. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes / G.V.F. Seaman, R.J. Knox, F.J. Nordt, D.H. Regan // Blood. – 1977 – Vol. 50. – P. 1001-1011.

43. Seebacher V. The prognostic value of plasma fibrinogen levels in patients with endometrial cancer: a multi-centre trial / V. Seebacher [et.al] // British Journal of Cancer. – 2010. – Vol.102. – P. 952-956.

44. Simmich T. Sialic acid – an acute phase reactant and concomitant of tumors / T. Simmich, A. Dehne, N. Laube, K.H. Frank // Z. Med. Zab. Diagn. – 1991. – Bd.32, №.3-4. – S. 188-192.

45. Takeuchi H. Pretreatment plasma fibrinogen level correlates with tumor progression and metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus / H. Takeuchi [et.al] // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2007. – Vol.22. – P. 2222-2227.

Надійшла до редколегії 09.06.16

Ю. Бурлака, науч. сотр., Н. Гринь, науч. сотр., О. Голобородько, ст. науч. сотр., канд. биол. наук, С. Веревка, зав. лабораторії, д-р биол. наук
Государственное Учреждение "Институт отоларингологии имени проф. А.С. Коломийченко НАМН Украины", Киев

ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ

Проведено сравнение показателей агрегации эритроцитов у больных раком с такими в контрольной группе (условно здоровые лица). Установлено, что у больных раком гортани с II-й и III-й стадиями опухолевого процесса на фоне повышения степени и времени агрегации относительно соответствующих контрольных данных, происходит одновременное снижение ее скорости. Кроме того, проведенное исследование показало повышение уровня молекул средней массы и фибриногена в плазме крови больных: более существенные их нарушения наблюдались при III-й стадии онкологического процесса чем при II-й. Содержание сialовых кислот был увеличенным при II-й и III-й стадиях рака гортани в одинаковой степени по сравнению с контрольным показателем. Выявлены разнонаправленные изменения основных параметров агрегации эритроцитов. Наиболее значительные нарушения степени агрегации эритроцитов отмечается при II-й стадии онкологического процесса. Рост уровней молекул средней массы, фибриногена и сialовых кислот в плазме крови больных раком гортани указывает на наличие у них метаболической интоксикации и острой фазы воспаления, степень выраженности которых в определенной степени зависит от стадии заболевания.

Ключевые слова: рак гортани, эритроциты, агрегация, молекулы средней массы, фибриноген, сialовые кислоты.

Iu.B. Burlaka, fellow researcher, N.V. Gryn', fellow researcher, O.P. Goloborodko, senior researcher, Ph.D.,
S.V. Verevka, head of laboratory, Dr.Sci. Biol
National Academy of Medical Sciences of Ukraine prof. O.S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology, Kyiv, Ukraine

INVESTIGATION OF ERYTHROCYTE AGGREGATION IN PATIENTS WITH LARYNGEAL CANCER

It was compared evaluation of results of erythrocytes aggregation parameters in patients with laryngeal cancer compared to the healthy persons. It was found that in patients with laryngeal cancer II-d and III-d stage of the tumor process against the background of increasing the degree of aggregation and the time relative to the corresponding reference data, there is a simultaneous decrease in its speed of aggregation. In addition, the study has shown increase in average weight molecules and fibrinogen levels in the blood plasma of patients with laryngeal cancer, to a lesser extent – with the II-d stage of the disease, and their more significant violations were observed in the III-d stage of the cancer process. Sialic acid content was increased at II and III-d stages of cancer of the larynx in the same degree compared to the healthy persons. It was established opposite changes of basic parameters of erythrocytes aggregation. The most significant violations of aggregation degree were observed in the II-d stage of the cancer process. Growing of levels of the average weight molecules, fibrinogen and sialic acid in the blood plasma of patients with laryngeal cancer indicates the presence of metabolic intoxication and the acute phase of inflammation, the severity of which to a certain extent depends on the stage of the disease.

Keywords: laryngeal cancer, erythrocytes, aggregation, average weight molecules, fibrinogen, sialic acid.

УДК 577.27, 57.083.3, 616.006

М. Гром, асп.
Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ,
Л. Яковенко, канд. біол. наук, Л. Сидорик, канд. біол. наук, О. Корнелюк, д-р біол. наук,
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ,
В. Григоренко, д-р мед. наук, М. Вікарчук, лікар
Інститут урології НАМН України, Київ

ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗА ТА ЇЇ ОКРЕМІ ДОМЕНІ ВІРОГІДНІ АУТОІМУННІ КОМПОНЕНТИ ПАТОГЕНЕЗУ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Показано статистично значиме підвищення рівнів аутоантитіл до тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів з прозапальними та ангіогенними властивостями у пацієнтів з раком передміхурової залози у порівнянні з такими клінічно здорових донорів. Максимальна аутоагресія спостерігалась до С-кінцевого домену ферменту, найнижчий рівень аутосенсibiliзації було показано до N-кінцевого модуля тирозил-тРНК синтетази.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, аутоантитіла, рак передміхурової залози.

Вступ. Рак передміхурової залози є гетерогенним за своїми біологічними властивостями, що не дозволяє сподіватися на однаково позитивні результати терапії у різних пацієнтів [2, 22]. Розуміння ключових молекулярних процесів при злоякісній трансформації залози дозволить персоналізувати лікування та досягти максимального терапевтичного ефекту. Дослідження останніх років звертаються до вивчення особливостей пухлинного ангіогенезу та ролі хронічного запалення, що часто супроводжує канцерогенез передміхурової залози, але загальної думки з приводу агентів запалення та ключових молекул ангіогенезу поки немає [25, 19].

Тирозил-тРНК синтетаза (ТирРС) належить до класу високо консервативних ферментів, що виконують ключову функцію на дорибосомному етапі біосинтезу білка. Ферменти каталізують реакцію аміноацилювання при якій відбувається приєднання амінокислоти до відповідної тРНК [18, 35]. У ході еволюції аміноацил-тРНК синтетази (ААРС) набули додаткових структур та доменів, а разом з ними і здатності здійснювати неканонічні функції залучаючись у різноманітні клітинні процеси [11]. Нові властивості синтетази можуть бути реалізовані через цитоплазматичні, ядерні чи позаклітинні форми ферментів та впливати на клітинний сигналінг, імунну

відповідь, ангіогенез [23, 8]. Через таку багатофункціональність ферменти часто є причиною або учасниками патогенезу різних захворювань [21]. ААРС можуть бути залучені до розладів нервової системи [20, 16, 24], аутоімунних захворювань, зокрема "антисинтетазного синдрому" [30, 12, 17], та злоякісної трансформації [13].

Повнорозмірний фермент ТирРС ссавців є процитокином [34]. За стресових умов він може бути секретований з цитоплазми у зовнішньоклітинне середовище та розщеплений ферментом на зразок лейкоцитарної еластази на два окремі фрагменти, кожен з яких володіє своїми цитокиновими властивостями [27, 28]. N-кінцевий каталітичний домен (міні-ТирРС) з мотивом Glu-Leu-Arg (ELR) є потужним промотором ангіогенезу [3] а також здатен залучати до місця запалення поліморфоядерні лейкоцити [4, 29]. C-кінцевий домен за амінокислотною послідовністю має високу гомологію з активною формою прозапального цитокиноподібного білка людини Endothelial-Monocyte-Activating Polypeptide (EMAP II) [36] з ангіогенними властивостями, та здійснює подібний вплив [15, 33].

Здатність ААРС залучатись до патогенезу захворювань з одного боку, та запальні і ангіогенні властивості окремих доменів ТирРС з іншого, робить синтетазу потенційним учасником злоякісної трансформації передміхурової залози. Окрім того, домени синтетази можуть не лише сприяти запаленню при патології завдяки своїм функціям, а й виступати у ролі аутоантігенів. Наслідком подібної аутосенсibiliзації може бути хронічне запалення, яке сприяє прогресуванню захворювання та часто є причиною хибно позитивних тестів на PSA (Prostate Specific Antigen – антиген специфічний для тканини передміхурової залози) [25], що ускладнює своєчасну постановку діагнозу.

Дослідження рівнів антитіл проти тирозил-тРНК синтетази може не лише вказувати на наявність хронічного запалення передміхурової залози, а й бути непрямим свідком цитокиноподібної активності окремих доменів ферменту при патології.

Метою дослідження було порівняти рівні аутоантитіл проти ТирРС та її окремих доменів у сироватці крові пацієнтів з раком передміхурової залози та здорових донорів.

Матеріали і методи. Для отримання рекомбінантних білків повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази та її окремих модулів *Bos taurus* використовували штамподуценти на основі реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE. Штами *E.coli* трансформували за загальноприйнятою методикою [1] відповідними сконструйованими плазмідними векторами *pET30a-59K* TyrRS, *pET30a-39K* TyrRS та *pET30a-20K* TyrRS.

Рекомбінантні білки одержували із супернатантів лізованих клітин методом металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA-агарозній колонці. Бактеріальні білки аналізували SDS-гель електрофорезом за Леммлі в денатуруючих умовах (12 % розділюючий гель), використовуючи суміш маркерних білків фірми "Fermentas" (Литва).

Рівень специфічних аутоантитіл досліджували методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) у сироватці крові 67 пацієнтів з раком передміхурової залози. Контролем слугувала сироватка крові 24 здорових донорів. Сироватка крові була люб'язно надана співробітниками ДУ "Інституту урології" НМАН України. В лунки планшета вносили по 1 мкг антигену, іммобілізували протягом 18 год за 4 °С у натрій-фосфатному буфері (0,75M NaCl, 0,025M Na₂HPO₄, pH 7,4). Потім планшети ретельно відмивали натрій-фосфатним буфером, що містив 0,1%-й твін-20, вільні сайти адсорбції блокували цим же буфером. Сироватку крові вносили в об'ємі 100 мкл у розведенні 1:50. Інкубували протягом

18 год при 4 °С. Далі планшети 10 разів відмивали натрій-фосфатним буфером з 0,1 %-м твін-20 та інкубували з антитілами проти IgG людини, кон'югованими з пероксидазою хрому ("Sigma", США). Після десятикратної відмивки реакцію візуалізували додаванням субстрату (0,05 мг/мл ABTS р 0,05 % H₂O₂ в 50 мМ цитрат-фосфатному буфері, pH 4,5-5,2). Оптичну густину визначали на рідері BioTek (BioTek Instruments, США) за довжини хвилі 405 нм.

Результати отриманні методом ІФА перевіряли у Вестерн-блот тесті. Суміш рекомбінантних білків тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів розділяли у препаративному SDS-гелі електрофорезом за Леммлі в денатуруючих умовах (12 % розділюючий гель) та здійснювали напівсухий перенос з гелю на нітроцелюлозну мембрану (Amersham Bioscience, Німеччина). Мембрану розділяли на окремі смуги та інкубували у 5 % знежиреному сухому молоці у натрій-фосфатному буфері з додаванням 0,1 % твін-20 1 год. Смуги нітроцелюлози інкубували у сироватці кроля, імунізованого тирозил-тРНК синтетазою (1:75) та пацієнтів з раком передміхурової залози (1:200) 18 год при 4 °С. Після відмивки вносили вторинні антитіла кон'юговані з пероксидазою хрому. Реакцію візуалізували на ChemiDoc System (Bio-Rad Laboratories, США).

Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 10.0. Непараметричні данні порівнювали у тесті Манна-Уїтні. Статистично значимою вважали різницю при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Для ідентифікації аутоантитіл проти тирозил-тРНК синтетази у крові людей нами було використано рекомбінантні тирозил-тРНК синтетазу та її окремі домени бичачого походження. Гомологія амінокислотних послідовностей тирозил-тРНК синтетаз достатньо висока для усіх еукаріотичних ферментів і становить більше 50 відсотків. При зіставленні амінокислотних послідовностей цитоплазматичних тРНК синтетаз людини та *B.taurus* показано, що ці послідовності мають однакову кількість амінокислотних залишків і відрізняються за 26 позиціями: їхня ідентичність становить 95%, а гомологія – 98%. Про ідентичність синтетаз також свідчить наявність імунологічного перехресту, визначеного при взаємодії обох синтетаз з моноклональними антитілами проти тирозил-тРНК синтетази *B. taurus* [37]. Необхідна чистота білків (більше 95%), що дозволяє судити про специфічність зв'язування з антитілами, була підтверджена у електрофорезі у денатуруючих умовах за Леммлі (дані не представлені).

Наявність аутоантитіл до рекомбінантних білків бичачої повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів у зразках сироватки крові пацієнтів з раком передміхурової залози та здорових донорів визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Зразки сироватки з густиною оптичного поглинання більше за середнє значення плюс 2 стандартні відхилення (M+2SD) для донорських зразків вважали позитивними.

У контрольній групі не було виявлено серопозитивних зразків ні до повнорозмірної форми фермента, ні до її доменів. Натомість зразки з підвищеними рівнями аутоантитіл у пацієнтів з раком передміхурової залози були ідентифіковані до кожного з трьох білків. Максимальна аутореактивність була показана проти C-кінцевого домену. Рівень антитіл до домену був вищий від такого здорових донорів у 1,4 рази. Антитіло-позитивними до C-кінцевого домену виявились 46,3% пацієнтів з раком передміхурової залози. 29,8% пацієнтів мали підвищені рівні аутоантитіл до міні-ТирРС, і 38,8% особин з раком передміхурової залози були се-

ропозитивні до повнорозмірного ферменту. Підвищення рівнів аутоантитіл проти кожного з білків було статистично значиме з різним ступенем достовірності: проти ТирРС та С-кінцевого домену – $p < 0,001$, проти міні-ТирРС – $p < 0,01$.

Зразки сироваток найбільш або найменш реактивні до кожного з трьох білків за даними імуноферментного аналізу були перевірені методом імуноблотингу. Результати Вестерн-блот аналізу підтвердили дані отримані методом ІФА.

На сьогоднішній день існує значна кількість статей, що відзначають важливість дослідження аутоімунних процесів при раку передміхурової залози. Найбільш актуальним дане питання є у контексті пошуку нових маркерів онкопатології, оскільки ПСА при високій чутливості має низьку специфічність, наслідком чого є значна кількість хибно позитивних результатів. Сучасні тести для скринінгу раку передміхурової залози основані на виявленні PSA або PCA3 (Prostate Cancer Antigen – антиген раку передміхурової залози) [5]. Тому за допомогою тест-систем неможливо діагностувати онкопатологію на ранніх стадіях розвитку пухлини.

За отриманими нами даними, підвищення рівнів аутоантитіл до тирозил-тРНК синтетази та її окремих фрагментів у пацієнтів з раком передміхурової залози було статистично значимим для кожного з білків. Підвищену аутореактивність до ТирРС та С-кінцевого домену виявляли 38,8% та 46,3% пацієнтів з онкопатологією відповідно. Така кількість пацієнтів, що має підвищені рівні аутоантитіл до синтетази та її домену, вказує на перспективність білків як допоміжних маркерів при виявленні захворювання. X. Zhou з колегами провели протеомний скринінг білків, рівні яких найбільше відрізняються у сироватці крові пацієнтів з аденокарциномою легень та можуть слугувати неінвазивними маркерами захворювання. За результатами їх досліджень ТирРС є одним з трьох таких потенційних маркерів [32]. Робіт, які б досліджували аутоантитіла до тирозил-тРНК синтетази як маркери онкопатологій, на сьогодні немає. Натомість раніше нами було показано підвищення рівнів аутоантитіл до окремих доменів тирозил-тРНК синтетази при артеріальній гіпертензії [9], тому можливість використання аутоантитіл до ферменту та його окремих модулів у якості додаткових маркерів захворювання вимагає попереднього широкого скринінгу антитіл при різних патологіях.

У результаті гуморальної відповіді на канцерогенез утворюються антитіла до значної кількості внутрішньоклітинних молекул, які є потенційними маркерами захворювання та прогнозування перебігу захворювання, але вони несуть і фізіологічну функцію яка може як захищати організм від злоякісної трансформації, так і бути залученою до розвитку пухлини. Аутоантитіла, приєднуючись до антигена на поверхні клітини, можуть індукувати комплемент- або лейкоцит-залежну цитотоксичність [7], утворювати імунні

тирозил-тРНК синтетаз людини та *B.taurus* показано, що ці послідовності мають однакову кількість тирозилкомплекси, які потенційно мають реакцію запалення [10], просто приєднуючись до своїх антигенів, позбавляти їх можливості здійснити свої функції, або діяти як неімунні агоністи рецепторів. Усі ці властивості антитіл можуть бути використані як організмом, так і пухлиною, тому глибоке дослідження властивостей аутоантитіл при злоякісній трансформації може покращити наше розу-

міння патогенезу конкретного захворювання та стати основою для створення нових терапевтичних підходів.

Нами були виявлені антитіла як проти проангіогенного домену тирозил-тРНК синтетази – міні-ТирРС, так і проти С-кінцевого домену, спрямованість ангіогенних властивостей якого залежить від його концентрації [15]. Гетерогенність раку передміхурової залози значною мірою залежить від особливостей ангіогенезу. Створення мережі судин відіграє центральну роль в канцерогенезі, від нього залежить забезпечення пухлини поживними речовинами та її метастатичний потенціал [6]. Логічним є припустити, що підвищення рівнів аутоантитіл проти міні-ТирРС у пацієнтів з раком простати може сприяти нейтралізації розчинного антигену, знижуючи концентрацію проангіогенного білка у крові і сприяючи вповільненню пухлинного росту. Але при значній концентрації міні-ТирРС димеризується і виступає як нефункціональний агоніст рецептора хемокінів CXCR1/2 [26], що пов'язаний з клітинним ростом та ангіогенезом, блокуючи рецептор через який мономер міні-ТирРС запускає каскад, що призводить до судинної перебудови. Відтак аутоантитіла до міні-ТирРС можуть слугувати і на користь пухлини, сприяючи неангіогенезу.

Ознаки хронічного запалення часто спостерігають у гістологічних зразках пацієнтів з раком передміхурової залози. Як вже було зазначено, вважається, що таке запалення сприяє прогресуванню захворювання та часто є причиною хибно позитивних тестів на ПСА [25], що ускладнює своєчасну постановку діагнозу. Запальні агенти при цьому залишаються нез'ясованими.

Обидва окремі домени тирозил-тРНК синтетази проявляють прозапальні властивості у той час як повнорозмірний фермент не несе цитокинових функцій. Це пояснюється особливостями структури білка. Ділянки послідовності, що відповідають за цитокинові властивості окремих доменів у нативній формі синтетази просторово недоступні. Мотив ELR на міні-ТирРС та гептапептид (Arg13-Thr19) на N-кінцевій частині EMAP II-подібного домену, які відповідають за цитокинові властивості, у молекулі повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази просторово орієнтовані одна до одної, що робить кожну з послідовностей стерично недоступними [31]. За стресових умов, зокрема при запаленні, повнорозмірний фермент секретується з цитоплазми у зовнішню клітинний простір та може бути розщеплений протеазою на зразок лейкоцитарної еластази, при цьому сайти цитокинової активності стають доступні для взаємодії з відповідними рецепторами. Окрім того ділянки, що відповідають за цитокинову активність, можуть відкриватись при зв'язуванні ТирРС з відповідною тРНК [31], або при мутації ферменту Y341A [14]. Особливість просторової структури білка може пояснити той факт, що рівні аутоантитілів до окремого домену вищі за такі до повнорозмірного фермента. При протеолітичному розщепленні ТирРС відкриваються не тільки ділянки, що відповідають за цитокинову активність, а й нові потенційні антигенні детермінанти. Припущення, що фрагменти білкової послідовності, які у нормі є просторово недоступними, відкриваючись мають бути потужними антигенами, здається цілком логічним.

Оскільки за нашими результатами С-кінцевий домен синтетази викликав підвищення рівнів аутоантитіл більше за таке до повнорозмірного ферменту можна припустити що його імуногенність може пояснюватись саме доступністю нових, закритих у повнорозмірному ферменті, епітопів.

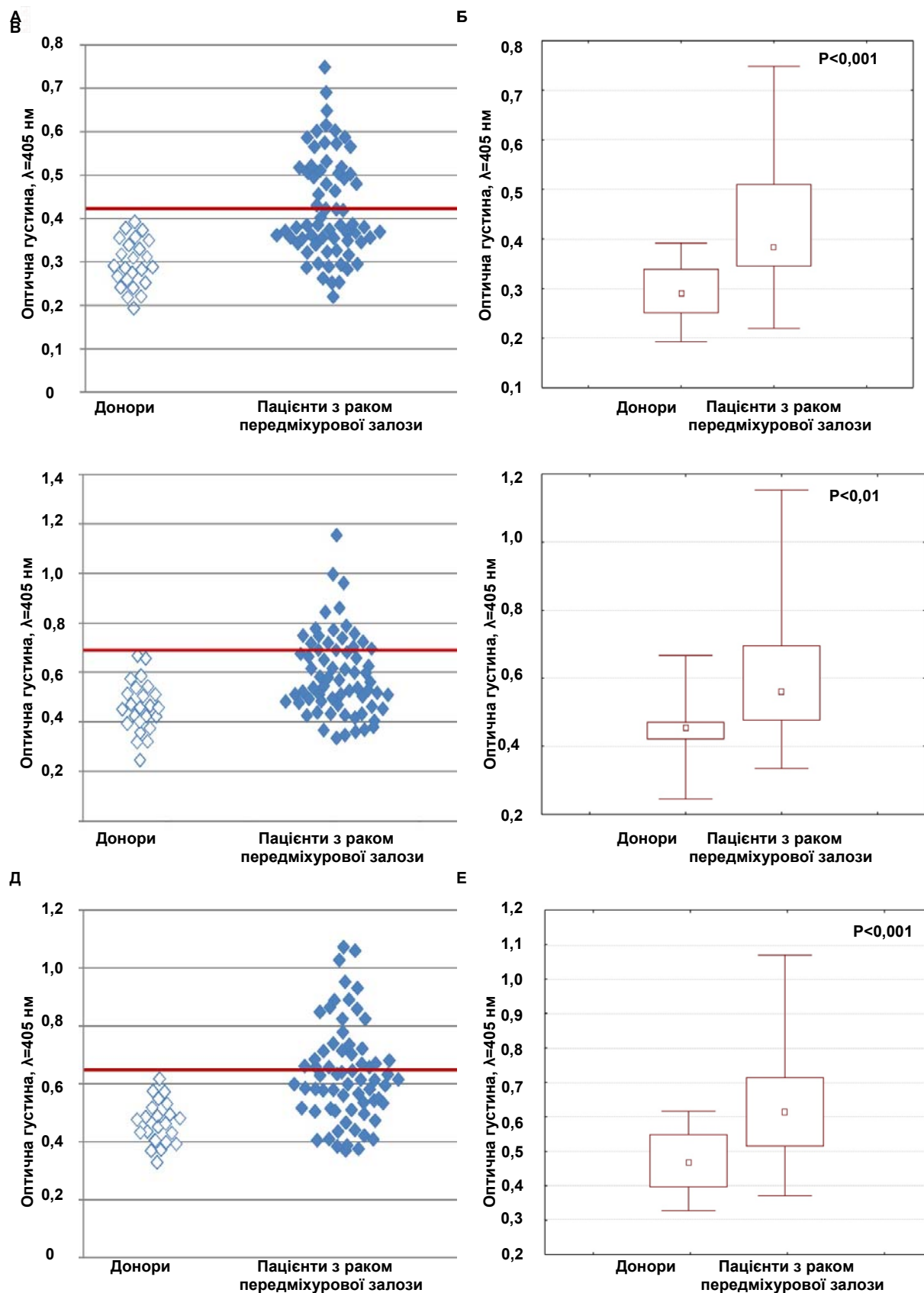


Рис. 1. Рівні аутоантитіл проти тирозил-тРНК синтетази (Д, Е), її N-кінцевого (В, Г) та С-кінцевого (А, Б) доменів у сироватці пацієнтів з раком передміхурової залози та здорових донорів. Маркерна лінія (А,В,Д) відділяє позитивні зразки сироватки та чисельно дорівнює середньому значенню плюс 2 стандартні відхилення відповідної донорської групи.

Квадратні графіки (Б,Г,Е) відображають середнє, максимальне та мінімальне значення, а також діапазон у якому знаходиться 50% значень для кожної вибірки. Статистичну значимість різниці між дослідною та контрольною групою визначали у тесті Манна-Уїтні

Аутоантитіла до окремих доменів ТирРС можуть нейтралізувати прозапальні цитокіни. Міні-ТирРС та С-кінцевий домен стимулюють запалення через клітини або гуморальні фактори неспецифічного імунітету, який вважається ефективним в елімінації пухлинних клітин на самих ранніх стадіях канцерогенезу, тоді як у подальшому запалення сприяє пухлинному росту. Відтак вплив аутоантитіл до фрагментів синтетази при злоякісній трансформації теоретично може виконувати захис-

ну функцію організму але таке припущення потребує значних практичних підтверджень. По-перше, аутоантитіла до окремих доменів можуть здійснювати і інші функції прозапальної спрямованості, по-друге, фактори імунної системи при канцерогенезі пов'язані у мережі складних взаємодій, що значно варіюють при різних патологіях та у різних пацієнтів, і наше розуміння таких зв'язків є досить обмеженим.

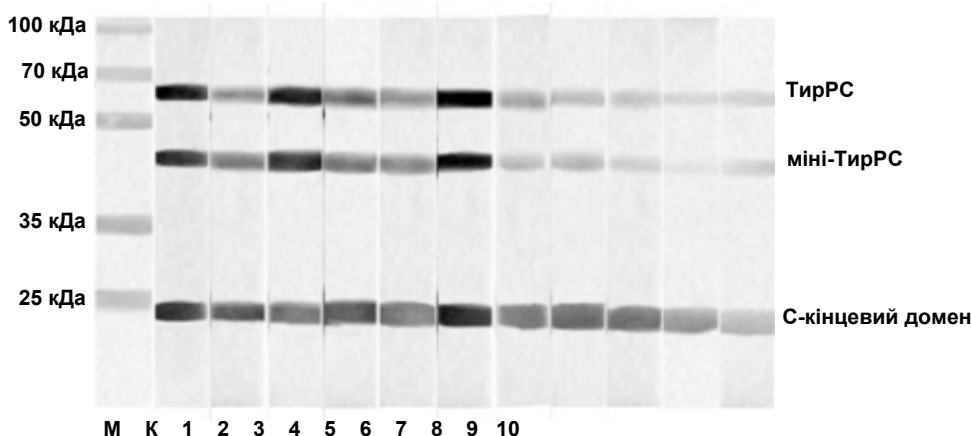


Рис. 2. Імунореактивність пацієнтів з раком передміхурової залози до тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів за результатами Вестерн блот аналізу. Смуги 1-5 інкубовані у сироватці пацієнтів з підвищеними рівнями аутоантитіл до синтетази та її окремих доменів, 6-10 – з більш низькими за результатами ІФА. К – контрольна смуга інкубована з сироваткою крові кролів імунізованих рекомбінантною повнорозмірною тирозил-тРНК синтетазою. М – маркерна суміш білків

Висновки. За умов необхідності створення комплексних тест-систем для виявлення раку передміхурової залози, аутоантитіла до тирозил-тРНК синтетази та її С-кінцевого домену є можливими додатковими антигенами серед панелі інших білків. Подальше вивчення значення впливу аутоантитіл до ферменту та його окремих модулів у взаємовідносинах організм-пухлина може значно поглибити наше уявлення про роль синтетази у канцерогенезі та сприяти персоналізації нових терапевтичних стратегій.

Список використаної літератури.

1. Кондратюк Ю. Ю. Виявлення аутоантитіл до тирозил-тРНК синтетази при серцевих дисфункціях / Ю. Ю. Кондратюк, Л. Л. Сидорук, В. І. Бобик, Д. В. Рябенко, А. І. Корнелюк // *Biopolym. Cell.* – 2010. – Том 26, № 2, С. 373-377.
2. Albertsen P. 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer / P. Albertsen, J. Hanley, J. Fine // *JAMA.* – 2005. – Vol. 293. – P. 2095-2101.
3. Belperio J. CXC chemokines in angiogenesis / J. Belperio, M. Keane, D. Arenberg [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2000. – Vol. 68, N 1. – P. 1-8.
4. Dean R. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx / R. Dean, J. Cox, C. Bellac // *Blood.* – 2008. – Vol. 112, N 8. – P. 3455-64.
5. Duffy M. PSA in screening for prostate cancer: more good than harm or more harm than good? / M. J. Duffy // *Advances in clinical chemistry.* – 2014. – Vol. 66. – P. 1-23.
6. Fukumura D. Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for antiangiogenesis and normalization / D. Fukumura, R. Jain // *Microvasc Res.* – 2007. – Vol. 74. – P. 72-84.
7. Gehrs B. Autoimmune hemolytic anemia / B. Gehrs, R. Friedberg // *Am J Hematol.* – 2002. – Vol. 69, N 4. – P. 258-71.
8. Greenberg Y. The novel fragment of tyrosyl-tRNA synthetase, mini-TyrRS, is secreted to induce an angiogenic response in endothelial cells / Y. Greenberg, M. King, W.B. Kiosses [et al.] // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22(5):1597-605.
9. Grom M. Yu. Autoantibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its separated domains at essential hypertension / M. Yu. Grom, L. F. Yakovenko, V. M. Granich, A. S. Dobrohod, O. O. Torbas, G. D. Radchenko [et al.] // *Biopolym. Cell.* – 2015. – Vol. 31, N 4. – P. 255-263.
10. Gross W. Diagnosis and evaluation of vasculitis / W. Gross, A. Trabandt, E. Reinhold-Keller // *Rheumatology (Oxford).* – 2000. – Vol. 39, N 3. – P. 245-52.
11. Guo M. New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation / M. Guo, X.-L. Yang, P. Schimmel // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11, N 9. – P. 668-74.
12. Howard O. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells / O. Howard, H. Dong, D. Yang [et al.] // *J Exp Med.* – 2002. – Vol. 196, N 6. – P. 781-91.
13. Jura M. Comprehensive insight into human aminoacyl-tRNA synthetases as autoantigens in idiopathic inflammatory myopathies. M. Jura, L. Rychlewski, J. Barciszewski // *Crit Rev Immunol.* – 2007. – Vol. 27. – N 6. – P. 559-72.
14. Kim D. Association of Aminoacyl-tRNA Synthetases with Cancer / D. Kim, N. H. Kwon, and S. Kim // *Top Curr Chem.* – 2014. – Vol. 344. – P. 207-246.
15. Kornelyuk A. I. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase / A. I. Kornelyuk, M. P. Tas, A. L. Dubrovsky, J. C. Murray // *Biopolym. Cell.* – 1999. – Vol. 15, N 2. – P. 168-72.
16. Kunst CB. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions / CB. Kunst, E. Mezey, M.J. Brownstein, D. Patterson // *Nat Genet.* – 1997. – Vol. 15, N 1. – P. 91-4.
17. Mahler M. Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: a comprehensive review / M. Mahler, F. Miller, M. Fritzler // *Autoimmun Rev.* – 2014. – Vol. 13, N 4-5. – P. 367-71.
18. Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: structural domains and their implications / M. Mirande // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* – 1991. – Vol. 40. – P. 95-142.
19. Mucci L. Prospective Study of Prostate Tumor Angiogenesis and Cancer-Specific Mortality in Health Professionals Follow-Up Study / L. Mucci, A. Powolny, E. Giovannucci, [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 5627-5633.
20. Nangle L. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant tRNA synthetases linked to altered dimer interface and neurite distribution defect / L. Nangle, W. Zhang, W. Xie, X.-L. Yang, P. Schimmel // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – Vol. 104, N 27. – P. 11239-44.
21. Park SG. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease / SG. Park, P. Schimmel, S. Kim // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2008. – Vol. 105, N 32. – P. 11043-9.
22. Porter C. 25-year prostate cancer control and survival outcomes: A 40-year radical prostatectomy single institution series / C. Porter, K. Kodama, R. Gibbons, [et al.] // *J Urol.* – 2006. – Vol. 176. – P. 569-574.
23. Sampath P. Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: genespecific silencing of translation / P. Sampath, B. Mazumder, V. Seshadri [et al.] // *Cell.* – 2004. – Vol. 119, N 2. – P. 195-208.

24. Scheper G. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation / *GC. Scheper, T. van der Kloot, R. van Andel [et al.] // Nat Genet.* – 2007. – Vol. 39, N 4. – P. 534–9.
25. Schlick B. Serum Autoantibodies in Chronic Prostate Inflammation in Prostate Cancer Patients. *B. Schlick, P. Massoner, A. Lueking, [et al.] // PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11, N 2. DOI:10.1371/journal.pone.0147739.
26. Vo M. N., Dissociating quaternary structure regulates cell-signaling functions of a secreted human tRNA synthetase / *M. N. Vo, X.-L. Yang, P. Schimmel // J Biol Chem.* – 2011. – Vol. 286, N 13. – P. 11563–11568.
27. Wakasugi K. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase / *K. Wakasugi, P. Schimmel // Science.* – 1999. – Vol. 284, N 5411. – P. 147–51.
28. Wakasugi K. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase / *K. Wakasugi, P. Schimmel // J Biol Chem.* – 1999. – Vol. 274, N 33. – P. 23155–9.
29. Wakasugi K. Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase / *K. Wakasugi, B. Slike, J. Hood [et al.] // J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 23. – P. 20124–6.
30. Won Lee S. Multifunctional proteins in tumorigenesis: aminoacyl-tRNA synthetases and translational components / *S. Won Lee, Y. Sun Kang, S. Kim // Curr Proteomics.* – 2006. – Vol. 3, N 4. – P. 233–47.
31. Yang X.-L. Crystal structure of an EMAP-II-like cytokine released from a human tRNA synthetase / *X.-L. Yang, J. Liu, R. Skene, D. McRee, P. Schimmel // Helv Chim Acta.* – 2003. – Vol. 86, N 4. – P. 1246–57.
32. Zhou X. Proteomics-based identification of tumor relevant proteins in lung adenocarcinoma / *X. Zhou, L. Xue, L. Hao, S. Liu, F. Zhou, H. Xion [et al.] // Biomed Pharmacother.* – 2013. – Vol. 67, N 7. – P. 621–7.
33. Дубровский А. Л. Бактериальная экспрессия полноразмерных и усеченных форм цитокина EMAP-2 и цитокинподобного домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих / *А. Л. Дубровский, Дж. Браун, А. И. Корнелюк, Дж. К. Мюррей, Г. Х. Мауца // Biopolym. Cell.* – 2000. – Том 16, № 3. – С. 229–235.
34. Корнелюк А. И. Тирозил – тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства / *А. И. Корнелюк И. В. Курочкин, Г. Х. Мауца // Мол. биол.* – 1988. – Т. 22, № 1 – С. 176–186.
35. Корнелюк А. И. Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих / *А. И. Корнелюк // Biopolym. Cell.* – 1998. – Том 14, № 4. – С. 349–359.
36. Леванец О. В. Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитокином EMAP II и некаталитическими доменами метионил- и фенилаланил-тРНК синтетаз / *О. В. Леванец, В. Г. Наїденов, К. А. Одынец, [и др.] // Biopolym. Cell.* – 1997. – Том 13, № 6. – С. 474–478.
37. Рибкинська Т. А. Иммунохимический подход к изучению структуры тирозил-тРНК синтетазы из печени быка / *Т. А. Рибкинська, А. И. Корнелюк, А. И. Берестень, Г. Х. Мауца // Biopolym. Cell.* – 1991. – Том 7, № 5. – С. 33–36.
12. Howard OM, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, et al. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;196(6):781–91.
13. Jura M, Rychlewski L, Barciszewski J. Comprehensive insight into human aminoacyl-tRNA synthetases as autoantigens in idiopathic inflammatory myopathies. *Crit Rev Immunol.* 2007;27(6):559–72.
14. Kim D, Kwon NH, Kim S. Association of Aminoacyl-tRNA Synthetases with Cancer *Top Curr Chem.* 2014;344:207–246.
15. Kornelyuk AI, Tas MPR, Dubrovsky AL, Murray JC. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Biopolym Cell.* 1999;15(2):168–72.
16. Kunst CB, Mezey E, Brownstein MJ, Patterson D. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nat Genet.* 1997;15(1):91–4.
17. Mahler M, Miller FW, Fritzler MJ. Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: a comprehensive review. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5):367–71.
18. Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: structural domains and their implications. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1991;40:95–142.
19. Mucci LA, Powolny A, Giovannucci E, Liao Z, Kenfield SA, Shen R, et al. Prospective Study of Prostate Tumor Angiogenesis and Cancer-Specific Mortality in Health Professionals Follow-Up Study. *StudyJ Clin Oncol.* 2009;27:5627–5633.
20. Nangle LA, Zhang W, Xie W, Yang XL, Schimmel P. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant tRNA synthetases linked to altered dimer interface and neurite distribution defect. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(27):11239–44.
21. Park SG, Schimmel P, Kim S. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(32):11043–9.
22. Porter CR, Kodama K, Gibbons RP, Correa RJr, Chun FK, Perrotte P, Karakiewicz PI. 25-year prostate cancer control and survival outcomes: A 40-year radical prostatectomy single institution series. *J Urol* 2006;176:569–574.
23. Sampath P, Mazumder B, Seshadri V, Gerber CA, Chavatte L, Kinter M, et al. Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: genespecific silencing of translation. *Cell.* 2004;119(2):195–208.
24. Scheper GC, van der Kloot T, van Andel RJ, van Berkel CG, Sissler M, Smet J et al. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet.* 2007;39(4):534–9.
25. Schlick B, Massoner P, Lueking A, Charoentong P, Blattner M, Schaefer G, et al. Serum Autoantibodies in Chronic Prostate Inflammation in Prostate Cancer Patients. *PLoS ONE.* 2016;11(2):e0147739.
26. Vo MN, Yang XL, Schimmel P. Dissociating quaternary structure regulates cell-signaling functions of a secreted human tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 2006;286(13):11563–11568.
27. Wakasugi K, Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science.* 1999;284(5411):147–51.
28. Wakasugi K, Schimmel P. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 1999;274(33):23155–9.
29. Wakasugi K, Slike BM, Hood J, Ewalt KL, Cheresch DA, Schimmel P. Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 2002;277(23):20124–6.
30. Won Lee S, Sun Kang Y, Kim S. Multifunctional proteins in tumorigenesis: aminoacyl-tRNA synthetases and translational components. *Curr Proteomics.* 2006;3(4):233–47.
31. Yang X.-L, Liu J, Skene RJ, McRee DE, Schimmel P. Crystal structure of an EMAP-II-like cytokine released from a human tRNA synthetase. *Helv Chim Acta.* 2003;86(4):1246–57.
32. Zhou X, Xue L, Hao L, Liu S, Zhou F, Xion, et al Proteomics-based identification of tumor relevant proteins in lung adenocarcinoma. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(7):621–7.
33. Дубровский А.Л., Браун Дж., Корнелюк А.И., Мюррей Дж.К., Мауца Г.Х. Бактериальная экспрессия полноразмерных и усеченных форм цитокина EMAP-2 и цитокинподобного домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих. *Biopolym. Cell.* 2000; 16(3): 229–235.
34. Корнелюк А.И., Курочкин И.В., Мауца Г.Х. Тирозил – тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства. *Мол. биол.* 1988; 22(1): 176–186.
35. Корнелюк АИ. Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих. *Biopolym. Cell.* 1998; 14 (4): 349–359.
36. Леванец ОВ, Наїденов ВГ, Одынец КА [и др.]. Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитокином EMAP II и некаталитическими доменами метионил- и фенилаланил-тРНК синтетаз. *Biopolym Cell.* 1997; 13(6): 474–8.
37. Рибкинська ТА, Корнелюк АИ, Берестень АИ, Мауца ГХ. Иммунохимический подход к изучению структуры тирозил-тРНК синтетазы из печени быка. *Biopolym. Cell.* 1991;7(5): 33–36.

Надійшла до редакції 06.06.16

М. Гром, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Л. Яковенко, канд. биол. наук, Л. Сидорик, канд. биол. наук, О. Корнелюк, д-р биол. наук
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина,
В. Григоренко, д-р мед. наук, М. Викарчук, врач
Институт урологии НАМН Украины, Киев, Украина

ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗА И ЕЕ ОТДЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ ВЕРОЯТНЫЕ АУТОИММУННЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПАТОГЕНЕЗА РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Показано статистически значимое повышение уровней аутоантител к тирозил-тРНК синтетазе и ее отдельным доменам с про-воспалительными и ангиогенными свойствами у пациентов с раком предстательной железы в сравнении с таким у клинически здоровых доноров. Максимальная аутоагрессия наблюдалась к С-концевому домену фермента, в то время как наиболее низкий уровень аутоантител к N-концевому модулю тирозил-тРНК синтетазы.

Ключевые слова: тирозил-тРНК синтетаза, аутоантитела, рак предстательной железы.

M. Grom, PhD Stud.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine, Kyiv, Ukraine,
L. Yakovenko, PhD., L. Sidorik, PhD., A. Kornelyuk, Doctor of Biological Sciences
Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
V. Grygorenko, Doctor of Medical Sciences, M. Vikarchuk, doctor
SI Institute of Urology NMAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

TYROSYL-tRNA SYNTHETASE AND ITS SEPARATED DOMAINS ARE SUPPOSITIONAL COMPONENTS OF PROSTATE CANCER PATHOGENESIS

Elevated levels of autoantibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its separated fragments enriched with proinflammatory and angiogenic properties in sera of patients with prostate cancer were shown. In serum samples of patients the highest levels of autoantibodies against C-terminal domain were observed. Minimal autoreactivity among persons with oncopathology was shown against N-terminal domain of tyrosyl-tRNA synthetase.

Key words: tyrosyl-tRNA synthetase, autoantibodies, prostate cancer.

УДК 577.112.7

А. Харькова, асп.,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Київ,
О. Мінченко, проф.
Институт біохімії імені О.В. Палладіна, Київ

ЭКСПРЕСИЯ ГЕНОВ ПОДИБНЫХ ДО ИНСУЛИНУ ФАКТОРОВ РОСТУ ТА ЇХ РЕЦЕПТОРА У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ З ПРИГНІЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ ЕНЗИМУ ERN1 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ

Встановлено, що за умов інгібування сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 спостерігається зниження рівня експресії генів подібних до інсуліну факторів росту (IGF1 та IGF2), а також зростання експресії гена, що кодує IGF рецептор (IGF1R). За умов відсутності у поживному середовищі глюкози рівень експресії гена IGF1 знижується, а IGF2 та IGF1R – істотно не змінюється. Пригнічення функціональної активності ензиму ERN1 не впливає на чутливість експресії генів IGF1 та IGF1R до умов дефіциту глюкози у поживному середовищі, але інгібування ERN1 знімає ефект дефіциту глюкози на експресію гена IGF2. Таким чином, експресія генів IGF1, IGF2 та IGF1R, що задіяні у регуляції процесів проліферації клітин гліоми, є чутливою до умов дефіциту глюкози та залежить від функціональної активності ензиму ERN1.

Ключові слова: експресія генів, IGF1, IGF2, IGF1R, клітини гліоми, дефіцит глюкози, ERN1.

Вступ. Процеси проліферації, апоптозу та утворення пухлин тісно пов'язані з внутрішньоклітинними шляхами трансдукції сигналів, які є високо чутливими до впливу різноманітних сторонніх чинників. Зміна клітинного гомеостазу, концентрації йонів Ca^{2+} , нестача глюкози, амінокислот, дія хімічних токсинів, оксидативного стресу, гіпоксії, інгібіторів глікозилювання, тощо викликає в клітині комплекс реакцій відомих під загальною назвою стресу ендоплазматичного ретикулу (ЕР). Це є адаптивна реакція клітини на накопичення в люмені ЕР невірно згорнутих чи не згорнутих протеїнів внаслідок дії різноманітних зовнішніх чи внутрішніх стресових факторів [9].

Сигнальний шлях біфункціонального сенсорно-сигнального ензиму ERN1/IRE1 α (Endoplasmic Reticulum to Nuclei Signaling 1/Inositol Requiring Enzyme-1 α), який має серин-треонінкіназну та ендорибонуклеазну активності, являє собою найбільш універсальний та еволюційно консервативний механізм відповіді клітини на стрес ЕР. Ензим ERN1 залучений до початкових реакцій клітини на накопичення неправильно згорнутих протеїнів в ЕР як за фізіологічних, так і патологічних умов, зокрема в процесі розвитку злоякісних пухлин [7, 9]. Шаперони, що

за нормальних умов перебувають у комплексі з ERN1, при накопиченні неправильно згорнутих протеїнів у люмені ЕР дисоціюють. Це призводить до димеризації та аутофосфорильовання ERN1, а також активації рибонуклеозного домену ERN1, який здійснює сплайсинг мРНК транскрипційного фактора XBP1 (X-box binding protein 1) та деградацію низки мРНК [1]. У результаті сплайсована форма мРНК транскрипційного фактора XBP1 транслюється з утворенням транскрипційного фактора, що регулює експресію великої групи генів, продукти яких відповідають за фолдинг протеїнів, виживання чи апоптоз клітини в залежності від інтенсивності і тривалості дії стресових чинників [9].

Апоптоз, індукований стресом ЕР, є важливим етапом у розвитку нейродегенеративних захворювань, атеросклерозу, ожиріння, різних форм діабету [14, 19]. З іншого боку, активація реакцій стресу ЕР у пухлинних клітинах, що характеризуються швидким поділом та підвищеним рівнем метаболічних процесів, доводить провідну роль реакцій стресу ЕР у регуляції проліферації та виживання пухлинних клітин [10]. Участь ERN1 у стресових реакціях клітини за умов пухлинного росту підтверджується тим фактом, що інгібування його акти-

вності має протипухлинні ефекти. Зокрема було показано, що клітини гліоми лінії U87 із повним пригніченням ERN1 характеризуються меншими розмірами, нижчою щільністю, уповільненням росту, а також зниженням здатності до утворення пухлин на моделі ембріонів курчат [15], але молекулярні механізми пригнічення пухлинного росту шляхом інгібування ERN1 поки що не до кінця з'ясовані та потребують детального вивчення.

Пухлина, що активно росте, перебуває в умовах гіпоксії, дефіциту поживних речовин, що призводить до функціональних перебудов її метаболізму та репрограмування геному пухлинних клітин з метою адаптації до цих умов [5, 20]. Роль глюкози в проліферації та метаболізмі пухлинних клітин важко переоцінити. Порушення вуглеводного обміну в таких клітинах полягає, поперше, в тому, що катаболізм глюкози здійснюється переважно шляхом її анаеробного окиснення, причому навіть підвищення оксигенації пухлин у процесі ангиогенезу не гальмує гліколітичне розщеплення глюкози, що призводить до підвищення стійкості клітин до гіпоксії [5]. По-друге, в пухлинних клітинах спостерігається інтенсифікація процесу розщеплення вуглеводів у пентозофосфатному шунті, який є основним джерелом пентоз для біосинтезу нуклеїнових кислот, що є вкрай необхідним для проліферації та поділу цих клітин [20].

Важлива роль у регуляції проліферації, виживання та запрограмованої клітинної загибелі за умов онкогенної трансформації належить секреторним факторам росту та протеїнам, що регулюють їх активність. Одним із таких сигнальних шляхів є система інсуліноподібного фактора росту (IGF – Insulin-like Growth Factor), компоненти якої залучені до регуляції проліферації і диференціації клітин у нормі та за багатьох патологічних станів. До системи IGF входять ліганди (IGF1 та IGF2), рецептор IGF1R, секреторні регуляторні протеїни, що зв'язують IGF (IGFBP) та протеази, які здійснюють протеоліз IGFBP, вивільняючи IGF із неактивного комплексу [16]. Результати багатьох досліджень вказують на існування зв'язку між рівнем циркулюючих IGF1 та IGF2 та ризиком утворення пухлин. Так, наприклад, у пацієнтів з акромегалією, коли рівень IGF в плазмі є вищим за фізіологічну норму, ризик розвитку захворювань на рак шлунково-кишкового тракту підвищується [11], і навпаки – говорять про захисний проти-пухлинний ефект у пацієнтів із вродженою недостатністю IGF1 [2]. Епідеміологічні дослідження показали, що підвищення рівня IGF-1 у плазмі крові асоціюється із підвищеним ризиком розвитку раку простати, тонкого кишечника, молочної залози і прямої кишки [4]. В останні роки було неодноразово показано, що IGF фактори сприяють виживанню, проліферації, міграції та інвазії пухлинних клітин багатьох типів [6, 17]. Виявлено також зв'язок між підвищенням рівня IGF та активацією індукованого гіпоксією ангиогенезу, який є необхідною умовою для росту злоякісних пухлин [13].

Метою даної роботи було вивчення впливу дефіциту глюкози на експресію генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 для визначення його ролі у регуляції експресії цих генів та їх можливу причетність до регуляції процесів проліферації у клітинах гліоми, що не експресують функціонально активний ензим ERN1.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на клітинах гліоми людини лінії U87, отриманих із "ATCC" (США). Клітини культивували у поживному середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; "Gibco", "Invitrogen", США) з високою концентрацією глюкози (4,5 г/л), до якого додавали 2 ммоль/л глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят

("Equitech-Bio, Inc.", США), пеніцилін (100 одиниць/мл; "Gibco") та стрептоміцин (0,1 мг/мл; "Gibco") за температури 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. У цій роботі були використані дві сублінії цих клітин гліоми: 1) контрольні клітини (вектор), що були стабільно трансфіковані вектором pcDNA3.1; 2) клітини з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1), трансфіковані домінант-негативною конструкцією dnERN1, що експресувала ERN1 без протеїнізаційного та ендорибонуклеазного доменів. Пригнічення функції ензиму ERN1 було раніше оцінено по рівню фосфорилювання ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов індукованого тунікаміцином (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулулу [12]. При дослідженні впливу дефіциту глюкози спочатку видаляли середовище вирощування, промивали фосфатно-сольовим розчином (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4), а потім додавали середовище DMEM без глюкози і витримували протягом 16 годин в інкубаторі.

РНК із клітин гліоми виділяли як було описано раніше [12, 15]. Осади РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували етанолом для додаткового очищення від можливих залишків фенолу, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК. Концентрацію РНК та її спектральні характеристики визначали на безкуветному спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Синтез кДНК проводили за допомогою "QuantiTect Reverse Transcription Kit" ("QIAGEN", Німеччина) згідно протоколу виробника.

Рівень експресії генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної реакції у реальному часі, використовуючи "7900 HT Fast Real-Time PCR System" (Applied Biosystems) або "Mx 3000P QPCR" ("Stratagene", La Jolla, CA, США) та "SYBRGreen Mix" ("AB gene", "Thermo Fisher Scientific", Epsom, Surrey, UK). Ампліфікацію проводили протягом 40 циклів для всіх досліджених генів за таких температурних умов циклу: 95°C – 30 сек., 55°C – 30 сек. та 72°C – 30 сек. Нуклеотидні послідовності праймерів, що використовували для ампліфікації кДНК генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R*, послідовності генів, що їм відповідають, а також довжина продуктів ампліфікації кількісної полімеразної ланцюгової реакції наведені в табл. 1. Дизайн та селекцію праймерів проводили у програмі "Primer3web", версія 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>). По рівню експресії мРНК гена бета-актину оцінювали рівень експресії мРНК досліджуваних генів. Олігонуклеотидні праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* виконували за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення – програми "Differential expression calculator", статистичний аналіз проводили з використанням *t*-критерію однієї проби (one sample *t* test) або *t*-критерію для двох незалежних вибірок. Значення експресії генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* нормалізували по рівню експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %), ефект дефіциту глюкози у клітинах (dnERN1) порівнювали з цими ж клітинами, що росли за присутності глюкози. Представлені середні значення $\pm m$ чотирьох експериментів.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених у табл. 2, рівень експресії гена *IGF1* за умов дефіциту глюкози у середовищі знижується у контрольних клітинах гліоми (вектор), що мають функціонально активний сенсорно-сигнальний ензим ERN1, (-35 %; $p < 0,05$) у порівнянні з цими ж клітинами гліоми, що росли у середовищі з глюкозою. Разом

з тим, у клітинах з пригніченою активністю кінази та ендорибонуклеази ERN1 (dnERN1) рівень експресії гена *IGF1* також знижується за умов дефіциту глюкози, але значно більшою мірою: -84 % ($p < 0,05$) при порівнянні з контрольними клітинами з вектором і -63 % ($p < 0,05$) при порівнянні з клітинами гліоми, що експресують функціонально неактивний ензим ERN1 (dnERN1), що росли за присутності глюкози (табл. 2 та рис. 1). Це

свідчить про значно більшу чутливість експресії гена *IGF1* до дефіциту глюкози за умов пригнічення ензиматичної активності сигнального ензиму ERN1. Крім того, було показано, що пригнічення ензиму ERN1 також призводить до зниження рівня експресії гена цього ростового фактора у клітинах гліоми лінії U87 (-57 %; $p < 0,05$) у порівнянні з контрольними клітинами (вектор) за нормальних умов інкубації (табл. 2).

Таблиця 1. Олігонуклеотидні праймери, що використовувались для визначення рівня експресії мРНК досліджуваних генів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК

Ген	Послідовності праймерів (п – прямий, з – зворотний)	Відповідні послідовності генів	Довжина ампліфікованого фрагмента (п.н.з.)	Номер гена в базі GenBank
<i>β-актин</i> (ACTB)	п: 5'-cgtaccactggcatcgatg-3' з: 5'-gtgtggcggtacaggtctt-3'	п: 704-723 з: 937-918	233	X00351
<i>IGF1</i>	п: 5'-catgtcctcctcgcatctct-3' з: 5'-ggcgcaatacatctccag-3'	п: 297-316 з: 551-532	254	NM_000618
<i>IGF2</i>	п: 5'-caatggggaagtcgatgctg-3' з: 5'-ggaaacagcactctcaacg-3'	п: 763-782 з: 969-950	206	NM_000612
<i>IGF1R</i>	п: 5'-gccactactatgcccgt-3' з: 5'-gtgcatccttgagcatctg-3'	п: 875-856 з: 1111-1092	255	NM_000875

Таблиця 2. Рівень експресії генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції: вплив дефіциту глюкози.

Рівень експресії цих мРНК нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину) і представляли у відсотках від контролю (контрольні клітини з вектором), прийнятого за 100 %; $n = 4$; * – $p < 0,05$ при порівнянні з контролем

№ п/п	Ген	Дефіцит глюкози у клітинах з вектором	Пригнічення ERN1 (dnERN1)	Дефіцит глюкози у клітинах з dnERN1
1	<i>IGF1</i>	$65 \pm 4,1$ *	$43 \pm 2,8$ *	$16 \pm 1,7$ *
2	<i>IGF2</i>	$111 \pm 7,5$	$62 \pm 3,8$ *	$30 \pm 2,1$ *
3	<i>IGF1R</i>	$90 \pm 5,6$	$126 \pm 6,26$ *	$115 \pm 7,4$

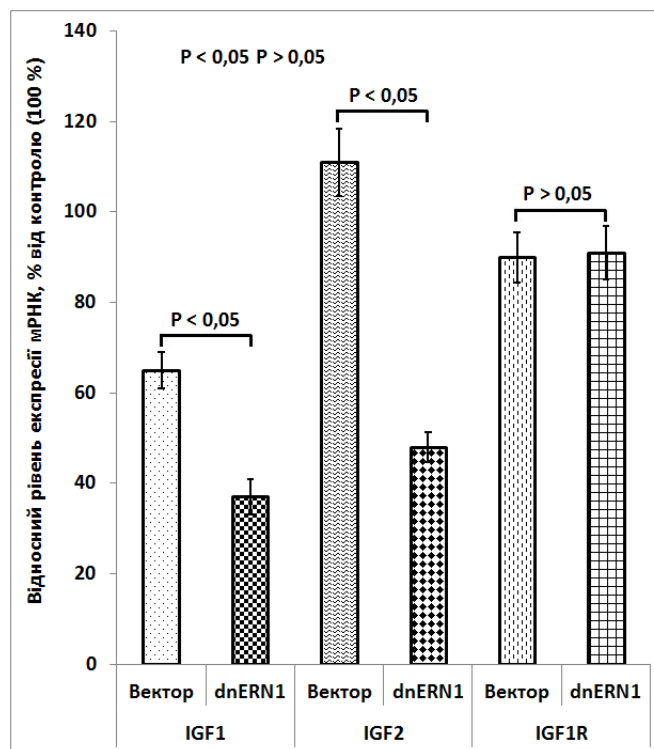


Рис. 1. Рівень експресії генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором, та клітинах із домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) за дефіциту глюкози по даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Рівень експресії цих мРНК нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю для клітин з вектором і для клітин з dnERN1, прийнятих за 100 %; $n = 4$

Встановлено також, що у контрольних клітинах гліоми, що експресують функціонально активний ензим ERN1 (вектор) експресія гена *IGF2* є резистентною до дефіциту глюкози, а у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 експресія гена цього ростового фактора за умов дефіциту глюкози суттєво знижується: -70 % ($p < 0,05$) при порівнянні з контрольними клітинами з вектором і -52 % ($p < 0,05$), що росли за присутності глюкози (табл. 2 та рис. 1). Пригнічення функції ERN1 у клітинах гліоми за умов присутності глюкози у середовищі також призводить до зниження відносного рівня експресії *IGF2* (-38 %; $p < 0,05$) (табл. 2). Таким чином, пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми не лише знижує рівень експресії гена *IGF2*, а і змінює чутливість експресії цього гена до дефіциту глюкози.

Із даних, приведених у табл. 2 та на рис. 1 видно, що рівень експресії гена *IGF1R* не залежить від дефіциту глюкози як у контрольних клітинах гліоми (вектор) при порівнянні з цими ж клітинами, що росли за присутності глюкози, так і у клітинах гліоми з пригніченою активністю кінази та ендорибонуклеази ERN1. У той же час, рівень експресії гена рецептора інсуліноподібного фактора росту за умов пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 в клітинах гліоми (dnERN1) зростає на 26 %; ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольними клітинами гліоми (вектор), що культивували за присутності глюкози у середовищі (табл. 2). Таким чином, пригнічення функціональної активності сигнального ензиму ERN1 посилює експресію гена *IGF1R* за присутності глюкози, але не впливає на чутливість експресії цього гена до дефіциту глюкози.

Виявлене нами зниження рівня експресії гена *IGF1* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ERN1 за умов культивування цих клітин на повноцінному поживному середовищі, а також за умов дефіциту глюкози, узгоджується з даними літератури про здатність *IGF1* посилювати проліферацію та інвазію ряду нормальних і пухлинних клітин, зокрема через активацію міграції та інвазії із залученням різних сигнальних шляхів, активації клітинного поділу насамперед через Ras/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) і пригнічення апоптозу через сигнальний шлях PI3K/Akt (Phosphoinositol-3 Kinase) із залученням адаптерних протеїнів IRS1 та IRS2 (Insuline Reseptor Substrate) [18]. Більше того, отримані нами результати про значне зниження рівня експресії гена *IGF1* узгоджується з даними літератури про зменшення інтенсивності проліферації клітин гліоми лінії U87 з пригніченою активністю ERN1 та росту пухлин з цих клітин [15].

Ростовий фактор *IGF2* також відіграє важливу роль у регуляції процесів проліферації, виживання та апоптозу, причому ріст пухлин центральної нервової системи контролюється переважно фактором *IGF2* за аутокринним або паракринним механізмом, оскільки результати більшості досліджень свідчать про відсутність активації експресії гена *IGF1* в клітинах гліом, коли експресія гена *IGF2* часто підвищується, що і дозволяє говорити про специфічну регуляцію росту гліом за допомогою *IGF2*, але не *IGF1* [19]. Припускається, що участь *IGF-1* у розвитку гліальних пухлин може компенсуватися продуктами інших генів, що експресуються на високому рівні та є залученими до регуляції внутрішньоклітинних сигнальних каскадів MAPK та PI3K [19]. Є також дані про участь *IGF-1* у регуляції апоптозу, індукованого стресом ER, що було показано на клітинах карциноми молочної залози людини лінії MCF-7 та фібробластах миші лінії NIH/3T3 [10]. У наших досліджен-

нях за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 в клітинах гліоми людини лінії U87 було показано майже двократне зниження відносного рівня експресії обох генів (*IGF1* та *IGF2*), що може мати певний вклад у пригнічення проліферації клітин гліоми, що експресують функціонально неактивний ензим ERN1. В той же час нами було показано підвищення відносного рівня експресії *IGF1R* за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму стресу ER. Підвищення відносного рівня експресії гена, що кодує рецептор *IGF*, за даних експериментальних умов можна пояснити компенсаторними механізмами адаптації клітини до зниження кількості лігандів (*IGF1* та, особливо, *IGF2*). Аналогічні ефекти можна спостерігати на клітинах, що на високому рівні експресують інсулінові рецептори (наприклад, панкреатичні β -клітини). Так, було показано, що за умов зниження кількості інсуліну, підвищення рівня експресії гена інсулінового рецептора та *IRS2*, що кодує внутрішньоклітинний адапторний протеїн, який передає сигнал від інсулінового рецептора в середину клітини, попереджає розвиток діабету [8].

Одержані результати розкривають нові аспекти молекулярних механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми за умов інгібування сенсорно-сигнального ензиму стресу ER ERN1 за рахунок змін в експресії генів інсуліноподібних факторів росту (*IGF1* та *IGF2*) та їх рецептора (*IGF1R*), залучених до регуляції процесів проліферації, виживання та апоптозу, а також залежність їх експресії за умов дефіциту глюкози від сигнальних шляхів стресу ER, опосередкованого сенсорно-сигнальним ензимом ERN1.

Таким чином, результати даної роботи вказують на те, що експресія генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* у клітинах гліоми лінії U87 контролюється опосередкованою ERN1 сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулу, а виявлені зміни у функціонуванні системи подібного до інсуліну фактора росту за умов інгібування ензиму ERN1 можуть сприяти пригніченню проліферації цих клітин, оскільки протеїнові продукти цих генів є ключовими активаторами росту гліоми *in vitro* та *in vivo*.

Висновки

1. Встановлено, що повне пригнічення протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1 призводить до зниження відносного рівня експресії генів *IGF1* і *IGF2* та посилення експресії гена *IGF1R* у клітинах гліоми за стандартних умов їх вирощування.

2. Показано, що у контрольних клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози знижується рівень експресії лише гена *IGF1*, а пригнічення ензиму ERN1 змінює чутливість клітин до цих умов, посилюючи ефект дефіциту глюкози на експресію гена *IGF1* та індукує зміни в експресії гена *IGF2*.

3. Результати цієї роботи свідчать про можливу участь генів інсуліноподібних факторів росту та їх рецептора у регуляції процесів проліферації клітин гліоми людини лінії U87 та про чутливість експресії цих генів до умов дефіциту глюкози в залежності від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1.

Список використаної літератури.

1. Aminzadeh S. Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor / S. Aminzadeh, S. Vidali, W. Sperl [et al.] // Translation pediatrics. – 2015. – Vol. 4, N 1. – P. 20–32.
2. Auf G. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor / G. Auf, A. Jabouille, M. Delugin [et al.] // BMC cancer. – 2013. – Vol. 13, N 597. – P. 59701–59712.
3. Clarke H. Endoplasmic reticulum stress in malignancy / H. Clarke, J. Chambers, E. Liniker, S.J. Marciniak // Cancer cell. – 2014. – Vol. 25, N 5. – P. 563–573.

4. Clemmons D.R. Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer / D. Clemmons // *Nature reviews. Drug discovery*. – 2007. – Vol. 6, N 10. – P. 821–833.
5. Dmitrenko V.V. Expression of genes belonging to the IGF system in glial tumors / V.V. Dmitrenko, V.M. Kavsan, O.I. Boyko [et al.] // *Tsitologiya i genetika*. – 2011. – Vol. 45, N 5. – P. 41–57.
6. Girnita L. Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signaling regulation / L. Girnita, C. Worrall, S. Takahashi [et al.] // *Cellular and molecular life science*. – 2014. – Vol. 71, N 13. – P. 2403–2427.
7. Hanahan D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. Weinberg // *Cell*. – 2011. – Vol. 144, N 5. – P. 646–674.
8. Harding H. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review / H. Harding, D. Ron // *Diabetes*. – 2002. – Vol. 51, N 3. – P. 455–461.
9. Hennige A. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes / A. Hennige, D. Burks, U. Ozcan [et al.] // *The journal of clinical investigations*. – 2003. – Vol. 112, N 10. – P. 1521–1532.
10. Hoeben A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis / A. Hoeben, B. Landuyt, M. Highley [et al.] // *Pharmacological reviews*. – 2004. – Vol. 56, N 4. – P. 549–580.
11. Kauppinen-Makelin R. Increased cancer incidence in acromegaly – a nationwide survey / R. Kauppinen-Makelin, T. Sane, M. Valimaki [et al.] // *Clinical endocrinology (Oxf.)*. – 2010. – Vol. 72, N 2. – P. 278–279.
12. Korennykh A.V. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 / A.V. Korennykh, P.F. Egea, A.A. Korostelev [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 457, N 7230. – P. 687–693.
13. Maxfield F.R. Role of cholesterol and lipid organization in disease / F.R. Maxfield, I. Tabas // *Nature*. – 2005. – Vol. 438, N 7068. – P. 612–621.
14. Minchenko D.O. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from *ERN1* knockdown. / D.O. Minchenko, K.I. Kubajchuk, O.O. Ratushna [et al.] // *Advances in biological chemistry*. – 2012. – Vol. 2, N 2. – P. 198–206.
15. Novosyadlyy R. Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. Cell death and differentiation. – 2008. – Vol. 15, N 8. – P. 1304–1317.
16. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update / M. Pollak // *Nature reviews. Cancer*. – 2012. – Vol. 12, N 3. – P. 159–169.
17. Shevah O. Patients with congenital deficiency of IGF-I seem protected from the development of malignancies: a preliminary report / O. Shevah, Z. Laron // *Growth hormone and IGF research*. – 2007. – Vol. 17, N 1. – P. 54–57.
18. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players / K. Siddle // *Journal of molecular endocrinology*. – 2011. – Vol. 47, N 1. – P. 101 – 110.
19. Taouji S. Oligomerization in endoplasmic reticulum stress signaling / S. Taouji, S. Wolf, E. Chevet // *Progress in molecular biology and translational science*. – 2013. – Vol. 117. – P. 465–484.
20. Yoon J.H. Proteomic analysis of hypoxia-induced U373MG glioma secretome reveals novel hypoxia-dependent migration factors / J.H. Yoon, J. Kim, K.L. Kim [et al.] // *Proteomics*. – 2014. – Vol. 14, N 12. – P. 1494–1502.

References

1. Aminzadeh S, Vidali S., Sperl W., Kofler B, Feichtinger RG. Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor. *Transl Pediatr*. 2015;4(1):20–32.

A. Харьков, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

A. Минченко, проф.

Институт биохимии имени А.В. Палладина, Киев, Украина

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА И ИХ РЕЦЕПТОРА В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ С УГНЕТЕННОЙ ФУНКЦИЕЙ ЭНЗИМА ERN1 ПРИ ДЕФИЦИТЕ ГЛЮКОЗЫ

Установлено, что при ингибировании сенсорно-сигнального энзима стресса эндоплазматического ретикула ERN1 в клетках глиомы линии U87 наблюдается снижение уровня экспрессии генов инсулиноподобных факторов роста (IGF1 и IGF2), а также увеличения уровня экспрессии гена, который кодирует рецептор IGF (IGF1R). В условиях отсутствия в питательной среде глюкозы уровень экспрессии гена IGF1 уменьшается, а IGF2 и IGF1R – существенно не изменяется. Ингибирование функциональной активности энзима ERN1 не влияет на чувствительность экспрессии генов IGF1 и IGF1R к условиям дефицита глюкозы в питательной среде, но ингибирование ERN1 снимает эффект дефицита глюкозы на экспрессию гена IGF2. Таким образом, экспрессия генов IGF1, IGF2 и IGF1R, которые принимают участие в регуляции процессов пролиферации клеток глиомы, чувствительна к дефициту глюкозы и зависит от функциональной активности энзима ERN1.

Ключевые слова: экспрессия генов, IGF1, IGF2, IGF1R, клетки глиомы, дефицит глюкозы, ERN1.

A. Kharkova, PhD stud.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

O. Minchenko, prof.

Palladin Institute of Biochemistry, Kyiv, Ukraine

EXPRESSION OF INSULIN LIKE GROWTH FACTORS AND THEIR RECEPTOR GENES IN GLIOMA CELLS WITH SUPPRESSED FUNCTION OF ERN1 ENZYME UPON GLUCOSE DEPRIVATION

It was shown that the expression level of insulin like growth factors (IGF1 and IGF2) genes is decreased, but IGF receptor (IRF1R) gene is significantly increased in U87 glioma cells with suppressed activity of the sensor and signaling enzyme ERN1. In U87 glioma cells the expression level of IGF1 gene is decreased but IGF2 and IGF1R do not change significantly upon glucose deprivation condition. The inhibition of ERN1 functional activity does not affect the sensitivity of IGF1 and IGF1R gene expressions to glucose deprivation but the inhibition of ERN1 eliminates

2. Auf G, Jabouille A, Delugin M, Guérit S, Pineau R, North S, et al. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1α and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer*. 2013;13(1):597.

3. Clarke H, Chambers J, Liniker E, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer Cell*. 2014;25(5):563–73.

4. Clemmons DR. Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. *Nat Rev Drug Discovery*. 2007;6(10):821–33.

5. Dmitrenko VV, Kavsan VM, Boyko OI, Rymar VI, Stepanenko AA, Balynska OV, et al. Expression of genes belonging to the IGF system in glial tumors. *Tsitol Genet*. 2011;45(5):41–57.

6. Girnita L, Worrall C, Takahashi S, Seregard S, Girnita A. Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signaling regulation. *Cell. Mol. Life Sci*. 2014;71(13):2403–27.

7. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.

8. Harding H, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes*. 2002;51(3):455–61.

9. Hennige A, Burks D, Ozcan U, Kulkarni RN, Ye J, Park S, et al. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. *J. Clin. Invest*. 2003;112(10):1521–32.

10. Hoeben A, Landuyt B, Highley M, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev*. 2004;56(4):549–80.

11. Kauppinen-Makelin R, Sane T, Valimaki MJ, Markkanen H, Niskanen L, Ebeling T, et al. Increased cancer incidence in acromegaly – a nationwide survey. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2010;72(2):278–9.

12. Korennykh AV, Egea PF, Korostelev AA, Finer-Moore J, Zhang C, Shokat KM, et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature*. 2009;457(7230):687–93.

13. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. 2005;438(7068):612–21.

14. Minchenko DO, Kubajchuk KI, Ratushna OO, Komisarenko SV, Minchenko OH. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from *ERN1* knockdown. *Adv Biol Chem*. 2012;2(2):198–206.

15. Novosyadlyy R, Kurshan N, Lann D, Vijayakumar A, Yakar S, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ*. 2008;15(8):1304–17.

16. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(3):159–69.

17. Shevah O, Laron Z. Patients with congenital deficiency of IGF-I seem protected from the development of malignancies: a preliminary report. *Growth Horm. IGF Res*. 2007;17(1):54–7.

18. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J. Mol. Endocrinol*. 2011;47(1):101–10.

19. Taouji S, Wolf S, Chevet E. Oligomerization in endoplasmic reticulum stress signaling. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 2013;117:465–84.

20. Yoon JH, Kim J, Kim KL, Kim DH, Jung SJ, Lee H, et al. Proteomic analysis of hypoxia-induced U373MG glioma secretome reveals novel hypoxia-dependent migration factors. *Proteomics*. 2014;14(12):1494–502.

Надійшла до редколегії 16.05.16

the effect of glucose deprivation on IGF2 gene expression. Thus, the IGF1, IGF2 and IGF1R genes are related to the regulation of glioma cells proliferation and are sensitive to glucose deprivation in dependence of ERN1 enzyme function.

Key words: gene expressions, IGF1, IGF2, IGF1R, glioma cells, glucose deprivation, ERN1.

УДК: 577.353.9

Я.Фіщенко, канд. мед. наук
Державна Установа "Інститут травматології та ортопедії АМН України", Київ,
Д. Заводовський, канд. біол. наук., Т. Матвієнко, студ., Д. Ноздренко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
О. Мотузюк, канд. біол. наук
Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ ФІБРОЗУ СПИННОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ ЕПІДУРАЛЬНОМУ ВВЕДЕННІ СУМІШІ ЛОНГІДАЗИ ТА ДИПРОСПАНУ

Проведене дослідження змін в фіброзі спинного мозку щурів викликаного методом розривів волокон міжхребцевих дисків при епідуральному введенні суміші препаратів лонгідази та дипроспану. Одночасне епідуральне введення гіалуронідази та бетаметазону в складі препаратів дипроспану та лонгідази, проявило високий синергічний ефект та антифіброзну активність. Завдяки протизапальній дії та здатності знижувати епідуральну рубцеву адгезію цей комплекс, на нашу думку, є перспективним для його терапевтичних впроваджень при лікуванні епідурального фіброзу спинного мозку.

Ключові слова: фіброз, сполучна тканина, дипроспан, лонгідаза.

Вступ.

Поширеним післяопераційним ускладненням хірургічних втручань з приводу остеохондрозу та інших запальних патологій хребта є післяопераційний епідуральний фіброз (ПОЕФ), що супроводжується хронічним больовим синдромом, у більшості випадків з віддаленою у часі маніфестацією [1]. Це ускладнення є великою проблемою для сучасної вертебрології та медицини в цілому, оскільки досі достовірно не відомі механізми утворення фіброзу його стадійність, та не існує ефективних методів лікування його та больового синдрому що його супроводжує.

Фіброз – це утворення зі сполучної тканини на місці певної травми або іншого пошкодження, що утворюється внаслідок певного фактору. Ця тканина має характерні рубці. До факторів утворення фіброзу можна віднести, на сам перед, хірургічні втручання та травми, опромінення, інфекції, алергії, генетична схильність [2,3].

Сам фіброз можна розглядати, як певний збіг у загоєнні рани чи травми. Відомо, що для загоєння рани певним фактором проліферації активуються фібробласти, тобто вони починають своє ділення та міграцію у місце, де вони необхідні. Далі ці фібробласти починають синтез білків матриксу. А саме – колагену та фібронектину. Фібробласти, що вже є безпосередньо в рані – міобласти – починають синтезувати фактор, що обов'язковий для загоєння та закриття ран – фактор росту для α – актоміозину (α -SMA) [4]. Якщо розгляди ПОЕФ на тканинному рівні, то можна прийти висновку, що утворюється фіброзна тканина, яка огортається навколо нервового корінця і починає стискувати його та, можливо, судини, що знаходяться поряд [5]. Це призводить до больового синдрому. Відомо, що фіброз розвивається за 3-12 тижнів після пошкодження, що його індукує. [6].

Неврологічна картина ПОЕФ являє собою ішемічні ураження каудальних відділів спинного мозку [7]. Ортопедичні зміни у хворих не є дуже помітними. Вони виражаються у згладженості поперекового лордозу, зміні постави, ходи, обмеженні рухливості попереково-крижового відділу хребта [8].

Нажаль, поки що не має ефективного лікування фіброзних хвороб. Наразі, до терапевтичних методів лікування фіброзів можна віднести протибольову терапію, застосування засобів, що покращують мікроциркуляцію, застосування засобів проти набряку, фізіотерапію та

гіперболічну оксигенацію. До медикаментозних засобів лікування хронічного болю при фіброзах можна віднести лікування анестетиками, протизапальними, десенсибілізуючими, протинабряковими препаратами. Метод, що використовують для вводу ліків при гострих больових синдромах називається епідуральна блокада. За цим методом ліки вводять між твердою мозковою оболонкою та внутрішнім краєм міжхребцевого отвору. Стандартно використовують місцеві анестетики, не рідко в комплексі з глюкокортикоїдами [9,10.], такі як дипроспан. Діюча речовина – бетаметазон. Препарат є гормональним. Дія дипроспану направлена на пригнічення запалення, алергічної реакції та імуносупресію. Відомо, що препарат пригнічує функцію гіпофізу. Препарат має дві складові бетаметазон натрій фосфат та бетаметазону дипропінат. Перша речовина діє швидко та виводиться за добу. Інша утворює "депо", діє повільно через це та виводиться за 10 діб. Бетаметазон впливає на судини – має ядро виражений вазоконстрикторний ефект. Має яскраво виражений катаболічний вплив на сполучну тканину, жирову, м'язову, кісткову тканини та на шкіру [11]. Має ядро виражену протизапальну, протиалергічну, протипроліферативну, імунодепресивну дію.

Терапія фіброзу також включає використання ферментативних препаратів, таких як лонгідаза. Діюча речовина – суміш гіалуронідази та броміду азоксимеру. Лонгідаза має ферментативну, імуносупресорну, хілабуючу активність, має антиоксидантні та протизапальні властивості. Гіалуронідаза гідролізує глікозаміноглікани: гіалуронову кислоту, хондроїтин. Результатом такого гідролізу є тетрасахариди. В результаті гідролізу зменшується активність глікозаміногліканів, зменшується здатність зв'язувати воду та йони металів останніх. Через це збільшується проникність тканин, покращуються їх трофічні властивості, зменшуються набряки, зникають гематоми, збільшується еластичність ділянок з рубцями [12]. Бромід азоксимеру має яскраво виражені імуностимулюючі, дезінтоксикаційні властивості [13]. Найкращий ефект спостерігають при використанні даного препарату на ранніх стадіях патологічних процесів. Отже даний препарат має загалом позитивний вплив на патологічний фіброз, однак він на є засобом який здатен повністю прибрати існуючі та завадити утворенню нових фіброзних наростів.

Загалом, до цього часу не існує ефективного лікування ПОЕФ з повним відновленням структури та гарантією відсутності рецидивів, що є великою проблемою для сучасної вертебрології. Саме через це ця тема є актуальною та важливою для подальшого вивчення. В даній роботі ми дослідили впливи комплексного застосування препаратів дипроспан та лонгідаза на ушкоджений фіброзом спинний мозок.

Методика.

Дослідження проводили на 16 дорослих щурах вагою від 0,2 до 0,3 кг, які були поділені на 3 групи: контрольну (4 тварини) і 3 піддослідні (4 тварин). При попередній підготовці до експерименту анестезію здійснювали внутрішньочеревним введенням нембутала (40 мг/кг). Фіброз викликали хірургічним методом, шляхом пошкодження твердої мозкової оболонки поперекових відділів хребта наркотизованих щурів, методом розривів волокон міжхребцевих дисків. В епідуральну порожнину піддослідних тварин вводили препарат лонгідаза та дипроспан в концентраціях 1мг на 1кг ваги тварини. В третю піддослідну групу вводили суміш цих препаратів в концентраціях 0,5мг/кг кожний. Після 10 діб після ініціації фіброзу, тварин забивали методом декапітації та виділяли спинний мозок.

Спинний мозок фіксували протягом двох тижнів у 10% формаліні, після чого фіксували протягом 10 днів у 7% формаліні. Потім матеріал зневоднювали. Для цього використовували спирти зростаючих концентрацій: 60% спирт – 6 годин, 70% – 6 годин, 80% – 6 годин, 90% – 4 години, 100% – 2 години. Для приготування зрізів, заливали матеріал у парафін-воскову суміш (95% парафіну і 5% очищеного воску). Перед цим поміщали його в суміш різних частин абсолютного спирту і ксилолу на 1 годину. Потім переносили матеріал в ортоксидол на 30-40 хвилин. Після цього поміщали в насичений розчин парафіну в ортоксидолі при 37°C на одну годину, переносили в перший чистий парафін до 2-х годин при 57°C, а потім в другий чистий парафін до 1 години при 57°C. Виявлення сполучної тканини проводили за класичним методом зафарбовування за Ван-Гізона [14].

Фотографування гістологічних препаратів здійснювали за допомогою цифрової камери SEO на мікроскопі Axioscop фірми "Carl ZEISS". Обробку цифрових фотографій форматів JPEG проводили в програмі Adobe Photoshop 8.0. Фотографії, отримані за допомогою світлової електронної мікроскопії оброблялися за допомогою програми "ВідеоТест Морфологія 5.0" При обробці отриманих цифрових даних використовувались методи варіаційної статистики. Достовірність відмінностей між групами визначали за t-критерієм Стюдента. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували U – критерій Манна – Вітні. Вірогідними вважалися відмінності при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення.

Процес організації фіброзної тканини у щурів відбувається вже на другому тижні після операції (рис.1). На цьому етапі перебігу раневого процесу важлива роль відводиться чиннику рівноваги між утворенням і резорбцією рубцевої тканини [4]. При порушенні цього балансу фіброзна тканина починає посилено формуватися, ущільнюється і утворювати грубі фіброзні епідуральні зрощення, що призводять до компресії невральних і судинних структур.

Розвитку асептичного запалювального процесу в епідуральних клітинах на тлі утворення гриж міжхребцевого диска сприяють активація каскаду арахідонової кислоти з продукцією простагландинів E1 і E2, лейкотрієну B, накопиченням інтерлейкіна-1б і цитокінів.

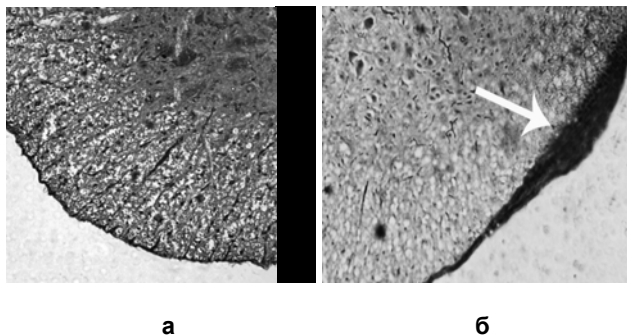


Рис. 1. Поперечний переріз нативного спинного мозку щура (а), епідуральний фіброз викликаний методом розривів волокон міжхребцевих дисків (б) Світлова мікроскопія, x100. Стрілкою показано місце виникнення фіброзних структур

На 10 добу після проведення розривів волокон міжхребцевих дисків та ініціації епідурального фіброзу товщина прошарку сполучної тканини зросла у 5,8 разів, порівняно з нормою, співвідношення фіброзних структур таких як максимальна товщина прошарку сполучної тканини та загальна площа фіброзного утворення дають можливість стверджувати о наявності епідурального фіброзу спинного мозку у піддослідних тваринах (рис.1,3,4). Введення препарату дипроспан, в концентраціях 1мл/кг ваги тварини, призвело до змін в морфо-

функціональному стані щурів. Зменшення максимальної товщини фіброзу склало відповідно 39%, в порівнянні з контрольними значеннями (рис. 3). Зафіксовано зменшення загальної площі фіброзного утворення – 36% в порівнянні з контролем (рис. 4). В дослідній групі котрій був введений препарат лонгідаза зменшення максимальної товщини фіброзу склало відповідно 43%, в порівнянні з контрольними значеннями (рис. 3), зменшення загальної площі фіброзного утворення складало – 48% відповідно.

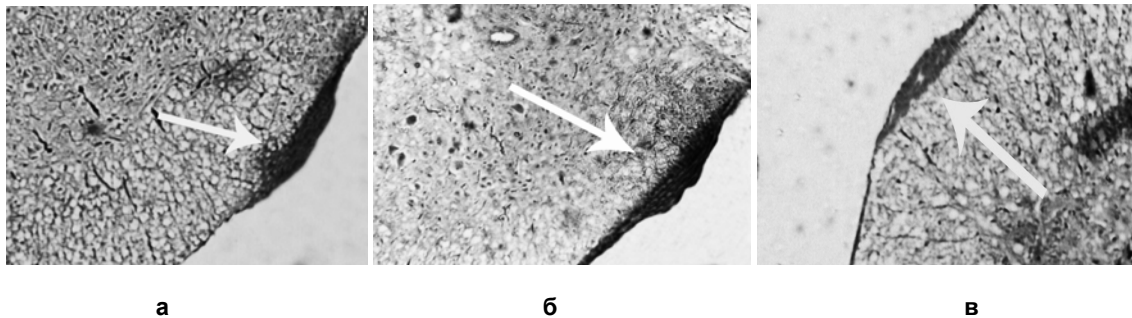


Рис. 2. Поперечний переріз спинного мозку щура при епідуральному фіброзі викликаному методом розривів волокон міжхребцевих дисків щура та введенню препарату лангідаза в концентрації 1мг/кг, (а), препарату дипроспан в концентрації 1мг/кг, (б) та суміші препаратів лангідаза та дипроспан дозах 0,5мл/кг кожний (в). Світлова мікроскопія, х100. Стрілками показані місця виникнення фіброзних структур.

Одночасне введення препаратів дипроспан і лонгідаза в співвідношеннях 1 до 1 в загальній дозі 1мг/кг, проявило значний синергічний ефект (рис. 2,3,4). Отримані данні показують, що об'єднана протифіброзна цих двох лікарських препаратів, є сильнішою, ніж сума дій цих двох ліків при їх роздільному використанні. Так зменшення максимальної товщини фіброзу склапо відповідно 49%, в порівнянні з контрольними значеннями, а зменшенні загальної прощі фіброзного утворення – 46% відповідно. Причини даного синергізму на нашу думку досить складні і потребують подальшого дослідження. Складність адекватного аналізу базується на

нерозумінні багатьох причин виникнення фіброзних утворень при епідуральних фіброзах спинного мозку. Значний інтерес представляє думка про те, що головним патогенетичним чинником утворення фіброзних структур спинного мозку є іммуноінфільтративний асептичний запальний процес [11,12]. Тріщини у фіброзному кільці міжхребцевого диска сприяють просочуванню молекул пульпозного ядра у венозну систему. Ці молекули сприяють виробленню антітіл, які і ініціюють реактивно-запальні зміни в корінцях епідуральних клітин спинномозкових оболонках.

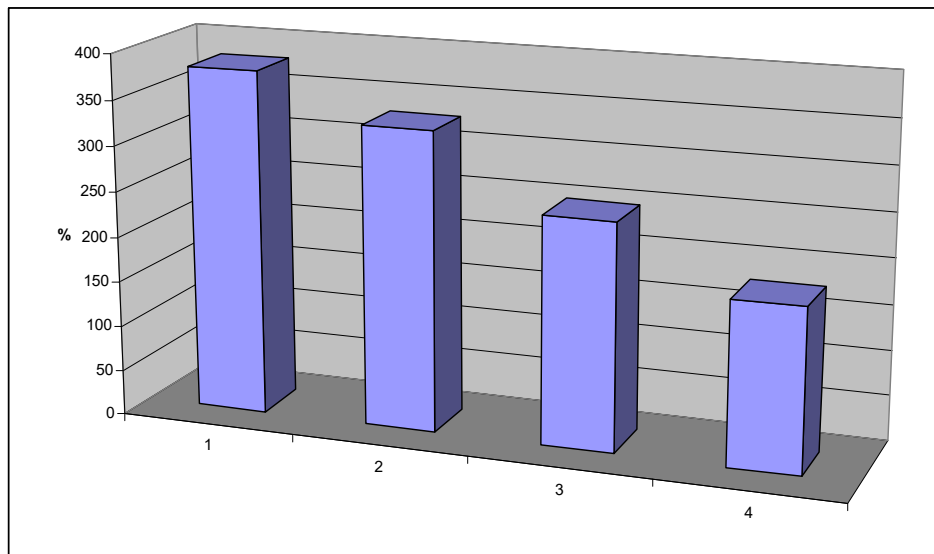


Рис. 3. Максимальна товщина прошарку сполучної тканини після ініціації індукованого епідурального фіброзу, при дії дипроспану та лангідази в концентрації 1мг/кг, та їх суміші в концентрації 0,5мг/кг. відображені в відсотках від контрольних значень прийнятих за 100%
 1 – епідуральний фіброз викликаний методом розривів волокон міжхребцевих дисків,
 2 – після введення дипроспану в концентрації 1мг/кг,
 3 – після введення лонгідази в концентрації 1мг/кг,
 4 – після введення їх суміші в концентрації 0,5мг/кг.

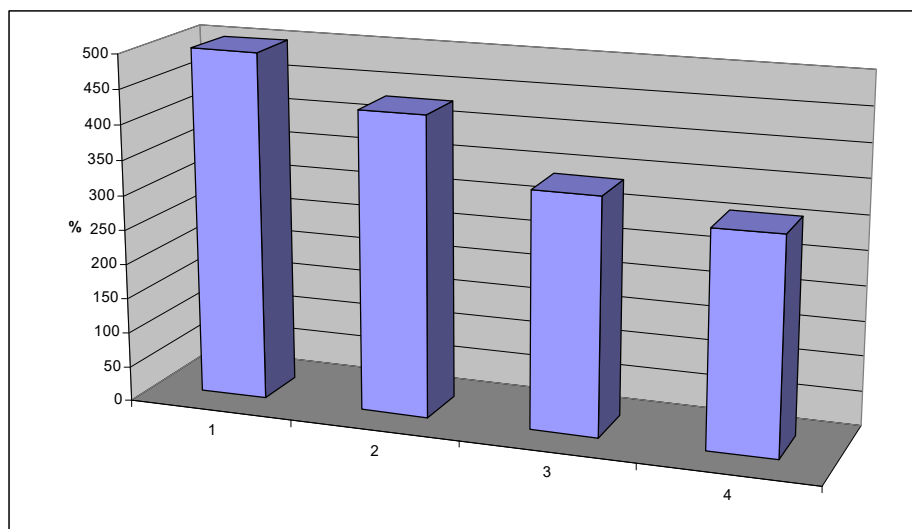


Рис. 4. Загальна площа фіброзного утворення після ініціації індукованого епідурального фіброзу, при дії дипроспану та лонгідази в концентрації 1мг/кг, та їх суміші в концентрації 0,5мг/кг.

відображені в відсотках від контрольних значень прийнятих за 100%

- 1 – епідуральний фіброз викликаний методом розривів волокон межхребцевих дисків,
 2 – після введення дипроспану в концентрації 1мг/кг,
 3 – після введення лонгідази в концентрації 1мг/кг,
 4 – після введення їх суміші в концентрації 0,5мг/кг.

Показано [11], що лонгідаза може зменшувати епідуральну рубцеву адгезію в піддослідних щурах та надає позитивну дію на запобігання епідурального фіброзу і зменшення щільності фіброзної тканини має значно вищий клінічний ефект ніж ефект нативної гіалуронідази, котра є основною діючою речовиною препарату. Також відомо, що дипроспан має високу глюкокортикостероїдну та незначну мінералокортикостероїдну активність. Бетаметазон, котрий входить до його складу, чинить сильну протизапальну, протиалергічну та імуносупресивну дію, що вносить важливий внесок в формування описаних ефектів. Протизапальний ефект препарату обумовлений, багатьма чинниками. Одним з основних ймовірно є інгібування фосфоліпази A_2 з подальшим пригніченням утворення протизапальних медіаторів і лейкотрієнів. Крім того, описана властивість стабілізації цим препаратом клітинної мембрани [10], в т.ч. мембрани лізосом, що запобігає виходу лізосомальних ферментів і знижує їх концентрацію у вогнищі запалення, знижуючи таким чином швидкий ріст епідурального фіброзу. Саме на протизапальних, імуносупресивних та протиалергічних властивостях глюкокортикоїдів може ґрунтуватись описана терапевтична дія препарату, а саме зниження епідуральної рубцевої адгезії в піддослідних щурах та надання позитивної дії на запобігання епідуральному фіброзу і зменшенням щільності фіброзної тканини. Як відомо, деградація і денатурація колагену відбувається під впливом колагенази, яка є основним ферментом специфічним для колагену I і III типів. Джерелом колагенази є нейтрофільні гранулоцити, моноцити і фібробласти. Гальмування дипроспаном міграції нейтрофілів і макрофагів у вогнище запалення і пригнічення їх фагоцитарної активності [11], зменшує набряки пошкодженої тканини, покращує мікроциркуляцію, зменшує ексудацію рідини і тим самим запобігає стрімкого розвитку епідуральних фіброзних утворень. Свій внесок, на нашу думку повинні вносити і протиалергічна дія препарату, яка розвивається в результаті зниження синтезу і секреції медіаторів алергії, гальмування вивільнення з сенсибілізованих оґрядних кліток і базофілів гістаміну і інших біологічно активних речовин, зменшення числа циркулюючих базофілів, придушення проліферації лімфоїдної і сполучної тканини, та пригнічення

антітелоутворення [10-11]. Описані нами ефекти дії дипроспану можуть бути пов'язані з його протизапальною дією. Тому, на нашу думку одночасна дія лонгідази та дипроспана і виявляє яскраво виражений синергичний ефект протидії утворення фіброзних структур.

Таким чином, одночасне епідуральне введення гіалуронідази та бетаметазону в складі препаратів дипроспану та лонгідази, проявляє високу антифіброзну активність. Завдяки протизапальній та дії та здатності понизити епідуральну рубцеву адгезію цей комплекс, на нашу думку, є перспективним для його терапевтичних впроваджень при лікуванні епідурального фіброзу спинного мозку.

Список використаної літератури

- Исаева Н.В. Основные подходы к лечению и профилактике послеоперационного эпидурального фиброза у больных с поясничным остеохондрозом позвоночника. // Нейрохирургия. – 2010. – № 3. – С.74 – 79.
- Riordan JR. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA / Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsky N, Chou JL, et al. // Science. – 1989. – Vol. 245. – P.1066-1073.
- Благодатский М.Д. Об аутоиммунном компоненте воспалительных реакций при корешковых синдромах поясничного остеохондроза / М.Д. Благодатский, Ю.В. Солодун. // Журн. неврол. и псих. им. Корсакова. – 1988. – Т. 88. – вып. 4. – С. 48–51.
- Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. // J. Pathol. – 2003. – P.500-503
- Bedossa, P.V. Liver extracellular matrix in health and disease. // J. Pathol. – 2003. – P.504-515.
- Ross JS. The postoperative lumbar spine: evaluation of epidural scar over a 1-year period / Obuchowski N, Zepp R. //Am J Neuroradiol.- 1998. – Vol. 19. P.183-186.
- Зеелингер А. Нейростимуляция в терапии хронических невропатических болей при синдроме неудачной операции на позвоночнике. // Мед. академ. журн. 2007. – Т.7. – № 4. – С. 100–105
- Земская А.Г., Мусихин В.Н. Клиника, диагностика и лечение поясничного остеохондроза, осложненного эпидуритом. // 1989. – Ленинград. – С. 15.
- Papagelopoulos P.J. Treatment of lumbosacral radicular pain with epidural steroid injections. / Petrou H.G., Triantafyllidis P.G. et al. // Orthopedics. 2001. – Vol.24. – № 2. – P. 145–149.
- Benzon H.T. / Epidural steroid injections for low back pain and lumbosacral radiculopathy. // Pain. 1986. – Vol. 24. – № 3. – P.277–295.
- Menendez MI. Pharmacokinetics of intra-articular betamethasone sodium phosphate and betamethasone acetate and endogenous hydrocortisone suppression in exercising horses / Phelps MA, Bertone AL. // J Vet Pharmacol Ther. – 2016. – Vol. 39. – P.22-26.
- Leena James. Management of Oral Submucous Fibrosis with Injection of Hyaluronidase and Dexamethasone in Grade III Oral

Submucous Fibrosis / Akshay Shetty, Diljith Rishi, Marin Abraham // J Int Oral Health – 2015. – Vol. 7. – P.82–85.

13. Dyakonova V.A. Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells / Dambaeva V.A., Dambaeva S.V., Khaitov R.M. // Int. Immunopharmacol. – 2004. – Vol. 15, № 13. P.1615-1623.

References

1. Исаева Н.В. Основные подходы к лечению и профилактике постоперационного эпидурального фиброза у больных с поясничным остеохондрозом позвоночника. Нейрохирургия. 2010. № 3. С.74 – 79.
2. Riordan JR., Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsky N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science. 1989;245:1066-1073.
3. Благодатский М.Д. Об аутоиммунном компоненте воспалительных реакций при корешковых синдромах поясничного остеохондроза. Журн. неврол. и псих. им. Корсакова. 1988. Т. 88. вып. 4. С. 48-51.
4. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. J. Pathol. 2003;500-503.
5. Bedossa, P.V. Liver extracellular matrix in health and disease. J. Pathol. 2003;504-515.
6. Ross JS., Obuchowski N, Zepp R. The postoperative lumbar spine: evaluation of epidural scar over a 1-year period. Am J Neuroradiol. 1998;(19):183-186.

7. Зеелингер А. Нейростимуляция в терапии хронических невропатических болей при синдроме неудачной операции на позвоночнике. Мед. академ. журн. 2007.; Т.7. – № 4. – С. 100–105.

8. Земская А.Г., Мусихин В.Н. Клиника, диагностика и лечение поясничного остеохондроза, осложненного эпидуритом. 1989. – ЛенГИДУБ; С. 15.

9. Papagelopoulos P.J., Petrou H.G., Triantafyllidis P.G. et al. Treatment of lumbosacral radicular pain with epidural steroid injections. Orthopedics. 2001;24(2):145–149.

10. Benzon H.T. Epidural steroid injections for low back pain and lumbosacral radiculopathy. Pain. 1986;24(3):277–295.

11. Menendez ML., Phelps MA, Bertone AL. Pharmacokinetics of intra-articular betamethasone sodium phosphate and betamethasone acetate and endogenous hydrocortisone suppression in exercising horses. J Vet Pharmacol Ther. 2016;(39):22-26.

12. Leena James, Akshay Shetty, Diljith Rishi, Marin Abraham Management of Oral Submucous Fibrosis with Injection of Hyaluronidase and Dexamethasone in Grade III Oral Submucous Fibrosis. J Int Oral Health. 2015;7:82–85.

13. Dyakonova V.A., Dambaeva V.A., Dambaeva S.V., Khaitov R.M. Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells. Int. Immunopharmacol. 2004;15(13):1615-1623.

Надійшла до редколегії 14.06.16

Я. Фищенко, канд. мед. наук

Государственное Учреждение "Институт травматологии и ортопедии АМН Украины", Киев, Украина,

Д.Заводовский, канд. биол. наук., Т.Матвиенко, студ., Д.Ноздренко, канд. биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,

О. Мотузюк, канд. биол. наук

Восточноевропейский национальный университет имени Леси Украинки, Луцк, Украина

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФИБРОЗА СПИННОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ЭПИДУРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ СМЕСИ ЛОНГИДАЗЫ И ДИПРОСПАНА

Проведено исследование изменений в фиброзе спинного мозга крыс вызванного методом разрывов волокон межпозвоночных дисков при эпидуральном введении смеси препаратов лонгидазы и дипроspana. Одновременное эпидуральное введение гиалуронидазы и бетаметазона в составе препаратов дипроspana и лонгидазы, выявило высокий синергический эффект и антифиброзную активность. Благодаря противовоспалительному действию и способностью снижать эпидуральную рубцовую адгезию этот комплекс, по нашему мнению, является перспективным для его терапевтического использования при лечении эпидурального фиброза спинного мозга.

Ключевые слова: фиброз, соединительная ткань, дипроspan, лонгидаза.

Ya. Fishchenko, PhD.

DU "Institute of traumatology and orthopedics of AMN of Ukraine", Kyiv, Ukraine,

D.Zavodovskyi, PhD., T. Matvienko, stud., D.Nozdrenko, PhD.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

O. Motuzuyk, PhD

Eastern European National University named after Lesia Ukrainka, Lutsk, Ukraine

STRUCTURAL CHANGES OF SPINAL CORD FIBROSIS DUE TO EPIDURAL APPLICATION OF MIXTURE OF LONGIDAZA AND DIPROSPAN

Changes in structure of fibrosis of rat spinal cord induced using intervertebral disc rupture fibers method due to application longidaza and diprospan mixture. Simultaneous epidural application of hyaluronidase and betamethasone in preparation of diprospan and longidaza had high synergistic effect and antifibrosis activity. Through anti-inflammatory effect and ability to reduce epidural scars adhesion this complex, to our opinion, has perspective in therapy of epidural spinal cord fibrosis.

Keywords: fibrosis, connective tissue, longidaza, diprospan.

УДК 577.12+616.379+616.831

Є.Пажукова, студ., Т. Царенко, асп., М. Тимошенко, канд. біол. наук, О.Кравченко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

КЛІНІКО-БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ОБМІНУ БІЛКІВ ТА ВМІСТ ЕЛЕКТРОЛІТІВ У КРОВІ ПАЦІЄНТІВ ЗА УМОВ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ, УСКЛАДНЕНОГО ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ ДРУГОГО ТИПУ

Одним із загальноновизнаних чинників гострих порушень мозкового кровопостачання є цукровий діабет. Численні дослідження показали, що у патогенезі діабетичних церебральних порушень бере участь багато факторів, найбільш важливими з яких є метаболічні зміни. Метою дослідження було визначити біохімічні особливості білкового та амінокислотного обміну та іонний склад крові за умов ішемічного інсульту ускладненого цукровим діабетом 2 типу в порівнянні з інсультом. Крім того визначався середній вік пацієнтів, індекс маси тіла (ІМТ) та вміст глюкози у крові. В результаті проведених досліджень було встановлено, що ішемічний інсульт, зокрема ускладнений інсуліном незалежним діабетом характеризується гіпопротеїнемією на фоні відсутності виражених змін вмісту альбуміну, активності трансаміназ та кількості кінцевих продуктів обміну білків (сечовини та креатиніну) в сироватці крові обох дослідних груп пацієнтів. Отримані результати дозволили встановити також суттєві відмінності значення ІМТ у групі пацієнтів з ішемічним інсультом, що супроводжується цукровим діабетом 2 типу.

Ключові слова: ішемічний інсульт, цукровий діабет II типу, аспартат-, аланінамінотрансфераза, сечовина, креатинін, індекс маси тіла.

Вступ. Цереброваскулярні захворювання, зокрема ішемічний інсульт (ІІ) становлять одну з найбільш важливих проблем сучасної медицини внаслідок неухиль-

ного зростання захворюваності та негативного впливу на якість життя. За даними ВООЗ, інсульт – гостре судинно-мозкове порушення кровообігу поліетіологічної

© Пажукова Є., Царенко Т., Тимошенко М., Кравченко О., 2016

природи, реєструється щорічно у 100-300 осіб на 100 тис. населення розвинених країн світу, в той час як для України даний показник становить 209 випадків. Крім того смертність від порушення мозкового кровообігу посідає третє місце, після хвороб серця та онкології [7]. Одним із загальновизнаних незалежних чинників гострих порушень мозкового кровопостачання є цукровий діабет (ЦД). Так, за даними численних досліджень, наявність ЦД підвищує ризик ішемічного інсульту у 1,5–6 разів. У свою чергу, кожний третій–п'ятий пацієнт із гострим порушеннями мозкового кровообігу має ЦД, причому останній нерідко встановлюється вперше лише під час госпіталізації з приводу ІІ. Наявність ЦД значно обтяжує перебіг інсульту, підвищує ризик летальних випадків та погіршує прогноз захворювання [5].

Численні дослідження показали, що у патогенезі діабетичних церебральних порушень, зокрема при ЦД 2-го типу, бере участь багато факторів, найбільш важливими з яких є метаболічні зміни (гіперглікемія та глюкозотоксичність, гіперінсулінемія, поліоловий шлях перетворення глюкози, глікозилювання білків, оксидантний стрес, дисліпідемія, ішемія), морфофункціональні порушення артеріальної судинної стінки, зокрема ендотелію; артеріальна гіпертензія; нефропатія; тромбоз, порушення й пригнічення фібринолізу, зміни мікроциркуляції, ожиріння тощо. Внаслідок вищезазначених змін порушуються усі ланки обміну, розвиваються гемодинамічні та гемореологічні патології [4].

Висунуті теорії механізму розвитку уражень головного мозку при ЦД можна умовно об'єднати в ішемічну (мікро- та макроангіопатії) та метаболічну, яка передбачає вплив різноманітних обмінних розладів, що відбуваються при ЦД, на нервову систему. Водночас беззаперечним вважається той факт, що ішемія головного мозку внаслідок мікро- та макросудинних уражень має метаболічне підґрунтя розвитку [5].

Таким чином, пошук біохімічних передумов, що забезпечують прогресування негативних проявів за умов ішемічного інсульту ускладненого діабетом 2 типу є актуальним питанням. Беручи до уваги все вищесказане, метою дослідження стало визначення біохімічних особливостей білкового та амінокислотного обміну та іонний склад крові за умов ішемічного інсульту ускладненого цукровим діабетом 2 типу в порівнянні з інсультом. Крім того визначався середній вік пацієнтів, індекс маси тіла (ІМТ) та вміст глюкози у крові, для діагностування діабету.

Матеріали та методи. Дослідження проводили одразу після надходження хворих до лікувального закладу. Діагностування ішемічного інсульту здійснювали загальновизнаними методами із застосуванням комп'ютерної та/або магнітно-резонансної томографії. Цукровий діабет виявляли за наявністю гіперглікемії натще, із застосуванням методу визначення рівня глікозилюваного гемоглобіну та оцінки інсулінорезистентності. Таким чином було відібрано 20 пацієнтів з ішемічним інсультом, у 10 з яких діагностувався цукровий діабет другого типу та отримано від них, чи їх родичів, згоду на проведення досліджень. Слід зазначити, що вищезазначені пацієнти не мали в анамнезі захворювань, що супроводжуються порушенням функцій нирок, печінки та м'язової системи. За контроль було взято результати досліджень умовно здорових донорів. Визначення показників здійснювали стандартними клініко-діагностич-

ними методами: загальний білок та альбумін визначали за допомогою біуретового та бромкрезолового зеленого реактивів, відповідно, вміст глюкози – глюкозооксидазним методом, іони K^+ , Cl^- , Na^+ вимірювали на автоматичному клініко-біохімічному аналізаторі. Активність амінотрансфераз оцінювали динітрофенілгідразиним методом за Райтманом-Френкелем, вміст сечовини визначали реакцією з діацетилмоноксидом, креатинін – за методом Яффе [2]. Індекс маси тіла (ІМТ) розраховували з використанням загальноприйнятої формули: $I = m/h^2$ де m – маса тіла в кг, h – зріст в м.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми Statistica 7.0, аналіз на параметричність – із застосуванням тесту Шапіро-Уїлка [1].

Результати та їх обговорення.

В результаті проведених досліджень до групи пацієнтів з ішемічним інсультом на фоні цукрового діабету (ІІ+ЦД) віднесено осіб, показник вмісту глюкози в крові яких складав $9,47 \pm 0,46$ ммоль/л, тоді як у групи з ішемічним інсультом (ІІ) він становив лише $4,93 \pm 0,11$ ммоль/л. При цьому наявність гіперглікемії статистично достовірно не позначилась на середньому віці виникнення інсульту ($73,8 \pm 0,9$ років для ІІ та $73,6 \pm 1,4$ років для ІІ+ЦД).

Загальноприйнятим є факт взаємозв'язку гіперглікемії з розвитком ожиріння, що в сукупності призводить до формування метаболічного синдрому. Останній в свою чергу характеризується порушенням вуглеводної, ліпідної, білкової та пуринової ланок обміну й артеріальною гіпертензією [10]. Крім того, наявні літературні дані щодо, так званого, "obesity paradox", відповідно до якого наявність надлишкової ваги зменшує ризик смертності, зокрема при серцевій та нирковій недостатності, гіпертензії та діабеті другого типу [9]. Тому визначення індексу маси тіла (ІМТ), величини, що дозволяє оцінити ступінь відповідності маси людини до її зросту, й тим самим, непрямо оцінити, чи є маса нормальною або ж надмірною, є важливим як для осіб, що перенесли ішемічний інсульт, так і для осіб з цукровим діабетом. Отримані результати показали, що пацієнти з ішемічним інсультом мали даний показник в межах нормальних значень – $20,26 \text{ кг/м}^2$, в той час як за наявності ЦД ця величина становила 34 кг/м^2 .

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я нормальне значення ІМТ коливається в межах $18,5\text{--}24,9 \text{ кг/м}^2$, а підвищення даного показника до 30 кг/м^2 і більше притаманно для людей з ожирінням. Відтак, можна підсумувати, що пацієнти з ішемічним інсультом ускладненим цукровим діабетом характеризуються наявністю зайвої ваги. Тому при дослідженні осіб з первинними випадками ІІ, у яких спостерігається тенденція до ожиріння, необхідно приділити особливу увагу їх глікемічному та інсулінорезистентному статусу. Слід також додати, що за даними літератури, особи з нормальною масою тіла при цукровому діабеті мають вищу смертність в порівнянні з особами, у яких спостерігається зайва вага при ЦД [8]. Беручи до уваги виявлені зміни в метаболізмі, якими характеризується цукровий діабет, актуальності набуває дослідження клініко-біохімічних маркерів обміну білків, амінокислот та електролітів за умов інсульту та при асоціації останнього з діабетом.

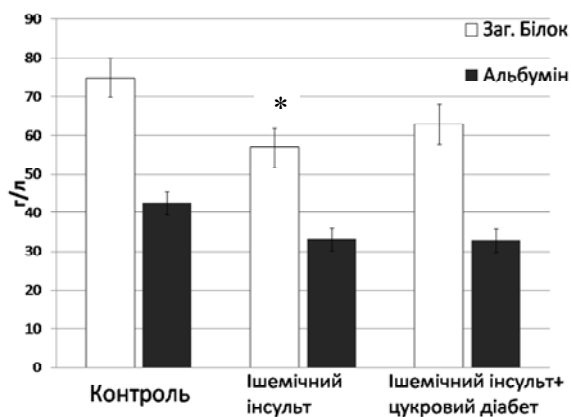


Рис.1. Вміст загального білка та альбуміна в сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом ускладненим цукровим діабетом

* – $p \leq 0,5$, по відношенню до контрольних значень

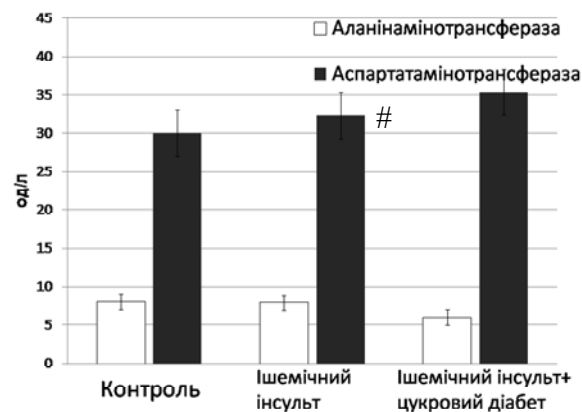


Рис.2. Активність трансаміназ в сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом ускладненим цукровим діабетом

#- $p \leq 0,5$, по відношенню до показників за умов інсульту

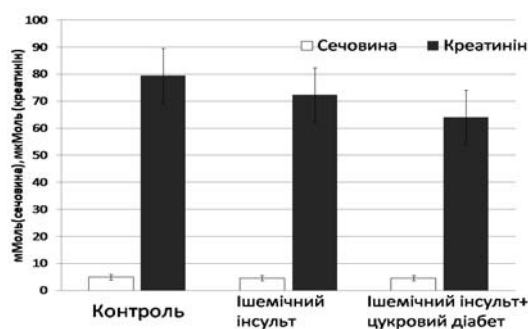


Рис.3. Вміст сечовини та креатиніну в сироватці крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом ускладненим цукровим діабетом

В результаті проведених досліджень встановлено виражене зниження вмісту загального білка при інсульті (рис.1), та зменшення концентрації альбуміну сироватки крові пацієнтів з ішемічним інсультом та інсультом ускладненим діабетом порівняно з контрольними показниками. Зокрема, концентрація загального білку за умов винятково ІІ становила $56,8 \pm 5,6$ г/л, а при ІІ+Д – $62,8 \pm 5,9$ г/л при контрольних значеннях $74,5 \pm 5,5$ г/л. При цьому кількість альбуміну складала порядку $33 \pm 3,9$ г/л для обох дослідних груп при контролі $42,5 \pm 4,5$ г/л. Таким чином, виявлене зниження вмісту загального білку в сироватці крові за умов ішемічного інсульту принаймні частково зумовлене зниженням вмісту альбуміну. Виражена гіпопротеїнемія, яка спостерігалась при вищезазначеній патології, є патологічним станом, який може бути спричинений такими факторами, як недостатнє надходження білків з їжею, внаслідок втрати здатності самостійно харчуватися, знижений синтез білків крові печінкою, надмірний їх розпад і виведення нирками, а також значні крововиливи та надмірне зростання проникності капілярів.

Тому були досліджені біохімічні показники, які головним чином, характеризують функціональний стан печінки та вказують на інтенсивність переамінування амінокислот та їх розпад. Активність трансаміназ (рис.2) коливалася в межах контрольних значень як для групи пацієнтів з ішемічним інсультом, так і за умови цукрового діабету та інсульту. Однак, статистично достовірна відмінність була виявлена між самими досліджуваними групами пацієнтів при визначенні активності АЛТ сироватки крові.

Так, активність даного ензиму у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу та інсультом була на 25% нижчою, ніж у групи пацієнтів лише з інсультом. Поруч із цим, активність АСТ мала тенденцію до зниження за умов винятково інсульту в порівнянні з показниками групи пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу на фоні ішемічного інсульту (рис.2).

Оскільки були виявлені коливання активності трансаміназ в сироватці крові хворих на інсульт та при інсульті ускладненим ЦД 2 типу, інтересу набуває оцінка вмісту сечовини, як кінцевого продукту фіксації аміаку при дезамінуванні амінокислот. Дослідження даного показника в сироватці крові обох груп пацієнтів не виявило статистично достовірних змін ні по відношенню до контрольних значень, ні при порівнянні даних дослідних груп між собою. Зокрема, результати умовно здорових донорів коливались в межах від $4,88 \pm 0,65$ ммоль/л, а при ішемічному інсульті та на фоні діабету становили $4,62 \pm 0,51$ ммоль/л та $4,68 \pm 0,59$ ммоль/л, відповідно (рис.3).

Інший кінцевий продукт обміну білків, що синтезується в м'язах та виводиться нирками, – креатинін. Даний компонент залишкового азоту, відповідно до результатів представлених досліджень (мал.3) залишався в межах контрольних величин, проявляючи тенденцію до зниження як у групи пацієнтів з ішемічним інсультом, так і у осіб з гіперглікемією на фоні ураження мозку. Слід зазначити, що за наявності цукрового діабету даний біохімічний показник використовують в якості маркера діабетичної нефропатії [6]. Відтак, відсутність зро-

стання вмісту креатиніну в сироватці крові хворих на цукровий діабет при інсульті, виявлена нами, може слугувати позитивним прогностичним фактором щодо функціонального стану нирок.

Причини ішемічного інсульту в значній мірі пов'язані зі змінами складу крові, її фізико-хімічними властивостями, системою згортання та кількістю білків, електролітів й інших компонентів. Пацієнти з інсультом, повинні мати збалансований водно-електролітний обмін, щоб уникнути зменшення об'єму плазми крові, який може в значній мірі впливати на мозковий кровотік. Суттєвий вплив на обмін іонів та білків крові справляє також гіперглікемія, характерна для діабету. Зростання вмісту

глюкози, білків, сечовини в крові супроводжується підвищенням осмотичного тиску в судинному руслі, компенсаторною втратою води та електролітів тканинами, дегідратацією, зменшенням периферійного та мозкового кровообігу й гіпоксией.

Зниження концентрації протеїнів в крові (рис.1), виявлене нами, може призводити до зміни осмотичного тиску, який асоційований з порушенням водно-мінерального обміну організму, що в значній мірі визначається концентрацією різних іонів. Аналіз вмісту іонів K^+ не виявив статистично достовірних змін в досліджуваних групах ні в порівнянні їх між собою, ні по відношенню до контролю (табл.1).

Таблиця 1. Вміст іонів в сироватці крові та індекс маси тіла пацієнтів з ішемічним інсультом та при інсульті ускладненому цукровим діабетом

	Контрольні значення	Ішемічний інсульт	Ішемічний інсульт + цукровий діабет
Індекс маси тіла, кг/м ²	18,5 – 24,9	20,26±2,0	34,01±5,48
Електроліти крові, ммоль/л			
K^+	4,50 ±0,99	3,31±0,33	3,35±0,31
Na^+	143,6 ±13,05	160,3±10,7	153,5±9,5
Cl^-	101,9 ± 6,9	89,2±4,3	93,2±4,5

Калій – основний внутрішньоклітинний катіон. В нормі його концентрація в плазмі становить 3,5-5,5 ммоль/л, а в клітинах – 150 ммоль/л. Таке велике співвідношення підтримується завдяки роботі Na^+, K^+ – АТФази, створююваній цим ензимом трансмембранний потенціал надзвичайно важливий для функціонування нервової та м'язової тканин. Слід додати, що інсулін опосередковано збільшує активність вищезазначеної АТФази, сприяючи переміщенню K^+ у міоцити та гепатоцити. Відтак, хворі на цукровий діабет перебувають у групі ризику щодо розвитку гіпокаліємії. Остання може бути діагностована, у разі якщо рівень K^+ в сироватці складає менше 3,6 ммоль/л, при чому спостерігається генералізована слабкість м'язів та серцеві аритмії [3]. При дослідженні інсульту та інсульту на фоні діабету нами було виявлено, що даний показник в середньому становив 3,3±0,33 ммоль/л, що має несприятливий прогноз, оскільки дані епідеміологічних та клінічних досліджень підтвердили роль дефіциту калію в патогенезі есенціальній артеріальній гіпертензії. Зростання вживання калію за таких умов матиме гіпотензивний ефект, зумовлений таким впливом, як пряме розширення судин, посилення барорефлекторна чутливість, зниження серцево-судинної реактивності до норадреналіну чи ангіотензину II, а також підвищений натрійурез [3]. Саме дослідження концентрації натрію в сироватці пацієнтів з інсультом та діабетом було здійснено в подальшому. При цьому оцінка концентрації Na^+ показала тенденцію до зростання даного параметру як у групи пацієнтів з ішемічним інсультом, так і у групи з діабетом. Однак, виявлені відхилення були більш виражені у пацієнтів з ішемічним інсультом і перевищували контроль на 10%, в той час як даний показник у пацієнтів з ішемічним інсультом ускладненим цукровим діабетом перевищував контроль лише на 6% (таб.1). Разом із K^+ іонам натрію притаманні наступні функції: створення умов для формування мембранного потенціалу, підтримання осмотичного, кислотно-лужного та водного балансу організму, забезпечення мембранного транспорту та активація ензимів. Окрім катіонів Na^+ основним елементом позаклітинного середовища є Cl^- , який також є важливим іоном для забезпечення вищезазначених функцій. Не дивлячись, на виявлену нами тенденцію до гіпокаліємії та гіпернатріємії, дослідження вмісту хлору показало певне зниження кількості даного аніону. При чому більш виражене відхилення від контролю зафіксоване за умов II (табл.1).

Отже, в результаті проведених досліджень було встановлено, що ішемічний інсульт, зокрема ускладнений інсуліном незалежним діабетом характеризується гіпопротеїнемією на фоні відсутності статистично достовірних змін у вмісті альбуміну, активності трансаміназ та кількості кінцевих продуктів обміну білків (сечовини та креатиніну) в сироватці крові обох дослідних груп пацієнтів. Іонограма дозволила виявити тенденцію до гіпернатріємії на фоні зниження вмісту іонів калію та хлору в крові пацієнтів з вищезазначеними патологіями. Слід додати, що більш виражені відхилення від контрольних показників були зафіксовані у хворих винятково на ішемічний інсульт, в той же час за наявності гіперглікемії при інсульті у пацієнтів спостерігались ідентичні коливання показників, однак вони були менш вираженими, що, принаймні частково, може бути пояснено вищезгаданим "obesity paradox". Проведені дослідження дозволили встановити також суттєві відмінності значення ІМТ, які супроводжують цукровий діабет 2 типу на фоні ішемічного інсульту.

Список використаної літератури

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Из-во Практика, 1998. – 459 с.
2. Камышников В. С. Методы клинических лабораторных исследований / В. С. Камышников. – М.: Из-во МедПресс-Информ, 2015. – 736 с.
3. Ляшенко Е. А. Роль калия и магния в профилактике инсульта / Е. А. Ляшенко // Русский медицинский журнал. – 2012. – №19. – С. 960.
4. Мохорт Т. В. Цереброваскулярная патология при сахарном диабете / Т. В. Мохорт // Медицинские новости. – 2011. – №6. – С. 15-18.
5. Пашковська Н. В. Гострі порушення мозкового кровообігу у хворих на цукровий діабет / Н. В. Пашковська, В. М. Пашковський // Практична ангіологія. – 2011. – №5-6. – С. 5-14.
6. Скворцов В. В. Инфекции мочевыводящих путей при сахарном диабете / В. В. Скворцов, А. В. Тумаренко, В. В. Капанова // Медлайн-Експресс. – 2008. – №2. – С. 18-23.
7. Торгалло Є. О. Інсульт: фактори ризику та методи лікування / Є. О. Торгалло, Л. І. Остапченко // Фізика живого. – 2010. – Т. 18, №3. – С. 39-41.
8. Carnethon M. Association of weight status with mortality in adults with incident diabetes / M. Carnethon, P. De Chavez, M. Biggs [et al.] // Journal of the American Medical Association. – 2012. – Vol. 308. – P. 581-590. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. Tobias D. Body-mass index and mortality among adults with incident type 2 diabetes / D. Tobias, A. Pan, C. Jackson [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 370. – P. 233-244. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. Vazquez G. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis / G. Vazquez, S. Duval, D. Jacobs, K. Silventoinen // Epidemiologic Reviews. – 2007. – Vol. 29. – P. 115-128. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

References

1. Glantz SA. [Primer of biostatistics]. 4th ed. Moscow: Praktika; 1998. 459 p. Russian.
2. Kamysnikov VS. [Methods of clinical laboratory analysis]. 7th ed. Moscow: MedPress-Inform; 2015. 736 p. Russian.
3. Lyashenko EA. [Role of potassium and magnesium in the prevention of stroke]. Russian Medical Journal. 2012;19:960. Russian.
4. Mokhort TV. [Cerebrovascular pathology in diabetes]. Medical News. 2011;6:15-18. Russian.
5. Pashkovska NV, Pashkovskiy VM. [Acute cerebral blood flow damage in patients with diabetes]. Praktichna Angiologia. 2011;5-6:5-14. Ukrainian.
6. Skvortsov VV, Tumarenko AV, Kaplanov VV. [Urinary tract infections in diabetes]. Medline-Express. 2008;2:18-23. Russian.

7. Torgalo YeO, Ostapchenko LI. [Stroke: factor risk and methods treatment]. Fizyka Zhyvogo. 2010;18:39-41. Ukrainian.
8. Carnethon MR, De Chavez PJ, Biggs ML, Lewis CE, Pankow JS, Bertoni AG, et al. Association of weight status with mortality in adults with incident diabetes. JAMA. 2014;308(6):581-90.
9. Tobias DK, Pan A, Jackson CL, O'Reilly EJ, Ding EL, Willett WC, et al. Body-mass index and mortality among adults with incident type 2 diabetes. N Engl J Med. 2014;370(3):233-44.
10. Vazquez G, Duval S, Jacobs DR Jr, Silventoinen K. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. Epidemiol Rev. 2007;29:115-28.

Надійшла до редколегії 14.06.16

Е.Пажукова, студ., Т. Царенко, асп., М. Тимошенко, канд. биол. наук, О. Кравченко, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА БЕЛКОВ И СОДЕРЖАНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ, ОСЛОЖНЕННОМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ВТОРОГО ТИПА

Одним из общепринятых факторов, сопровождающих нарушения мозгового кровообращения является сахарный диабет. Многочисленные исследования позволили установить, что в патогенезе диабетических церебральных нарушений задействовано множество элементов, важнейшими из которых являются метаболические изменения. Поэтому целью данной работы было определить активность трансаминаз, содержание мочевины, креатинина, ионов K^+ , Na^+ и Cl^- , а также общего белка и альбумина в сыворотке крови пациентов с ишемическим инсультом, а также инсультом, осложненным сахарным диабетом 2-го типа. Кроме этого определялся средний возраст пациентов, индекс массы тела и содержание глюкозы в крови. В результате проведенных исследований установлено, что ишемический инсульт, включая осложненный инсулиннезависимым диабетом, характеризуется гипопроотеинемией на фоне отсутствия выраженных изменений в содержании альбумина, активности трансаминаз и количества конечных продуктов обмена белков (мочевины и креатинина) в сыворотке крови обеих исследуемых групп пациентов. Полученные результаты позволили также выявить значительные отличия в показателях индекса массы тела при условии наличия сахарного диабета у пациентов с ишемическим инсультом.

Ключевые слова: ишемический инсульт, сахарный диабет II типа, аспартат-, аланинаминотрансфераза, мочевина, креатинин, индекс массы тела.

E. Pashukova, stud., T. Tsarenko, PhD stud., M. Tymoshenko, PhD., O. Kravchenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE PROTEIN METABOLISM BIOCHEMICAL PARAMETERS AND ELECTROLYTES LEVELS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE COMPLICATED BY TYPE TWO DIABETES

Diabetes is one of the generally accepted factors of acute cerebral blood flow disorders. Numerous studies have shown the involvement of many factors in the pathogenesis of diabetic cerebral disorders, the most important of which are the metabolic changes. The aim of this study was to determine the transaminase activities, the urea and creatinine, the levels of K^+ , Na^+ and Cl^- ions, the total protein and albumin contents in the serum of patients with ischemic stroke and patients with stroke complicated by type 2 diabetes. Also the average age of the patients, body mass index (BMI) and blood glucose level were determined.

The investigation has shown that patients with ischemic stroke, particularly complicated by insulin independent diabetes, were characterized by hypoproteinemia with the absence of marked changes of albumin content, transaminase activities and the concentrations of end-products of protein metabolism (urea and creatinine) in the serum of both groups patients. The results also have revealed the significant differences of BMI in patients with ischemic stroke accompanied by type 2 diabetes.

Key words: ischemic stroke, type 2 diabetes, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, urea, creatinine, body mass index.

UDK 575.224+578.832.1

L. Radchenko, PhD stud., A. Fesenko, GS, A. Mironenko, MD
SI "Gromashevsky L.V. Institute of epidemiology and infectious diseases, Kyiv, Ukraine,
O. Smutko, stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

COMPARATIVE ANALYSIS OF MUTATIONS IN INFLUENZA VIRUSES GENES – HA AND NA, ISOLATED DURING 2012-2015 YEARS

The article presents results of genetic analysis of influenza viruses genes – hemagglutinin and neuraminidase, isolated in Ukraine in 2012-2015 years. Influenza viruses had mutations observed during all investigated epidemic seasons and acquired new substitutions, which were saved in next years or not consolidated.

Key words: hemagglutinin, neuraminidase, substitution, isolate.

Introduction. Influenza viruses are members of the viral family *Orthomyxoviridae* and have a segmented, single-stranded, and negative-sense RNA genome in an enveloped virion. The genome encodes envelope glycoproteins, matrix proteins, nonstructural proteins, nucleoproteins, and polymerase proteins. According to the antigenic properties of matrix proteins or nucleoproteins, influenza viruses are classified into types A, B, C, Isavirus and Togotavirus [1]. Influenza A viruses cause epidemics and pandemics of influenza in mammals and birds, and aquatic birds are known to be the natural reservoir of these viruses. Influenza B and C viruses are isolated mainly from humans and are less pathogenic than influenza A viruses.

Influenza viruses have high level of mutations caused by errors of polymerase. Amino acid substitutions in the hemagglutinin protein can result in escape from neutralizing antibodies, affect viral fitness, and change receptor preference. Severity and course of influenza illness associated with point substitutions in surface proteins – HA and NA, which leads to changes in the properties of viruses [2].

The aim of our work was to analyze variability of influenza viruses type A: A(H1N1)pdm09 and A(H3N2); and influenza viruses type B, lineage B/Yamagata, isolated during 2012-2015 years.

Materials and methods. Nasal-throat swabs taken from influenza-affected patients from different regions of Ukraine, collected during 2012-2015 years, were used in the study. Samples were analyzed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Influenza viruses were isolated in MDCK and MDCK-SIAT cell culture.

Sequencing of influenza viruses genes, isolated in our laboratory, was performed in the World Influenza Center in London using the technology of RNA-SEQ, which allows sequencing coding and noncoding mRNA. Nucleotide sequences were translated into amino acid sequences using MEGA 6 software [3].

Results and discussion. Influenza viruses type A: A(H1N1)pdm09 and A(H3N2); and influenza viruses type B, lineage B/Yamagata were circulated during 2012-2013, 2013-2014 and 2014-2015 seasons.

Characterization of mutations of influenza viruses type A(H1N1)pdm09.

Influenza viruses A(H1N1)pdm09 spread worldwide, and they belong to eight genetic groups. Viruses collected in Ukraine included in the genetic subgroup 6B [4].

Most of mutations, like D97N, P83S, S203T, emerged in sequences HA and NA gene in 2009 year, were saved in viruses and were observed for the next seasons (table 1).

Table 1. Amino acid substitutions in HA and NA proteins of influenza A (H1N1)pdm09 viruses

Gene Season	HA			NA		
	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2012-2013	2013-2014	2014-2015
Substitutions	P83S, S203T, I321V	P83S, S203T, I321V	P83S, S203T, I321V	V106I, N248D	V106I, N248D	V106I, N248D
	S185T, S451N	S185T, S451N	S185T, S451N	V241I, N369K, N44S, I106V, N200S	V241I, N369K, N44S, I106V, N200S	V241I, N369K, N44S, I106V, N200S
	D97N	D97N	D97N	–	I34V, I321V, K432E	I34V, I321V, K432E
	K283E, E499K	K283E, E499K	K283E, E499K	N386S	N386K	N386K
	–	K163Q, A256T	K163Q, A256T	–	–	I117M, I365T
	A256T	–	–	–	–	I396M
Single substitutions in Ukrainian isolates	K22R, L44I, K146N, S183P, K160N	T474M, I510V	S84N, D94N, R205K	V83A, R220K, D416N	–	P93H, P198S, H275Y

The substitution S203T considered to be one of the first substitution in the HA molecule, registered in the world. It is not a fundamental change in the structure of the protein

molecule. However, viruses with threonine at position 203 HA1 have some selective advantage in the human population [5], that contributes to the fixing of this mutation (Fig.1).

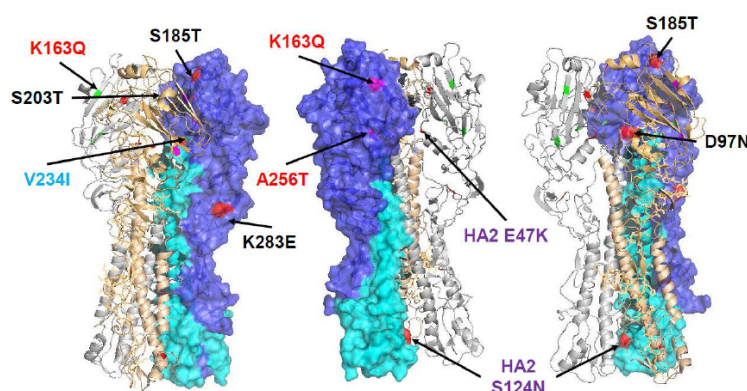


Figure 1. Locations of amino acid substitutions in the structure of influenza A(H1N1)pdm09 virus HA

According to data, proline in position 83 was replaced on serine, this substitution has been registered in the world later. This replacement related with pressure of immune response [6].

Group of viruses, which selected substitutions K283E and E499K, became the most widespread in the world. The amino acid substitutions located outside the known antigenic sites and away from the receptor-binding site. E499K substitution located in HA2 region, this may indicate a continuous process variability of the pathogen. This related with escape from neutralizing antibodies and fixing mutations, which give selective advantage for the

functioning of surface protein, that determines the infectivity of the virus [4].

The only one Ukrainian isolate had the substitution A256T in 2012-2013 season, but all Ukrainian isolates had this mutation in 2014-2015 season.

Interesting that substitution K163Q (that was observed around the world) was selected by Ukrainian isolates only in 2013-2014 season and was detected in the next season.

Point substitutions L44I, T474M, D94N are observed in Ukrainian influenza viruses HA gene every year.

All influenza A(H1N1)pdm09 viruses, since 2009 year, had two major mutations in NA gene – V106I та N248D,

that founded in all cases with the substitution S203T in HA genes. This changes located in regions are not related to direct catalytic properties of the enzyme or antigenic sites, but they were observed in all the viruses of studied seasons [7].

Amino acid residue 241 located in the middle of the NA molecule, remotely from the active site of the enzyme, while the 369 position refers to antigenically-significant region.

The Ukrainian isolates had replacement of asparagine on serine in the 386 position in 2012-2013 season, but asparagine changed for lysine in this position in 2013-2014 years. This substitution was observed in the next epidemic season.

Substitutions I117M, I365T and I396M weren't founded in Ukrainian isolates in 2012-2013 and 2013-2014 epidemic season, but were selected in 2014-2015 years.

In 2014-2015 epidemic season one Ukrainian isolate had substitution H275Y, which causes resistance to oseltamivir.

Also, point substitutions – V83A, P93H, P198S, were observed in sequences NA gene during all seasons.

Characterization of mutations of influenza viruses type A(H3N2)

There are 7 genetic groups of influenza A(H3N2) viruses today, but only 3 of them are circulating around the world [4].

Group 3 divided into 3A, 3B, 3C subgroups according to different amino acid substitutions. Subgroup 3C is the most widespread, since 2013 year. Substitution S45N characteristics viruses from this subgroup, resulting in the gain of a potential glycosylation site (table 2).

Table 2. Amino acid substitutions in HA and NA proteins of influenza A (H3N2) viruses

Gene	HA			NA		
Season	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2012-2013	2013-2014	2014-2015
Substitutions	K62E, – T212A, S214I	K62E, K144N, L183H, T212A, S214I	K62E, K144N, L183H, T212A, S214I	S367N, K369T, I464L	S367N, K369T –	S367N, K369T, I464L
	S45N, T48I	S45N, T48I	S45N, T48I	L81P, N402D	L81P, N402D	L81P, N402D
	Q33R, N278K, N145S	Q33R, N278K, N145S	Q33R, N278K, N145S	D93G	D93G	D93G
	–	R142G	R142G	E221D, T238A, S416N	E221D	–
	–	L157S	L157S	I62V	–	–
	D489N	D489N	D489N	–	V412I, I392T	– I392T
	–	A530V	–	–	Y155F, D251V, S315G	–
	–	I214T	–	–	I312T	–
	–	N122D, V529I	–	–	–	–
	–	L3I	L3I, N144S, F159Y	–	–	T267K, I380V
Single substitutions in Ukrainian isolates	–	K27R, A128V, I140M, V402I	Q75H, N171K, R261Q	N86D	Q5K, S44P, P45S, P99A, T434I	I30V, F37L, A82S, I392M, V396I

All investigated isolates from Ukraine and other countries had several common amino acid substitutions, characteristic A/Victoria/208/2010 cluster, like K62E, T212A and S214I. Also Ukrainian isolates selected substitutions K144N (lysine placed on asparagine) and L183H (leucine placed on histidine) since 2013-2014 years, which observed in the next epidemic season.

During all three seasons the group of mutations Q33R, N278K, N145S was observed, resulting in the gain of potential glycosylation sites [4].

It should be noted, that new mutation R142G have been observed in part of Ukrainian isolates since 2013-2014. This mutation led to change of amino acid residue charge(Fig.2).

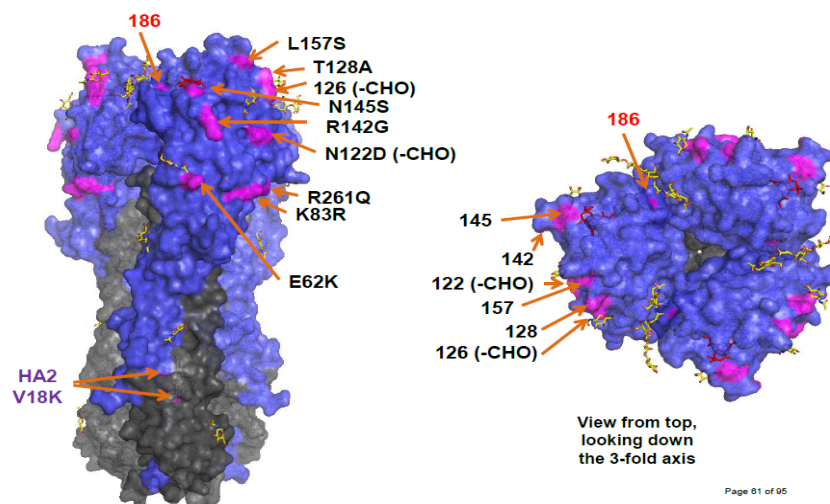


Figure 2. Locations of amino acid substitutions in the structure of influenza A(H3N2) virus HA

Amino acid substitutions A530V, I214T, N122D and V529I in Ukrainian isolates and isolates from other countries were observed only in 2013-2014 season.

Division of viruses on genetic groups on neuraminidase gene happened in the same way, as on gene of hemagglutinine. In 2012-2013 season Ukrainian isolates belonged to two subclusters 3A and 3C, but since 2013-2014 season only 3C group isolates have circulated and were divided into two subgroups.

Double substitution – S367N and K369T was observed among all investigated isolates, resulting in the loss of a potential glycosylation site at residue 367. Other glycosylation sites were lost at residue 402 (N402D). Substitutions L81P and D93G were attended during three seasons [4].

Substitutions E221D, T238A, S416N and I62V were selected during 2012-2013 epidemic season, but weren't observed in the next season. Only substitution E221D (glutamate placed on aspartate) was observed in the 2013-2014 epidemic season.

In the 2013-2014 season substitutions Y155F, D251V, S315G and I312T were presented and weren't fixed in influenza virus isolate in the next season.

Point substitutions T267K, I380V, M51V also were selected in 2014-2015 epidemic season, and have not been previously detected in Ukrainian isolates.

Characterization of mutations of influenza viruses type B/Yamagata

Influenza B viruses of the B/Yamagata lineage were divided into genetic groups within a cluster B/Bangladesh/3333 (B/Yamagata – lineage) and B/Brisbane/60 (B/Victoria – lineage) depending on amino acid substitutions, that define these groups, in the period from 2010 to 2012 years [8].

Influenza B viruses of the B/Yamagata lineage divided into two clusters – B/Wisconsin/01 and B/Massachusetts/02, in 2012-2013 influenza season, which had different substitutions (table 3).

Table 3. Amino acid substitutions in HA and NA proteins of influenza B/Yamagata viruses

Gene	HA			NA		
Season	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2012-2013	2013-2014	2014-2015
Substitutions	K88R, D196N	K88R, D196N	K88R, D196N	I248E, T106I, S295R	– – –	– – –
	R48K, P108A, T181A	– – –	– – –	Q42R, A68T, T125K, D463N	Q42R, A68T, T125K, D463N	Q42R, A68T, T125K, D463N
	– – S150I, N165Y G229D	– – S150I, N165Y, S229D	K48R, A108P, S150I, N165Y, S229D	– – – –	I45V, I49T, S295R, E320D, K343E	I45V, I49T, S295R, E320K, K343E
	– –	N202S, N116K	N202S, N116K	–	–	D384G
	K298E, E312K	K298E, E312K	K298E, E312K	V422I	–	–
	–	M251V	M251V			
	–	–	L172Q			
	Single substitutions in Ukrainian isolates	T75N, N116K, D163N, N164S, M251L	–	A500T	C54Y, A68E, P67S, I262M, I396E	–

Today influenza B viruses are divided into three genetic groups on phylogenetic characteristics [4].

All investigated influenza virus isolates belonged only to genetic lineage B/Yamagata during 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015 epidemic seasons. Isolates of both genetic lineage B/Yamagata and B/Victoria were circulated in previous seasons. Ukrainian isolates were belonged to two clusters – B/Wisconsin/01 and B/Massachusetts/02 in 2012-2013 epidemic season. Influenza B viruses cluster B/Massachusetts/02 weren't observed in Ukraine since 2013-2014 years.

Only influenza B viruses cluster B/Wisconsin/01 were circulated during 2013-2014 and 2014-2015 epidemic seasons.

Influenza viruses HA gene had substitution D196N (aspartic acid placed on asparagine), resulting in the gain of a potential glycosylation site. This substitution was presented during all three investigated epidemic season.

Influenza B viruses cluster B/Massachusetts/02 selected mutations, specific for this group of viruses – R48K, P108A, T181A, K298E, E312K in 2012-2013 epidemic season. In the next season viruses of this cluster weren't observed. Also influenza B viruses B/Wisconsin/01 were circulated in 2012-2013 and 2014-2015 seasons and had common substitutions – S150I, N165Y. They selected one more common substitution – S229D (serine placed on

aspartic acid) in 2013-2014 epidemic season, and K48R, A108P in the 2014-2015 years.

Common substitutions N202S, N116K, M251V have been selected by viruses of cluster B/Wisconsin/01 since 2013 for 2015 years (Fig.3).

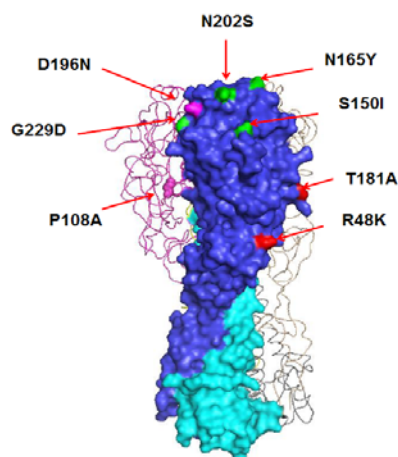


Figure 3. Locations of amino acid substitutions in the structure of influenza B/Yamagata virus HA

In 2014-2015 season new point substitution L172Q was selected by Ukrainian isolates (leucine placed on glutamine)

The sequences NA gene had amino acid substitutions I248E, T106I, S295R, characterizing cluster B/Massachusetts/02, which circulated in 2012-2013 years.

Influenza B viruses cluster B/Wisconsin/01 were circulated during all 3 seasons and had a lot of common substitutions – Q42R, A68T, T125K, D463N.

One Ukrainian isolate selected more than 20 point substitutions in 2013-2014 years and part of them was observed in the next epidemic season, like I45V, I49T, S295R, E320K, K343E. Also part of Ukrainian isolates had substitution D384G (aspartic acid placed on glycine) in 2014-2015 epidemic season.

Conclusions.

A large number of unique amino acid substitutions were observed by sequencing in influenza viruses sequences HA and NA gene, which hadn't affect the antigenic or other functional regions. Some of these mutations occurred in particular as a result of cultivation in cell culture, and many of them have still not deciphered.

As result of our studies was observed only one Ukrainian isolate with substitution, which led to the emergence of resistance to antiviral drugs.

Список використаної літератури

1. King M.Q. Virus Taxonomy / M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens // Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic Press. – 2011. – P.749–75.
2. Dawood F.S. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans / F.S. Dawood, S. Jain, L. Finelli, M.W. Shaw, S. Lindstrom, R.J. Garten [et al.] // N Engl J Med. – 2009. – Vol.360. – P.2605–2615.
3. Tamura K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. // Mol Biol Evol. – 2011. – Vol.28, №10. – P.2731–2739.

Л. Радченко, асп., А. Фесенко, млад. науч. сотр., А. Міроненко, д-р мед. наук
ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В.Громашевського, НАМН України", Київ,
О. Смутко, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МУТАЦІЙ В ГЕНАХ НА ТА НА ВІРУСІВ ГРИПУ, ВИДІЛЕНИХ ПРОТЯГОМ 2012-2015 РОКІВ

В статті представлені результати генетичного аналізу генів вірусів грипу – гемаглютиніну та нейрамінідази, виділених в Україні в 2012-2015 роках. Віруси грипу мали мутації, які спостерігалися протягом всіх досліджуваних епідемічних сезонів та набули нових мутацій, які зберігалися протягом наступних років або не закріпились.

Ключові слова: гемаглютинін, нейрамінідаза, заміна, ізолят.

Л. Радченко, асп., А. Фесенко, млад. науч. сотр., А. Міроненко, д-р мед. наук
Государственное Учреждение "Институт эпидемиологии
и инфекционных заболеваний имени Л.В. Громашевского, НАМН Украины", Киев, Украина,
О. Смутко, студ.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ ВИРУСОВ ГРИППА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ПРОТЯЖЕНИИ 2012-2015 ГОДОВ

В статье представлены результаты генетического анализа генов вирусов гриппа – гемагглютинина и нейраминидазы, выделенных в Украине в 2012-2015 годах. Вирусы гриппа имели мутации, которые наблюдались на протяжении всех исследуемых эпидемических сезонов и приобрели новые мутации, которые сохранились на протяжении следующих годов или не закрепились.

Ключевые слова: гемагглютинин, нейраминидаза, замещение, изолят.

4. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report. 2014:1-95.
5. Koel B.F. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution / B.F. Koel, D.F. Burke, T.M. Bestebroer, G.C. Zondag, G. Vervaeke [et al.] // Science. – 2013. – Vol.342. – P.976–979.
6. Nelson M. The evolution of epidemic influenza / M. Nelson, E. Holmes // Nature. – 2007. – Vol.8. – P.196–205.
7. Lin P. Recent changes among human influenza viruses / P. Lin, V. Gregory, M. Bennett, A. Hay // Virus Res. – 2004. – Vol.103. – P.47–52.
8. Leibenko L. Phylogenetic analysis of B/Victoria – like influenza viruses isolated in 2008 – 2012 in Ukraine / L. Leibenko, S. Babii, L. Radchenko, O. Smutko. // The Journal of Taras Shevchenko National University of Kiev, Series: biology. – 2013. – Vol.3, №65. – P.37–42.

References

1. King M.Q, Adams M.J, Carstens E.B. Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic Press. 2011: 749–758.
2. Dawood F.S, Jain S, Finelli L, Shaw M.W, Lindstrom S, Garten R.J, Gubareva L.V, Xu X, Bridges C.B., Uyeki T.M. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N Engl J Med. 2009;360:2605–2615.
3. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol Evol. 2011;28(10):2731–2739.
4. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report. 2014:1-95.
5. Koel B.F, Burke D.F, Bestebroer T.M, van der Vliet S, Zondag G.C, Vervaeke G, Skepner E, Lewis N.S, Spronken M.I, Russell C.A, Eropkin M.Y, Hurt A. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. Science. 2013;342:976–979.
6. Nelson M, Holmes E. The evolution of epidemic influenza. Nature. 2007;8:P.196–205.
7. Lin P, Gregory V, Bennett M, Hay A. Recent changes among human influenza viruses. Virus Res. 2004;103: 47–52.
8. Leibenko L, Babii S, Radchenko L, Smutko O. Phylogenetic analysis of B/Victoria – like influenza viruses isolated in 2008 – 2012 in Ukraine. The Journal of Taras Shevchenko National University of Kiev, Series: biology. 2013;3(65):37–42.

Надійшла до редколегії 14.06.16

DETERGENT-STABLE PROTEASES FROM THE ANTARCTIC SCALLOP *ADAMUSSIUM COLBECKI*

Detergent-stable proteases were found in crude extract of the Antarctic scallop Adamussium colbecki. The results of gelatin zymography indicated the availability of the proteases which able to act in the presence of SDS, whereas plasmin and miniplasmin maintained their activity toward gelatin only after complete removing of detergent. Total proteolytic activity, represented by casein hydrolysis was within the control level after incubation of crude extract with detergents such as Tween 80 and SDS whereas trypsin activity was significantly reduced.

Keywords: marine hydrobiont *Adamussium colbecki*, SDS, Tween 80, ethanol, total proteolytic activity.

Introduction. Proteases are an unique class of enzymes, since they have immense physiological as well as commercial importance. They possess both degradative and synthetic properties. Enzyme-catalyzed reactions play important roles in various industrial processes and proteases represent one of the three largest groups of industrial enzymes. They have extensive applications in a range of industrial and household products including detergents, food, leather, silk, pharmaceuticals industries and bioremediation processes [13, 7]. Proteases are also useful and important components of biopharmaceutical products such as enzyme contact-lens cleaners and enzymatic debriders [6, 2]. Proteolytic enzymes also offer a gentle and selective debridement, supporting the natural healing process in the successful local management of skin ulcerations by the efficient removal of the necrotic material. The demand for industrial enzymes progressively increased during the last decades. It includes the quantity of enzyme protein as well as the quality and purity of enzyme preparations.

Since proteases are physiologically necessary, they occur ubiquitously in animals, plants, and microbes. The enzymes can be obtained from various sources and the nature of the source provides the availability, the cost, the ease of recovery and other factors. For this reason many investigators have focused their attention on marine organisms, which have a significant potential of delivering valuable enzymes. It should be noted that in response to environmental factors like salinity of ocean waters, low light or its absence, high pressure, low temperature marine organisms and particularly hydrobionts from the Antarctic region have developed highly specialized biochemical adaptations. It provides not only considerable structural and functional diversity of marine hydrobionts biologically active compounds but also the presence of enzymes with unique structures and activities. So, proteases from cold-water organisms possess greater proteolytic activity toward native protein substrates, lower activation energy for catalysis and often have higher catalytic activity at very low temperatures, e.g. 4°C, compared with proteases from warm-blooded animals [11, 5]. Despite indisputable practical interest, cold-active enzymes also represent a valuable model for fundamental researches of protein folding and catalysis.

Many industrial applications of proteases require enzymes with properties that are non physiological. For example enzymes stable in organic solvents and/or detergents are of special interest for industrial applications [12]. Reports on a few enzymes that are naturally stable and also exhibit high activities in the presence of organic solvent have emerged recently [3].

In recent years, special attention has been paid to hydrobionts from the Antarctic region which are poorly explored and potentially could be a valuable source of new bioactive compounds. We have chosen for our study the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. This hydrobiont is one of the most common bivalves in Antarctica which is widely spread not only along the coast, but also can be

found at depths from 3 to nearly 1500 meters down into the ocean [14]. In our work we examined *A. colbecki* for the presence proteases stable in detergents and solvents.

Materials and methods. The specimens of *A. colbecki* (n = 35) were collected near the island Galindez (geographical coordinates – 65°15' south latitude, 64°15' west longitude) of Argentine Islands archipelago. The materials were collected by the XVII, XVIII Ukrainian Antarctic expeditions on March 2012 – April 2013, March 2013 – April 2014, respectively. After collection the scallops were immediately frozen in liquid nitrogen to prevent enzyme deterioration and stored at -80°C. The samples were brought to the laboratory frozen. The mass of hydrobiont was measured and the samples were homogenized with sequential addition of liquid nitrogen and extraction buffer – 0.1 M Na-phosphate buffer containing 0.15 M NaCl, 0.15 mM EDTA, 2 mM PMSF and 0.1% Triton X-100, pH 7.4. Samples were homogenized using blender (Braun, Germany) for 5 min and then centrifuged (Allegra 64 R Centrifuge, Beckman Coulter, USA) at 10 000 g for 60 min at 4°C. The resulting supernatant either used immediately or lyophilized. Thus obtained primary material can be stored for a long time at a temperature of -20°C without losing the functional properties of proteins and peptides.

Protein quantitation. Protein concentration was determined according to the method of Bradford [1], using bovine serum albumin as the standard protein and measuring the absorbance at 595 nm.

Zymography assay. Zymography was carried out according to the method [10]. The separating gel solution (12 %, w/v) was polymerized in the presence of gelatin (1 mg/ml). Samples for zymography were dissolved in the standard SDS-PAGE buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% (v/v) glycerol, and 0.002% bromophenol blue) under non-reducing conditions (no boiling and no reducing agents). After electrophoresis, the gels were soaked in 2.5% Triton X-100 solution with shaking for 30 min at 25°C for SDS removal. The gels were washed with distilled water for 10 min to remove Triton X-100 and then incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at room temperature for 24 h. The gels were stained according to standard protocol for electrophoresis. Areas of gelatin hydrolysis were visualized as cleared areas on a Coomassie stained background of the zymograms. Represented zymograms were typical for the series of repeated experiments.

Total proteolytic activity assay. The protease activity was assayed spectrophotometrically according to the method [8]. The reaction was carried out in a reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% (w/v) casein and 75 µg protein. After 30 min incubation at 37°C the reaction was stopped by adding 9% (v/v) TCA solution followed by 10 min incubation at room temperature and centrifugation (15000 x g, 30 min). The absorbance of the soluble peptides (supernatant) was measured at 280 nm. One unit of the enzyme activity was

defined as the amount of enzyme which releases 1 μmol of tyrosine per min under the assay conditions.

Effect of SDS, Tween 80 and ethanol on protease activity. Protease activity against solvent such as ethanol or detergents (SDS and Tween 80) was determined using casein as substrate. Ethanol (25%, 50%), SDS (1%, 5%), Tween 80 (5%, 20%) was added to the probes containing 75 μg protein and incubated at 37°C with shaking at 150 rpm for 30 min. At the end of the incubation period, residual protease activity was measured by the spectrophotometric method under standard assay conditions (see above) and compared with the activity of the enzyme in the absence of detergent. All the reactions were performed in triplicate.

Results were expressed as means $\pm$ SD. The difference between groups was analyzed by standard Student's *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion. Organic solvents can be advantageous in various industrial enzymatic processes, e.g. the reaction media used in biocatalytic esterification and trans-esterification contains less than 1% water. The use of organic solvents can increase the solubility of non-polar substrates, enhance the thermal stability of enzymes, decrease water-dependent side reactions, or eliminate microbial contamination. For today only few proteases, stable in organic solvent have been purified. Low activity of these enzymes in solvents/detergents can be explained by their partial denaturation, reduced flexibility and limited dispersion of enzymes. Therefore the search for enzymes which are active in the presence of organic solvents or/and detergents will be very useful for biochemical studies as well as for industrial purposes. In recent years, interest in studying of hydrobionts from the Antarctic region has

increased significantly because these organisms are characterized by considerable structural and functional diversity of biologically active compounds, and the presence of enzymes with unique structures and activities. These features, as well as economic profitability, high reproducibility and abundance of marine hydrobionts allowed considering them as a promising source of enzymes for industrial applications, such as the food and detergent industries.

At the first stage of our work we tested crude extract of *A. colbecki* for the enzymes stable in the presence of ionic detergent SDS. For this purpose zymography method was applied. Zymography technique was described as a simple, sensitive, quantifiable and functional assay to analyze active enzymes in biological samples. To assess the enzymatic activity by zymography technique, solution of 12% polyacrylamide can be copolymerized with different high molecular weight substrates, such as starch for identification of amylase activity, and protein substrates, such as gelatin, casein, and collagen, for revealing protease activity. Analyzed extract of *A. colbecki* was submitted to zymography with gelatin (1 mg/ml) as substrate. After electrophoretic separation, the gels were divided into two parts; one part was washed with Triton X-100 and another one used without washing for zymography. It should be noted that at this stage washing in Triton X-100 is necessary for SDS removal. Clear areas on dark background were considered as protease active bands.

In accordance with the results of our experiment, it was found that the proteases of *A. colbecki* able to act in the presence of SDS.

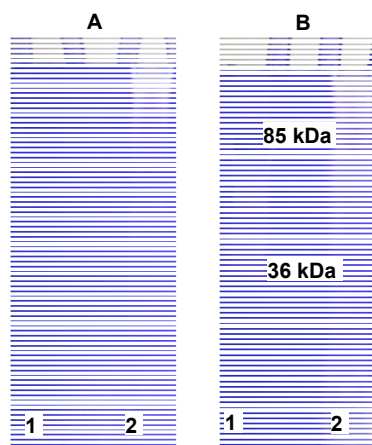


Fig. 1. Typical gelatin zymogram of crude extracts of *A. colbecki* without washing with Triton X-100 (A) and under washing with Triton X-100 (B): 1 – molecular weight markers (36 kDa – miniplasmin, 85 kDa – plasmin); 2 – crude extract of *A. colbecki*

So, we showed that the proteases from crude extracts of *A. colbecki* retained their activities after electrophoresis without washing in Triton X-100 (Fig. 1A). Three clear areas were detected at zymogram in this case. To establish the exact molecular weights of identified proteases zymogram was calculated using TotalLab 2.04 program. According to obtained results the molecular weights of these enzymes were estimated about 24, 40 and 53 kDa. In additional significant proteolytic active zone was found at the top of the track. But after gels washing with Triton X-100 clear bands were more visible and proteolytic activities were localized over the whole length of the track (Fig. 1B).

In contrast, plasmin and miniplasmin used as controls maintained their activity toward gelatin only after washing

gel with Triton X-100 (Fig. 1B). No clear areas were found in the presence of SDS but complete removing of detergent resulted in resumption of enzymatic activity.

Based on obtained results the next goal of our work was to estimate total proteolytic activity in crude extract of *A. colbecki* under incubation with detergents/solvent. As we known detergents are routinely incorporated into protein formulations to solubilize hydrophobic proteins or to act as chaotropic agents to prevent protein aggregation. But their usage in high concentrations may produce protein denaturation by means of their interaction with hydrophobic and hydrophilic regions of the proteins.

Partial characterization of crude extract of *A. colbecki*, without any purification, suggested the

existence of enzymes active in the presence of detergents Tween 80 and SDS. As shown in Table 1 the proteases from crude extract of *A. colbecki* had ability to act at different concentration of Tween 80 in reaction system. So, the incubation with 5% Tween 80 increased total proteolytic activity in extract of *A. colbecki* in 1.2 times whereas under incubation with 20% Tween 80 the proteolytic activity was within the control value. It should

be noted that the incubation of the pure trypsin with Tween 80 at different concentrations caused a significant decrease of enzyme activity. According to obtained results trypsin activity was decreased in 1.8 times compared to the control in the presence of 5% detergent. Higher concentration (20%) of Tween 80 caused a further reduction of proteolytic activity in 2 times.

Table 1. Proteolytic activity under incubation with detergents/solvent

	Trypsin	Crude extract of <i>A. colbecki</i>
	Units/mg protein	
Total proteolytic activity	425.7±6.5	12.8±0.8
5% Tween 80	236.5±3.7*	15.4±1.2*
20% Tween 80	203.5±3.1*	12.3±1.0
1% SDS	no activity	12.2±1.1
5% SDS	no activity	11.8±0.75
25% Ethanol	430.3±5.0	1.56±0.57*
50% Ethanol	239.7±4.2*	no activity

Data are shown as the means ± SD

* – $p < 0.05$ in compare with total proteolytic activity

Enzymes of *A. colbecki* studied in this work maintained stability in the presence of strong ionic surfactant SDS assayed at concentration of 1% and 5% for 30 min. This fact is very interesting and promising because SDS-stable enzymes are not generally available except for some enzymes isolated from microbial source [4]. The total proteolytic activity was not significantly affected by 1% SDS, retaining 95.7% of the initial activity, although total proteolytic activity was decreased slightly (in 1.08 times) when SDS concentration was raised to 5%. Surprisingly, but activity of trypsin in the presence of SDS at different concentrations was found to be strongly inhibited by this detergent. Such result was similar to result of zymography.

So, our results demonstrated stability of the proteases from *A. colbecki* against denaturation or unfolding in the presence of analyzed detergents. The nature of this stability is unclear, but it may be explained by the presence of disulfide bonds which according to [9] are essential for stability of the proteins against detergents. On the other hand detergents can also bind to proteins and induce structural changes that for 5% Tween 80 appear to be stimulatory.

Enzymes stable in organic solvents have been intensively investigated because they have several industrial applications in addition to their using in classic detergent formulations.

Our studies of the stability of *A. colbecki* proteases in ethanol represented at Table 1 too. According to obtained results total proteolytic activity in crude extract of *A. colbecki* decreased in 8.3 times of initial value in case of incubation with 25% ethanol. Further increasing of ethanol concentration to 50% caused a continuous reduction of activity – no proteolytic activity was found at this concentration. Trypsin activity, in contrast, was not strongly inhibited by ethanol. The enzyme was highly stable in the presence of 25% ethanol, showing the retaining of the proteolytic activity at the control level. But preincubation of trypsin with 50% ethanol resulted in decreasing its activity in 1.8 times.

Ethanol-mediated reduction of enzymatic activity may be due to unfolding, structural disfunctioning and stripping of the essential water layer from the enzyme molecule. The presence of organic solvent alters the catalytic process of enzyme by disruption of hydrogen bonds and hydrophobic interactions as well as changes in the dynamics and conformation of the proteins.

Summarizing, the results obtained in this work indicated that the proteases from the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* were quite stable in the presence of detergents such as Tween 80, SDS and unstable in the presence of ethanol. Further studies on purification and detail characterization of proteases from *A. colbecki* as well as analysis of other hydrobionts from the Antarctic region on the presence of detergent stable enzymes are necessary and will undoubtedly be carried out.

Acknowledgment

This research was supported by National Antarctic Scientific Center of Ukraine Ministry of Education and Science of Ukraine.

Список використаної літератури

- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M.M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 86. – P. 193–200.
- Fuchise T. Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis / T. Fuchise, H. Sekizaki, H. Kishimura [et al.] // Journal of Amino Acids. – 2014. – Vol. 8. – P. 1–8.
- Gupta A. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA / A. Gupta, I. Roy, S.K. Khare [et al.] // J Chromatogr A. – 2005. – Vol. 1069. – P. 155–61.
- Joo H.S. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties / H.S. Joo, C.G. Kumar, G.C. Park [et al.] // J Appl Microbiol. – 2003. – Vol. 95. – P. 267–72.
- Karan K. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity / K. Karan, M.D. Capes, S. DasSarma // Aquatic Biosystems. – 2012. – Vol. 8. – P. 1–15.
- Klomklao S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications / S. Klomklao // Songklanakarin J. Sci. Technology. – 2008. – Vol. 30, № 1. – P. 37–46.
- Li Q. Commercial Proteases: Present and future / Q. Li, L. Yi, P. Marek, B.L. Inverson // FEBS Lett. – 2013. – Vol. 587. – P. 1155–1163.
- Munilla-Moran R. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.) / R. Munilla-Moran, J.R. Stark // Aquaculture. – 1989. – Vol. 8. – P. 315–327.
- Ogino H. Role of intermolecular disulfide bonds of the organic solvent-stable PST-01 protease in its organic solvent stability / H. Ogino, T. Uchiho, J. Yokoo [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67(2). – P. 942–947.
- Ostapchenko L. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of hemostasis system / L. Ostapchenko, O. Savchuk, N. Burlova-Vasilieva // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2011. – Vol. 2. P. 20–26.
- Peck L.S. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species / L.S. Peck, K.E. Webb, D.M. Bailey // Functional Ecology. – 2004. – Vol. 18. – P. 625–630.
- Rai S.K. Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04 / S.K. Rai, A.K. Mukherjee // Bioresour. Technol. – 2009. – Vol. 100. – P. 2642–2645.

13. Sawant R. Protease: an enzyme with multiple industrial / R. Sawant, S. Nagendran // World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Vol. 3, № 6. – P. 568-579.
14. Schiaparellia S. A reassessment of the distribution of the common Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Smith, 1902) / S. Schiaparellia, K. Linseb // Deep-Sea Research II. – 2006. – Vol. 53. – P. 912–920.

References

1. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding. Analytical Biochemistry. 1976;86:193–200.
2. Fuchise T, Sekizaki H, Kishimura H, et al. Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis. Journal of Amino Acids. 2014; 8:1–8.
3. Gupta A, Roy I, Khare SK, et al. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. Journal of Chromatogr A. 2005;1069:155–161.
4. Joo HS, Kumar CG, Park GC, et al. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. J Appl Microbiol. 2003;95:267–72.
5. Karan K, Capes MD, DasSarma S. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. Aquatic Biosystems. 2012;8:1-15.
6. Klomklo S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin Journal of Sci. Technology. 2008;30(1):37–46.

7. Li Q, Yi L, Marek P, Inverson BL. Commercial Proteases: Present and future. FEBS Lett. 2013;587:1155-1163.
8. Munilla-Moran R, Stark JR. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). Aquaculture. 1989;8:315–327.
9. Ogino H, Uchiho T, Yokoo J, et al. Role of intermolecular disulfide bonds of the organic solvent-stable PST-01 protease in its organic solvent stability. Applied and Environmental Microbiology. 2001;67(2): 942-947.
10. Ostapchenko L, Savchuk O, Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of hemostasis system. Advances in Bioscience and Biotechnology. 2011;2:20–26.
11. Peck LS, Webb KE, Bailey DM. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. Functional Ecology. 2004;18:625–630.
12. Rai SK, Mukherjee AK. Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04. Bioresour. Technol. 2009;100:2642–2645.
13. Sawant R, Nagendran S. Protease: an enzyme with multiple industrial. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;3(6):568-579.
14. Schiaparellia S, Linseb K. A reassessment of the distribution of the common Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Smith, 1902). Deep-Sea Research II. 2006;53:912–920.

Надійшла до редколегії 11.05.16

Н. Ракша, канд. біол. наук, Д. Гладун, асп.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,

ДЕТЕРГЕНТ-СТІЙКІ ПРОТЕІНАЗИ АНТАРКТИЧНОГО ГРЕБІНЦЯ *ADAMUSSIUM COLBECKI*

Показано, що екстракт тканин Антарктичного морського гребінця *Adamussium colbecki* містить протеїнази стійкі до дії ряду детергентів. Результати ензим-електрофорезу з використанням як субстрату желатину свідчать про наявність ферментів, що зберігають активність за присутності SDS, в той час як активність плазміну і мініплазміну реєструвалася лише після повного його видалення. Загальна протеолітична активність, яку оцінювали за ступенем гідролізу казеїну після інкубації екстракту тканин *A. colbecki* з детергентами Tween 80 і SDS, зберігалася на рівні контролю, тоді як активність трипсину за аналогічних умов інкубації значно знижувалася.

Ключові слова: морський гідробіонт *Adamussium colbecki*, SDS, Tween 80, етанол, загальна протеолітична активність.

Н. Ракша, канд. біол. наук, Д. Гладун, асп.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ДЕТЕРГЕНТ-УСТОЙЧИВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ АНТАРКТИЧЕСКОГО ГРЕБЕШКА *ADAMUSSIUM COLBECKI*

Показано, что экстракт тканей Антарктического гребешка *Adamussium colbecki* содержит протеиназы устойчивые к действию ряда детергентов. Результаты энзим-электрофореза с использованием как субстрата желатина свидетельствуют о наличии ферментов, сохраняющих активность в присутствии SDS, в то время как плазмин и миниплазмин сохраняли активность только после полного удаления детергента. Общая протеолитическая активность, оцененная по степени гидролиза казеина после инкубации экстракта тканей *A. colbecki* с детергентами Tween 80 и SDS, сохранялась на уровне контроля, тогда как активность трипсина в аналогичных условиях инкубации значительно снижалась.

Ключевые слова: морской гидробионт *Adamussium colbecki*, SDS, Tween 80, этанол, общая протеолитическая активность.

УДК 612.119+616.155.392-036.12+616.15-07

І. Свєженцева, асп., Д. Білько, канд. біол. наук., Н. Білько, д-р мед. наук, проф.
Національний університет "Києво-Могилянська академія", Київ,
І. Дягіль, д-р мед. наук
Державна Установа "Науковий центр радіаційної медицини НАМН України", Київ

ОСОБЛИВОСТІ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ЕРИТРОПОЕЗУ ПРИ ХРОНІЧНІЙ МІЄЛОЇДНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН *IN VIVO*

Досліджено особливості проліферації та диференціювання клітин еритроїдної ланки гемопоєзу в культурі дифузійних камер *in vivo* у пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією при терапії інгібіторами тирозинкіназ – імаїнібом та нілотинібом. У результаті культивування було виявлено, що відбувається підвищення проліферативної активності клітин-попередників еритропоєзу як у випадку пацієнтів із вперше виявленою лейкемією, так і у зразках кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю клітин лейкемічного клону до терапії інгібіторами тирозинкіназ. Продемонстровано пригнічення диференціювання клітин-попередників еритроїдного ряду із набуттям клітинами лейкемічного клону стійкості до інгібіторів тирозинкіназ.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, клітини-попередники еритропоєзу, культура клітин *in vivo*, інгібітори тирозинкіназ.

Вступ. Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) вважається одним із найбільш поширених онкогематологічних захворювань [12]. Захворювання характеризується підвищенням проліферації ранніх клітин-попередників мієлоїдної ланки кровотворення, що призводить до накопичення незрілих клітин гранулоцито-макрофагального ряду у кістковому мозку та периферичній крові пацієнтів [2, 3]. Причиною лейкемічної трансформації є поява в ранній гемопоетичній клітині-попереднику дериватної хромосоми 22, яку прийнято називати Філадельфійсь-

кою (Ph-хромосома) [9]. На ній міститься химерний онкоген *bcr-abl*, що кодує однойменний онкобілок, який характеризується тирозинкіназою активністю. BCR-ABL тирозинкіназа активує низку внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, призводячи до надмірної проліферативної активності, нечутливості до впливу сигналів кісткомозкового мікрооточення та блокування апоптозу у клітинах лейкемічного клону [7, 10, 11].

Із розвитком більш чутливих методів молекулярної біології було встановлено, що в хронічній фазі захо-

рювання, коли клітини вже характеризуються підвищеною проліферетивною активністю, але ще не втратили здатності до диференціювання, Ph-хромосома міститься у гемопоетичних клітинах всіх клітинних ланок, включаючи еритроїдну [4, 8]. Деякі автори припускають, що під час прогресії ХМЛ за фізіологічних умов відбувається інгібування проліферації та диференціювання клітин еритроїдної ланки гемопоезу за допомогою факторів мікрооточення [13]. Однак, існують експериментальні підтвердження того, що у культурах клітин кісткового мозку пацієнтів із ХМЛ окрім збільшення кількості гранулоцито-макрофагальних, також спостерігається підвищення рівня еритроїдних колоній [6, 8, 11]. Крім того, наразі в науковій літературі нема однозначних результатів стосовно впливу препаратів нового покоління – інгібіторів тирозинкіназ на функціональну активність клітин еритроїдної ланки гемопоезу у напіврідкому середовищі *in vivo*. Отже, метою роботи було виявлення особливостей зміни функціональних характеристик клітин-попередників еритропоєзу у разі терапії інгібіторами тирозинкіназ першого і другого покоління – іматинібом та нілотинібом, у культурі дифузійних камер *in vivo*.

Матеріали і методи. Здійснювали дослідження в культурі *in vivo* 300 зразків кісткового мозку від 75 пацієнтів, серед яких було 27 чоловіків та 48 жінок. Вік пацієнтів знаходився в межах від 28 до 64 із середнім значенням 56 років. Залежно від тактики терапії, яку отримували пацієнти, їх було поділено на три групи: ті, у яких ХМЛ діагностовано вперше ($n=7$), пацієнти, що у якості терапії отримували препарат іматиніб ($n=47$), та хворі, котрі у якості таргетної терапії отримували препарат нілотиніб ($n=21$). Всі пацієнти перебували на амбулаторному лікуванні гематологічного відділення інституту клінічної радіології ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України" і перед початком дослідження підписували добровільну інформовану згоду.

Для підтвердження діагнозу та оцінки відповіді клітин лейкоїчного клону на терапію інгібіторами тирозинкіназ проводили цитогенетичне дослідження гемопоетичних клітин пацієнтів на 12-й місяць від початку терапії, вираховуючи процентний вміст метафаз, що містять Ph-хромосому. Відповідно до отриманих результатів пацієнтів підрозділяли на підгрупи з оптимальною відповіддю (відсутність клітин з Ph-хромосомою) та резистентністю до терапії інгібіторами тирозинкіназ (у їх кістковому мозку відзначалося від 1 до 100% Ph⁺-клітин).

З метою виявлення впливу факторів мікрооточення на функціональну активність клітин кісткового мозку при ХМЛ здійснювали їх дослідження в культурі клітин *in vivo* із використанням оригінальної моделі гелевих дифузійних камер, які занурювали у черевну порожнину спеціально підготованих мишей лінії Balb/C. Для цього протягом тижня із синуса ока тварин за допомогою скляної піпетки Пастера, попередньо обробленої гепарином, забирали по 0,5 мл крові. За 20 хвилин до оперування у черевну порожнину мишам вводили тіопентал натрію (Київмедпрепарат, Україна) у дозі 200 мг/кг маси тварини. На 13-ту добу культивування тварин забирали методом цервікальної дислокації спинного мозку у шийному відділі, вилучали камери, очищали їх від сполучної тканини та досліджували під інвертованим мікроскопом (Zeiss, Німеччина). Всі маніпуляції із тваринами проводили відповідно до вимог біоетики та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин і національного законодавства з гуманного поводження із тваринами, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [5].

По закінченню терміну культивування, під інвертованим мікроскопом (Zeiss, Німеччина) підраховували кількість сформованих клітинних агрегатів, які після підрахунку вилучали з напіврідкого середовища за допомогою автоматичної мікропіпетки і готували препарати за допомогою цитоцентрифуги (Shandon, Німеччина) протягом 1 хв. при 360 g. Отримані препарати еритроїдних колоній забарвлювали за методом Палпенгейма і здійснювали диференційний підрахунок та дослідження морфологічних особливостей клітин у агрегатах за допомогою мікроскопа (Leika, Японія) при збільшенні $\times 630$. Статистичний аналіз проводили за допомогою критерію Манна-Уїтні. Достовірність оцінювали на рівні значущості $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. З літературних джерел відомо, що при ХМЛ відбувається розширення пулу переважно гранулоцито-макрофагальних попередників [2, 3]. Оскільки гранулоцито-макрофагальні попередники походять зі спільної для обох ланок гемопоетичної клітини-попередника мієлоїдного ряду, то не виключається, що зміни в проліферації і диференціюванні в клонах стосуються не лише гранулоцито-макрофагальної, а й еритроїдної ланки гемопоезу [8]. Тому, для перевірки даної гіпотези здійснювали дослідження особливостей впливу розчинних факторів нормального мікрооточення на функціональну активність клітин-попередників еритроїдної ланки гемопоезу, використовуючи модель культивування гемопоетичних клітин у гелевих дифузійних камерах. Їх занурювали у черевну порожнину мишей-реципієнтів, що попередньо були анемізовані шляхом забору із синуса ока 0,5 мл крові за допомогою обробленої гепарином скляної піпетки Пастера. Забір проводили щодня протягом тижня. За рахунок цього у тварин розвивалася анемія і вироблялися еритропоетин та інші фактори нормального мікрооточення, що беруть участь у регуляції еритропоєзу [1].

Колонієутворюючі одиниці еритроїдні (КУО-Е), що формувалися на 13-ту добу від початку культивування, в напіврідкому агарі *in vivo* являли собою клітинні агрегати, що складалися з дрібних, щільно розташованих клітин червоного відтінку за рахунок синтезу гемоглобіну. У дифузійній камері еритроїдні колонії переважно розміщувалися по периферії, біля її стінок. У результаті морфологічного дослідження КУО-Е виявили, що до їхнього складу входили диференційовані клітини еритроїдної ланки кровотворення із вираженою базофілією цитоплазми: проеритробласти та поліхроматофільні еритробласти і нормобласти.

У результаті підрахунку кількості КУО-Е у культурах зразків кісткового мозку досліджуваних груп пацієнтів виявилось, що найбільша їхня кількість була у культурах *in vivo* зразків кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до інгібіторів тирозинкіназ (рис. 3). Так, у групі з резистентністю до нілотинібу кількість КУО-Е була найвищою і сягала $65,1 \pm 4,2$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів, а випадку резистентності до іматинібу число КУО-Е становило $56,2 \pm 3,7$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів. У групі зразків із вперше виявленою ХМЛ кількість КУО-Е була дещо меншою і становила $47,8 \pm 3,7$ на 1×10^5 експлантованих мононуклеарів. У випадку, коли терапія інгібіторами тирозинкіназ була ефективною і після 12 місяців застосування у зразках кісткового мозку пацієнтів за результатами цитогенетичного дослідження не виявляли Ph-клітин, число КУО-Е було у 5 разів нижчим і сягало $14,9 \pm 2,1$ та $11,2 \pm 0,9$ на 1×10^5 експлантованих мієлокаріоцитів у випадку застосування іматинібу та нілотинібу, відповідно.

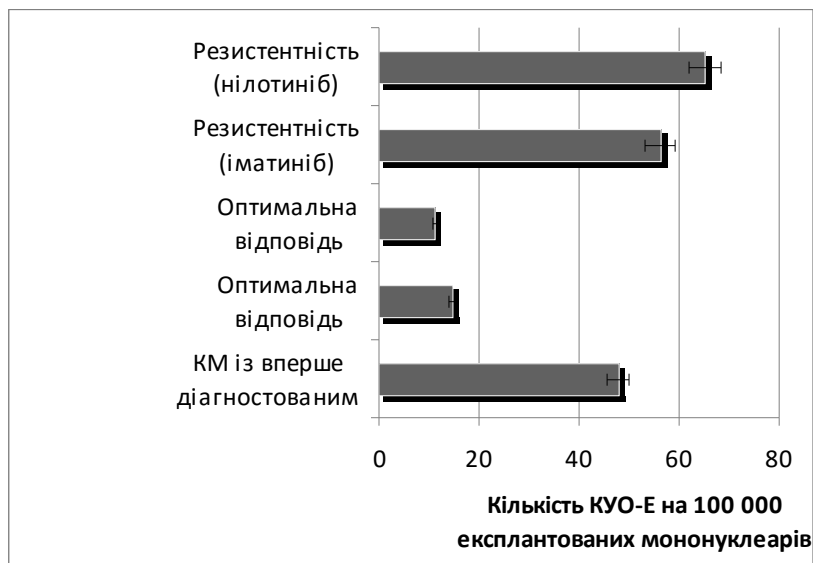


Рис. 3. Показники ефективності формування еритроїдних колоній зразків кісткового мозку досліджуваних груп у культурі дифузійних камер *in vivo*

За результатами кількісного аналізу клітин, що диференціювалися у КУО-Е в культурі клітин *in vivo* було виявлено, що агрегати переважно склалися із ранніх форм клітин-попередників еритропоезу. Крім того, в культурах кісткового мозку усіх груп виявлено значну перевагу еритробластів, порівняно із числом нормобластів та проеритробластів (рис. 4). Також було встановлено, що у випадку резистентності клітин лейкоемічного клону до імаїнібу та нілотинібу, а також в тому випадку,

коли клітини лейкоемічного клону не підлягали впливові жодних терапевтичних препаратів, статистично достовірної різниці між кількістю проеритробластів у агрегатах не було. Так, їх число становило $24,3 \pm 1,1\%$, $27,7 \pm 2,4\%$ та $23,1 \pm 2,5\%$, відповідно. В свою чергу у тому випадку, коли за результатами цитогенетичного дослідження не виявляли Рн-клітин, кількість проеритробластів була значно меншою та сягала $14,2 \pm 3,2\%$ та $12,7 \pm 0,9\%$ у випадку терапії імаїнібом та нілотинібом, відповідно.

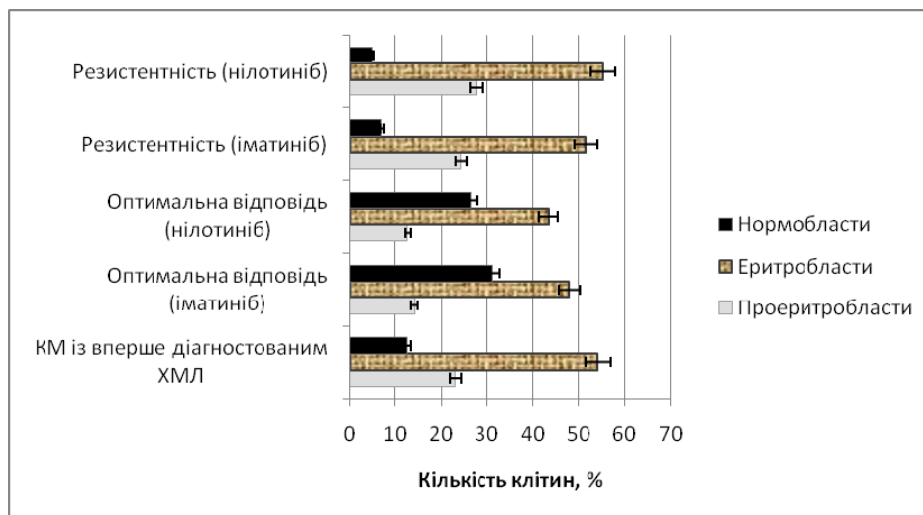


Рис. 4. Внутрішній склад еритроїдних колоній, отриманих у результаті культивування кісткового мозку при ХМЛ у культурі клітин *in vivo*

Кількість еритробластів була високою і достовірно не різнилася у всіх досліджуваних групах зразків кісткового мозку. Так, у випадку стійкості до імаїнібу та нілотинібу число еритробластів сягало $51,5 \pm 3,1\%$ та $55,3 \pm 4,7\%$, відповідно. У випадку ефективності терапії їх кількість становила $47,9 \pm 5,3\%$ та $43,3 \pm 3,7\%$ для груп із застосуванням імаїнібу та нілотинібу, відповідно. Наразці, у культурах кісткового мозку пацієнтів, діагноз яким було встановлено вперше, число еритробластів сягало $54,2 \pm 4,1\%$.

На відміну від еритробластів, число нормобластів у культурах кісткового мозку різних груп значно різнило-

ся. Так, їх найменша кількість спостерігалася у культурах зразків зі стійкістю клітин лейкоемічного клону до терапії інгібіторами тирозинкінази і становила $7,1 \pm 0,4\%$ та $5,2 \pm 1,2\%$ у випадку застосування імаїнібу та нілотинібу, відповідно. У групі зразків із вперше діагностованою ХМЛ число нормобластів було вдвічі вищим і становило $12,7 \pm 3,1\%$. В свою чергу при резистентності клітин лейкоемічного клону до імаїнібу та нілотинібу кількість нормобластів була найвищою і становила $31,3 \pm 2,7\%$ та $26,4 \pm 2,4\%$, відповідно.

Таким чином, було виявлено, що у зразках кісткового мозку пацієнтів зі стійкістю до терапії імаїнібом та

нілотинібом відбувається підвищення проліферативної активності клітин-попередників еритропоезу, а також пригнічення диференціювання проеритробластів до еритробластів у клітинних агрегатах. Подібна картина спостерігалася і у культурах зразків кісткового мозку із вперше виявленою ХМЛ. Це може свідчити про те, що із набуттям стійкості до інгібіторів тирозинкінази клітини-попередники еритропоезу втрачають здатність реагувати на дію розчинних факторів мікрооточення, що продукуються в організмі анемізованої тварини.

Висновки

Результати досліджень вказують на підвищення проліферативної активності клітин-попередників еритропоезу у пацієнтів із стійкістю до терапії інгібіторами тирозинкінази, що не залежить від факторів нормального мікрооточення. Паралельно зі збільшенням проліферативної активності клітин-попередників еритропоезу відбувалася також затримка диференціювання до більш зрілих форм у пацієнтів зі стійкістю до терапії інгібіторами тирозинкінази, що проявлялося накопиченням проеритробластів, порівняно еритробластами та нормобластами, в КУО-Е як в культурі дифузійних камер *in vivo*.

Список використаної літератури

1. Гольдберг Е.Д. Методы культуры клеток в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов // Томск: Изд-во Том. Ун-та. – 1992. – 246 с.
2. Глузман Д.Ф. Эволюция лейкоэмических стволовых клеток при хроническом миелолейкозе / Д.Ф. Глузман, Л.М.Скляренко, Т.С. Ивановская и др. // Лабораторная диагностика. – 2012. – Т. 4, № 62. – С. 44–49.
3. Bacco D.A. Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Deregulation of Cell Growth and Apoptosis / D.A. Bacco, K. Keeshan, S.L. McKenna, et al. // The Oncologist. – 2000. – Vol. 5. – P. 405–415.
4. Catriona H.M. Granulocyte–Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML / H.M. Catriona, M.D. Jamieson, L. E. Ailles et al. // The new england journal of medicine. – 2004. – № 351. – P. 657–667.
5. Commission of European Communities. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes // 1986. – 86/609 EES. – ISSN 03780698.
6. Deininger M. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells / M. Deininger, J.M. Goldman, N.B. Lydon, et al. // Blood. – 1997. – Vol. 90. – P. 3691–3698.
7. Hariharan I.K. *bcr-abl* oncogene renders myeloid cell line factor independent: Potential autocrine mechanism in chronic myeloid leukemia / I.K. Hariharan, J.M. Adams, S. Cory // Oncogene Res. – 1988. – Vol. 3. – P. 387.

8. Issaad C. Growth of erythroid colonies in chronic myelogenous leukemia is independent of erythropoietin only in the presence of steel factor / C. Issaad, W. Vainchenker // Blood. – 1994. – Vol. 84, № 10. – P. 3447–3456.
9. Lozzio C.B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome / C.B. Lozzio, B.B. Lozzio // Blood. – 1975. – Vol. 45. – P. 321–334.
10. Majsternek I. Chromosom Philadelphia / I. Majsternek, J. Blasiak // Postępy biochemii. – 2002. – Т. 48, № 3 – S. 156–166.
11. Mayani H. In vitro biology of human myeloid leukemia / H. Mayani, E. Flores-Figueroa, A. Chavez-Gonzalez // Leukemia Research – 2009. – № 33. – P. 624–637.
12. Weisberg E. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL⁺ leukemias / E. Weisberg, L. Catley, R.D. Wright, et al. // Blood. – 2007. – Vol. 19, № 5. – P. 2112–2120.
13. Zhou H. Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia / H. Zhou, R. Xu // Protein & Cell. – 2015. – Vol. 6, № 6. – P. 403–412.

References

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры клеток в гематологии. Томск: Изд-во Том. Ун-та; 1992. 246.
2. Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Ивановская Т.С. и др. Эволюция лейкоэмических стволовых клеток при хроническом миелолейкозе. Лабораторная диагностика. 2012; 4 (62): 44–49.
3. Bacco DA, Keeshan K, McKenna SL et al. Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Deregulation of Cell Growth and Apoptosis. Oncologist. 2000; 5: 405–415.
4. Catriona HM, Jamieson MD, Ailles LE, et al. Granulocyte–Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML. The new england journal of medicine. 2004; 351: 657–667.
5. Commission of European Communities. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. 1986. 86/609 EES. – ISSN 03780698.
6. Deininger M, Goldman JM, Lydon NB, et al. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells. Blood. 1997; 90: 3691–3698.
7. Hariharan IK, Adams JM, Cory S. *bcr-abl* oncogene renders myeloid cell line factor independent: Potential autocrine mechanism in chronic myeloid leukemia. Oncogene Res. 1988; 3: P. 387.
8. Issaad C, Vainchenker W. Growth of erythroid colonies in chronic myelogenous leukemia is independent of erythropoietin only in the presence of steel factor. Blood. 1994; 84 (10): 3447–3456.
9. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood. 1975; 45: 321–334.
10. Majsternek I, Blasiak J. Chromosom Philadelphia. Postępy biochemii. 2002; 48 (3): 156–166.
11. Mayani H, Flores-Figueroa E, Chavez-Gonzalez A. In vitro biology of human myeloid leukemia. Leukemia Research. 2009; 33: 624–637.
12. Weisberg E, Catley L., Wright RD, et al. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL⁺ leukemias. Blood. 2007; 19(5): 2112–2120.
13. Zhou H, Xu R. Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia. Protein & Cell. 2015; 6(6): 403–412.

Надійшла до редколегії 01.04.16

И. Свеженцева, асп., Д. Билько, канд. биол. наук, Н. Билько, д-р мед. наук, проф.

Национальный университет "Киево-Могилянская академия", Киев, Украина,

И. Дягель, д-р мед. наук

Государственное Учреждение "Национальный центр радиационной медицины НАМН Украины", Киев, Украина

ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЭРИТРОПОЭЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *IN VIVO*

Исследованы особенности пролиферации и дифференцировки клеток эритроидного ряда гемопоэза в культуре диффузных камер *in vivo* у пациентов с хронической миелоидной лейкемией при терапии ингибиторами тирозинкиназы – иматинибом и nilotinибом. В результате культивирования показано, что происходит повышение пролиферативной активности клеток-предшественников эритропоеза как в случае пациентов с впервые диагностированной лейкемией, так и в образцах костного мозга пациентов с резистентностью клеток лейкоэмического клона к терапии ингибиторами тирозинкиназы. Продemonстрировано подавление дифференцировки клеток-предшественников эритроидного ряда с приобретением клетками лейкоэмического клона резистентности к ингибиторам тирозинкиназы.

Ключевые слова: хроническая миелоидная лейкемия, клетки-предшественники эритропоеза, культура клеток *in vivo*, ингибиторы тирозинкиназы.

I. Sviezhentseva, PhD stud., D. Bilko, PhD., N. Bilko, DSc.

The National University of "Kyiv-Mohyla Academy", Kyiv, Ukraine,

I. Dyagil, DSc.

SI "National Research Center for Radiation Medicine of the NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

CHARACTERISTICS OF PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF ERYTHROID PROGENITOR CELLS AT CHRONIC MYELOID LEUKEMIA IN CELL CULTURE *IN VIVO*

The article presents a study of proliferation and differentiation features of erythroid progenitor cells of patients with chronic myeloid leukemia during the treatment with tyrosine kinase inhibitors – imatinib and nilotinib. The cultivation results showed an increase in proliferative activity of erythropoiesis progenitor cells both in the case of patients with leukemia, diagnosed for the first time, and in the case of bone marrow samples of patients with a resistance of leukemic cells clone to treatment with tyrosine kinase inhibitors. Moreover, the results showed an inhibition of erythroid progenitor cell differentiation and acquisition of resistance to tyrosine kinase inhibitors by leukemic cells clone.

Keywords: chronic myeloid leukemia, erythroid progenitor cells, cell culture *in vivo*, tyrosine kinase inhibitors.

UDC: 616-006/-08:57.04

Н. Храновська, канд. біол. наук, О. Скачкова, канд. біол. наук
Національний інститут раку, Київ,
Р. Сидор, асп., Л. Сківка, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ АНАЛЬГЕТИКІВ ОМНОПОНУ ТА ДЕКСКЕТОПРОФЕНУ НА ЕНДОЦИТАРНУ АКТИВНІСТЬ ФАГОЦИТІВ РІЗНОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ НА МОДЕЛІ ХІРУРГІЧНОГО ВИДАЛЕННЯ ПУХЛИНИ

Метою даного дослідження було порівняти вплив знеболення із застосуванням опіоїдного анальгетика омнопону та неселективного інгібітора ЦОГ-2 декскетопрофену на ендоцитарну активність фагоцитів різної локалізації на моделі хірургічного видалення пухлини. У дослідженні було використано 50 мишей лінії C57/black, яким перещеплювали карциному легень Льюїс у подушечку задньої лапи. На 22 добу лапу з пухлиною ампутували. Анальгетики (омнопон у дозі 10 мг/кг, декскетопрофен – 20 мг/кг) вводили за 30 хв до операції та 1 раз у добу упродовж 3 днів після операції. Оцінку ендоцитарної активності фагоцитів проводили методом протокової цитометрії до, на 1 та 3 добу після операції. Було встановлено, що застосування декскетопрофену сприяє підтриманню ендоцитарної активності фагоцитів крові та селезінки у післяопераційному періоді. На 3 добу після операції у групі тварин, що отримували для знеболення декскетопрофен, фагоцитарна активність гранулоцитів крові та селезінки були вищими порівняно із групою, що отримувала опіоїдну анальгезію, на 70% та 86% відповідно. Фагоцитарні індекси моноцитів крові та селезінки також були вищими у 2 рази при знеболенні декскетопрофеном. Таким чином, при анальгезії декскетопрофеном активність фагоцитів крові та селезінки мишей після операції зберігається на значно вищому рівні у порівнянні із застосуванням омнопону.

Ключові слова: фагоцитарна активність, периопераційна анальгезія, інгібітори циклооксигенази-2, опіоїдні препарати.

Вступ. Хірургічне видалення пухлини є основним терапевтичним підходом первинного лікування більшості нозологічних форм раку. Клінічні та експериментальні дослідження останніх 10 років встановили, що хірургічні стресові фактори, такі як пошкодження тканин, крововтрата, біль, а також анестезіологічні препарати чинять негативний вплив на імунну систему пацієнта, створюючи тим самим сприятливі умови для уникнення пухлинними клітинами імунного нагляду [1, 2]. Крім того, післяопераційне запалення є одним із важливих чинників системного поширення пухлини [3]. Мінімізація післяопераційного запалення – один із терапевтичних підходів для зниження ризику розвитку рецидивів і метастазів. Виключну роль в динаміці запального процесу відіграють фагоцити [4, 5]. На початкових стадіях запалення фагоцити поляризуються до прозапального функціонального профілю (M1 для мононуклеарних і N1 для поліморфнонуклеарних фагоцитів), для яких властиве посилення синтезу реактивних форм кисню, нітритів, прозапальних медіаторів. Це сприяє елімінації тригерних чинників запальної реакції. Резолюція запалення супроводжується зміною функціонального профілю фагоцитів на протизапальний [4]. Важливим компонентом протизапальної функціональної поляризації фагоцитів є підвищення ендоцитарної активності, необхідної для утилізації загублених після нетозу нейтрофілів та тканинного дебрису, котрий є наслідком руйнівної дії запалення. Зниження ендоцитарної активності фагоцитів може призводити до хронізації запального процесу, який стає одним із чинників, що сприяють прогресії пухлинного процесу [6, 5].

Опіоїди широко застосовуються для периопераційного знеболення, а також при больовому синдромі, що викликаний пухлинним процесом. Проте, сучасні дослідження встановили, що опіоїдні препарати негативно впливають на клітини імунної системи. [7]. Застосування опіоїдів пригнічує продукцію антитіл та цитокінів, знижує активність природних кілерів та фагоцитів [7, 8]. Останні кілька років активно дискутується питання щодо заміни або ж доповнення опіатів іншими анальгетиками, що дозволило б зменшити негативний вплив премедикації на імунну систему хірургічних хворих. Серед альтернатив опіатам особливо перспективними вважаються інгібітори циклооксигенази-2 (ЦОГ-2). Продуктом ЦОГ-2 є простагландин E2 (PGE2), котрий залучений як у механізми формування болю, так і в регуляції імунної відпові-

ді. Беручи до уваги те, що PGE2 є одним із основних медіаторів пухлиноасоційованої імуносупресії та дані недавніх ретроспективних досліджень, які вказують на здатність інгібіторів ЦОГ-2 знижувати ризик розвитку деяких нозологічних форм раку [9, 10] особливо актуальним видається дослідження цих препаратів для периопераційного знеболення саме в онкохірургії.

Метою даного дослідження було порівняти вплив знеболення із застосуванням опіоїдного анальгетика омнопону та неселективного інгібітора ЦОГ-2 декскетопрофену на ендоцитарну активність фагоцитів різної локалізації на моделі хірургічного видалення перещепленої пухлини.

Матеріали і методи. У дослідженні було використано 50 самців мишей лінії C57/black вагою 18–22 г та віком 1,5 місяця. Всі дослідження на мишах проводили у відповідності до вимог регіонального Комітету з етики роботи з піддослідними тваринами та з додержанням правил роботи з лабораторними тваринами. Як експериментальну пухлинну модель було використано карциному легень Льюїс (КЛЛ). Клітини КЛЛ були люб'язно надані Банком клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України. КЛЛ перещеплювали підшкірно у подушечку стопи задньої лапи у кількості 4×10^5 клітин на мишу. Після трансплантації пухлини тварин було розділено на 3 групи (по 15 тварин на групу): тваринам у групі I вводили для периопераційного знеболення опіоїдний анальгетик омнопон у дозі 10 мг/кг, у групі II тваринам вводили 20 мг/кг неселективного інгібітору ЦОГ-2 декскетопрофену, у контрольній групі тварини отримували рівнозначний об'єм фізіологічного розчину. 5 тварин були використані як інтактний контроль.

Хірургічне видалення пухлини проводили на 22 добу після перещеплення. Анестезію проводили кетаміном (25 мг/кг внутрішньочеревно), на лапу з пухлиною накладали лігатуру та ампутували на рівні колінного суглобу. Знеболюючі препарати (або фізіологічний розчин у контрольній групі) вводили внутрішньочеревно 4 рази: за 30 хв до початку операції та протягом 3 днів після операції (1 раз на добу). У 3 часових точках (до операції, на 1 та 3 добу після операції) проводили евтаназію 5 тварин з кожної групи, проводили забір біологічного матеріалу та аналізу ендоцитарної активності фагоцитів різної локалізації.

Фагоцитарну активність клітин селезінки, периферичної крові та перитонеальних макрофагів оцінювали методом

протокової цитометрії. У пробірку вносили 50 мкл крові, суспензії спленоцитів або перитонеальних макрофагів (попередньо доводили концентрацію до 2×10^6 кл/мл) та додавали 40 мкл суспензії *Staphylococcus aureus* (1×10^7 кл/мл), міченого флюоресцеїн ізотіоціанатом. У пробу негативного контролю замість мічених мікроорганізмів додавали забуферений фізрозчин. Клітини інкубували при 37°C протягом 30 хв. Після цього для зупинки реакції та лізису еритроцитів додавали холодний лізуючий розчин, що містить ЕДТА. Клітини двічі відмивали в забуференому фізрозчині та оцінювали результати на протоковому цитофлуориметрі FACSCalibur з використанням програми CellQuest (Becton Dickinson, США). Фагоцитарне число (ФЧ) визначали як відсоток клітин із флюоресценцією у відповідному гейті, а фагоцитарний індекс (ФІ) визначали як середню інтенсивність свічення цих клітин, яка була пропорційна кількості поглинутих мічених бактеріальних клітин.

Статистичну обробку результатів проводили в програмі Statistica 10 (StatSoft Inc., USA) із застосуванням дисперсійного аналізу One-way ANOVA для порівняння двох і більше вибірок та Wilcoxon test для порівняння двох вибірок залежних даних. Відмінності вважали статистично достовірними при значенні похибки першого роду $p < 0,05$.

Результати та обговорення.

Одними із перших на періопераційний стрес реагують клітини вродженої ланки імунної системи, серед яких нейтрофіли, моноцити та макрофаги [11]. Як зазначено вище, хірургічна травма асоціюється зі значним пригніченням активності імунних клітин, у тому числі й фагоцитів, що пов'язано із активацією гіпоталамо-гіпофізарної осі внаслідок пошкодження тканин та болю, крововтратою та іншими стресовими факторами, до яких зараз відносять і опіоїдні анальгетики [2, 8]. Стратегічно важливими для мінімізації післяопераційного запалення і зниження ризику рецидиву та метастазування злоякісної пухлини є циркулюючі фагоцити та фагоцити селезінки. Циркулюючі фагоцити

утилізують апоптичні клітини, тканинний дебрис і залишкові пухлинні клітини, котрі з'являються у крові після операції [12]. Фагоцити селезінки забезпечують її основну функцію – фільтрування та елімінацію циркулюючих антигенів, у тому числі й експонованих внаслідок хірургічної травми [13].

У даному дослідженні на моделі хірургічної травми при видаленні перещепленої пухлини нами було показано зниження відносної кількості фагоцитуючих гранулоцитів периферичної крові та селезінки мишей на 1 добу після операції (Рис. 1), що, імовірно, пов'язано з крововтратою. На 3 добу після операції спостерігалось відновлення цього показника, що може бути наслідком активації кровотворення, характерної для післяопераційних репаративних процесів. Частка гранулоцитів крові, здатних до фагоцитозу, на 3 добу після хірургічного видалення пухлини у тварин, що отримували для знеболення омнопон, була вірогідно нижчою, ніж у контрольних тварин з пухлинами ($p < 0,05$) і становила $62 \pm 4,3\%$ (Рис. 1, А). Це узгоджується з даними літератури про здатність морфіну пригнічувати кровотворення [14], а також функціональну активність нейтрофілів зі зниженням експресії рецепторів комплексу, інтенсивності фагоцитозу та киснезалежного метаболізму [15]. При застосуванні для анальгезії інгібітора ЦОГ-2 декскетопрофену фагоцитарне число гранулоцитів крові на 1 добу після видалення пухлини знижувалось незначно. На 3 добу кількість фагоцитуючих гранулоцитів у периферичній крові відновлювалась практично до передопераційного рівня і становила $(83 \pm 2,5)\%$. Фагоцитарне число спленічних гранулоцитів у контрольних тварин з пухлинами та тварин, що отримали омнопон, прогресивно знижувалось у післяопераційному періоді. У тварин, котрі отримали декскетопрофен, цей показник зберігався на рівні інтактних тварин упродовж всього післяопераційного періоду (Рис. 1, Б).

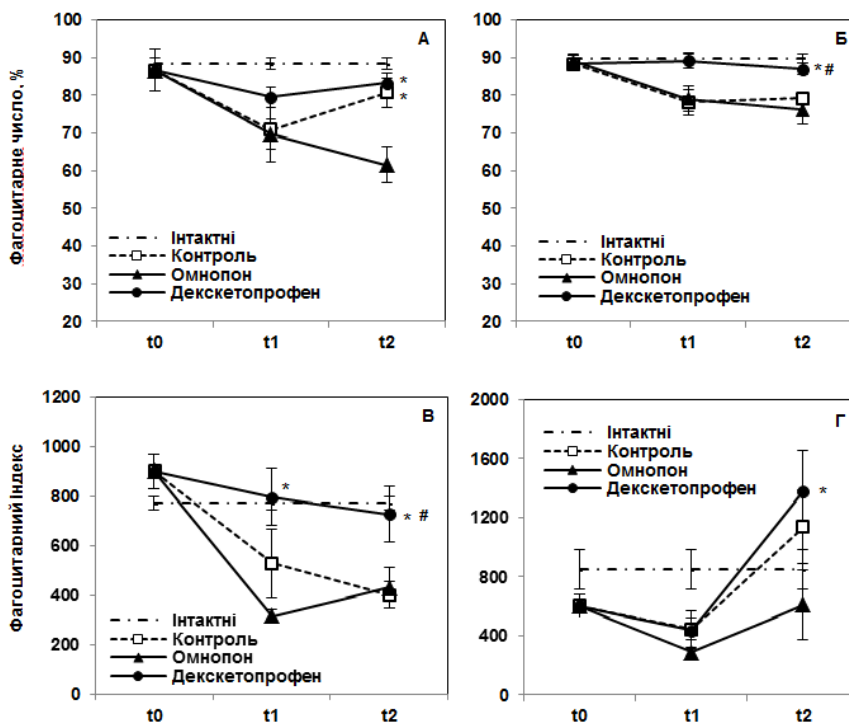


Рис. 1. Показники фагоцитарної активності гранулоцитів мишей до та після видалення перещепленої пухлини: фагоцитарне число гранулоцитів крові (А) та селезінки (Б); фагоцитарний індекс гранулоцитів крові (В) та селезінки (Г). t0 – до операції; t1 – на 1 добу після операції; t2 – на третю добу після операції. Значення представлені як середнє $\pm$ похибка середнього ($n=5$); * – $p < 0,05$ порівняно із значеннями у групі, що отримувало омнопон

Фагоцитарна активність гранулоцитів крові після операції суттєво знижувалася в контрольній групі та групі омнопону, тоді як при застосуванні декскетопрофену достовірно не відрізнялася від аналогічного показника інтактних тварин (Рис.1, В) і перевищувала значення у групі омнопону на першу добу після операції в 2,7 разів, а на 3 добу – в 1,8 разів ($p<0,05$). Фагоцитарний індекс гранулоцитів селезінки на 3 добу після видалення пухлини також був найвищим у групі, що отримувала декскетопрофен (Рис.1, Г) та перевищував на 86% значення у групі тварин, яким застосовували опіоїдну анальгезію ($p<0,05$).

Операція негативно позначилася і на фагоцитарній функції мононуклеарних фагоцитів різної локалізації. Відносна кількість фагоцитуючих моноцитів у периферичній крові була істотно знижена у всіх дослідних групах (Рис. 2, А), що також може бути пов'язано із хірургічною травмою та крововтратою. Через 3 доби після операції кількість фагоцитуючих мононуклеарних клітин відновлювалась, проте значно слабше при застосуванні опіоїдної анальгезії (фагоцитарне число становило

(47,25±4,8)% у групі омнопону проти (62,5±5,0)% у групі декскетопрофену, $p<0,05$). Фагоцитарне число моноцитів селезінки у тварин, що отримували декскетопрофен, практично не змінювалось у післяопераційному періоді (Рис. 2, Б), тоді як в контрольній групі вже на 1 добу після операції знижувалось на 13%, а в групі опіоїдної анальгезії – на 22% ($p<0,05$). Фагоцитарний індекс моноцитів як крові, так і селезінки, у післяопераційному періоді також був найвищим у тварин, що отримували декскетопрофен (Рис. 2, В, Г), та на 3 добу після операції перевищував значення у групі опіоїдної анальгезії у 2 рази ($p<0,05$). Слід також зазначити, що фагоцитарна активність моноцитів крові у тварин із пухлиною була зниженою у порівнянні з інтактними тваринами (Рис. 2, В), що може бути наслідком пухлиноіндукованої імуносупресії. Після видалення пухлини фагоцитарний індекс циркулюючих мононуклеарних фагоцитів зростав незначно у контрольній групі та групі омнопону, тоді як при застосуванні декскетопрофену уже на 1 добу після операції збільшувався в 2,7 разів ($p<0,05$) і навіть перевищував значення аналогічного показника у інтактних тварин.

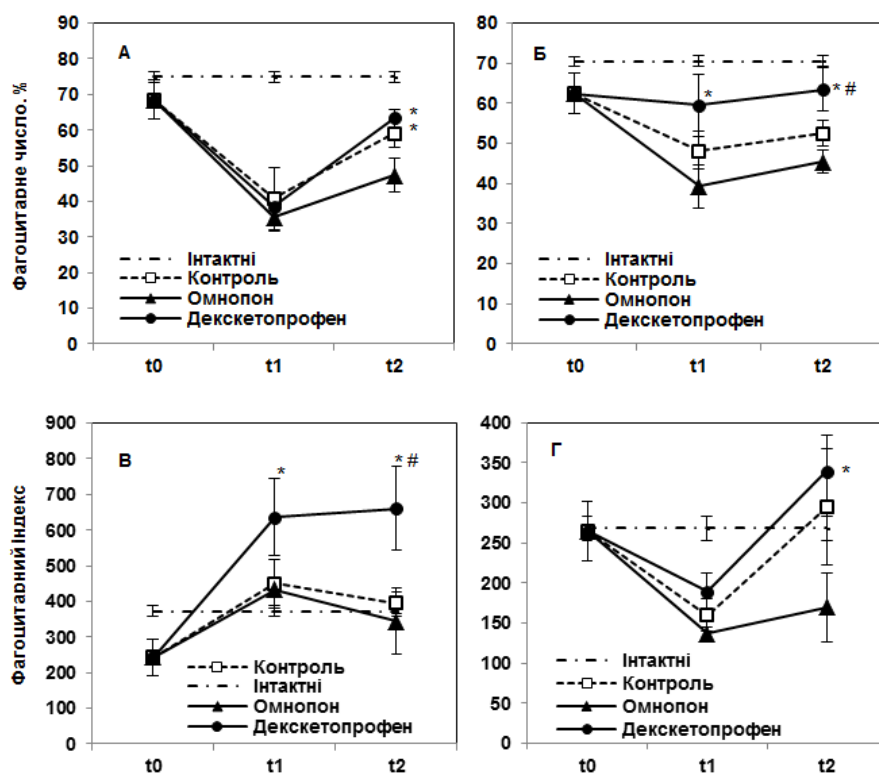


Рис. 2. Показники фагоцитарної активності моноцитів мишей до та після видалення перещепленої пухлини: фагоцитарне число моноцитів крові (А) та селезінки (Б); фагоцитарний індекс моноцитів крові (В) та селезінки (Г).

t0 – до операції; t1 – на 1 добу після операції; t2 – на третю добу після операції. Значення представлені як середнє ± стандартна похибка середнього (n=5); * – $p<0,05$ порівняно із значеннями у групі, що отримувала омнопон, # – $p<0,05$ порівняно із значеннями контрольної групи

Результати дослідження резидентних мононуклеарних фагоцитів перитонеальної порожнини показали, що у всіх мишей із перещепленою пухлиною спостерігалось істотне зменшення кількості перитонеальних фагоцитуючих клітин (у 3,3 разів порівняно з інтактними тваринами) (Рис. 3, А) у відсутності змін їх поглинальної активності. У попередніх дослідженнях нами показано, що ріст карциноми легені Льюїс супроводжується розвитком паранеопластичного гематологічного синдрому [16], тому суттєве зменшення кількості перитонеальних макрофагів може бути наслідком системного впливу пухлинного процесу. Після хірургічного видалення пухлини кількість фагоцитуючих клітин у перитонеальній порожнині контрольних

тварин та тварин, котрі отримали анальгезію з омнопон, відновлювалася до значень інтактних тварин, а у групі декскетопрофену перевищувала показник тварин інших груп, більше, ніж в 1,5 разів. Інтенсивність ендотоксозу після проведення хірургічної операції вірогідно знижувалася у всіх тварин (Рис. 3, Б). Та третю добу після операції цей показник у контрольних прооперованих тварин та тварин групи декскетопрофену сягав значень інтактних тварин, а у групі омнопону залишався вірогідно зниженим. Це узгоджується з даними, що опіоїди, зокрема морфін, здатні пригнічувати проліферацію клітин попередників зрілих мононуклеарних фагоцитів – макрофагів та їх здатність до фагоцитозу [17].

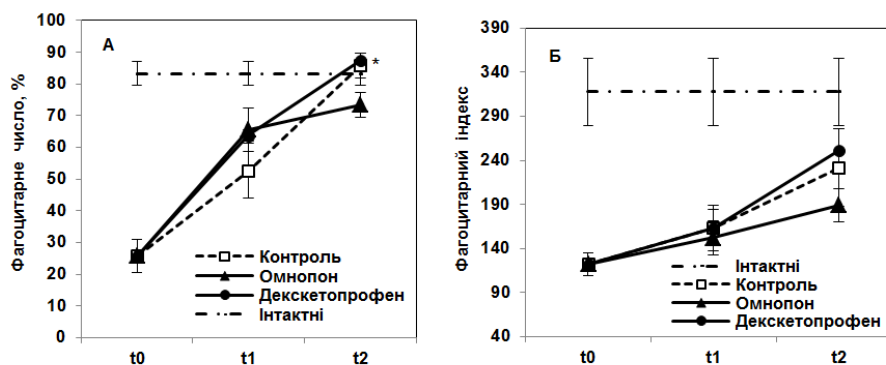


Рис. 3. Показники фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів мишей до та після видалення перещепленої пухлини: фагоцитарне число (А) та фагоцитарний індекс (Б). t0 – до операції; t1 – на 1 добу після операції; t2 – на третю добу після операції. Значення представлені як середнє $\pm$ стандартна похибка середнього (n=5); * – $p < 0,05$ порівняно із значеннями у групі, що отримувала омнопон

Підтримання високої фагоцитарної активності як нейтрофілів, так і моноцитів є важливим у періопераційному періоді. Гостре запалення, яке виникає при пошкодженні тканин, в нормі згасає і приводить до відновлення тканинного гомеостазу. Порушення механізмів його регуляції приводить до хронізації запального процесу, що супроводжується зниженням адаптивної імунної відповіді та сприяє метастазуванню пухлинних клітин [18, 3].

Поліморфноядерні та моноцитарні клітини знаходяться у тісному взаємозв'язку при розвитку запалення та його резолуції. Їх фагоцитарна функція має важливе значення для елімінації чинників, які є джерелом прозапальних сигналів [5]. Нейтрофіли першими приходять у сайт запалення та виконують фагоцитоз клітинного дебрису, а їх дегрануляція забезпечує атракцію моноцитів та інших клітин імунної системи. Нейтрофіли є короткоживучими клітинами і після виконання своїх функцій гинуть шляхом нетозу [19]. Ендоцитарна функція фагоцитів моноцитарного походження забезпечує не лише елімінацію дебрису, а й резолуцію запалення, адже саме фагоцитування апоптисованих нейтрофілів запускає процес реполяризації моноцитів та макрофагів до протизапального фенотипу [4].

При застосуванні для анальгезії інгібітора ЦОГ-2 декскетопрофену спостерігалось збереження фагоцитарної функції гранулоцитів та моноцитів у післяопераційному періоді на високому рівні у порівнянні із контрольною групою. Це узгоджується з тим фактом, що індукція ЦОГ-2 є одним з ключових факторів у розвитку запалення, а її посилення експресія сприяє пролонгації запального процесу [6]. PGE-2, що є продуктом ЦОГ-2, здає негативно впливати на фагоцитарну активність фагоцитарних клітин [20], а також вважається одним із основних медіаторів, що пов'язує хронічне запалення та посилення пухлинного росту [6, 3]. При знеболенні омнопонем зниження активності та кількості фагоцитів після операції було більш виразним ніж у тварин контрольної групи та при знеболенні декскетопрофеном, що лише підтверджує дані досліджень про негативний вплив опіатів на фагоцитарну активність макрофагів, моноцитів та нейтрофілів [11, 17].

Таким чином, отримані результати створюють підґрунтя для подальших досліджень декскетопрофену як перспективної альтернативи опіоїдним препаратам для зменшення ризику розвитку метастазів та післяопераційних ускладнень прооперованих онкологічних хворих внаслідок постхірургічного запалення.

Список використаної літератури

1. Das J. Are we causing the recurrence-impact of perioperative period on long-term cancer prognosis: Review of current evidence and practice / J. Das, S. Kumar, S. Khanna, Y. Mehta // J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. – 2014. – Vol. 30(2). – P. 153-9.
2. Kimura F. Immunosuppression following surgical and traumatic injury / F. Kimura, H. Shimizu, H. Yoshidome, M. Ohtsuka, M. Miyazaki // Surg. Today. – 2010. – Vol. 40(9). – P. 793-808.
3. Wu Y. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis / Y. Wu, B.P. Zhou // Cell Cycle. – 2009. – Vol. 8(20). – P. 3267-3273.
4. Maskrey B. H. Mechanisms of Resolution of Inflammation a Focus on Cardiovascular Disease / B.H. Maskrey, I.L. Megson, P.D. Whitfield, A.G. Rossi // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2011. – Vol. 31. – P. 1001-1006.
5. Soehnlein O. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation / O. Soehnlein, L. Lindbom // Nat. Rev. Immunol. – 2010. – Vol. 10(6). – P. 427-39.
6. Kundu J.K. Inflammation: gearing the journey to cancer / J.K. Kundu, Y.J. Surh // Mutat. Res. – 2008. – Vol. 659(1-2). – P. 15-30.
7. Meserve J.M. The Role of Analgesics in Cancer Propagation / J.M. Meserve, A.D. Kaye, A. Prabhakar, R.D. Urman // Best Pract Res Clin Anaesthesiol. – 2014. – Vol. 28(2). – P. 139-51.
8. Kaye A.D. Effect of Opiates, Anesthetic Techniques, and Other Perioperative Factors on Surgical Cancer Patients / A.D. Kaye, N. Patel, F.R. Bueno [et al.] // The Ochsner Journal. – 2014. – Vol. 14. – P. 216-228.
9. Yiannakopoulou E. Targeting epigenetic mechanisms and microRNAs by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory agents – implications for cancer treatment and chemoprevention / E. Yiannakopoulou // Cell Oncol (Dordr). – 2014. – Vol. 37(3). – P. 167-78.
10. Harris R.E. Cyclooxygenase-2 blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung / R.E. Harris // Inflammopharmacology. – 2009. – Vol. 17. – P. 55-67.
11. Kurosawa S. Anesthetics, immune cells, and immune responses / S. Kurosawa, M. Kato // J. Anesth. – 2008. – Vol. 22(3). – P. 263 – 77.
12. Xie R. Phagocytosis by macrophages and endothelial cells inhibits procoagulant and fibrinolytic activity of acute promyelocytic leukemia cells / R. Xie, C. Gao, W. Li [et al.] // Blood. – 2012. – Vol. 119(10). – P. 2325-34.
13. Bronte V. The spleen in local and systemic regulation of immunity / V. Bronte, M.J. Pittet // Immunity. – 2013 – Vol. 39(5). – P. 806-18.
14. Stefano B.G. Endogenous Morphine/Nitric Oxide-Coupled Regulation of Cellular Physiology and Gene Expression: Implications for Cancer Biology / R.M. Kream, K.J. Mantione, M. Sheehan [et al.] // Semin Cancer Biol. – 2008. – 18(3). – P. 199-210.
15. Menzebach A. Morphine inhibits complement receptor expression, phagocytosis and oxidative burst by a nitric oxide dependent mechanism / A. Menzebach, J. Hirsch, R. Nöst [et al.] // Anesthesiol. Intensivmed Notfallmed Schmerzther. – 2004. – Vol. 39(4). – P. 204-11.
16. Fedorchuk O.G. Paraneoplastic syndrome in mice bearing high-angiogenic variant of Lewis lung carcinoma: relations with tumor derived VEGF / O.G. Fedorchuk, O.M. Pyaskovskaya, L.M. Skivka // Cytokine. – 2012. – Vol. 57(1). – P. 81-8.
17. Shirzad H. Comparison of morphine and tramadol effects on phagocytic activity of mice peritoneal phagocytes in vivo / H. Shirzad, M. Shahrani, M. Rafieian-Kopaei // Int Immunopharmacol. – 2009. – Vol. 9(7-8). – P. 968-70.
18. Tanja C. The fundamental role of mechanical properties in the progression of cancer disease and inflammation / C. Tanja // Reports on Progress in Physics. – 2014. – Vol. 77(7). – P. 121-126.
19. Silvestre-Roig C. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis / C. Silvestre-Roig, A. Hidalgo, O. Soehnlein // Blood. – 2016. – Vol. 127(18). – P. 2173-81.
20. Medeiros A. Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs / A. Medeiros, C. Peres-

Buzalaf, V.F. Fortino, C.H. Serezani // Mediators Inflamm. – 2012. – Vol. 2012. – P.127-40.

References

1. Das J, Kumar S, Khanna S, Mehta Y. Are we causing the recurrence-impact of perioperative period on long-term cancer prognosis: Review of current evidence and practice. J Anaesthesiol Clin Pharmacol. 2014;30(2):153-9.
2. Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. Surg Today. 2010;40(9):793-808.
3. Wu Y, Zhou BP. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. Cell Cycle. 2009;8(20):3267-73.
4. Maskrey BH, Megson IL, Whitfield PD, Rossi AG. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31(5):1001-6.
5. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. Nat Rev Immunol. 2010;10(6):427-39.
6. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. Mutat Res. 2008;659(1-2):15-30.
7. Meserve JR, Kaye AD, Prabhakar A, Urman RD. The role of analgesics in cancer propagation. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2014 ;28(2):139-51.
8. Kaye AD, Patel N, Bueno FR, Hymel B, Vadivelu N et al. Effect of opiates, anesthetic techniques, and other perioperative factors on surgical cancer patients. Ochsner J. 2014;14(2):216-28.
9. Yiannakopoulou E. Targeting epigenetic mechanisms and microRNAs by aspirin and other non steroidal anti-inflammatory agents--implications for cancer treatment and chemoprevention. Cell Oncol (Dordr). 2014;37(3):167-78.
10. Harris RE. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. Inflammopharmacology. 2009;17(2):55-67.
11. Kurosawa S. Anesthetics, immune cells, and immune responses. J Anesth. 2008;22(3):263-77.
12. Xie R, Gao C, Li W, Zhu J, Novakovic V, et al. Phagocytosis by macrophages and endothelial cells inhibits procoagulant and fibrinolytic activity of acute promyelocytic leukemia cells. Blood. 2012 8;119(10):2325-34.
13. Bronte V. The spleen in local and systemic regulation of immunity. Immunity. 2013;39(5):806-18.
14. Stefano GB, Kream RM, Mantione KJ, Sheehan M, Cadet P, Zhu W, Biffiger TV, Esch T. Endogenous morphine/nitric oxide-coupled regulation of cellular physiology and gene expression: implications for cancer biology. Semin Cancer Biol. 2008 ;18(3):199-210. German.
15. Menzebach A, Hirsch J, Nöst R, Mogk M, Hempelmann G, Welters ID. [Morphine inhibits complement receptor expression, phagocytosis and oxidative burst by a nitric oxide dependent mechanism. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 2004;39(4):204-11.
16. Fedorchuk OG, Pyaskovskaya OM, Skivka LM, Gorbik GV, Trompak OO, Solyanik GI. Paraneoplastic syndrome in mice bearing high-angiogenic variant of Lewis lung carcinoma: relations with tumor derived VEGF. Cytokine. 2012 Jan;57(1):81-8.
17. Shirzad H, Shahrani M, Rafieian-Kopaei M. Comparison of morphine and tramadol effects on phagocytic activity of mice peritoneal phagocytes in vivo. Int Immunopharmacol. 2009 ;9(7-8):968-70.
18. Tanja C. The fundamental role of mechanical properties in the progression of cancer disease and inflammation. Reports on Progress in Physics. 2014;77(7):121-126.
19. Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. Blood. 2016;127(18):2173-81.
20. Medeiros A, Peres-Buzalaf C, Fortino Verdan F, Serezani CH. Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs. Mediators Inflamm. 2012;2012:327568.

Надійшла до редколегії 13.06.16

Н. Храновская, канд. биол. наук, О. Скачкова, канд. биол. наук

Национальный институт рака, Киев,

Р. Сидор, асп., Л. Скивка, д-р биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина, Киев

ВЛИЯНИЕ АНАЛЬГЕТИКОВ ОМНОПОНА И ДЕКСКАТОПРОФЕНА НА ЭНДОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ НА МОДЕЛИ ХИРУРГИЧЕСКОГО УДАЛЕНИЯ ОПУХОЛИ

Целью данного исследования было сравнить влияние обезболивания с применением опиоидного анальгетика омнопона и неселективного ингибитора ЦОГ-2 декскетопрофена на эндоцитарную активность фагоцитов различной локализации на модели хирургического удаления опухоли. В исследовании было использовано 50 мышей линии C57/black, которым перевивали карциному легких Льюис в подушечку задней лапы. На 22 сутки лапу с опухолью ампутировали. Анальгетики (омнопон в дозе 10 мг / кг, декскетопрофен – 20 мг / кг) вводили за 30 мин до операции и 1 раз в сутки в течение 3 дней после операции. Оценку эндоцитарной активности фагоцитов проводили методом проточной цитометрии за сутки до, на 1 и 3 сутки после операции. Было установлено, что применение декскетопрофена способствует поддержанию эндоцитарной активности фагоцитов крови и селезенки в послеоперационном периоде. На 3 сутки после операции в группе животных, получавших для обезболивания декскетопрофен, фагоцитарная активность гранулоцитов крови и селезенки были выше по сравнению с группой, получавшей опиоидную анальгезию, на 70% и 86% соответственно. Фагоцитарные индексы моноцитов крови и селезенки также были выше в 2 раза при обезболивании декскетопрофеном. Таким образом, при анальгезии декскетопрофена активность фагоцитов крови и селезенки мышей после операции сохраняется на более высоком уровне по сравнению с применением омнопона.

Ключевые слова: фагоцитарная активность, периоперационная анальгезия, ингибиторы циклооксигеназы-2, опиоидные препараты.

N. Khranovska, PhD, O. Skachkova, PhD

National cancer institute, Kyiv, Ukraine,

R. Sydor, PhD stud., L. Skivka, DSc.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE EFFECT OF ANALGESIA WITH OMNOPON AND DEXKETOPROFEN ON THE ENDOCYTIC ACTIVITY OF PHAGOCYTES OF DIFFERENT LOCALISATION ON THE SURGICAL TUMOR RESECTION MODEL

We aimed to compare the effect of anesthesia with opioid analgesics omnopon and non-selective COX-2 inhibitor dexketoprofen on the endocytic activity of phagocytes of different localization sites on the model of surgical tumor removal. The study used 50 C57/black mice, which were transplanted with Lewis lung carcinoma in the hind paw pad. After 22 days the tumor paw was amputated. Analgesics (omnopon 10 mg/kg, dexketoprofen – 20 mg/kg) was administered 30 minutes before the operation and once per day for 3 days after surgery. Assessment of endocytic activity of phagocytes was performed by flow cytometry before the surgery, at days 1 and 3 after the surgery. It was found that dexketoprofen analgesia maintain the endocytic activity of blood and spleen phagocytes in the postoperative period. At day 3 postsurgery in dexketoprofen-treated animals phagocytic activities of blood and spleen granulocytes were higher compared to the group receiving opioid analgesia by 70% and 86% respectively. Phagocytic indices of blood and spleen monocytes were also 2 times higher at dexketoprofen-treated mice. Thus, dexketoprofen analgesia maintains the activity of blood and spleen phagocytes in mice after the surgical tumor removal at a much higher level as compared with the omnopon analgesia.

Keywords: phagocytic activity, perioperative analgesia, cyclooxygenase-2 inhibitors, opioid drugs.

УДК: 612.398.192:542.49.612.112

Н. Салига, канд. біол. наук, Р. Іскра, д-р біол. наук
Інститут біології тварин НААН України, Львів

ВПЛИВ L-ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ НА ДЕЯКІ БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ДІЇ НІТРИТУ НАТРІЮ

Досліджено вплив різних доз L-глутамінової кислоти на активність антиоксидантних ензимів та окремих біохімічних показників крові щурів за дії нітритру натрію. Показано, що введення нітритру натрію приводить до зниження активності антиоксидантних ензимів та вмісту гемоглобіну і глюкози у крові тварин. Встановлено, що введення щурам L-глутамінової кислоти призводить до менш виражених змін досліджуваних показників стосовно контрольної групи тварин.

Ключові слова: щури, L-глутамінова кислота, нітрит натрію, антиоксидантні ензими, інтоксикація.

Вступ. Організм людини нітрати та нітриту поступають разом з водою, продуктами харчування та лікарськими препаратами. Деструктивний вплив нітритів та нітратів на організм зумовлений ініціацією вільнорадикальних процесів та перекисного окиснення ліпідів, що призводить до пошкодження клітинних мембран, зниження активності імунної системи, змін антиоксидантної системи, активації окиснювальної модифікації протеїнів. Існують думки, що нітриту здатні інгібувати активність пероксидаз, внаслідок чого швидкість нейтралізації активних форм Оксигену знижується [4]. Нітриту окислюють двоховалентний Ферум гемоглобіну у трьохвалентний. При цьому утворюється метгемоглобін, який не здатен переносити Оксиген до тканин і органів. Це приводить до порушення нормального дихання клітин організму, тобто гіпоксії. Найбільша небезпека підвищеного вмісту нітратів і нітритів в організмі полягає у тому, що вони переходять в N-нітросполуки, які володіють мутагенною дією та мають високу гепато- та нефротоксичність. Існують публікації [10], де висловлюються припущення здатності нітритів інгібувати не лише гемоглобін, але й інші гемовмістні протеїни, у цьому числі, цитохроми електронтранспортного ланцюга мітохондрій.

В останні роки все більший інтерес викликають речовини, які здатні запобігти або усунути пошкодження спричинені вільними радикалами та захистити організм від наслідків вільнорадикального окиснення. До таких речовин належать амінокислоти, яким властива мала токсичність, висока фармакологічна і терапевтична активність, широкий спектр дії як лікарських засобів [13, 14]. Особливе місце займає L-глутамінова кислота, яка володіє вираженою антиоксидантною, мембраностабілізуючою та антигіпоксичною активністю [5, 8]. Ця кислота бере участь у протеїновому і вуглеводному обміні, стимулює окислювальні процеси, перешкоджає зниженню окисно-відновного потенціалу, підвищує стійкість організму до гіпоксії, покращує обмін речовин, впливає на процеси гліколізу в тканинах, проявляє гепатопротекторну дію [2, 12].

Мета роботи полягала у дослідженні впливу різних доз L-глутамінової кислоти на активність окремих антиоксидантних ензимів та біохімічних показників у крові щурів за умов введення нітритру натрію.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проведено на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 200-220 г. Тваринам згодовували стандартний комбікорм для лабораторних щурів. Під час проведення досліджень на тваринах дотримувалися принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положенням "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей" (Страсбург, 1986) і "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим Націона-

льним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Було сформовано 4 групи тварин-аналогів (3 дослідних і 1 контрольна). Тваринам першої дослідної групи вводили внутрішньоочеревинно одноразово нітрит натрію з розрахунку 50 мг/кг (вибрана дозоздатна викликати гіпоксію середнього ступеня важкості), тваринам другої дослідної групи – нітрит натрію з розрахунку 50 мг/кг, після чого розчин L-Glu у дозі 500 мг/кг. Тваринам третьої дослідної групи вводили нітрит натрію з розрахунку 50 мг/кг, після чого розчин L-Glu у дозі 750 мг/кг. Дози L-глутамінової кислоти були вибрані на основі попередніх досліджень, враховуючи сукупність досліджених біохімічних показників та найбільшу ефективність у боротьбі з оксидативним стресом. Щурам контрольної групи вводили відповідну кількість фізіологічного розчину. Через добу тварин всіх груп за анестезії ефіром декапітували.

В еритроцитах крові визначали глутатіонредуктазну активність (ГР) (КФ 1.6.4.2) за швидкістю окислення NADPH при $\lambda = 340$ нм [1]; глутатіонтрансферазну активність (ГТ) (КФ 2.5.1.18) за швидкістю утворення кон'югату глутатіону і 1-хлор-2,4-дінітробензолу [7]; активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) (КФ 1.1.1.49) визначали спектрофотометричним методом, що базується на використанні спряжених систем окиснення або відновлення нікотинамідних коензимів [3]; концентрацію глюкози визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів "Філісіт-Діагностика" (Україна); концентрацію гемоглобіну визначали гемоглобін-ціанідним методом [6]; концентрацію загального протеїну визначали за методом Лоурі [11]. Одержані цифрові дані обробляли статистично. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стюдента.

Результати та їх обговорення. Як показали результати досліджень, інтоксикація нітритом натрію супроводжувалась зниженням активності антиоксидантних ензимів у крові щурів. Глутатіонредуктазна активність (Рис.1) була нижчою у тварин усіх дослідних груп, але слід відзначити вірогідне зниження цього показника лише у щурів першої та другої дослідних груп відповідно на 38,2%, 23,8% порівняно до тварин контрольної групи. Зниження активності цього ензиму є несприятливим для організму, оскільки глутатіонредуктаза відновлює окислений глутатіон, який є необхідним для функціонування іншого ензиму – глутатіонпероксидази, яка відновлює пероксид гідрогену і пероксиди протеїнів, нуклеїнових кислот і ліпідів. Причиною зниження глутатіонредуктазної активності може бути виснаження антиоксидантної системи через певний час після дії токсиканта. Можна припустити, що іншою причиною може бути виснаження пула НАДФН в умовах розвитку гіпоксії та виснаження енергетичних ресурсів системи захисту клітини.

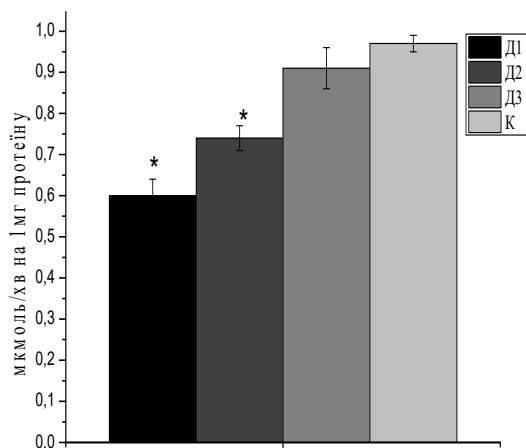


Рис.1. Глутатионредуктазна активність в еритроцитах крові щурів

В цьому і наст. рис.: *-вірогідно ($p < 0,05$) відносно контролю

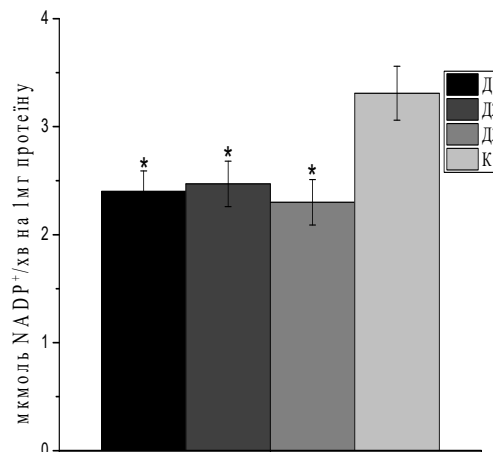


Рис.2. Активність Г-6-ФДГ в еритроцитах крові щурів

Це припущення узгоджується з результатами досліджень активності Г-6-ФДГ, ензиму пентозофосфатного гліколізу. Основна функція цього ензиму полягає у відновленні НАДФ до НАДФН, що необхідний для переходу окисленого глутатіону у відновлену форму. Пентозофосфатний гліколіз забезпечує клітину енергією. Зниження активності Г-6-ФДГ приводить до зниження енергетичних запасів клітини. Наші результати показали вірогідно нижчу активність Г-6-ФДГ в усіх дослідних групах тварин відповідно на 27,5 %, 25,4% та 30,6% порівняно з контролем (Рис.2). Можна припустити, що подібні зміни відбуваються внаслідок пошкодження ензиму вільними радикалами, які активно продукуються за дії нітриту натрію. Відповідно порушується процес відновлення НАДФ, і, як наслідок, дефіцит відновленого НАДФН для ензиму ГР. Окрім цього, зниження активності Г-6-ФДГ і ГР приводить до порушення нормальної концентрації відновленого глутатіону, оскільки ці ензими відповідають за відновлення цього трипептиду.

ГТ каталізує незворотній процес кон'югації відновленого глутатіону з електрофільними чужорідними сполуками [9]. Цей процес є початковою стадією синтезу меркаптурових кислот – продуктів деградації глутатионового кон'югату, який пошкоджує ДНК. Як видно з результатів досліджень (Рис.3) глутатіонтрансферазна активність була вірогідно нижчою майже у 2 рази у тварин першої дослідної групи, якій вводили нітрит натрію у дозі 50 мг/кг порівняно з тваринами контрольної групи. Що стосується тварин другої та третьої дослідних груп, які тримували L-глутамінову кислоту у різних дозах, глутатіонтрансферазна активність виходила практично на рівень контрольних значень. Додавання L-глутамінової кислоти, яка відіграє ключову роль у циклі трикарбонових кислот ймовірно сприяло посиленому утворенню АТФ, яка необхідна для енергозабезпечення всіх процесів кон'югації.

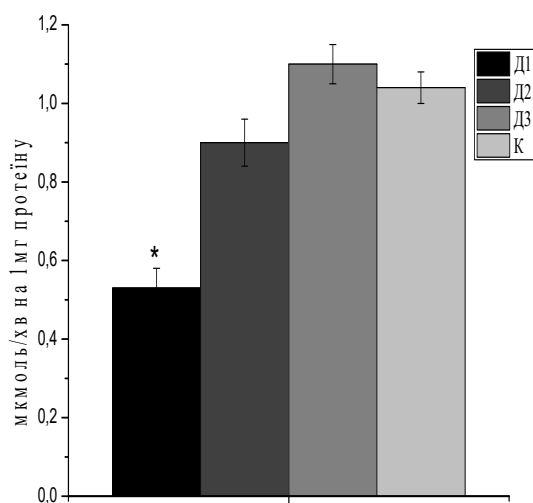


Рис.3. Глутатіонтрансферазна активність в еритроцитах крові щурів

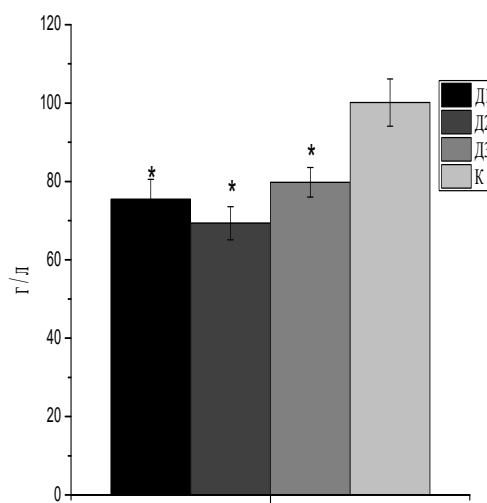


Рис.4. Вміст загального гемоглобіну в еритроцитах крові щурів

Першою ланкою, яка зазнає пошкоджень при дії нітрит-іонів є гемоглобін. Вміст загального гемоглобіну у наших дослідженнях вірогідно знижувався у всіх дослідних груп тварин стосовно контролю відповідно (Рис.4).

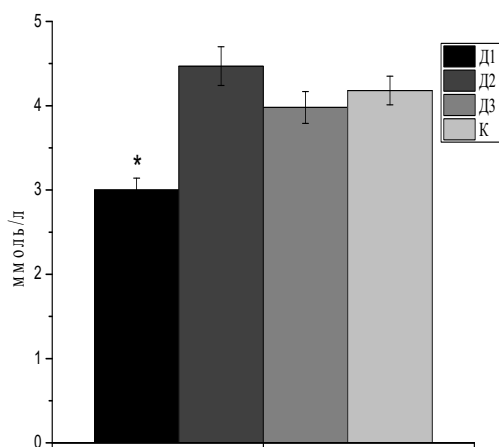


Рис.5. Вміст глюкози в плазмі крові щурів

Глюкоза є енергетичним субстратом у клітинах, а проміжні продукти катаболізму цього моносахариду впливають на Оксиген-транспортні властивості гемоглобіну. Вміст глюкози у плазмі крові тварин першої дослідної групи був вірогідно нижчим порівняно до контрольної групи тварин (Рис.5). Зниження вмісту глюкози в тканинах можна пояснити участю у низці метаболічних процесів, що активуються за дії ксенобіотиків. Концентрація загального протеїну була нижчою у тварин першої дослідної групи відповідно на 37,1% порівняно з контролем (Рис.6). Можна припустити, що зниження протеїну відбувається внаслідок гіпоксії, яку викликає нітрит натрію. Слід відмітити, що у тварин другої та третьої дослідних груп, що додатково отримували L-Glu цей показник виходив на рівень контрольних значень.

Таким чином, з'ясовано, що інтоксикація тварин нітритом натрію у дозі 50 мг/кг супроводжувалась зниженням активності антиоксидантних ензимів та окремих біохімічних показників крові щурів. Всі ці зрушення вказують на виснаження організму в умовах інтоксикації нітритом натрію. Тварини, які окрім нітриту натрію отримували L-глутамінову кислоту відрізнялися меншими різницями у порівнянні з контрольною групою, а по деяких показниках виходили на рівень контрольних значень. Більш вигідно відрізнялась дослідна група, яка отримувала вищу дозу L-Glu. Аналіз отриманих нами результатів дозволяє говорити про те, що L-Glu сприяє нейтралізації шкідливої дії нітритів, що потрапили в організм.

Висновки. Встановлено, що при дії нітриту натрію в організмі щурів знижується активність досліджуваних ензимів антиоксидантного захисту та загальний вміст протеїну, гемоглобіну та глюкози. Виявлено, що введення ураженим щурам різних доз L-глутамінової кислоти приводило до таких змін: глутатіонтрансферазна активність, вміст глюкози та загального протеїну був майже на рівні контрольних значень у тварин обох дослідних груп, яким вводили різні дози L-глутамінової кислоти, а глутатіонредуктазна активність лише у тварин третьої дослідної групи.

Список використаних джерел

1. Путилина Е. Ф. Определения активности глутатионредуктазы / Путилина Е. Ф. // Методы биологических исследований. – М.: Ин. Лит, 1982. – С. 181-183.

Можна припустити, що зниження рівня гемоглобіну може бути пов'язано з пригнічення еритропоетичної функції кісткового мозку внаслідок прояву токсичної дії нітриту натрію та трансформацією гемоглобіну в метгемоглобін.

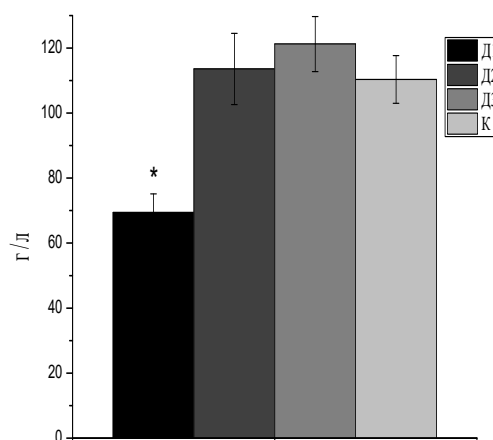


Рис.6. Концентрація загального протеїну в плазмі крові щурів

2. Салига Н.О. Активність глутатіонової ланки антиоксидантного захисту та інтенсивність процесів пероксидного окислення ліпідів у тканинах щурів за дії L-глутамінової кислоти / Н.О. Салига // Український біохімічний журнал. – 2013. – Т. 85, №4. – С.40-47. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem_2013_85_4_7
3. Снитинский В.В., Янович В.Г. Исследование углеводно-энергетического обмена у сельскохозяйственных животных: методические рекомендации. – Львов, 1984. – 28 с.
4. Шугалей И.В. Влияние интоксикации нитритом натрия на активность ферментов антиоксидантной защиты и процессы перекисидации в эритроцитах мышей / И.В. Шугалей, С.Н. Львов, И.В. Целинский // Український біохімічний журнал. – 1992. – № 2. – С. 111-114.
5. Brosnan J.T. Glutamate: a truly functional amino acid / J.T.Brosnan, M.E.Brosnan // Amino Acids. – 2012. – Vol. 25. – P. 207-218. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. Drabkin D. The crystallographic and optical properties of the haemoglobin of man in the comparison with those of other species / D. Drabkin // J. Biol. Chem. – 1946. – Vol. 164. – P.703. Available from: <http://www.jbc.org/>
7. Habig W.H. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J.Pabst, W.B.Jakoby // J.Biol. Chem. – 1974. – Vol. 249. – P.7130-7139. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
8. Hansen A.M. Glutamate joins the ranks of immunomodulators / A.M. Hansen, R.R. Caspi // Nature medicine. – 2010. – Vol. 16, №8. – P. 856-858. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. Hayes J. D. Glutathione transferases / J. D. Hayes, J. U. Flanagan, I. R. Jewsey // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2005. – Vol. 45. – P. 51-88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. Jensen F.B. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective / F.B. Jensen // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1787, № 7. – P. 841-848. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
11. Lowry O.H. Protein measurement with folinphenol reagent / O.H.Lowry, H. J. Rosebrough, A. L.Farr, R. J. Randall// J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265-275. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
12. Roth E. Non nutritive effects of glutamine / E. Roth // J.Nutr. – 2008. – Vol. 138. – P. 2025-2031. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
13. Wu G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health / G.Wu // Adv.Nutr. – 2010. – Vol.1, № 1. – P. 31-37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. Wu G. Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond / G. Wu, F.W. Bazer, Z. Dai, D.Li, J.Wang, Z. Wu// Annu Rev Anim Biosci. – 2014. – Vol. 2. – P. 387-417. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

References

1. Putilina E.F. [Determining the activity of glutathione reductase. Methods of biological studies]. – M.: In.Lit, 1982:181-3. Russian.
2. Salyha N. O. [Activity of the glutathione system of antioxidant defense in rat under the action of L-glutamic acid]. Ukrainian Biochem. Journal. 2013; 85(4):40-7. Ukrainian.
3. Snitsky V.V., Yanovich V.G. [Study of carbohydrate and energy metabolism in farm animals: guidelines]. Lviv; 1984. 28 p. Russian.
4. Shugaley I.V., Lvov S.N., Tselinsky I.V., Baev V.I. [Effect of sodium nitrite in toxication on the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation].

tion processes in red blood cells of mice]. Ukrainian Biochem. Journal. 1992; 4:111-4. Ukrainian.

5. Brosnan J.T., Brosnan M.E. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids*. 2013 Sep;45(3):413-8. doi: 10.1007/s00726-012-1280-4.

6. Drabkin D. The crystallographic and optical properties of the haemoglobin of man in the comparison with those of other species. *J. Biol. Chem.* 1946;164:703.

7. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974; 249:7130-39.

8. Hansen A.M., Caspi R.R. Glutamate joins the ranks of immunomodulators. *Nat. Med.* 2010;16(8): 856-8. doi: 10.1038/nm0810-856.

9. Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 45: 51-88. PubMed PMID: 15822171.

10. Jensen F.B. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009;1787(7): 841-8. doi: 10.1016/j.bbabo.2009.02.010.

11. Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193(1): 265-75. PubMed PMID:14907713.

12. Roth E. Non nutritive effects of glutamine. *J. Nutr.* 2008;138(10):2025S-2031S. PubMed PMID:18806119.

13. Wu G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv. Nutr.* 2010;1(1):31-7. doi: 10.3945/an.110.1008.

14. Wu G., Bazer F.W., Dai Z., Li D., Wang J., Wu Z. Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2014;2:387-417. doi: 10.1146/annurev-animal-022513-114113.

Надійшла до редколегії 18.05.16

Н. Салыга, канд. биол. наук, Р.Искра, д-р биол. наук
Институт биологии животных НААН, Львов, Украина

ВЛИЯНИЕ L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ НИТРИТА НАТРИЯ

Исследовано влияние разных доз L-глутаминовой кислоты на активность антиоксидантных ферментов и отдельных биохимических показателей крови крыс при действии нитрита натрия. Показано, что введение нитрита натрия приводит к снижению активности антиоксидантных ферментов и содержания гемоглобина и глюкозы в крови животных. Установлено, что введение крысам L-глутаминовой кислоты приводит к менее выраженным изменениям исследуемых показателей по сравнению с контрольной группой животных.

Ключевые слова: крысы, L-глутаминовая кислота, нитрит натрия, антиоксидантные ферменты, интоксикация.

N. Salyha, PhD, R. Iskra, DSc
Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, Ukraine

EFFECT OF L-GLUTAMIC ACID ON SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RAT BLOOD UNDER THE ACTION OF SODIUM NITRITE

The effect of different doses of L-glutamic acid on activity of antioxidant enzymes and some blood biochemical parameters in rats under the influence of sodium nitrite was studied. It was shown that administration of sodium nitrite leads to decreased activity of antioxidant enzymes and hemoglobin and glucose content in the blood of animals. It was established, that changes of studied parameters were less expressed in rats administered of L-glutamic acid compared to the control group of animals.

Key words: rats, L-glutamic acid, sodium nitrite, antioxidant enzymes, intoxication.

УДК 578.1

Л. Дудар, асп., В. Поліщук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ГІСТОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ЦИРКОВІРУС-АСОЦІЙОВАНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ, УРАЖЕНИХ ЦИРКОВІРУСОМ 2-ГО ТИПУ

Аналіз патоморфологічних змін органів свиней, уражених цирковірусом свиней 2 типу показав, що найбільше відхилення спостерігається в органах імунної системи, а саме лімфовузлах та селезінці. Таким чином, для встановлення діагнозу як цирковірус-асоційованого синдрому є необхідним, крім підтвердження критеріїв специфічних клінічних ознак, проведення гістологічних досліджень мікроскопічних уражень, пов'язаних з ЦВС-2 (виснаження лімфоїдної тканини та/або заміна лімфоцитів сполучною тканиною).

Ключові слова: цирковірус-асоційований синдром свиней, гістологічний аналіз, цирковірус свиней 2-го типу.

Вступ. Вперше захворювання, асоційоване з цирковірусом свиней 2 типу було описано у 1997 році і названо синдромом мультисистемного виснаження поросят (Porcine Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS) [1, 2]. Однак, наявність збудника в матеріалі тварин не обов'язково свідчить про розвиток клінічних проявів [3]. Тому, для встановлення діагнозу як цирковірус-асоційованого синдрому необхідним є підтвердження таких критеріїв: наявності специфічних клінічних ознак (втрата ваги, виснаження, респіраторні проблеми), мікроскопічних уражень, пов'язаних з ЦВС-2 (виснаження лімфоїдної тканини, і/або заміна лімфоцитів сполучною тканиною) та антигену ЦВС-2 за імуногістохімічного дослідження або ДНК вірусу за молекулярно-генетичного дослідження [3]. Таким чином, визначення захворювання як цирковірус-асоційованого синдрому свиней може бути здійснене за субклінічного перебігу, коли в матеріалі виявлено збудника та характерні патологічні зміни або за клінічного перебігу при таких проявах як мультисистемне захворювання з втратою ваги, високий рівень смертності, респіраторні дисфункції,

дерматити, нефропатії, кишкові розлади та проблеми репродукції (абортів, муміфікація плодів, народження нежиттєздатного потомства) [3]. Наразі, синдроми, асоційовані з цирковірусом 2 типу, описано серед свиней усіх без виключення країн світу, де здійснюють промислове вирощування цих тварин. В той же час, найбільше вірус поширений в Німеччині, Пн. Ірландії, Данії, Швеції, Швейцарії, а також в США, Канаді, Китаї, Індії [4, 5, 6]. Причому не виявлено кореляції між розвитком тих чи інших клінічних синдромів та географічними особливостями поширення вказаного збудника.

Мета. Таким чином, метою дослідження був гістологічний аналіз зразків тканин та органів свиней з 109 господарств 22 областей України, уражених цирковірусом свиней 2 типу.

Матеріали та методи. Для виділення вірусу використовували матеріал тварин, віком від 35 до 120 днів, у яких було зареєстровано зовнішні ознаки цирковірус-асоційованих синдромів.

Приготування гістологічних зразків. Фіксування досліджуваних зразків тканин органів проводили занурен-

© Дудар Л., Поліщук В., 2016

ням у 80 мл 10 % розчину формаліну та витримуванням у мікрохвильовій пічі впродовж 30 секунд за потужності 400 Вт з водним навантаженням 400 мл. Після фіксації проводили первинне зневоднення тканин шляхом занурення зразків у 80 мл 96 % етанолу та експозицією у мікрохвильовій печі протягом 10 хв за потужності 100 Вт. Після цього зразки тканин нарізали (ширина зрізу становила не більше 1,5 см) з урахуванням особливостей будови кожного органу та наявності видимих патологічних змін й поміщали у пластикові касети Turbo flowe.

Після фіксування проводили попередню обробку досліджуваних тканин із використанням автоматизованої станції Microm STP-120 (7). Після закінчення процесу попередньої обробки зразки переносили у металеві форми, заливали рідким парафіном і накривали пластиковою касетою з розрахунку 6 мл парафіну на одну касету. Металеві форми зі шматочками органів переносили на криоконсоль на 30 хв. Для заливки та охолодження зразків використовували станцію для заливки "Microm EC 350".

Приготування тонких зрізів із патологічного матеріалу залитого у парафін здійснювали із використанням мікротому "Microm HM 340-E" та ножів для гістологічних досліджень "Sec-130". Прирізки виконували встановлюючи "крок" мікротому 50 мкм, а для виготовлення зразків тканин органів – 5 мкм. Зрізи тканин органів досліджуваних зразків переносили з водяної бані (температура води 39 °C) безпосередньо на скельця.

Виготовлені гістологічні зрізи витримували 1 – 2 години за температури + 37 °C для підсушування. Фарбування гістологічних зрізів здійснювали розчина миеози-

ну та гематоксиліну. Для цього попередньо зрізи послідовно занурювали на 5 хвилин у розчини ксилолу 99,85 %, етанолу 96 %, етанолу 70 % та дистильовану воду, а потім поміщали на 1 хв у розчин еозину. Після витримування у розчині еозину промивали протягом 3 хв у воді, після чого занурювали зріз у розчин гематоксиліну на 30 секунд та знову виконували відмивання зразків водою протягом 3 хв. По закінченню процесу фарбування зрізи витримували по 3 хв у етанолі різних концентрацій (70 % й 96 %) та у ксилолі 99,85 %.

Мікроскопіювання досліджуваних зразків проводили за збільшення у 100 разів із застосуванням об'єктиву Plan Neo fluar 10x, (CarlZeiss) та збільшення в 1000 разів із використанням іммерсійного об'єктиву мікроскопу Axio skor 2 plus, CarlZeiss (збільшення окуляру 10X). Фотографування зразків для подальшого аналізу виконували за допомогою фотоапарату Canon Power Shot G5 за чотирьох кратного оптичного збільшення, що дозволяло отримувати мікрофотографії з результуючим збільшенням від 400 до 4000 разів. Отримані мікрофотографії маркували, зберігали в архіві та проводили аналіз і опис виявлених гістологічних змін.

Результати та обговорення. Гістологічний аналіз патолого-морфологічних змін проводили в тканинах органів, відібраних від 54 свиней, у зразках від яких було виявлено цирковірус свиней 2 типу методом ПЛР.

У результаті аналізу було встановлено, що у переважної більшості обстежених тварин (37 з 54) спостерігаються патологічні зміни у лімфатичних вузлах. Втім у 17 тварин структура зазначеного органу була збережена.

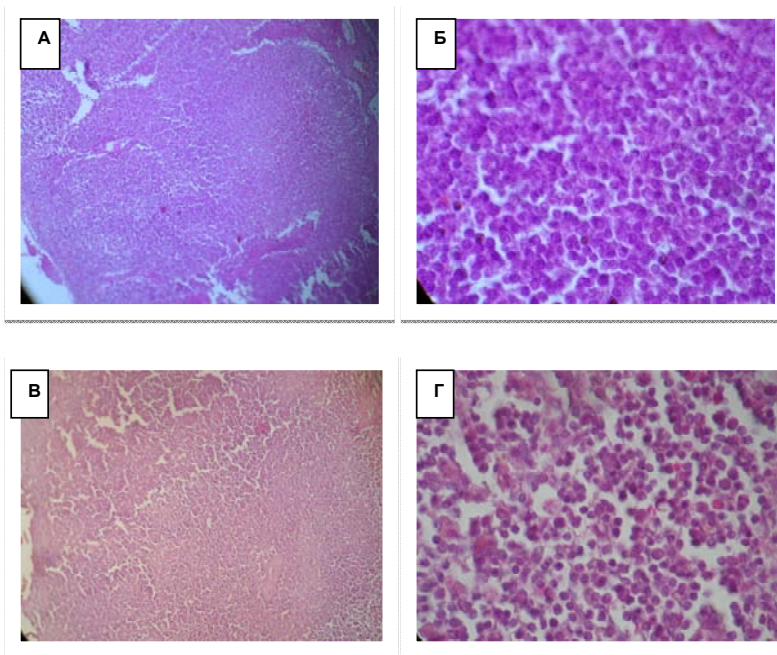


Рис. 1. Структура лімфатичного вузла свиней у нормі: А – збільшення в 400 разів, Б – збільшення в 4000 разів. В, Г: виснаження фолікулів лімфатичного вузла свиней на 70 %, обширні зони некрозу лімфоцитів: В – збільшення в 400 разів, Г – збільшення в 4000 разів.

Водночас, серед патологічних змін, що були відмічені в різних лімфатичних вузлах, у 2 випадках спостерігали часткове виснаження фолікулів, що становило близько 10 % від норми.

У 12 зразках пахових, перибронхіальних та мезентеріальних лімфатичних вузлів, виснаження фолікулів становило близько 20 %, а також було відмічено зони некрозу лімфоїдної тканини. Водночас, виснаження фолікулів лімфовузла на рівні 40% було виявлено у

10 досліджених випадках, а також встановлено наявність значних ділянок некрозу лімфоцитів та сполучнотканинного заміщення уражених зон.

Значно вищі рівні ураження тканини лімфатичного вузла було зареєстровано у 8 випадках і встановлено, що структура органу була зруйнованою, а рівень виснаження фолікулів сягав близько 70 %, крім того були наявні обширні зони некрозу тканини (рис. 1).

У 5 досліджених зразках пахових та мезентеріальних лімфатичних вузлів було встановлено 100 % виснаження фолікулів, некроз лімфоцитів та наявність повного заміщення структури органу сполучною тканиною.

Окрім зареєстрованих змін тканини лімфатичних вузлів, патолого-морфологічні ураження спостерігалися і у структурі іншого органу імунної системи свиней – селезінки. Так, виснаження білої пульпи селезінки на рівні 15 % зареєстрували у 22 зразках від тварин.

У 9 досліджених зразках виснаження білої пульпи селезінки сягало 70 %, також було відмічено наявність великих ділянок некрозу лімфоцитів та сполучнотканинного заміщення структури даного органу. Крім того, у 7 зразках селезінки свиней було зареєстровано повне руйнування структури органу, 100 % виснаження білої пульпи з абсолютним некрозом лімфоцитів та сполучнотканинним заміщенням.

Також патолого-морфологічні зміни було виявлено у легенях досліджених зразків від 26 з 54 свиней. А саме, було зареєстровано значне потовщення інтерстицій легень за рахунок лімфоцитарної інфільтрації та некротичні зміни паренхіми органу.

Крім того, спостерігали велику кількість крововиливів у легеневій тканині, а особливо у перибронхіальних ділянках, а також перибронхіальну фіброплазію та капілярний виразковий бронхіт.

При дослідженні структури кишечника у 13 з 54 досліджених зразків спостерігалися крововиливи у підслизовій оболонці органу, некротичні зміни епітелію слизової та підслизової оболонок і вкорочення ворсинок. Патолого-морфологічні зміни кишечнику характеризувалися також наявністю лімфоцитарних інфільтрацій у підслизовій оболонці, що призводило до втрати структури органу. Втім у 41 з 54 досліджених зразків кишечника свиней значних морфолого-патологічних змін виявлено не було. У цих зразках реєстрували наявність лише незначних зон некрозу епітелію слизової оболонки.

Окрім порушень структури лімфатичних вузлів, селезінки, легень та кишечника в зразках тварин, патолого-морфологічні зміни спостерігалися і в структурі печінки у 4 з 54 обстежених свиней. Втім у 50 з 54 досліджених зразків жодних відхилень від норми виявлено не було. Слід зазначити, що не дивлячись на невелику кількість зразків з патолого-морфологічними змінами печінки, серед встановлених змін було виявлено значні зони некрозу гепатоцитів, потужні крововиливи та ознаки запального процесу в паренхімі органу.

Висновки. На підставі результатів аналізу патоморфологічних змін органів свиней, можна зробити висновки, що найбільше відхилень спостерігається в органах імунної системи, а саме лімфовузлах та селезінці, які, в свою чергу, характеризуються різним ступенем тяжкості (від незначних ділянок виснаження органів до повного

некрозу тканини з сполучнотканинним заміщенням). Певні порушення було виявлено також і в структурі легень, кишечника та печінки тварин. Натомість специфічних змін тканин мозку, трахей, серця, нирок і шлунку виявлено не було. Отримані нами результати дозволяють зробити висновок про те, що для встановлення діагнозу як цирковірус-асоційованого синдрому є необхідним, крім підтвердження таких критеріїв як наявність специфічних клінічних ознак (втрата ваги, виснаження, респіраторні проблеми), проведення гістологічних досліджень мікроскопічних уражень, пов'язаних з ЦВС-2 (виснаження лімфоїдної тканини, та/або заміна лімфоцитів сполучною тканиною).

Список використаної літератури

1. Allan G. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe // Allan G., McNeilly F., Kennedy S. et al. // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1998. – Vol. 10. – P. 3–10.
2. Harding J. Recognizing and diagnosing post weaning multi systemic wasting syndrome (PMWS) // Journal of Swine Health and Production / Harding J., Clark E. – 1997. – Vol. 5. – P. 201–203.
3. Sorden S. Update on porcine circovirus and post weaning multi systemic wasting syndrome (PMWS) // Journal of Swine Health and Production. – 2000. – Vol. 8. – P. 133–136.
4. Grierson S. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK // Archives of Virology / Grierson S., King D., Sandvik T. et al. – 2004. – Vol. 149. – P. 1171–1183.
5. Magar R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 // Canadian Journal of Veterinary Research / Magar R., Muller P., Larochelle R. – 2000. – Vol. 64. – P. 184–186.
6. Rodriguez-Arrioja G. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain // Journal of Veterinary Medicine Series B / Rodriguez-Arrioja G., Segale's J., Rosell C. et al. – 2003. – Vol. 50. – P. 99–101.
7. Thermo Scientific Spin Tissue Processor Microm STP 120. INSTRUCTION MANUAL. Version 2.30. Microm International GmbH, Walldorf, Germany – 2011, 42p.

References

1. Allan G., Mc Neilly F., Kennedy S. et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pig with a wasting disease in the USA and Europe // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1998. – Vol. 10. – P. 3–10.
2. Harding J., Clark E. Recognizing and diagnosing post weaning multi systemic wasting syndrome (PMWS) // Journal of Swine Health and Production. – 1997. – Vol. 5. – P. 201–203.
3. Sorden S. Update on porcine circovirus and post weaning multi systemic wasting syndrome (PMWS) // Journal of Swine Health and Production. – 2000. – Vol. 8. – P. 133–136.
4. Grierson S., King D., Sandvik T. et al. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK // Archives of Virology. – 2004. – Vol. 149. – P. 1171–1183.
5. Magar R., Muller P., Larochelle R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 // Canadian Journal of Veterinary Research. – 2000. – Vol. 64. – P. 184–186.
6. Rodriguez-Arrioja G., Segale's J., Rosell C. et al. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain // Journal of Veterinary Medicine Series B. – 2003. – Vol. 50. – P. 99–101.
7. Thermo Scientific Spin Tissue Processor Microm STP 120. INSTRUCTION MANUAL. Version 2.30. Microm International GmbH, Walldorf, Germany – 2011, 42p.

Надійшла до редколегії 15.06.16

Л. Дудар, асп., В. Полищук, д-р биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЦИРКОВИРУС-АССОЦИИРОВАННОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ, ПОРАЖЕННЫХ ЦИРКОВИРУСОМ 2-ГО ТИПА

Анализ патоморфологических изменений органов свиней, пораженных цирковиром свиней 2 типа показал, что больше всего отклонений наблюдается в органах иммунной системы, а именно лимфоузлах и селезенке. Таким образом, для установления диагноза как цирковир-ассоциированного синдрома необходимо, кроме подтверждения критериев специфических клинических признаков, проведения гистологических исследований микроскопических поражений, связанных с ЦВС-2 (истощение лимфоидной ткани и / или замена лимфоцитов соединительной тканью).

Ключевые слова: цирковир-ассоциированный синдром свиней, гистологический анализ, цирковир свиней 2-го типа.

L. Dudar, PhD student., V. Polischuk, Dr.Sci

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

HISTOLOGICAL ASPECTS OF CIRCOVIRUS-ASSOCIATED SYNDROME OF PIGS INFECTED WITH CIRCOVIRUS TYPE 2

Analysis of pathological changes in organs of pigs infected with porcine circovirus type 2 showed that most of the variances were observed in immune system's organs, namely the lymph nodes and spleen. Thus, in addition to specific clinical symptoms' criteria confirmation, the histological examination of microscopic lesions associated with PCV2 (depletion of lymphoid tissue and / or connective tissue replacement lymphocytes) is necessary for concluding the diagnosis of circovirus-associated syndrome.

Keywords: swine circovirus-associated syndrome, histological analysis, porcine circovirus type 2.

УДК (612.825.5+612.825.1):57.017.6

Н. Кожем'яко, студ. А. Чернінський, канд. біол. наук, І. Зима, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
Н. Карасевич, канд. мед. наук, С. Крижанівський, канд. біол. наук
Державна установа "Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова НАМН України", Київ

ГЕТЕРОГЕННА ПРИРОДА ТЕТА-АКТИВНОСТІ ТА ЇЇ ДЖЕРЕЛА ПРИ ХВОРОБІ ПАРКІНСОНА

В процесі прогресування хвороби Паркінсона (ХП) зростає вірогідність розвитку немоторних симптомів, до яких належать когнітивні порушення. У багатьох EEG-дослідженнях було показано, що когнітивні порушення корелюють зі збільшенням спектральної потужності θ -діапазону. Метою даної роботи було встановити, чим викликаний даний феномен. В обстеженні взяли участь 60 обстежуваних – 30 хворих на ХП та 30 здорових добровольців віком 45-65 років, у яких було зареєстровано EEG в стані спокою. В результаті нам вдалось встановити, що збільшення спектральної потужності θ -діапазону має гетерогенну природу. Одною з причин є наявність підвищеної активності специфічних генераторів θ -активності в задній частині поясної звивини, інша складова – це уповільнення основного ритму спокою, яке впливає на характеристики потужності θ -діапазону (ефект Гібса).

Ключові слова: тета (θ) -активність, хвороба Паркінсона, уповільнення основного ритму спокою.

Вступ. Хвороба Паркінсона (ХП) – одне з найпоширеніших нейродегенеративних захворювань, що обумовлене загибеллю нейронів чорної субстанції стовбура головного мозку і проявляється, в першу чергу, в порушенні рухових функцій – брадикинезії, ригідності м'язів та треморі спокою. Клінічна картина даного захворювання може ускладнюватись розвитком когнітивних розладів, причому якщо донедавна вважалося, що вони притаманні пізнім стадіям захворювання, то зараз існують дані про наявність певних порушень вже у 36% первинно діагностованих пацієнтів з ХП [1]. Такі зміни суттєво знижують якість життя хворих та прискорюють їх остаточну інвалідизацію, а виникнення деменції крім того знижує очікувану тривалість життя [2]. Однак питання про предиктори таких порушень та механізми їхнього розвитку залишається відкритим [3].

В ряді досліджень було показано, що помірні когнітивні розлади та деменції при нейродегенеративних захворюваннях відображаються у зміні структури біоелектричної активності головного мозку. Найбільш характерною особливістю цих перебудов є зростання потужності θ -діапазону EEG у таких пацієнтів [4, 5]. Цікаво, що при ХП з деменцією таке підвищення навіть більше виражене, ніж при хворобі Альцгеймера [5]. З іншого боку, встановлено, що підвищена відносно норми потужність θ -діапазону у осіб з ХП без когнітивних розладів може відображати зростання ризику розвитку деменції [6]. Все це вказує на можливу прогностичну цінність даного показника.

У той же час не до кінця зрозуміло, які саме зміни стоять за описаним посиленням θ -активності. З одного

боку, збільшення частки одного з діапазонів EEG може вказувати на активізацію незалежних патологічних генераторів відповідних ритмів. З іншого боку, було показано, що паралельно зі змінами в θ -діапазоні при ХП відбувається зменшення (відносно норми) частоти домінуючого ритму спокою, найбільш виражене також на фоні когнітивних дисфункцій [4, 6]. Як зазначають автори, зміни в θ -діапазоні можуть пояснюватись саме цим фактом, оскільки домінуючий пік може переходити з α - у θ -діапазон. Слід зауважити, що навіть якщо цього не відбувається, сповільнений ритм спокою може підвищувати потужність θ -діапазону за рахунок так званого ефекту витікання потужності (ефекту Гібса), що притаманний перетворенню Фур'є, яке широко застосовується для спектрального аналізу EEG [7]. Таким чином, існує як мінімум два можливих механізми описаних змін EEG-активності, однак їх фактична участь у патологічному процесі різних нейродегенеративних захворювань залишається нез'ясованою.

Метою даного дослідження є вивчення внеску двох описаних факторів у зміни вираженості θ -діапазону у осіб з ХП без деменції.

Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 60 обстежуваних однієї вікової групи (45-65 р.): пацієнти з ХП ($n=30$; $\text{♀}=20$, $\text{♂}=10$) порівнювались з групою контролю – добровольцями без діагностованих неврологічних захворювань ($n=30$; $\text{♀}=23$, $\text{♂}=7$). У всіх обстежуваних не було виявлено когнітивних порушень за результатами короткої шкали оцінки психічного статусу (Mini-mental State Examination, MMSE). Демографічні та клінічні характеристики пацієнтів з ХП наведені у Табл. 1.

Таблиця 1. Основні демографічні та клінічна характеристика обстежуваних з ХП

Показники	Група ХП, $M \pm Sd$
Тривалість хвороби, р.	$5,27 \pm 2,97$
Сумарний бал шкали MMSE	$28,37 \pm 1,28$
Сумарний бал шкали UPDRS	$49,33 \pm 18,2$
UPDRS 1	$1,97 \pm 1,75$
UPDRS 2	$13,63 \pm 4,66$
UPDRS 3	$33,73 \pm 14,39$
Стадійність за шкалою Hoehn-Yahr	Кількість пацієнтів
Стадія 1	1
Стадія 1,5	0
Стадія 2	5
Стадія 2,5	10
Стадія 3	14

Реєстрація EEG проводилась у першу половину дня у спеціально обладнаній для нейрофізіологічного дослідження кімнаті. Під час обстеження пацієнти перебу-

вали у розслабленому, спокійному стані в зручному положенні напівлежачи. Процедура дослідження полягала в реєстрації EEG у стані спокою із заплющеними

очима (3 хв). Для аналізу були обрані 20-секундні проміжки часу першої хвилини (20-40 с), другої хвилини (80-100 с) і третьої хвилини (140-160 с).

Електричну активність кори головного мозку реєстрували за допомогою апаратно-програмного комплексу "НейроКом" (Харків). Активні Ag/AgCl-електроди розташовували за міжнародною системою 10-20. Електроенцефалограма реєструвалась монополярно у 19 стандартних відведеннях: Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, C3, C4, P3, P4, T3, T4, T5, T6, O1, O2, Fz, Cz, Pz. У якості референтного використовували об'єднаний вушний електрод (A1+A2)/2). Частота дискретизації аналогового сигналу – 500 Гц. Застосовувались фільтри низьких та високих частот (0,3 Гц і 45 Гц відповідно) та вузькочастотний фільтр 50 Гц. Міжелектродний опір був менше 5 кОм. Артефакти знаходили і усували за допомогою візуального аналізу та аналізу незалежних компонент (ICA).

Аналізу підлягали фрагменти ЕЕГ довжиною 20 с. Для визначення спектрального складу енцефалограми застосовували швидке перетворення Фур'є із віконною функцією Гемінга для зменшення ефекту витікання потужності (ефекту Гібса). Ширина вікна спектрального аналізу становила 5 с. Під час аналізу ЕЕГ записів визначалась спектральна потужність таких частотних смуг $\theta 1$ (4,0-6,0 Гц), $\theta 2$ (6,0-7,5 Гц), $\alpha 1$ (7,51-9,5 Гц), $\alpha 2$ (9,51-11,0 Гц), $\alpha 3$ (11,0-13,0 Гц), $\beta 1$ (13,1-20,0 Гц), $\beta 2$ (20,1-35,0 Гц).

Для визначення впливу уповільнення основного ритму спокою на збільшення потужності θ -діапазону був використаний метод аналізу незалежних компонентів (Independent Component Analysis, ICA), який здійснювався в програмі "НейроКом". Визначались домінуюча частота і амплітуда α -ритму кожного обстежуваного, після чого ідентифікувались незалежні компоненти, виділені за допомогою ICA, в яких переважали коливання з відповідними характеристиками. Відібрані таким чином компоненти видалялись з сумарного ЕЕГ-сигналу.

Локалізація джерел спонтанної та викликанної активності здійснювалась за допомогою програмного комплексу sLORETA (Standardized low resolution electromagnetic tomography, R.D. Pascual-Marqui, Швейцарія) [8]. На підставі даних про розподіл ЕЕГ-сигналу по скальпу розраховувалась тривимірна модель розподілу щільності струму у мозку для окремих частотних діапазонів спонтанної ЕЕГ та для компонентів викликанних потенціалів, що відображала розміщення можливих джерел сигналу. Отримана модель співвідносилась із просторовим розміщенням сірої речовини мозку за даними томографічних зрізів атласу MNI (Montreal Neurological Institute). Моделі, отримані для окремих вибірок, статистично порівнювались між собою для виявлення відмінностей в локалізації та активності мозкових джерел біоелектричного сигналу.

Статистична обробка даних здійснювалась у пакеті програми "STATISTICA 8.0". Для аналізу виду розподілу даних був використаний W критерій Шапіро-Уїлка ($n \leq 50$). Оскільки дані не були розподілені за нормальним законом, порівняння вибірок проводилося за допомогою непараметричного критерію Манна-Вітні. Нульова гіпотеза відкидалася при рівні значущості $\alpha = 0.05$.

Результати та їх обговорення. За допомогою спектрального аналізу нами було проаналізовано характер змін частоти основного ритму спокою ЕЕГ у пацієнтів з ХП. Як і очікувалось, в результаті порівняння з контрольною групою ми виявили генералізоване збільшення спектральної потужності в $\theta 2$ -діапазоні протягом першої та третьої хвилин стану спокою (Рис.1, А). На другій хвилині відмінності в даному діапазоні стосувались тільки лівої скроневої та правої потиличної ділянок. Локальне збільшення потужності було відмічене також у $\theta 1$ - (відведення Т3, Т5) та $\alpha 1$ - (відведення F8) діапазонах. Значущих відмінностей інших компонентів спектру частот ЕЕГ виявлено не було.

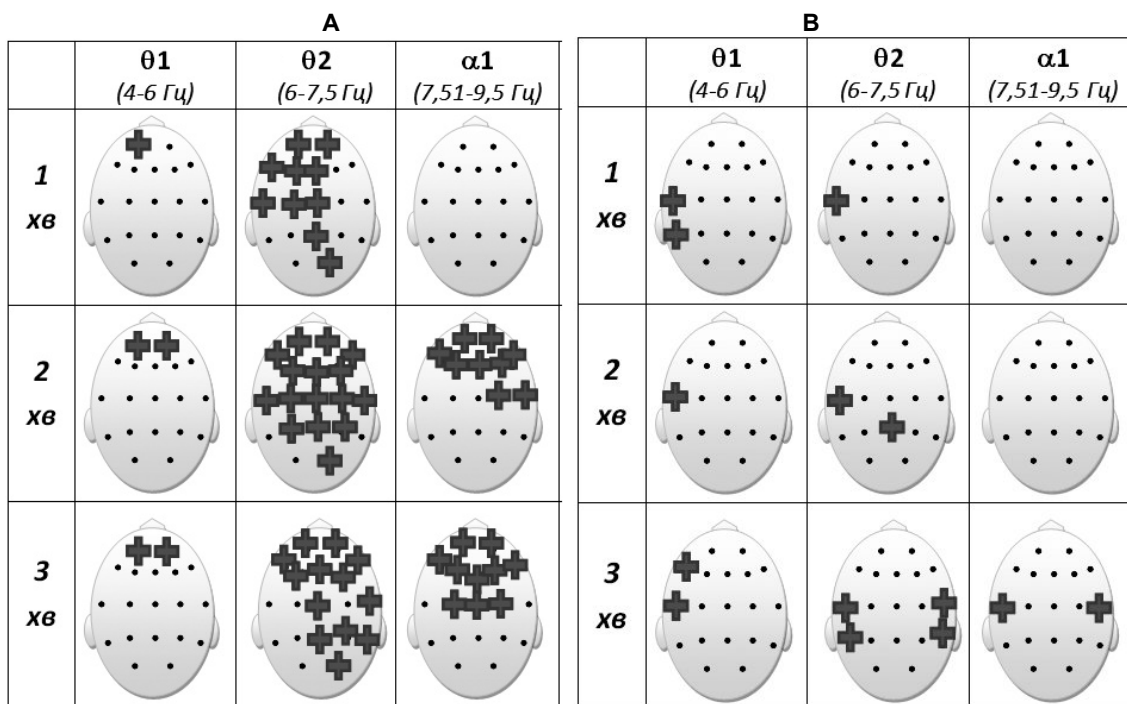


Рис. 1. Відмінності спектральної потужності піддіапазонів ЕЕГ у осіб з ХП відносно обстежуваних контрольної групи

Примітка:

А – результати обробки ЕЕГ без залучення ICA; В – результати обробки ЕЕГ після вилучення основного ритму спокою за допомогою ICA; "+" – більша спектральна потужність піддіапазону у обстежуваних з ХП ($p \leq 0,05$).

Отримані результати підтверджують наведені вище дані літератури про те, що при ХП у порівнянні з нормою виникають чіткі відмінності в структурі ЕЕГ, які полягають у збільшенні потужності низькочастотних коливань, найсильніше – у θ 2 діапазоні. Слід зауважити, що виникнення цих змін не пов'язане з помітними порушеннями у когнітивній сфері, оскільки обстежені нами пацієнти з ХП мали середній бал за шкалою психічного статусу MMSE не нижче 26. З іншого боку, ми вже згадували про докази зв'язку потужності θ -діапазону та порушення пізнавальних функцій [4, 6]. Це дає нам право припустити, що такі зміни ЕЕГ-активності є одним з продромальних симптомів когнітивної недостатності. З іншого боку, не можна виключати і того, що загальне зростання вираженості θ -діапазону при ХП (та деяких інших нейродегенеративних захворюваннях) і аналогічні зміни на фоні розвитку когнітивних порушень і деменції обумовлені незалежними механізмами.

Оскільки потужність ЕЕГ-діапазону є розраховуваним показником, виникає важливе питання: які саме перебудови електричної активності головного мозку лежать в основі описаних змін? Для відповіді на нього нами було запропоновано дві робочі гіпотези. Перша полягала в тому, що існують специфічні для ХП генератори патологічних коливань частотою 6-8 Гц. Саме ці незалежні від домінуючого ритму коливання можуть змінювати структуру ЕЕГ хворих на ХП, спричинюючи збільшення потужності θ 2-діапазону. Можливість подібних змін була показана раніше для людей, що мають помірні когнітивні розлади амnestичного типу [9].

Друга гіпотеза пов'язувала збільшення потужності високочастотного θ -діапазону з трансформацією ритму спокою у обстежуваних з ХП. Загалом основний ритм спокою зазнає змін впродовж онтогенезу – зокрема старіння супроводжується його плавним уповільненням, тобто зсувом у більш низькочастотну сторону [10]. Залежно від віку та інтенсивності такого зсуву частоти

виникає генералізоване збільшення потужності діапазонів α 1- та θ 2- у осіб похилого віку порівняно з молодими, в той час як більш високочастотні діапазони (α 2-, α 3 та β) не зазнають змін [11]. Вважається, що нейрофізіологічні причини такого явища пов'язані з поступовим зменшенням кількості нейронів мозку з віком. Тому можна припустити, що за рахунок наявності інтенсивної нейродегенерації, характерної для ХП, процес уповільнення основного ритму спокою також прискорюється. Відповідно, збільшення потужності коливань θ 2-діапазону легко пояснити, якщо частота ритму спокою "перетікає" з α - в θ -діапазон. Однак навіть у випадку, коли цього не відбувається, можливе зростання потужності θ -діапазону через ефект витікання потужності домінуючого піку спектрограми, якщо його частота наближується до нижньої межі α -діапазону. Такий ефект, що має також назву "феномен Гібса", є результатом застосування швидкого перетворення Фур'є для епохи аналізу, що включає неціле число періодів коливань певної частоти. Оскільки ЕЕГ-коливання мають складне походження і є результатом сумарного впливу багатьох джерел електричної активності, підібрати таку епоху аналізу, за якої всі прості коливання мали б ціле число періодів, практично неможливо. Внаслідок цього на спектрограмі виникає артефакт, що полягає у ефекті розширення піку частоти конкретного коливання [7]. В результаті можливі зміни потужності не тільки діапазону, до якого належить відповідний ритм, але й сусіднього з ним, що слід розглядати як непряму ознаку уповільнення домінуючого ритму. Отже, за рахунок феномену Гібса зсув основного ритму спокою ближче до нижньої межі α -діапазону викликати збільшення потужності сусіднього θ -діапазону.

Для оцінки впливу ефекту витікання потужності було ми проаналізували розподіл домінуючої частоти в обох групах у всіх відведеннях ЕЕГ для діапазону 3,9-14 Гц (Рис. 2).

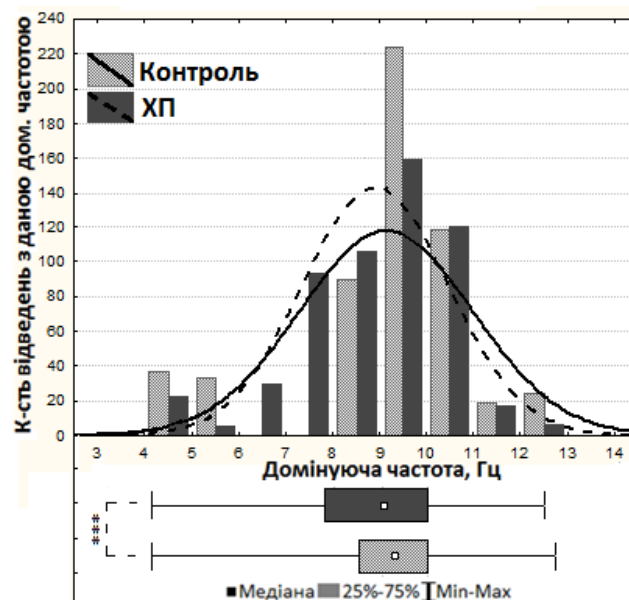


Рис. 2. Залежність кількості електродів, у яких домінує ритміка певної частоти, від частоти піку спектрограми. Розподіл домінуючих частот між відведеннями у діапазоні 4-13 Гц

Примітка: *** – $p \leq 0,001$.

Виявилось, що як у пацієнтів ХП, так і у контрольній групі значення домінуючої частоти у переважній більшості відведень залишаються в межах α -діапазону ЕЕГ.

У здорових обстежуваних медіана розподілу даного показника дорівнює 9,4 Гц, що відповідає нормі для людей даної вікової групи (45-65 років). У пацієнтів з ХП

виявлено значуще зменшення домінуючої частоти, причому медіана розподілу зміщена у бік більш низькочастотних коливань майже на 1 Гц (8,7 Гц), а у 11,5% відведень частота ритму спокою лежить на межі або перебігає у $\theta 2$ діапазон. Таким чином, уповільнення основного ритму спокою при ХП дійсно могло вплинути на результати спектрального аналізу ЕЕГ та обумовити підвищення потужності діапазону $\theta 2$.

Для того, щоб довести факт такого впливу, ми спробували видалити домінуючий ритм з сумарного запису ЕЕГ за допомогою процедури ICA. За нашим припущенням, якщо єдиною або вирішальною причиною збільшення потужності коливань у θ -діапазоні є уповільнення основного ритму спокою, то після його видалення повторне порівняння потужності не виявило б значущих відмінностей між групами.

Як видно з Рис. 1, В, отримані результати підтвердили цю гіпотезу лише частково. Дійсно, у більшості відведень зникли значущі відмінності у $\theta 2$ діапазоні після видалення α -ритму. Однак це не стосувалось скроневих ділянок кори та відведення Pz. Тому можна зробити висновок, що у пацієнтів з ХП найбільш вагомою причиною підвищення потужності діапазону $\theta 2$ у симетричних фронтальних, центральних та окципітальних відведеннях ЕЕГ було уповільнення основного ритму спокою. З іншого боку той факт, що в різні моменти часу реєструється незалежна від нього підвищена $\theta 2$ -активність зі стійкою локалізацією у скроневих відведеннях, дає нам право стверджувати, що такий резуль-

тат не є випадковим і вказує на існування певного специфічного генератора θ -осциляцій, пов'язаного з цією ділянкою. Цікаво, що в дослідженні N. Benz та співавторів показано зростання відносної потужності θ -діапазону у лівій скроневій ділянці у пацієнтів з хворобами Паркінсона і Альцгеймера на фоні помірної когнітивної дисфункції [4].

Для встановлення локалізації специфічних генераторів θ -активності ми порівняли досліджувані групи за допомогою програмного пакету sLORETA. Оскільки показником, за яким здійснювалось порівняння, була розрахована щільність струму, для отримання якої не використовувалось швидке перетворення Фур'є, ми відкидали можливість впливу на подальші результати згаданого раніше ефекту витікання потужності.

Отримані дані продемонстрували наявність у хворих з ХП підвищеної у порівнянні із здоровими обстежуваними активності джерел коливань діапазону $\theta 2$ впродовж всіх трьох хвилин перебування у стані спокою (Табл. 2). Протягом перших двох хвилин відмінності локалізувались у задній частині лівої поясної звивини (30 поле за Бродманом), на третій хвилині вони реєструвались в даній ділянці білатерально (Рис. 3). Виявлений перерозподіл джерел між півкулями повністю співпадає з аналогічними змінами в часі топографії підвищення $\theta 2$ -діапазону після видалення ритму спокою, де також спостерігався поступовий перехід від змін виключно в лівій півкулі до двосторонніх відмінностей (Рис. 1, В).

Таблиця 2. Відмінності густини струму в окремих частотних діапазонах ЕЕГ за результатами sLORETA між групами ХП і контролю

	Період реєстрації ЕЕГ, с			
	20-40		80-100	140-160
Діапазон ЕЕГ	$\theta 1$ (4-6 Гц)	$\theta 2$ (6-7,5 Гц)	$\theta 2$ (6-7,5 Гц)	$\theta 2$ (6-7,5 Гц)
t (0.05) One-Tailed (A>B)	1.19		1.26	1.19
Log of F-ratio	1.21	1.27	1.42	1.28
Кількість вокселів, для яких $p < 0.05$	9	52	154	89
Координати MNI (см)	-50, -20, 60	-5, -65, 10	-10, -65, 10	-5, -60, 10
Поле по Бродману	3	30	30	30
Анатомічна ділянка	Зацентральна звивина	Задня частина поясної звивини	Задня частина поясної звивини	Задня частина поясної звивини

Примітка: показано тільки діапазони, для яких виявлено значущі відмінності ($p < 0.05$)

Необхідно підкреслити, що для джерел α -діапазону ЕЕГ значущих відмінностей знайдено не було. Таким чином, зміни α -активності хворих з ХП характеризувались зниженням частоти без зміни інтенсивності та локалізації джерел, тоді як для діапазону $\theta 2$ було виявлено зростання активності специфічних мозкових генераторів в області задньої поясної звивини. В дослідженнях на тваринах у цій ділянці мозку було виявлено генератори θ -активності, які працюють незалежно від гіпокампу [12]. С. Styliadis із співавторами показали, що у людей з помірними когнітивними порушеннями восьмижневий курс комбінованого тренінгу, що включав фізичні та розумові навантаження, призводив не тільки до покращення стану когнітивних функцій, а й до зменшення активності джерел δ -, θ - та β -активності в області задньої поясної звивини та передклина [13]. Це вказує на можливий зв'язок виявлених нами особливостей функціонування мозкових θ -генераторів з процесами формування когнітивних дисфункцій при ХП.

Таким чином, отримані результати доводять, що зростання потужності у високочастотному θ -діапазоні при ХП, яке виявляється при стандартному спектраль-

ному аналізі ЕЕГ за допомогою перетворення Фур'є, має гетерогенну природу. Причинами даного явища є як уповільнення основного ритму спокою, так і наявність незалежних від α -діапазону патологічних θ -коливань. Важливим є те, що дані процеси мають різне клінічне значення – самостійна ритмічна θ -активність є маркером значних порушень функціонування мозку, тоді як зменшення частоти домінуючого ритму в стані спокою може супроводжувати процеси нормального старіння і в меншому ступені пов'язана з порушеннями розумової діяльності [14]. Неодноразово показано, що підвищена потужність θ -діапазону пов'язана з вираженістю когнітивних дисфункцій або ризиком їх виникнення при ХП [4, 5]. Можна припустити, що досліджені нами фактори такого підвищення мають різний ступінь зв'язку із цим класом немоторних порушень. Дослідження такого зв'язку та розробка підходів для оцінки вкладу кожного з факторів у трансформацію сумарної ЕЕГ можуть бути передумовою розробки методик діагностики та оцінки когнітивних порушень за об'єктивними електрофізіологічними характеристиками функціонування мозку.

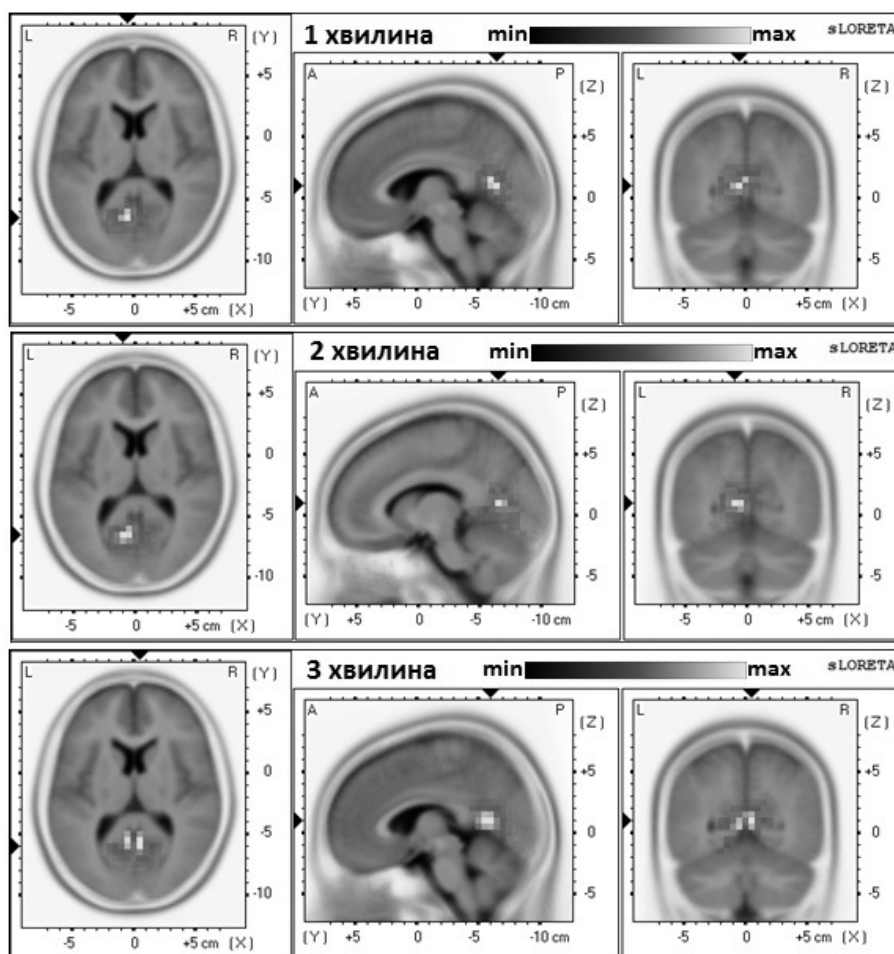


Рис. 3. Локалізація джерел активності в головному мозку у обстежуваних з ХП у стані спокою

Примітка: білим кольором виділено регіони головного мозку пацієнтів з ХП, які були причетні до генерування відмінної від контролю активності ($p < 0,05$)

Висновки. Результати нашого дослідження вказують на те, що підвищення потужності θ -діапазону при хворобі Паркінсона обумовлене впливом двох незалежних механізмів. Перший пов'язаний із зниженням частоти домінуючого ритму спокою в комплексі з ефектом витікання потужності і проявляється у переважній більшості відведень ЕЕГ. В основі другого механізму лежить активізація специфічних θ -генераторів в задній поясній звинині, що викликає відповідні зміни спектрального складу ЕЕГ переважно у скроневих ділянках. Ми припускаємо, що розуміння зв'язку кожного з цих факторів із розвитком немоторних симптомів хвороби Паркінсона може стати основою для створення інструменту ранньої оцінки ризику розвитку когнітивних розладів різної вираженості.

Список використаних джерел

- Williams-Gray C.H. Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease: a review of pathophysiology and therapeutic options / Williams-Gray C.H., Foltynie T., Lewis S.J. [et al.] // *CNS Drugs*. – 2006. – Vol. 20, 6. – P.477-505.
- Hobson P. The estimated life expectancy in a community cohort of Parkinson's disease patients with and without dementia, compared with the UK population / Hobson P., Meara J., Ishihara-Paul L. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. – 2010. – Vol. 81, N 10. – P.1093-1098.
- Foltynie T. The cognitive disease ability of an incident cohort of Parkinson's patients in the UK. The CamPaGN study / Foltynie T., Brayne C.E.G., Robbins T.W. [et al.] // *Brain*. – 2004. – Vol. 127. – P.1-11.
- Benz N. Slowing of EEG background activity in Parkinson's and Alzheimer's disease with early cognitive dysfunction / N. Benz, F. Hatz, H. Bousleiman [et al.] // *Front Aging Neurosci*. – 2014. – Vol. 6. – P.1-6.
- Fonseca L.C. Comparison of quantitative EEG between patients with Alzheimer's disease and those with Parkinson's disease dementia /

Fonseca L.C., Tedrus G.M.A.S., Carvas P.N. [et al.] // *Clinical Neurophysiology*. – 2013. – Vol. 124. – P.1970-1974.

6. Klassen B.T. Quantitative EEG as a predictive biomarker for Parkinson disease dementia / B.T.Klassen, J.G.Hentz, H.A.Shill [et al.] // *Neurology*. – 2011. – Vol. 77. – P.94-95.

7. Кулаичев А.П. Некоторые методические проблемы частотного анализа ЭЭГ / Кулаичев А.П. // журнал Высшей нервной деятельности. – 1997. – № 47 (5). – С. 918-927.

8. Pascual-Marqui R.D. Standardized low-resolution brain electromagnetic tomography (sLORETA): technical details / Pascual-Marqui R.D. // *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. – 2002. – Vol. 24, Suppl. D. – P.5-12.

9. Babiloni C. Cortical sources of resting EEG rhythms in mild cognitive impairment and subjective memory complaint / Babiloni C., Visser P.J., Frisoni G. [et al.] // *Neurobiology of Aging*. – 2010. – Vol. 31. – P.1787-1798.

10. Decary A. A preliminary study of the impact of age-related pathologies on cognitive functioning and waking EEG / Decary A., Vendette M., Massicotte-Marquez J. [et al.] // *North American Journal of Psychology*. – 2005. – Vol. 7, N 3. – P.469-480.

11. Кожем'яко Н.С. Особенности биоэлектричной активности головного мозга при хворобі Паркінсона / Н.С.Кожем'яко, С.А. Крижановський, А.О.Чернінський [та ін.] // Вісник Черкаського університету. – 2014. – №2 (295). – С.50-58.

12. Talk A. Independent generation of theta rhythm in the hippocampus and posterior cingulate cortex / A.Talk, E.Kang, M.Gabriel // *Brain Res*. – 2004. – Vol. 1015, N 12. – P.15-24.

13. Styliadis C. Neuroplastic Effects of Combined Computerized Physical and Cognitive Training in Elderly Individuals at Risk for Dementia: An eLORETA Controlled Study on Resting States / Styliadis C., Kartsidis P., Paraskevopoulos E., [et al.] // *Neural Plasticity*. – 2015. – Vol. 15. – P.172-192

14. Зенков Л.П. Клиническая электронцефалография (с элементами эпипатологии). Руководство для врачей / Л.П.Зенков – 3-е изд. – М : МЕДпресс-информ, 2004. – 368 с.

References

- Williams-Gray CH, Foltynie T, Lewis SJ, et al. Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease: a review of pathophysiology and therapeutic options. *CNS Drugs*. 2006; 20(6):477-505.

2. Hobson P, Meara J, Ishihara-Paul L. The estimated life expectancy in a community cohort of Parkinson's disease patients with and without dementia, compared with the UK population. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2010; 81(10):1093-8.
3. Foltynie T, Brayne CEG, Robbins TW, et al. The cognitive disease ability of an incident cohort of Parkinson's patients in the UK. The CamPaIGN study. *Brain*. 2004;127:1-11.
4. Benz N, Hatz F, Bousleiman H, et al. Slowing of EEG background activity in Parkinson's and Alzheimer's disease with early cognitive dysfunction. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:1-6.
5. Fonseca LC, Tedrus GMAS, Carvas PN, et al. Comparison of quantitative EEG between patients with Alzheimer's disease and those with Parkinson's disease dementia. *Clinical Neurophysiology*. 2013;124:1970-74.
6. Klassen BT, Hentz JG, Shill HA, et al. Quantitative EEG as a predictive biomarker for Parkinson disease dementia. *Neurology*. 2011; 77:94-95.
7. Kulaichev AP. Nekotorye metodicheskie problem chastotnogo analiza EEG. *Zhurnal Vysshey nervnoy deyatelnosti*. 1997;47(5): 918-27. Russian
8. Pascual-Marqui RD. Standardized low-resolution brain electromagnetic tomography (sLORETA): technical details. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2002;24D:5-12.

9. Babiloni C, Visser PJ, Frisoni G, et al. Cortical sources of resting EEG rhythms in mild cognitive impairment and subjective memory complaint. *Neurobiology of Aging*. 2010;31:1787-98.
10. Decary A, Vendette M, Massicotte-Marquez J, et al. A preliminary study of the impact of age-related pathologies on cognitive functioning and waking EEG. *North American Journal of Psychology*. 2005;7(N3):469-80.
11. Kozhemiako NS, Kryzhanovskiy SA, Cherninskiy AO, et al. The features of brain bioelectrical activity in parkinson's disease // *Cherkasy University Bulletin*. 2014; 295:50-58.
12. Talk A, Kang E, Gabriel M. Independent generation of theta rhythm in the hippocampus and posterior cingulate cortex. *Brain Res*. 2004;1015(12):15-24.
13. Styliadis C, Kartsidis P, Paraskevopoulos E, et al. Neuroplastic Effects of Combined Computerized Physical and Cognitive Training in Elderly Individuals at Risk for Dementia: An eLORETA Controlled Study on Resting States. *Neural Plasticity*. 2015;15:172-92
14. Zenkov LR. Klinicheskaia elektroencefalografia (s elementami epileptologii). *Rukovodstvo dlia vrachei*. 3rd ed. Moscow: MEDpress-inform; 2004.

Надійшла до редколегії 15.06.16

Н. Кожемяко, студ., А. Чернинський, канд. биол. наук, И. Зима, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
Н. Карасевич, канд. мед. наук, С. Крижановський, канд. биол. наук
Государственное учреждение "Институт геронтологии имени Д.Ф.Чеботарева НАМН Украины", Киев, Украина

ГЕТЕРОГЕННАЯ ПРИРОДА ТЕТА-АКТИВНОСТИ ТА ЕЕ ИСТОЧНИКИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

В процессе прогрессирования болезни Паркинсона (БП) растет вероятность развития немоторных симптомов, которые включают в себя когнитивные нарушения. Многими ЭЭГ-исследованиями было показано, что когнитивные нарушения коррелируют с увеличением спектральной мощности θ -диапазона. Целью данной работы было установить, чем вызван этот феномен. В обследовании приняли участие 60 человек – 30 больных БП и 30 здоровых добровольцев возрастом 45-65 лет, у которых была зарегистрирована ЭЭГ в состоянии покоя. В результате нам удалось установить, что увеличение спектральной мощности θ -диапазона имеет гетерогенную природу. Одной из причин является наличие повышенной активности специфических генераторов θ -активности в задней части поясной извилины, другая составляющая – это замедление основного ритма покоя, которое влияет на мощностные характеристики θ -диапазона (эффект Гиббса).

Ключевые слова: тета (θ)-активность, болезнь Паркинсона, замедление основного ритма спокойствия.

N. Kozhemiako, stud., A. Cherninskiy, PhD., I. Zyma, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
N. Karasevich, S PhD., S. Kryzhanovskiy, PhD
D.F.Chebotarev State Institute of Gerontology NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

HETEROGENEITY OF TETA-ACTIVITY AND ITS SOURCES IN PARKINSON'S DISEASE

The risk of appearance of non-motor symptoms including cognitive dysfunctions is increased while Parkinson's disease (PD) progression. A lot of EEG-studies have shown that the degree of cognitive impairments correlates with increasing of θ -band spectral power. The aim of this research was to investigate the cause of such phenomenon. The resting state EEGs of 30 patients with PD and 30 healthy volunteers 45-65 years old were analyzed. We have established that the increasing of θ power has heterogenic nature. First reason is greater activity of existing θ -generators, mainly in posterior cingulate cortex. The other reason is the decreasing of the dominant resting state rhythm's frequency, which can affect the values of spectral power of θ -band.

Key-words: teta (θ)-activity, Parkinson's disease, slowing of the resting state rhythm.

УДК 577.112.7

Т. Ніколасенко, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
С. Орісик, канд. хім. наук, В. Пехньо, д-р хім. наук
Інститут загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАН України, Київ

ПРОАНГІОГЕННА ДІЯ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ СПОЛУК-АНАЛОГІВ ІНГІБІТОРІВ HIF-1

Досліджено вплив новосинтезованих сполук-аналогів інгібіторів HIF-1 на метаболічний та проліферативний статус ендотеліальних клітин. Показано, що син-ізомер проявляє проліферативну дію та антиапоптотичну паралельно з анти-ізомером. Ці ефекти узгоджуються з показниками поглинання глюкози та рівня продукції оксиду азоту.

Ключові слова: анти-, син-ізомери, глюкоза, оксид азоту, ендотеліальні клітини.

Вступ. В клітинах ссавців в нормі підтримується постійний гомеостаз кисню для забезпечення аеробного метаболізму і вироблення енергії. При пухлинному рості, хворобах серця або хронічних обструктивних захворюваннях легень порушується кисневий баланс і клітини перебувають у гіпоксичних умовах. Гіпоксія властива багатьох видів пухлин, оскільки пухлинні клітини швидко проліферують і утворюють великі маси, що призводить до закупорки і стиснення кровоносних судин, що їх оточують [1]. Ці аномальні кровоносні судини найчастіше функціонують належним чином, що призводить до погіршення постачання кисню до централь-

них зон пухлини. Пухлинні клітини в цих гіпоксичних зонах адаптуються до умов низької концентрації кисню шляхом активації шляхів виживання, найвідомішим з яких є активація фактора транскрипції HIF-1 [2].

Активізація HIF-1 відіграє критичну роль в адаптивній відповіді пухлинних клітин на зміни в концентрації кисню через активацію транскрипції більш ніж 100 генів, які регулюють життєво важливі біологічні процеси необхідні для виживання і прогресії пухлини, зокрема гени, які беруть участь у метаболізмі глюкози, клітинній проліферації, міграції та ангиогенезі [3]. HIF-1 сприяє переорієнтації метаболізму клітин з більш ефективного окисного

фосфорилювання до менш ефективного гліколітичного шляху продукції енергії (ефект Варбурга). Тому клітини в гіпоксичних умовах, як правило, споживають більше глюкози, а HIF-1 опосередковує це метаболічне перетворення через індукцію ферментів, які беруть участь в гліколізі та надлишковій експресії переносників глюкози (GLUT). Крім того, HIF-1 індукуює транскрипцію декількох проангіогенних факторів, таких як фактор росту ендотелію судин (VEGF), який, в свою чергу, стимулює розвиток нових кровоносних судин для забезпечення пухлинних клітин киснем та поживними субстратами [4,5].

Сучасні дослідження показали, що гіпоксія і експресія HIF-1 можуть впливати на ангіогенез декількома шляхами, зокрема активацією транскрипції проангіогенних генів і їх рецепторів (VEGF, PlGF) [6, 7] та регулюванням проангіогенних хемокинів і їх рецепторів, таким чином полегшуючи рекрутинг ендотеліальних клітин-попередників до сайтів гіпоксії [8], а також шляхом підсилення проліферації ендотеліальних клітин та їх міграції [9]. Отже, HIF-1 може активувати процес ангіогенезу, перехресна активність між HIF-1 і проангіогенними чинниками є одним з основних чинників в процесі формування судин за гіпоксичних умов [10].

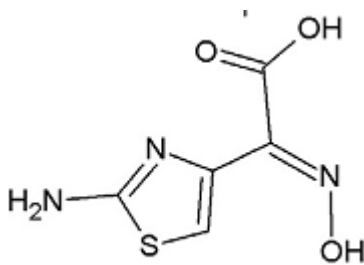
Таким чином, HIF-1 є потенційною мішенню для інгібування пухлино-опосередкованого ангіогенезу та метаболічних змін, які сприяють подальшій проліфера-

ції пухлинних клітин. Пошук нових сполук для регулювання активності HIF-1 є перспективним терапевтичним підходом, який міг би подолати існуючі обмеження про-і антиангіогенної медицини. Похідні гідроксиімінооцтових кислот представлені як ефективні інгібітори HIF-1. Тому ми для дослідження використали *син*- і *анти*-ізомери 2-(2-амінотіазоліл) гідроксиімінооцтової кислоти до складу яких входять два біологічно активні фрагменти: 2-амінотіазоліл- і гідроксиіміноацетатна група, що входять в структуру багатьох біологічно активних сполук та використовуються в ролі скеффолда в медичній хімії для отримання потенційних фармпрепаратів

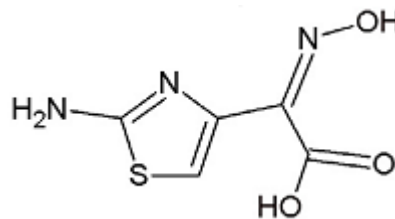
Метою даної роботи було вивчення біологічної активності *анти*- та *син*-ізомерів 2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-гідроксиімінооцтової кислоти на лінії ендотеліальних клітин, як потенційних інгібіторів HIF-1.

Матеріали і методи. Робота проведена з використанням лінії ендотеліальних клітин, отриманих з аорти миші (MAEC) [11]. Клітини інкубували в середовищі DMEM (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (ETC) (Sigma, США), 2 mL-глутаміну в умовах 5% CO₂, 100% вологості при температурі 37°C.

Новосинтезовані *анти*- та *син*-ізомери 2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-гідроксиімінооцтової кислоти [12] (Рис.1) використані як потенційні інгібітори HIF-1.



Анти-ізомер



Син-ізомер

Рис.1. Будова *анти*- та *син*-ізомерів 2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-гідроксиімінооцтової кислоти

Визначення цитотоксичного/пропроліферативного впливу досліджуваних ізомерів на культивовані ендотеліоцити проводили з використанням цитофлуориметричного аналізу [13], підрахунком концентрації живих і мертвих клітин за зафарбовуванням трипановим синім (0,25% розчин), а також в МТТ-колориметричному тесті [14] за активністю мітохондріальних дегідрогеназ. Цей метод базується на здатності дегідрогеназ живих клітин відновлювати розчинний в фізіологічних розчинах 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (MTT, Sigma) – сіль жовтого кольору в кристалічний МТТ-формазан фіолетового кольору.

Рівень продукції NO визначали з використанням реактиву Грісса, з перерахунком концентрації NO у відповідності з визначеною концентрацією NO₂⁻ в реакції [15].

Визначення рівня глюкози в середовищі інкубації ендотеліальних клітин під впливом ізомерів проводили глюкозооксидазним методом з використанням стандартного набору реактивів ("Філісіт", Україна), як описано нами раніше [16].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням "Origin 6,1" іт-критерія Стьюдента. Всі дані приведені вигляді середніх арифметичних та стандартних відхилень.

Результати та їх обговорення. Новосинтезовані сполуки-аналоги інгібіторів гіпоксія-індуцибельного фактору – *анти*- та *син*-ізомери 2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-гідроксиімінооцтових кислот залежно від ізомерії проявили про- та антиангіогенну дію на клітини лінії MAEC (Рис. 2). Так, *син*-ізомер призводив до зменшення субпопуляції ендотеліоцитів в G₀/G₁ фазі на 25,5±1,3% в порівнянні з контролем та збільшення популяції проліферативного пулу G₂/M+S в 2 рази відносно контролю. Після культивування клітин в присутності *анти*-ізомера відсоток клітин в G₀/G₁ фазі не змінювався в порівнянні з контролем, тоді як мав місце перерозподіл клітин проліферативного пулу: зменшення кількості в G₂/M фазі на 10±0,5% та збільшення в 4 рази ендотеліальних клітин в S-фазі порівняно з контролем.

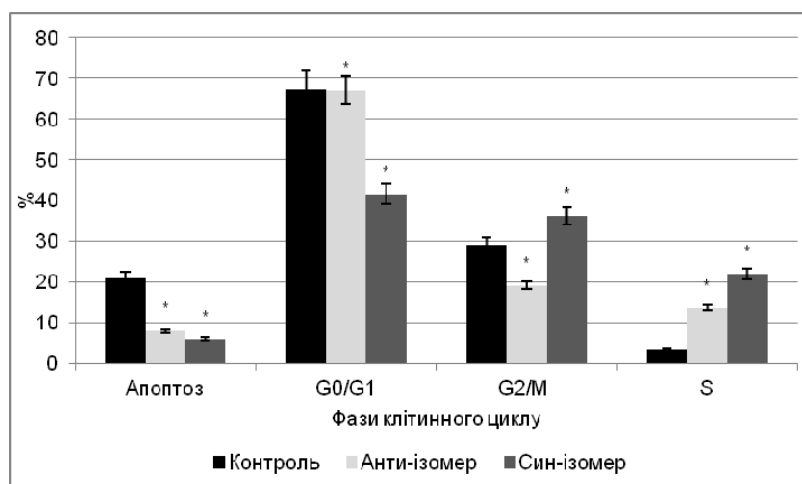


Рис.2. Розподіл за фазами клітинного циклу та рівень апоптозу клітин лінії MAEC під впливом *анти*- та *син*-ізомерів

* – $P \leq 0,05$; порівняно з контролем

Проте, було показано, що не залежно від просторової орієнтації аналогів-інгібіторів HIF-1, їх вплив на рівень апоптичних клітин був однаковим (Рис.2). Так, інкубація клітин лінії MAEC в присутності як *син*, так *анти*-ізомерів призводила до інгібування апоптозу в ендотеліальних клітинах в 3 та 2,6 рази відповідно по відношенню до контролю.

Отримані результати свідчать про виражену анти-апоптичну дію обох ізомерів по відношенню до ендотеліальних клітин, в той час як ефект на розподіл клітин за фазами клітинного циклу різнився в залежності від їх ізомерії. Так, *син*-ізомер характеризувався вираженим проліферативним ефектом, а *анти*-ізомер не змінював загального розподілу клітин в стані спокою (G_0/G_1), проте призводив до перерозподілу клітин в S і G_2/M фазах клітинного циклу.

Відомо, що HIF-1 відіграє важливу роль в багатьох процесах, які є сприятливими для виживання та адаптації клітин до змін в їх мікрооточенні. Основним напрямком адаптації клітин в умовах гіпоксії є переорієнтація клітинного

метаболізму, яка полягає в більш інтенсивному засвоєнні глюкози та включенні її в гліколіз. Тому нами було досліджено вплив інгібіторів HIF-1 на засвоєння глюкози ендотеліальними клітинами.

Показано, що досліджувані ізомери проявляють також різноспрямовану дію по відношенню до метаболічної активності ендотеліальних клітин. З рис.3 випливає, що інгібування активності HIF-1 *анти*-ізомером призводить до зменшення поглинання глюкози ендотеліальними клітинами з середовища інкубації на $15 \pm 0,8\%$ в порівнянні з контролем та на $43 \pm 2,3\%$ в порівнянні з *син*-ізомером. Можна припустити, що збільшення поглинання глюкози клітинами пов'язане з інтенсифікацією проліферації та перерозподілом клітин проліферативного пулу, що потребують більших затрат енергії і, відповідного, споживання глюкози як основного енергетичного субстрату. Такий ефект може свідчити про більшу селективність *анти*-ізомера до HIF-1 та більш виражену інгібуючу дію на споживання глюкози.

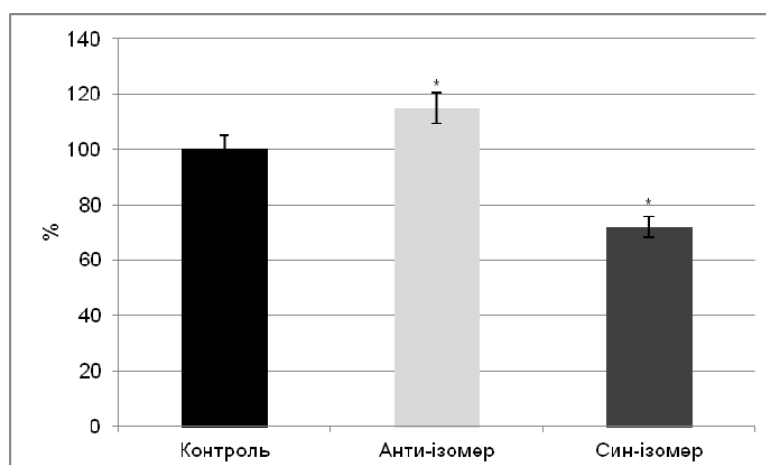


Рис.3. Рівень поглинання глюкози ендотеліальними клітинами під впливом *анти*- та *син*-ізомерів

* – $P \leq 0,05$; порівняно з контролем

HIF-1 відіграє роль ключового фактора транскрипції при опосередкованій гіпоксією експресії VEGF. Проте, оксид азоту (NO) так само як і гіпоксія залучений в регуляцію експресії VEGF шляхом підвищення активності HIF-1. Для нормального функціонування ендотеліальних

клітин та проходження ангіогенезу необхідний баланс між цими факторами, порушення якого призводить до фатальних наслідків. Тому наступним етапом нашого дослідження було визначення рівня продукції NO ендотеліальними клітинами під впливом інгібіторів HIF-1.

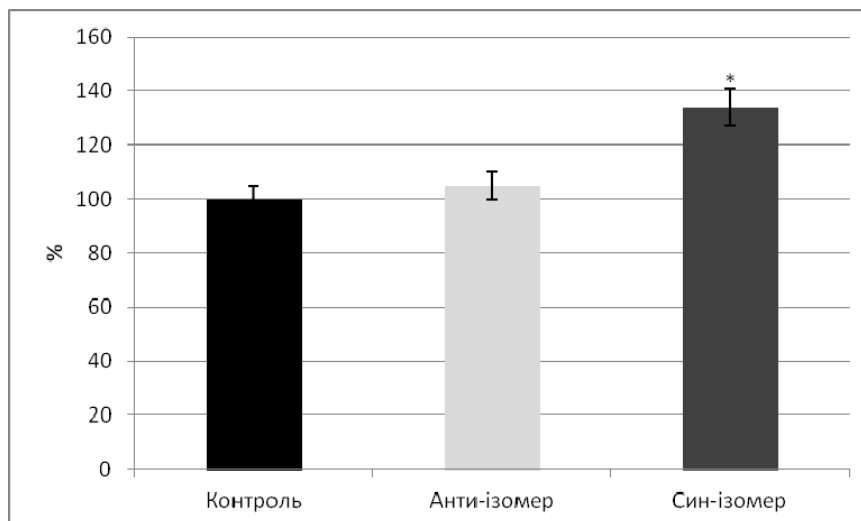


Рис. 4. Рівень продукції NO ендотеліальними клітинами під впливом *анти*- та *син*-ізомерів

*- $P \leq 0,05$; порівняно з контролем

Показано, що рівень продукції NO ендотеліоцитами під впливом анти-ізомера майже не змінюється в порівнянні з контролем, в той час як син-ізомер сприяє збільшенню кількості NO в середовищі інкубації клітин майже на $34 \pm 1,8\%$. Такий ефект узгоджується з попередніми даними, оскільки NO в такому випадку виступає одним з головних факторів, що сприяє перерозподілу клітин по фазам клітинного циклу та збільшенню клітин проліферативного пулу.

Таким чином, отримані результати свідчать про різнонаправлену дію ізомерів-аналогів інгібітора HIF-1 по відношенню до метаболічного та проліферативного статусу ендотеліальних клітин.

Висновки.

При дослідженні біологічної активності новосинтезованих сполук-аналогів інгібітора HIF-1 показано, що вони проявляють різні ефекти по відношенню до ендотеліоцитів. Так, *син*-ізомер проявив виражений проліферативний ефект, а також паралельно з *анти*-ізомером значну антиапоптотичну дію. Згідно отриманих даних можна припустити, що *анти*-ізомер проявляє більшу селективність до HIF-1 та проявляє більш виражений інгібуючий ефект. Отже, новосинтезовані сполуки можуть розглядатися як потенційні терапевтичні агенти з антиангіогенною дією.

Список використаних джерел

1. Lim C. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall / C.Lim, S.Kiriakidis, A. Sandison [et al.] // J Vasc Surg. – 2013. – Vol.8, N1. – P.219-30.
2. Carmeliet P. Angiogenesis in cancer and other disease / P. Carmeliet, R. Jain // Nature. – 2000. – Vol. 407. – P. 249-257.
3. Semenza G.L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing / G.L. Semenza, P. Carmeliet // Curr Opin Cell Biol. – 2001. – Vol.13. P.167-71.
4. Denko N.C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour / N.C. Denko // Nat Rev Cancer. – 2008. – Vol.8. – P.705-13.
5. Conway E.M. Molecular mechanisms of blood vessel growth / E.M. Conway, D. Collen, P. Carmeliet // Cardiovasc Res. – 2001. – Vol.49. – P.507-21.
6. Greijer A. E. Upregulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). / A. E. Greijer, P. Groep, D. Kemming [et al.] // J Path. – 2005. – Vol.206, N3. – P.291-304.
7. Semenza G.L. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders / G.L. Semenza // Annual Rev Med. – 2003. – Vol.54. – P.17-28.
8. Ceradini D.J. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1 / D. J. Ceradini, A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan [et al.] // Nat Med. – 2004. – Vol.10, N.8. – P. – 858-864.
9. Manalo D.J. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 / D.J. Manalo, A. Rowan, T. Lavoie et al. // Blood. – 2005. – Vol. 105, N.2. – P.659-669.

10. Masoud G. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy / G. Masoud, W. Li // Acta Pharm Sin B. – 2015. – Vol.5, N.5. – P.378-89.

11. Bastaki M. Basic fibroblast growth factor induced angiogenesis is phenotypic mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines / M. Bastaki, E. Nelli, P. Dell'Era, M. Rusnati [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 1997. – Vol. 17. – P. 454-64.

12. Orysyk S.I. Novel chelate complexes of Co(II), Ni(II), Cu(II), Pd(II) derived from anti- and syn-isomers of 2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-hydroxyiminoacetic acid with pro-/antiproliferative actions on endothelial cells / S.I. Orysyk, O.O. Zholob, V.V. Bon [et al.] // Polyhedron. – 2015. – Vol.85. – P.208-220.

13. Nicoletti L. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry / L. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci [et al.] // J Immunol Methods. – 1991. – Vol. 139. – P. 271-80.

14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // J Immunol Methods. – 1983. – Vol. 65. – P.55-63.

15. Green L. C. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids / L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski [et al.] // Anal. Biochem. – 1982. – Vol.126, N.1. – P.131-138.

16. Nikolaienko T. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity and glucose consumption by endothelial cells. / T. Nikolaienko, N. Petruk, D. Shelest [et al.] // Bull. of T. Shevchenko Nat. Univ. of Kyiv. – 2015. – Vol.69, N.1. – P.36-38.

Reference

1. Lim C, Kiriakidis S, Sandison A, et al. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall. J Vasc Surg.2013; 8(1):219-30.
2. Carmeliet P, Jain R. Angiogenesis in cancer and other disease. Nature. 2000; 407:249-57.
3. Semenza GL, Carmeliet P. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. Curr Opin Cell Biol. 2001;13:167-71.
4. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. Nat Rev Cancer. 2008; 8:705-13.
5. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res. 2001; 49:507-21.
6. Greijer AE, Groep P, Kemming D, et al. Upregulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). J Path. 2005; 206(3):291-304.
7. Semenza GL. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. Annual Rev Med. 2003; 54:17-28.
8. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF. Nat Med. 2004; 10(8):858-864.
9. Manalo D J, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. Blood. 2005;105(2):659-69.
10. Masoud G, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta Pharm Sin B.2015; 5(5):378-89.
11. Bastaki M, Nelli E, Dell'Era P, Rusnati M, et al. Basic fibroblast growth factor induced angiogenesis is phenotypic mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997; 17: 454-64.
12. Orysyk SI, Zholob OO, Bon VV, et al. Novel chelate complexes of Co(II), Ni(II), Cu(II), Pd(II) derived from anti- and syn-isomers of 2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-hydroxyiminoacetic acid with pro-/antiproliferative actions on endothelial cells. Polyhedron. 2015;85:208-20.

13. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods. 1991; 139:271-80.

14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods. 1983; 65:55-63.

15. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 1982; 126(1):1318.

16. Nikolaienko T, Petruk N, Shelest D, et al. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity and glucose consumption by endothelial cells. Bull. of T. Shevchenko Nat. Univ. of Kyiv. 2015; 69(1):36-8.

Надійшла до редколегії 19.05.16

Т. Николаєнко, асп., Л. Гарманчук, д-р биол. наук,
Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ, Україна,
С. Орьськ, канд. хим. наук, В. Пехньо, д-р хим. наук
Институт общей и неорганической химии им. В.И. Вернадского НАН Украины, Киев, Украина

ПРОАНГИОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВОСИНТЕЗИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ-АНАЛОГОВ ИНГИБИТОРОВ HIF-1

Исследовано влияние новых соединений-аналогов ингибиторов HIF-1 на метаболический и пролиферативный статус эндотелиальных клеток. Показано, что син-изомер проявил пропролиферативное действие и антиапоптотическое параллельно с анти-изомером. Эти эффекты согласуются с показателями поглощения глюкозы и уровня продукции оксида азота.

Ключевые слова: анти-, син-изомеры, глюкоза, оксид азота, эндотелиальные клетки.

T. Nikolaienko, PhD stud., L. Garmanchuk, DSc,
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
S. Orysyk, PhD., V. Pekhnyo, DSc.
V.I. Vernadskii Institute of General and Inorganic Chemistry NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

PROANGIOGENIC EFFECT OF NEWLY SYNTHESIZED COMPOUNDS – ANALOGUE OF INHIBITORS HIF-1

The effect of new compounds analog of inhibitors of HIF-1 on the metabolic and proliferative status of endothelial cells have been studied. It was shown that syn-isomer possesses of proproliferative effect and antiapoptotic effect with anti-isomer. These effects are consistent with the rates of glucose uptake and production of nitric oxide.

Key words: anti-, syn-isomers, glucose, nitric oxide, endothelial cells.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

**ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ
ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ**

Випуск 1(20)

Друкується за авторською редакцією

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, статистичних даних, відповідної галузевої термінології, імен власних та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали. Рукописи та матеріали на електронних носіях не повертаються.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 10,0. Наклад 300. Зам. № 216-7861.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 6.
Підписано до друку 08.07.16

Видавець і виготовлювач
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 3222; (38044) 239 3172; тел./факс (38044) 239 3128
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02