

**Results.** Twenty-three products with central nervous system tonic effects are authorized in the pharmaceutical market of Ukraine, among which the largest share belongs to complex tinctures (26%), balms (13%) and extracts (13 %). Medicines from 9 manufacturing countries (Ukraine, Pakistan, Hungary, Vietnam, Slovenia, Denmark, Germany, Austria and Bulgaria) are represented in the pharmaceutical market. Rhizomes and roots of *Eleutherococcus senticosus* and *Glycyrrhiza glabra* are included in 4 products. The next positions belong to *Acorus calamus*, *Menyanthes trifoliata*, *Achillea millefolium*, *Quercus robur*, *Zingiber officinale*, *Rhaponticum carthamoides*, *Artemisia absinthium* and *Rhodiola rosea*.

**Conclusion.** According to the data, the largest number of medicines was represented by Ukrainian manufacturers. The findings of the composition analysis of the above pharmaceuticals show that they include 82 herbs. *Panax ginseng* is among the most widely used herbs. Ginseng root is included in 7 drugs (over 30% of the investigated products).

**Key words:** multicomponent herbal medicinal products, the central nervous system tonication, pharmaceutical market, manufacturers.

### **Відомості про авторів:**

**Гудзенко Андрій Вікторович** - доктор фармацевтичних наук, завідувач кафедри фармації медико-фармацевтичного факультету ПВНЗ "Київський міжнародний університет".

**Анзіна Катерина Миколаївна** - студентка 1 курсу магістратури, медико-фармацевтичного факультету ПВНЗ "Київський міжнародний університет".

УДК 615.03;615.1/1.3

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2016

*Н.І. Гудзь<sup>1</sup>, Р.С. Коритнюк<sup>2</sup>, Н.М. Воробець<sup>1</sup>*

## **ВПЛИВ РОЗЧИНІВ ДЛЯ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ДІАЛІЗУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ І БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ КЛІТИН РІЗНИХ ТИПІВ IN VITRO І EX VIVO**

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького, м. Львів,

<sup>2</sup>Національна медична академія післядипломної освіти  
імені П.Л. Шупика, м. Київ

**Вступ.** Для проведення перитонеального діалізу (ПД) використовуються найчастіше глюколактатні розчини. Значний досвід з проведення ПД ідентифікував серію функціональних та анатомічних патологічних змін в перитонеальній мембрані (ПМ), що є результатом повторної дії біонесумісних перитонеальних діалітичних розчинів (ПДР). Принципові патофізіологічні механізми включають оксидативний стрес, запалення та їхні наслідки. Біохімічні маркери є корисними для неінвазивної оцінки погіршення стану ПМ. При розробці розчинів для ПД вивчення ступеня розкладу глюкози поєднують з лабораторними дослідженнями *in vitro*, *ex vivo* й доклінічними дослідженнями та клінічними випробуваннями щодо вивчення впливу ПДР на очеревину та/або її клітини, або клітини інших тканин. У дослідженнях *in vitro* біологічними об'єктами є перитонеальні мезотеліальні клітини (ПМК), фібробласти L-929 мишей, перитонеальні макрофаги, лімфоцити, гранулоцити. Біонесумісність ПДР вивчається шляхом визначення пригнічення росту клітин, кількісного виз-

начення вмісту різноманітних маркерів: фактор росту судинного ендотелію, трансформуючий фактор росту  $\beta$ -1, Е-кадгерин, інтерлейкін 8, інтерлейкін 6, глутатіон та ін.

**Мета.** Аналіз літературних даних щодо методик вивчення впливу розчинів для ПД на життєздатність та біохімічні маркери клітин різних типів тканин *in vitro* та *ex vivo*.

**Матеріали та методи.** У роботі використовувалися наступні методи: аналізу, узагальнення, систематизації і порівняння літературних даних.

**Результати.** Для вивчення біосумісності ПДР проводяться дослідження зі встановлення ступеня цитотоксичності розроблених розчинів та їх впливу на життєздатність різних клітин. Найчастіше для цих досліджень використовуються ПМК та фібробласти. Життєздатність клітин вивчається декількома методиками: метод МТТ тесту (методом визначення швидкості метаболізму МТТ [3-(4-4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду]), за допомогою нейтрального червоного, визначення внутрішньоклітинного аденозинтрифосфату, а також за здатністю стимульованого виділення інтерлейкіну 6. Краща життєздатність клітин асоціюється з меншою концентрацією інтерлейкіну 6, фактору росту судинного ендотелію, вищою концентрацією інтерлейкіну 6 після стимульованого виділення, ракового антигена Са 125, Е-кадгерину, більшою здатністю ПМК підтримувати епітеліальний фенотип.

**Ключові слова:** розчини для перитонеального діалізу, перитонеальні мезотеліальні клітини, фібробласти, перитонеальні макрофаги.

**Вступ.** Для проведення перитонеального діалізу (ПД) використовуються найчастіше глюкозолактатні розчини. Значний досвід з проведення ПД ідентифікував серію функціональних та анатомічних патологічних змін в перитонеальній мембрані (ПМ), що є результатом повторної дії біонесумісних перитональних діалізних розчинів (ПДР). При тривалому ПД ці зміни призводять до функціональної недостатності ПМ, основним проявом якої є недостатність ультрафільтрації (УФ). Принципові патофізіологічні механізми включають оксидативний стрес, запалення та їхні наслідки [7]. У теперішній час приділяється значна увага ролі вільнорадикальних процесів в тканинах при різних захворюваннях, пов'язаних з запальними процесами, радіацією, серцево-судинною і бронхо-легеневою патологією, неврологічними та психічними порушеннями зі сторони ЦНС тощо. З процесами вільнорадикального окиснення пов'язують старіння організму й розвиток важких захворювань старечого віку, зокрема атеросклероз, нейродегенеративні порушення. Стан оксидативного стресу, на фоні якого проходить багато захворювань, супроводжується різкою інтенсифікацією вільнорадикальних процесів, виснаженням та дисбалансом ензимних і неензимних компонентів антиоксидантного захисту, трансдиференціацією мезотеліальних клітин в перитонеальні фібробласти. Біохімічні маркери є корисними для неінвазивної оцінки погіршення стану перитонеальної мембрани [6, 7, 10, 16, 18].

Оскільки довготривале застосування ПД пов'язане з функціональними і структурними (епітеліально-мезенхіальне перетворення) змінами ПМ, тому при розробці розчинів для ПД вивчення ступеня розкладу глюкози часто закордонні вчені поєднують з лабораторними дослідженнями *in vitro*, *ex vivo* й доклінічними дослідженнями та клінічними випробуваннями щодо вивчення впливу ПДР на черевину та/або її клітини, або клітини інших тканин. У дослідженнях *in vitro* біологічними об'єктами є перитонеальні мезотеліальні клітини (ПМК), фібробласти L-929 мишей, перитонеальні макрофаги, лімфоцити, гранулоцити. Біонесумісність ПДР вивчається шляхом визначення

пригнічення росту клітин, кількісного визначення вмісту різноманітних маркерів (фактор росту судинного ендотелію, трансформуючий фактор росту бетта-1, Е-кадгерин, інтерлейкін 8, інтерлейкін 6, глутатіон, ліпідна пероксидаза тощо). Фактор росту судинного ендотелію, який виробляється в ПМК, є мітогеном для ендотеліальних клітин, регулятором нормального та абнормального ангиогенезу та спричиняє судинну гіперпроницність шляхом прямої дії на ендотеліальні клітини. Трансформуючий фактор росту  $\beta$ -1, який виробляється клітинами ПМ, є багатофункціональним цитокином, який відіграє основну роль в фіброгенезі [7, 9, 10, 15, 18, 19, 21, 22].

**Мета.** Аналіз літературних даних щодо методик вивчення впливу розчинів для ПД на життєздатність та біохімічні маркери клітин різних типів тканин *in vitro* та *ex vivo*.

**Матеріали та методи.** У роботі використовувалися наступні методи: аналізу, узагальнення, систематизації і порівняння літературних даних.

**Результати та їх обговорення.** Біонесумісність ПДР пов'язують з низьким значенням рН цих розчинів, вмістом лактат-іонів, глюкози, продуктами деградації глюкози (ПДГ), платифікаторів і підвищеною осмолярністю [14, 17, 18, 20]. Вважається, що ПДГ є найбільш виразним чинником біонесумісності, оскільки володіють цитотоксичністю. Протягом термічної стерилізації та наступного зберігання у глюкозолактатних розчинах утворюються в різних кількостях 3-деоксиглюкозон, 3,4-дидеоксиглюкозон-3-ен (3,4-ДГЕ), гліюксаль, метилгліюксаль, 5-гідроксиметилфурфурол (5-ГМФ), ацетальдегід, формальдегід. Наші дослідження показали, що після термічної стерилізації збільшується оптична густина розчинів при 228 і 278-286 нм. Значення оптичних густин залежить від концентрації глюкози, натрію лактату, режиму стерилізації та рН розчинів до стерилізації. 3,4-ДГЕ є одним з найбільш цитотоксичних ПДГ [2-4, 5, 11, 14, 19, 20-22].

Дослідження останніх років підтвердили, що мезотелій, найбільш структурно диференційований та вразливий шар очеревини. Мезотеліальні клітини відіграють центральну роль у підтримці цілісності ПМ та сприяють місцевому перитонеальному захисту та гомеостазу. Мезотелій реагує на контакт з ПДР уже в перші декілька діб після початку ПД. У клітинах мезотелію у відповідь на вплив ПДР прискорюються процеси обміну та регенерації, підсилюються процеси перекисного окиснення та проліферації, підвищується активність мітохондрій та інших цитоплазматичних органел. Постійний контакт з гіперосмолярним ПДР призводить до підвищення активності іонних pomp на поверхні ПМК, таких як Na/K-АТФаза, алкалінофосфатаза, а також цитоплазматичних цитохромоксидази та глюкозо-6-фосфатази. Високий осмотичний градієнт впливає на ауторегуляцію високоспеціалізованих протеїнів, які забезпечують трансцелюлярний транспорт води, кількість цих протеїнів з часом зменшується [1, 14]. Мезотелій починає відділятися від базальної мембрани (БМ), частково її оголюючи. Вміст маркерів маси мезотеліальних клітин зменшується, в зоні міжклітинних контактів з'являються розриви, які з часом заповнюються шаром фібрину. При уремії суттєво зростають концентрації циркулюючого NO, продуктів підвищеного глікозильовання, фактору росту судинного ендотелію, прозапальних цитокинів (інтерлейкін-1 $\beta$ , інтерлейкін 6, фактор-альфа некрозу пухлин тощо) [1, 13, 14]. ПМК піддаються епітеліально-мезенхімальному перетворенню (ЕМП)

після менш ніж 1 року проведення ПД. Склерозуюча хвороба очеревини розвивається на 4-5 році лікування ПД і пов'язана з рецидивами перитоніту, а також з порушенням біосумісності ПМ і ПДР. Після більше, ніж 4-5 років проведення ПД, розвивається фіброз і неоангінез в субмезотеліальній зоні. Особливу роль в патогенезі склерозуючої хвороби відіграють часті рецидиви стафілокового перитоніту (склерозуючий перитоніт). Клінічні дослідження демонструють, що структурні зміни корелюють зі змінами в транспортній функції ПМ і прогресивною недостатністю УФ [1, 5].

Для визначення цитотоксичності розчинів для ПД використовуються різні методики та маркери. Одні автори використовують ПМК, які отримуються з діалізітів від декількох пацієнтів. Інші автори отримують ПМК за згодою від неуремічних пацієнтів, яким проводяться абдомінальні операції [14, 17, 20, 22]. Діалізати центрифугуються при понижених температурах, осаджені клітини промиваються фосфатним буфером та піддаються пасажам. Для експериментів використовуються клітини від першого до третього пасажу. Також широко в дослідженнях *in vitro* використовуються фібробластні клітини L-929 мишей. Раковий антиген 125 (Ca 125) використовується як маркер активності ПМК, гіалуронан – маркер фіброзу, інтерлейкін 6 - запального стану в ПМ. Вміст інтерлейкіну 6 збільшується при гострому запаленні в ПМ та зі збільшенням тривалості лікування у хронічних пацієнтів, які перебувають на ПД. Продукти деградації фібрину і фібриногену є маркерами збільшеного фібринолізу та хронічного запалення в ПМ. Припускається, що зменшений вміст інтерлейкіну 6 та гіалуронану в діалізатах більш сумісних ПДР (нейтральне значення рН, зменшений вміст ПДГ) зумовлений зменшенням інтраперитонеального запалення. Проте необхідні подальші дослідження зі встановлення ролі інтраперитонеального інтерлейкіну 6, взаємозв'язку цитокінів з запальним феноменом перитонеальних клітин [1, 7, 11, 14, 16, 19, 20, 22].

Egipon M. і співавт. (2004) досліджували залежність ступеня інгібування росту фібробластів L-929 розчинами, які зберігалися за різних умов - 25 і 40°C. Досліджувані зразки розчинів, які вміщували 1,5 % глюкози і 35 ммоль/л натрію лактату та були приготовлені в лабораторних умовах (стерилізація при 121°C протягом 40 хв), додавалися до певної кількості клітин та поміщалися в термостат протягом 72 год при температурі 37 °С. Після термостатування визначався ступінь інгібування клітинного росту за допомогою нейтрального червоного. Ці дослідження продемонстрували, що інгібування клітинного росту тим сильніше виражене, чим більша концентрація 3,4-ДГЕ у розчині, а також що ПМК є більш чутливі до цитотоксичної дії розчинів для ПД порівняно з фібробластами L929. ПМК були отримані з діалізітів, які знаходилися протягом ночі в перитонеальній порожнині уремічних пацієнтів. При початковій концентрації 3,4-ДГЕ і 3-ДГ (125±4) і (230±6) мікромоль/л, відповідно, інгібування росту ПМК спостерігалось на рівні 80 %, в той час для фібробластів - 58 %. При зберіганні зразків при 40 °С протягом 30 днів інгібування росту клітин зменшилося і становило 18 % для ПМК і 8 % для фібробластів при концентрації 3,4-ДГЕ і 3-ДГ (32±2) і (265±12) мікромоль/л, відповідно. Результатами цих досліджень є те, що відразу після стерилізації розчинів концентрація 3,4-ДГЕ-3-ену є дуже велика, що в дослідженнях *in vitro* супроводжується високим ступенем інгібування росту клітин. Протягом зберігання при 25 °С протягом 30 днів концентрація 3,4-ДГЕ зменшується в 5 разів (до 25 мікромоль/л), а концентрація 3-ДГ зростає від

230 до 307 мікромоль/л. Ці хімічні перетворення в розчині супроводжувалися суттєвим зменшенням цитотоксичності розчину по відношенню до фібробластів. При зберіганні промислово виготовлених розчинів для ПД при підвищених температурах спостерігалось зростання концентрації 3,4-ДГЕ-3-ену та підвищення ступеня інгібування росту фібробластів. На основі проведених досліджень, ці автори прийшли до висновку, що глюкозовмісні розчини для ПД не повинні застосовуватися принаймні протягом 30 днів після стерилізації і не зберігатися при температурі вищій за 25 °С протягом терміну придатності [11, 14].

В іншій публікації [20] ці автори проводили дослідження з вивчення цитотоксичності традиційного промислово-виготовленого розчину для ПД з вмістом глюкози 2,5 %, використовуючи фібробласти мишей L-929. При вмісті 3,4-ДГЕ-3-ен 13 мікромоль/л інгібування росту цих клітин було близько 42 %. При зберіганні цього розчину протягом 1 доби при 60°С концентрація 3,4-ДГЕ-3-ен зростає від 13 до 51 мікромоль/л з одночасним значним збільшенням цитотоксичності розчину до 80 %. На основі проведених досліджень ці автори роблять ще один висновок: що можливою причиною зростання кількості випадків хімічного перитоніту влітку у пацієнтів, які перебувають на ПД, може бути не тільки посилений ріст і розмноження мікроорганізмів в цей період року, а й зростання концентрації 3,4-ДГЕ-3-ен при неправильному зберіганні (при температурі вищій за 25°С), який сприяє виникненню хімічного перитоніту [20].

J. Witowski і співавт. (2003) вивчали вплив лабораторно-виготовлених розчинів для ПД з різним вмістом глюкози (1,5 % та 4,25 %), які піддалися термічній стерилізації та стерилізуючій фільтрації без наступного нагрівання, на життєздатність людських ПМК методом визначення швидкості метаболізму МТТ [3-(4-4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід] (МТТ-тест) та шляхом визначення вивільнення цими клітинами інтерлейкіну-6 після попередньої стимуляції інтерлейкіном-1β. У цих дослідженнях були отримані наступні результати. Після експозиції протягом 10 днів ПМК в розчинах, які піддавалися стерилізуючій фільтрації, їх життєздатність не змінювалася. Не змінювалася також здатність до стимульованого виділення інтерлейкіну-6. Проте після експозиції ПМК в розчинах, які піддавалися термічній стерилізації протягом 10 днів, їх життєздатність суттєво зменшувалася (до 29,8 ± 25 %). Здатність до стимульованого виділення інтерлейкіну-6 також суттєво зменшувалася - до 31,4 % (для розчину з вмістом глюкози 1,5 %) і 28,76 % (для розчину з вмістом глюкози 4,25 %) порівняно з контролем [17].

ПДГ погіршують активність гліюксалазо-глутатіонової системи ПМК, яка бере участь в ефективній елімінації таких ПДГ, як метилглюксаль, глюксаль та 3-ДГ. К. Korybalska і співавт. (2006) досліджували вплив розчинів для ПД на вміст гліюксалази I та відновленого глутатіону в ПМК, вивільнення інтерлейкіну-6 та їх життєздатність методом «МТТ тесту». ПМК отримували від неуремічних пацієнтів, які дали згоду на відбір цих клітин під час абдомінальних операцій. Як досліджувані розчини використовувалися лактатні розчини з вмістом глюкози 1,5 і 4,25 %, які піддавалися стерилізуючій фільтрації та термічній стерилізації. рН усіх розчинів коректувалося 1 М розчином натрію гідрокарбонату до 7,3. 24 годинна експозиція ПМК у термічно обробленому розчині з вмістом глюкози 4,25 % призводила до зменшення активності

глюкосази I, загального внутрішньоклітинного глутатіону та життєздатності клітин. При експозиції ПМК у розчині з вмістом глюкози 4,25 %, який піддавався стерилізуючій фільтрації, показники активності глюкосази I, загального внутрішньоклітинного глутатіону та життєздатності клітин не відрізнялися від показників в контрольному досліді. Попереднє додавання до цього розчину суміші глюкосази I (10 ОД/л) та глутатіону (2 ммоль/л) суттєво збільшувало показник життєздатності клітин. Проведені дослідження підтвердили гіпотезу, що експозиція ПМК до дії термічно стерилізованих розчинів для ПД зменшує рівень глутатіону і пов'язаного з цим зменшеної активності глюкосази I та життєздатності клітин. Ці зміни пов'язуються з присутністю ПДГ у розчинах, оскільки у відсутності останніх відсутні й зміни у вмісті глюкосази I, глутатіону та життєздатності клітин [22].

Kjellstrand P. та співавт. (2004) вважають, що маркером біонесумісності можна вважати не тільки пригнічення росту клітин, а й скоректовану величину оптичної густини при 228 нм, оскільки дослідження з пригнічення росту клітин вимагають спеціальної лабораторії. Вони провели численні експериментальні дослідження зі встановлення залежності ступеня пригнічення росту фібробластів L-929 від скоректованої оптичної густини розчинів для ПД за довжини хвилі 228 нм ( $A_{228\text{corr}} = [A_{228} - A(284/5.7)] - 0.3$ ). Під скоректованою оптичною густиною автори мають на увазі зменшення оптичної густини при 228 нм на величину 0,3, яка зумовлена поглинанням натрію лактату в кількості 40 ммоль/л, та величину оптичної густини при 284 нм, поділеній на 5,7, яка зумовлена поглинанням 5-ГМФ при 228 нм [21]. Наші експериментальні дослідження підтверджують, що величина 0,3 – це величина оптичної густини лактатвмісних розчинів до стерилізації при 228 нм [2-4].

Глюкозовмісні ПДР спричиняють епітеліально-мезенхімальне перетворення (ЕМП) МК, яке асоціюється з перитонеальним фіброзом і васкуляризацією. Маркерами ЕМП є  $\alpha$ -рівний м'язовий актин ( $\alpha$ -smooth muscle actin) і E-кадгерин. Ефекти покращення біосумісності відображаються через зміни концентрації вмісту вищезазначених маркерів в ПМК. У присутності глюкози та ПДГ вміст першого маркера збільшується, в той час другого – зменшується. Інгібітор-1 активатора плазміногену (PAI-1) і тканинний тип активатора плазміногену (t-PA) беруть участь у фіброгенезі різних органів. Людські ПМК можуть утворювати PAI-1 і t-PA після стимуляції глюкозою. Глюкозовмісні ПДР спричиняють надутворення PAI-1 і t-PA шляхом активізації позаклітинної сигнал-регулюючої кінази 1/2. У той же час розчини для ПД на основі ікодекстрину менше впливали на утворення PAI-1 і t-PA. Ікодекстрин менше стимулює утворення зазначених вище маркерів [13]. Так, Нутриніл спричиняє менше наростання вмісту ракового антигену 125 (CA 125) і лактатдегідрогенази, ніж Діаніл з вмістом глюкози 4,25 %. Тому вважають, що за показником «вміст антигену (CA 125) і лактатдегідрогенази» Нутриніл більш біосумісний, ніж стандартні глюкозовмісні ПДР [9].

Лабораторні дослідження *in vivo* демонструють, що реактивний кисень, генерований стандартними ПДР, великою мірою відповідальний за перитонеальний фіброз і гіперпроникисть ПМ. Додавання до стандартних ПДР ацетилцистеїну як антиоксиданта і лозартану як блокатора рецепторів ангіотензину краще зберігає структурну й функціональну цілісність ПМ, зокрема, зменшує концентрацію в діалізаті ангіотензину, фактора росту

судинного ендотелію, рівень ліпідного пероксиду, трансформуючого фактора росту  $\beta$ -1 [18]. У лабораторних дослідженнях на щурах з впливу ПДГ на ПМ, було показано, що ПДР з низьким вмістом ПДГ (Фізіоніл, вміст глюкози 4,25 %, рН 7,0-7,4) ефективно послаблює перитонеальні васкуляризацію та фіброз в порівнянні зі стандартним ПДР (Діаніл, вміст глюкози 4,25 %, рН 5,2 доведено до значення 7,0) [8].

Показано, що *in vitro* 3,4-ДГЕ викликає каспазозалежний апоптоз нейтрофілів та монуклеарних клітин периферичної крові. Такий вплив можна пояснити імуносупресивними властивостями 3,4-ДГЕ, які *in vivo* спричиняють погіршення антибактеріального захисту очеревини. 3,4-ДГЕ також спричиняє апоптоз ниркових клітин і може спричинити діабетичну нефропатію й погіршувати антибактерійний захист при діабеті. Формальдегід і 3,4-ДГЕ сповільнюють ремезотелізацію, причому пригнічення ремезотелізації характеризується дозозалежним ефектом. Глюкоза в концентрації 5-80 ммоль/л суттєво не впливає на ремезотелізацію. Традиційні розчини для ПД з збільшеним вмістом ПДГ сповільнюють ремезотелізацію порівняно з розчинами в багатокамерних контейнерах [14]. Як свідчать доклінічні та клінічні дослідження, зменшення ПДГ в ПДР є одним із факторів підвищення їх біосумісності. Тому внаслідок постійного впливу нефізіологічних діалізних розчинів на ПМ знижується її здатність чинити локальну антибактеріальну дію, що підвищує ризик виникнення перитоніту. Як зазначає Андрусев А.М. (2005), низький рівень рН та гіперосмолярність стандартних ПДР призводить до вираженої дисфункції перитонеальних макрофагів та МК. Висока концентрація глюкози в ПДР негативно впливає на продукцію перитонеальними лейкоцитами деяких протизапальних факторів. У пошкодженні захисних властивостей очеревини значну роль відіграють ПДГ [1].

При вивченні *in vitro* та *ex vivo* впливу гідрокарбонатного ПДР з низьким вмістом ПДГ (Bica Vera виробництва «Fresenius Medical Care», Німеччина) і традиційного лактатного ПДР з вмістом глюкози 2,3 % на форму та функції ПМК спостерігали здатність першого ПДР підтримувати епітеліальний фенотип ПМК і менші характеристики фіброгенезу (вищі рівні Е-кадгерину та нижчі рівні фібронектину, фактору росту васкулярного ендотелію, хемоцитокіну (інтерлейкіну 8)) порівняно зі традиційним ПДР [15]. В інших дослідженнях зазначається, що концентрація СА-125 є вищою при використанні лактатно-гідрокарбонатних розчинів порівняно з лактатними розчинами. Проте кількість перитонеальних макрофагів та лімфоцитів в 1 л діалізату була суттєво вища при використанні лактатно-гідрокарбонатного розчину порівняно з лактатним. Рајек J. та співавтори (2008) пояснюють це більшою фізіологічністю лактатно-гідрокарбонатного розчину, який викликає менше вивільнення прозапального цитокіну інтерлейкіну 6 і більший вміст перитонеальних макрофагів в діалізаті, що сприяє кращому інтраперитонеальному захисту. Одним із можливих пояснень збільшеного вмісту останніх є зменшений ступінь їхнього апоптозу і некрозу [19].

Узагальнивши дані літератури, можна зробити висновок, що для вивчення біосумісності ПДР проводяться дослідження зі встановлення ступеня цитотоксичності розроблених розчинів. Найчастіше для цих досліджень використовуються ПМК та фібробласти. Життєздатність клітин вивчається декількома методиками: метод МТТ тесту, за допомогою нейтрального

червоного, визначення внутрішньоклітинного аденозитрифосфату, а також за здатністю стимульованого виділення інтерлейкіну 6. Краща життєздатність клітин асоціюється з меншою концентрацією інтерлейкіну 6, фактору росту судинного ендотелію, вищою концентрацією інтерлейкіну 6 після стимульованого виділення, ракового антигена Ca 125, E-кадгерину, більшою здатністю ПМК підтримувати епітеліальний фенотип.

#### **Література**

1. Андрусев, А. М. Перитонеальный диализ: отдаленные результаты лечения, факторы, их определяющие, и клиническая патофизиология метода (Обзор литературы) / А. М. Андрусев // Нефрология и диализ. – 2005. – №2. – С.110 – 129.

2. Гудзь, Н.И. Обоснование состава перитонеальных диализных глюкозо-содержащих растворов / Н.И. Гудзь // Вестник фармации.- 2015.-№2.-С. 33-40.

3. Гудзь, Н.И. Спектрофотометрический анализ в разработке перитонеальных диализных растворов / Н.И. Гудзь // Вестник фармации.- 2015.- №4.- С63-70.

4. Гудзь, Н.И. Особенности разработки технологии лабораторных серий глюкозолактатных растворов для перитонеального диализа / Н.И. Гудзь, Р.С. Коритнюк // Рецепт.-2016.-№1.- С. 14-25.

5. Николаев А.Ю., Милованов Ю.С. Лечение почечной недостаточности. Москва, МИА, 1999 (008). Режим доступа: <http://www.hd13.ru/library/865/>

6. Окислительный стресс и антиоксиданты: организм, кожа, косметика. Сборник статей (под общей ред. А. Петрухиной).- М.: ООО «Фирма КЛАВЕЛЬ», 2006. -288 с.

7. Diaz-Buxo, J.A. Agents that modulate peritoneal membrane structure and function / J.A. Diaz-Buxo, L. Gotloib // Perit. Dial. Int. – 2007.- №1.-P.16-30. Access mode: <http://www.pdiconnect.com/content/27/1/16.long>

8. Effects of low glucose degradation products peritoneal dialysis fluid on the peritoneal fibrosis and vascularization in a chronic rat model / C.D. Kim, H.M. Kwon, S.H. Park, et al. // Ther. Apher. Dial. – 2007. - №1. -P. 56-64. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=8.%09Effects+of+low+glucose+degradation+products+peritoneal+dialysis+fluid+on+the+peritoneal+fibrosis+and+vascularization+in+a+chronic+rat+model>

9. Effects of glucose-free dialysis solutions on human peritoneal mesothelial cells. J.M. Chang, S.P.Lin, Y.H.Lai, H.C.Chen // Am. J. Nephrol. 2007.-№2.-P.206-111. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17377374>

10. Epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation of peritoneal mesothelial cells mediated by oxidative stress in peritoneal fibrosis rats / S. Duan, J. Yu, Q. Liu, et al // Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. - 2011.-№1.- p.34-43. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2011.01.006. Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21311137>

11. Erixon M. PD fluids contain high concentrations of cytotoxic GDPs directly after sterilization / M. Erixon [et al.] // Perit. Dial. Int. – 2004. – №4. – P.392-398. – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15335155>.

12. Fusshoeller A. Histomorphological and functional changes of the peritoneal membrane during long-term dialysis // Pediatr. Nephrol. -2007. -№1. – P. 97-103. Access mode:<http://link.springer.com/article/10.1007/s00467-007-0541-z#page-2>



13. Glucose-based PD solution, but not icodextrin-based PD solution, induces plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2. M. Katsutani, T. Ito, T. Masaki, et al. // *Ther Apher Dial.* - 2007. - №2. - p. 94-100. Access mode: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-9987.2007.00423.x/pdf>

14. Glucose degradation products (GDP) retard remesothelialization independently of-glucose concentration / L.W. Morgan, A. Wieslander, M. Davies [et al.] // *Kidney Int.* – 2003. – №5. – P. 1854 – 1866. Access mode: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Glucose+degradation+products+\(GDP\)+retard+remesothelialization+independently+of-glucose+concentration](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Glucose+degradation+products+(GDP)+retard+remesothelialization+independently+of-glucose+concentration)

15. Influence of bicarbonate/low-GDP peritoneal dialysis fluid (BicaVera) on in vitro and ex vivo epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells / A. Fernández-Perpén, M.L. Pérez-Lozano, M.A. Bajo et al. // *Perit. Dial. Int.*- 2012.- №3.- p.292-304. doi: 10.3747/pdi.2010.00315. Access mode: <http://www.pdconnect.com/content/32/3/292.full.pdf+html>

16. Markers in peritoneal effluent for withdrawal from peritoneal dialysis: multicenter prospective study in Japan. Kawanishi H., Fujimori A, Tsuchida K., et al / *Adv. Perit. Dial.* -2005.- Vol.21.- P.134-138. Access mode: <http://www.advancesinpd.com/adv05/Adv20053e-1.pdf>

17. Mesothelial toxicity of peritoneal dialysis fluids is related primarily to glucose degradation products, not to glucose per se / J. Witowski, T. Bender, J. Wisniewska et al // *Perit. Dial. Int.* – 2003. – Vol.23, №4. – P.381-390. – Access mode: <http://www.pdconnect.com/content/23/4/381>.

18. Oxidative stress during peritoneal dialysis: implications in functional and structural changes in the membrane. Noh H., Kim J.S., Han K.H., et al // *Kidney Int.* – 2006.- 69(11).-p.2022-2028. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=oxidative+stress+peritoneal+dialysis+lozartan>

19. Short-term effects of a new bicarbonate/lactate-buffered and conventional peritoneal dialysis fluid on peritoneal and systemic inflammation in CAPD patients: a randomized controlled study / J.Pajek, R. Kveder, A. Bren et al // *Perit. Dial. Int.*- 2008. -№1.- p.44-52.

20. Take care in how you store your PD fluids: actual temperature determines the balance between reactive and non-reactive GDPs / Erixon M., Wieslander A., Linden T. [et al] // *Perit. Dial. Int.* – 2005. - №6. - P. 583 -590. Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16411526>

21. Temperature: the single most important factor for degradation of glucose fluids during storage / Kjellstrand P., Erixon M., Wieslander A. et al // *Perit. Dial. Int.* – 2004.- №4.-P.385-391. Access mode: <http://www.pdconnect.com/content/24/4/385.long>

22. The role of glyoxalase pathway in reducing mesothelial toxicity of glucose degradation products / Korybalska K., Wisniewska-Elnur J., Tróminska J. et al // *Perit. Dial. Int.* – 2006. - №2. -P. 259-265. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24584621>

*Н.И. Гудзь, Р.С. Коритнюк, Н.М. Воробець*

## **Влияние растворов для перитонеального диализа на жизнеспособность и биохимические маркеры клеток разных типов *in vitro* і *ex vivo***

**Львовский национальный медицинский университет  
имени Данила Галицкого, г. Львов,**

**Национальна медицинская академия последипломного образования  
имени П.Л. Шупика, г. Киев**

**Введение.** Для проведения перитонеального диализа (ПД) чаще всего используются глюкозолактатные растворы. Значительный опыт по проведению ПД идентифицировал серию функциональных и анатомических патологических изменений в перитонеальной мембране (ПМ), что является результатом повторного воздействия бионесовместимых перитональных диализных растворов (ПДР). Биохимические маркеры полезны для неинвазивной оценки ухудшения состояния ПМ. При разработке растворов для ПД, изучение степени разложения глюкозы сочетают с лабораторными исследованиями *in vitro*, *ex vivo* и доклиническими исследованиями, а также клиническими испытаниями по изучению влияния ПДР на брюшину и/или ее клетки, или клетки других тканей. В исследованиях *in vitro* биологическими объектами являются перитонеальные мезотелиальные клетки (ПМК), фибробласты L-929 мышей, перитонеальные макрофаги, лимфоциты, гранулоциты. Бионесовместимость ПДР изучается путем определения подавления роста клеток, количественного определения содержания различных маркеров: фактора роста сосудистого эндотелия, трансформирующего фактора роста  $\beta$ -1, E-кадгерина, интерлейкина 8, интерлейкина 6, глутатиона и др.

**Цель.** Анализ литературных данных относительно методик изучения влияния растворов для ПД на жизнеспособность и биохимические маркеры клеток различных типов тканей *in vitro* и *ex vivo*.

**Материалы и методы.** В работе использовались следующие методы: анализа, обобщения, систематизации и сравнения литературных данных.

**Результаты.** Для изучения биосовместимости ПДР проводятся исследования по установлению степени цитотоксичности разработанных растворов и их влияния на жизнеспособность различных клеток. Чаще всего для этих исследований используются ПМК и фибробласты. Жизнеспособность клеток изучается несколькими методиками: метод МТТ теста, с помощью нейтрального красного, определения внутриклеточного аденозинтрифосфата, а также стимулированного выделения интерлейкина 6. Лучшая жизнеспособность клеток ассоциируется с меньшей концентрацией интерлейкина 6, фактора роста сосудистого эндотелия, высокой концентрацией интерлейкина 6 после стимулированного выделения, ракового антигена Ca 125, E-кадгерина, большей способностью ПМК поддерживать эпителиальный фенотип.

**Ключевые слова:** растворы для перитонеального диализа, перитонеальные мезотелиальные клетки, фибробласты, перитонеальные макрофаги.

*N.I.Hudz, R.S.Korytniuk, N.M.Vorobets*

## **Influence of solutions for peritoneal dialysis on the viability and biochemical markers of different cells in vitro and ex vivo**

**Danylo Halytsky Lviv National Medical University,**

**Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education**

**Introduction.** Solutions for the peritoneal dialysis (PD) containing dextrose and sodium lactate are widely used. The large experience of PD identified functional and anatomic pathological changes in the peritoneal membrane (PM) which result from the repeated action of bioincompatible peritoneal dialysis solutions (PDA). The principal pathophysiological mechanisms include oxidative stress, inflammation and its consequences. Biochemical markers are useful for noninvasive assessment of the deterioration of the peritoneal membrane condition. When developing solutions for PD foreign scientists often combine the study of the degree of glucose degradation with laboratory studies in vitro, ex vivo and preclinical and clinical trials to ascertain the impact of peritoneal dialysis solutions on the entire peritoneum and/or its cells or cells of other tissues. In vitro studies involve such biological objects as peritoneal mesothelial cells (PMC), mice fibroblasts L-929, peritoneal macrophages, lymphocytes and granulocytes. Biocompatibility of PDS is studied by determining the inhibition of cell growth, quantitative determination of different markers, including vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta-1, E-cadherin, interleukin 8, interleukin 6, glutathione, lipid peroxidase, etc..

**Materials and methods.** There were used the following methods: analysis, synthesis, systematization and comparison of published data.

**Results.** To study the biocompatibility of developed solutions for PD, the degree of their cytotoxicity and their impact on the viability of various cells are investigated. Peritoneal mesothelial cells (PMC) and fibroblasts are mainly used. Cell viability is studied by the methods as follows: MTT test, by neutral red, and determination of intracellular adenosine triphosphate and the ability to produce stimulated interleukin 6. The best viability selection of cells is associated with lower concentrations of interleukin 6, vascular endothelial growth factor, interleukin 6 concentration higher after stimulated release, cancer antigen CA 125, E-cadherin, greater ability to support epithelial phenotype by PMC.

**Key words:** solutions for peritoneal dialysis, peritoneal mesothelial cells, fibroblasts, peritoneal macrophages.

### ***Відомості про авторів:***

***Гудзь Наталія Іванівна*** - доцент кафедри технології ліків та біофармації Львівського медичного університету імені Данила Галицького, канд. фармацевтичних наук.

***Коритнюк Раїса Сергіївна*** - професор кафедри фармацевтичної технології та біофармації Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, доктор фармацевтичних наук. Адреса: 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9.

***Воробець Наталія Миколаївна*** - професор кафедри фармакогнозії та фармацевтичної ботаніки Львівського медичного університету імені Данила Галицького, доктор біологічних наук.