

DISTRIBUTION CHARACTERISTICS OF TOLL-LIKE RECEPTORS OF INNATE IMMUNITY IN ADIPOCYTES OF PARAPANCREATIC ADIPOSE TISSUE AT AN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS AND METFORMIN ADMINISTRATION

D.A. Putilin, A.M. Kamyshny

Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye

Increasing incidence of type 1 and type 2 diabetes mellitus is a major health problem of the modern world and requires new diagnostic tools to assess early metabolic disorders, particularly insulin resistance. The link between obesity, inflammation and insulin resistance indicates the important secretory role of adipose tissue. Proinflammatory factors (cytokines, adipokines) produced by adipose tissue are related to impaired glucose metabolism. The discovery of the expression of the Toll-like receptors (TLRs) in adipocytes, suggests an important role in innate immunity. In different models of obesity, there has been observed an increase of TLRs expression in the fat tissue, therefore TLRs could be involved in systemic inflammation in this disease, and in the development of insulin resistance. To study the influence of experimental diabetes mellitus on the expression of TLR2 and TLR4 adipocytes in parapancreatic adipose tissue in Wistar line rats.

The research was conducted on 60 males of Wistar line rats with weighing 115-135 grams, which were divided into 5 experimental groups of 12 rats: control rats - group 1, rats with 3-week experimental streptozotocin-induced in diabetes (ESD1) - group 2, rats with 3-week experimental streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes (ESD2) - group 3, rats with a 3-week ESD1 – the 4-th group and ESD2 group – the 5-th group, which were administered metformin at a dose of 50 mg/kg starting from the 1-st day of diabetes induction during 3 weeks intragastrically. For induction ESD1 streptozotocin (STZ) was administered intraperitoneally to the rats at a dose of 50 mg/kg dissolved in 0.5 ml of 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) before the point of entry. ESD2 STZ induction was carried out at a dose of 65 mg/kg of the previous (15 min.) by nicotinamide administration (intraperitoneally - 230 mg/kg). The experimental model of streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes has some similarities with type 2 diabetes in humans with reduced β -cell mass (e.g. partially reduced insulin secretion in response to glucose). Therefore, this diabetic model may be very useful in studies related with different aspects of type 2 diabetes in humans.

Structure of population of TLR2⁺ and TLR4⁺ adipocytes has been studied by the analysis of serial histological sections using the method of indirect immunofluorescence with polyclonal antibodies to TLR2 and TLR4 of rat. Processed histological sections were examined by a computer program Image J. The density of TLR on the surface of adipocytes was determined taking into account the intensity of fluorescence identified immune positive cells and nonspecific fluorescence of the drug. Adjustable cell fluorescence was calculated basing on these indicators.

The development of ESD1 increased the number of TLR2⁺ and TLR4⁺ adipocytes in 2.5 times and on 95%, respectively, increased the density of TLR2⁺-receptors on the surface of adipocytes in all grades in 9-23% and affected the density of TLR4⁺-receptor in different directions. Induction of ESD2 led to an increase in the number of TLR2⁺-adipocytes in 83%, did not affect the number of TLR4⁺-adipose cells, increased density of TLR2⁺- and TLR4⁺-receptors on the membrane in large adipocytes. Introduction of metformin to diabetic rats reduced total

number of TLR2⁺ -adipocytes in 16% at ESD1, in 22% in ESD2, TLR4⁺ -adipocytes in 36% (ETSD1), accompanied by a decrease in the density of TLR2⁺- and TLR4⁺- receptors on the surface of adipose cells.

The increasing of number of TLR2⁺- and TLR4⁺- adipocytes in parapancreatic adipose tissue and density of TLR2⁺- and TLR4⁺-receptors on the surface in the conditions of ESD induction indicates a possible increase in proinflammatory signaling and is one of the factors that may support the progression of disease. Our data demonstrate the ability of metformin to reduce the density of TLR2⁺- and TLR4⁺- receptors on the surface of adipose cells and there by adjust the ranks of adipose tissue inflammation.

ВИКОРИСТАННЯ АГЕНТІВ, ЩО БЛОКУЮТЬ КЛІТИННИЙ ЦИКЛ, ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АНАПЛАСТИЧНОГО РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

В.М. Пушкар'юв

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України, м. Київ.

У сучасній медицині найбільш ефективними канцеростатичними засобами є агенти та сполуки, дія яких пов'язана з гальмуванням або зупинкою клітинного циклу. До таких належать, в першу чергу, таксани, які діють на мікротрубочки, порушуючи таким чином поділ клітин. Друга група агентів, таких як іонізуюча радіація (ІР) та препарати платини, пошкоджує ДНК пухлинної клітини, що також супроводжується зупинкою клітинного циклу. Нарешті, останнім часом у медичну практику почали вводити препарати, що вибірково пригнічують окремі ферменти, які беруть участь у регуляції перебігу клітинного циклу. До них належить, зокрема, інгібітор циклін-залежних кіназ – росковітин.

Вивчали ефекти паклітакселю (Рtx), γ -опромінення, росковітину та їх комбінацій на апоптозні процеси в клітинах та ксенотрансплантованих пухлинних анапластичного раку щитоподібної залози (АТЗ). Показано, що ІР та Рtx конкурентно впливають на фосфорилування основного регулятора клітинного циклу, пухлинного супресора р53, інших важливих регуляторів циклу та експресію проапоптозного білка Вах в пухлинних клітинах. В той же час, ефект комбінованої дії ІР та паклітакселю щодо активації каспаз вірогідно вище від ефектів кожного з цих агентів зокрема. Дослідження дії Рtx, γ -опромінення та їх комбінації на виживання клітин АТЗ та ріст ксенотрансплантованих пухлин, що походять з цих клітин, показало, що ІР впливає на життєздатність пухлинних клітин не суттєво, а найбільш ефективними виявились низькі (0,5-2 Гр) дози іонізуючої радіації. В дослідях *in vivo* опромінення також не зупинило ріст пухлин – спостерігалось лише гальмування їх росту. Рtx виявився значно ефективнішим, а за комбінованої дії ІР та Рtx розмір пухлин зменшувався до 0-0,3% від контролю.

Дослідження комбінованої дії паклітакселю та росковітину на апоптозні механізми виявило, що росковітин активує каспази та розщеплення одного з субстратів каспази-3 – полі(АДФ-рибозо)-полімерази (ПАРП), але послаблює Рtx-залежну активацію каспази-9, розщеплення ПАРП та, особливо, активацію каспази-8. З іншого боку, росковітин значно знижує рівень антиапоптозного білка XIAP, який зростає при дії паклітакселю, що напевно є головною причиною канцеростатичних властивостей росковітину.

Вивчення виживаності клітин показало, що росковітин,

після 24 год інкубації, посилював цитотоксичність Ptx щодо клітин АТС в усіх досліджених концентраціях. Після 48 год інкубації росковітин підвищував цитотоксичність Ptx тільки при низьких (2,5 нМ) концентраціях і не впливав або навіть гальмував апоптоз при вищих концентраціях Ptx. Пригнічення цитотоксичності Ptx росковітином в останньому випадку можливо відображає зниження активності каспаз при спільній дії Ptx та росковітину.

Таким чином, комбіноване застосування Ptx у концентраціях, що викликають апоптоз (10-25 нМ) та низьких фракційних доз (0,5 – 5 Гр) IP, а також росковітину та низьких (1-5 нМ) концентрацій Ptx є перспективною стратегією для подальших доклінічних досліджень, що мають за мету розробку нових та інтенсифікацію традиційних терапевтичних підходів для лікування недиференційованого та анапластичного раку щитовидної залози.

КОМБІНОВАНА ДІЯ ПАКЛІТАКСЕЛЮ ТА ІНГІБИТОРА ЯДЕРНОГО ФАКТОРА NF-κB НА ПУХЛИНИ РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

В.М. Пушкар'юв, О.І. Ковзун, В.В. Пушкар'юв, М.Д. Тронько

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України, м. Київ

Паклітаксель є ефективним протипухлинним препаратом, що використовується для лікування деяких видів раку. Досліджуються можливості його застосування для терапії пухлин щитоподібної залози (ЩЗ). Одержані дані свідчать, що паклітаксель активує в пухлинних клітинах не тільки процеси, які ведуть до апоптозу, але й механізми, що активно протидіють загибелі клітин. Тому, актуальними є дослідження, які б давали змогу визначити способи інактивації сигнальних каскадів, що беруть участь у формуванні стійкості ракових клітин до цього протипухлинного препарату.

Ядерний транскрипційний фактор NF-κB контролює процеси проліферації, диференціації, поділу, виживання та міграції клітин. Порушення його функції призводить до запальних процесів та ряду захворювань, в тому числі і раку. Більше того, саме NF-κB вважають головним посередником, який пов'язує хронічні запальні процеси зі злоскісною трансформацією клітин.

Раніше нами було показано, що паклітаксель посилює активність та експресію кіназного комплексу ІКК (ІκB-кіназа), який призводить до активації NF-κB і транспортування його до ядра. Оскільки фактор NF-κB відіграє важливу роль в антиапоптозних процесах, зумовлює хемо- та радіорезистентність пухлинних клітин, очікувалося, що його пригнічення буде посилювати токсичний ефект паклітакселю в пухлинах.

Мета дослідження полягала у вивченні комбінованої дії паклітакселю та специфічного інгібітора ядерного чинника NF-κB – ДНМЕQ – щодо росту пухлин, одержаних шляхом ксенотрансплантації трансгенним мишам клітин анапластичного раку щитоподібної залози.

Досліди *in vivo* проводили на ксенотрансплантах. Для цього 4 групам, у кожній по 9 трансгенних, безтисунних, 8-тижневих за віком самок мишей BALB/c nu/nu, підшкірно вводили в стегно задньої лапки суспензію клітин FRO, суспендованих у RPMI-1640 (5×10^6 клітин на тварину). Вага тварин складала близько 25 мг. Розмір пухлини замірювали через 1 день і розраховували за формулою $a^2 \times b \times 0,4$, де а – най-

менший діаметр пухлини, b – діаметр пухлини, перпендикулярний до а. Лікування паклітакселем та ДНМЕQ починали після того, як розмір пухлин наближався до 100 мм³. Препарати паклітакселю (10 мг/кг/день) і ДНМЕQ (8 мг/кг/день) вводили внутрішньочеревно у суміші, що складалася з Steromorph EL (Sigma, США), етанолу та PBS (1:1:1). Контрольним групам вводили в такій же кількості цю суміш без препаратів.

Підсаджені мишам клітини утворюють пухлину, яка досить швидко росте, досягаючи через 7 днів у контрольній групі 350% від початкового об'єму пухлини. Лікування тварин інгібітором NF-κB, ДНМЕQ, призводить до вірогідного гальмування росту пухлини. Паклітаксель виявився ефективнішим *in vivo*. Розмір пухлини зменшувався більш ніж у два рази у порівнянні з початковим об'ємом, до лікування. Ще ефективнішою була комбінована дія паклітакселю з ДНМЕQ, в результаті якої об'єм пухлини зменшувався більш ніж у 4 рази. Ефект поєднаного лікування обома препаратами вірогідно відрізнявся від дії кожної зі сполук окремо.

Комбінована дія паклітакселю та інгібітора NF-κB більшою мірою посилює апоптозні процеси в пухлинах анапластичного раку ЩЗ, ніж кожен з агентів окремо і, таким чином, комбінація цих препаратів може бути перспективним варіантом для доклінічних досліджень щодо терапії агресивних, метастатуючих та радіоїод-резистентних форм раку ЩЗ.

ПАТОГЕНЕЗ І ПРИНЦИПИ ГОРМОНАЛЬНОЇ ФАРМАКОТЕРАПІЇ СИНДРОМУ ВІКОВОГО ДЕФІЦИТУ АНДРОГЕНІВ У ЧОЛОВІКІВ

О.Г. Резніков

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України, м. Київ

Тестостерон та його активні метаболіти задіяні у гормональній регуляції метаболізму та структури і функції майже всіх органів і тканин. Цей вплив вони здійснюють здебільшого через відповідну андроген-рецепторну сигналізацію. Демонстрацією цього є, наприклад, швидке відновлення морфологічної будови і функції передміхурової залози, включаючи неоваскулогенез, яке спостерігається у кастрованих самців щурів на тлі введення тестостерону. З іншого боку, фармакологічна блокада андрогенних рецепторів досить швидко призводить до атрофічних змін в органах-мішенях, гальмування сперматогенезу. Вікове згасання гормональної активності сім'яних залоз супроводжується зменшенням фертильного потенціалу та іншими наслідками як у чоловіків, так і у тварин.

Дослідженнями останніх років показано зв'язок між надмірною масою тіла та зменшенням рівня тестостерону (Т) в крові. Так, у чоловіків з ІМТ < 25 кг/м² у діапазоні 40-79 pp. рівень Т зменшується лише з 20 до 18 нмоль/л, а при ІМТ ≥ 30 кг/м² він становить 13-14 нмоль/л, тобто наближається до гіпогонадних значень (10-12 нмоль/л). Ще більших змін зазнає рівень вільного Т. На нашу думку, причиною цього є надмірна продукція естрогенів жировою тканиною та їхній гальмівний вплив на секрецію гонадотропінів. Проте гіпогонадний стан, який характеризує синдром вікового дефіциту андрогенів (СВДА), може розвинути і незалежно від ожиріння. З іншого боку, саме СВДА суттєво підвищує ризик інсулінорезистентності, накопичення вісцерального жиру і розвитку метаболічного синдрому, що реалізується через лептин, прозапальні цитокіни, інсулін тощо. Таким чином, виникає порочне коло