

УДК: 616-006.66; 615.326

Місяк С.А.¹, Лукін С.М.¹, Голотюк В.В.², Корнієнко П.Л.³, Тавокін В.В.³, Вовк А.В.¹, Бурлака А.П.¹**Вплив препарату з глини “Бента” на швидкість генерування супероксидних радикалів пухлинною тканиною та нейтрофілами крові хворих на рак прямої кишки**¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, м. Київ²ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»³Наукова лабораторія “Гармонія”, УКРТЕХМЕД, м. Київ
misvyak@gmail.com

Резюме. Мета дослідження: з’ясувати ефективність застосування фармакопейного продукту глини “Бента” в якості переклопача супероксидних радикалів, генерованих імунотентними клітинами крові і пухлиною у хворих на рак прямої кишки.

Матеріал і методи. Дослідження були проведені на взірцях пухлин та нейтрофілах венозної крові 12 хворих з помірно-диференційованою аденокарциномою прямої кишки. Досліджували зміни супероксид-генеруючої активності НАДФН-оксидази ізольованих нейтрофілів венозної крові та пухлинної тканини під впливом препарату з глини “Бента” методом електронного парамагнітного резонансу з використанням спінового уловлювача 1-гідрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидину при кімнатній температурі на комп’ютеризованому спектрометрі ЕПР PE-1307. В якості контролю використовували взірці кишки, відібрані на відстані 3-4 см від пухлини, і лейкоцити донорської крові.

Результати. У результаті проведених досліджень встановлено, що мітохондрії клітин тканини умовно здорової кишки генерують супероксидні радикали зі швидкістю $0,28 \pm 0,04$ нмоль/г пухлинної тк. •хв, аденокарциноми прямої кишки – $0,48 \pm 0,03$ нмоль/г пухлинної тк. •хв. При додаванні препарату «Бента» цей показник знизився до значень $0,35 \pm 0,05$ нмоль/г пухлинної тк.хв. Показник супероксид-генеруючої активності НАДФН-оксидази нейтрофілів у донорів визначався на рівні $0,23 \pm 0,03$ нмоль/10³ клітин•хв, тоді як у хворих на рак прямої кишки активність нейтрофілів складала $0,63 \pm 0,09$ нмоль/10³ клітин•хв. Додавання препарату «Бента» до суспензії нейтрофілів супроводжувалося зниженням зазначеного показника до $0,45 \pm 0,06$ нмоль/10³ клітин•хв.

Висновки. Виявлена нова характеристика фармакопейного продукту глини “Бента”, а саме її спроможність виступати в якості перехоплювача супероксидних радикалів, генерованих як імунотентними клітинами крові хворих на рак прямої кишки, так і джерелами клітин паренхіматозних структур, зокрема аденокарциномою прямої кишки.

Ключові слова: глина, супероксидний радикал, нейтрофіли, рак прямої кишки, реабілітація.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Важливим напрямком медицини на сучасному етапі є розробка та широке впровадження в практику технологій, засобів і методів попередження та лікування хронічних захворювань. З цією метою можуть бути використані речовини природного походження, які впливають на обмінні процеси та підсилюють функціональну активність систем організму, підвищуючи природну резистентність. До таких речовин слід віднести препарати глини, що складаються з одного або декількох глинистих мінералів: каолініту, монтморилоніту, сапоніту чи інших шаруватих алюмо- і магнієсилкатів, що мають специфічні властивості. Серед останніх виділяють іонообмінні, сорбційні, каталітичні, цитопротекторні, можливість регуляції кислотно-лужної рівноваги в організмі, а також функцію молекулярного сита [2, 4, 5].

Монтморилоніт (-m Mg₃ [Si₄O₁₀] [OH] 2) • p {Al, Fe^{•••}} 2 [Si₄O₁₀] [OH] 2) • n H₂O) – тришаровий силкат, сформований з двох тетраедричних і одного октаедричного шару, розташованого між ними. У мінералах монтморилоніту між пакетами розташовуються молекули води. Для мінералів цієї групи характерні широкі ізоморфні заміщення Si⁴⁺ на Al³⁺, надлишкові негативні заряди компенсуються при цьому іонами Ca, Na, K та ін., що розташовуються разом з молекулами води між пакетами. Кількість води між пакетами може змінюватися в широких межах, з чим пов’язана висока сорбційна та іонообмінна здатність монтморилоніту. Монтморилоніт – це основний мінерал глини, що має лікувальні

властивості. Взірці глини з високим вмістом (більше 45%) монтморилоніту називають бентонітовими. Мінерали монтморилонітової групи мають практично всі властивості природних нанорозмірних частинок. Щоб природні наночастинки за своїми властивостями могли перевершувати штучні наноматеріали, необхідно використовувати бентонітові глини високої якості з вмістом монтморилоніту 85 - 95% [2].

Лікувальні якості глини з давніх-давен використовували в народній медицині. Сьогодні цей ефективний лікувальний засіб було витіснено сильнодіючими хімічними препаратами і забутий. В останні роки вчені знову звернулися до досліджень цієї унікальної природної, нетоксичної речовини і доводять незаперечну користь препаратів з глини при лікуванні хворих з різноманітними захворюваннями [6].

Мета дослідження: з’ясувати ефективність застосування фармакопейного продукту глини “Бента” в якості перехоплювача супероксидних радикалів, генерованих імунотентними клітинами крові і пухлиною у хворих на рак прямої кишки (РПК).

Матеріал і методи дослідження

Дослідження були проведені на взірцях пухлин та нейтрофілах венозної крові 12 хворих на РПК (5 чоловіків та 7 жінок, середній вік складав $62 \pm 1,8$ років). Гістологічний тип пухлини в усіх хворих – помірнодиференційована аденокарцинома. У всіх пацієнтів діагноз, стадію захворювання і наявність метастазів верифіковано відповідно до вимог доказової медицини (в ході відповідних клініко-інструментальних обстежень, морфологічно). Критеріями виключення хворих при проведенні дослідження були: вік більше 80 років; первинно-множинний характер пухлинного ураження; загальний важкий стан хворих при перебуванні в стаціонарі, зумовлений наявністю супутніх соматичних захворювань в стадії декомпенсації; прийом вітамінів-антиоксидантів хворими за місяць до початку і під час проведення досліджень. Дослідження виконували відповідно до принципів проведення біомедичних досліджень за участю людей, викладеними в Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації. В якості антикоагулянта використовували 3%-ий розчин трилону Б. У пробірку з 1 мл трилону Б набирали 5 мл крові з ліктьової вени і клали в холодильник для її зсідання упродовж 40 хв. Нейтрофіли виділяли згідно з методикою [7]. 250 мкл очищеної фракції нейтрофілів використовували для визначення рівнів швидкості генерування O₂⁻. 500 мг пухлини гомогенізували в скляному гомогенізаторі вручну з додаванням 0,5 мл фосфатного буфера pH=7,4. З отриманого гомогенату відбирали 250 мкл, вливали в спеціальну кварцову кювету і досліджували швидкість генерування супероксидних радикалів. В якості контролю використовували взірці кишки, відібрані на відстані 3-4 см від пухлини. Дослідження супероксид-генеруючої активності НАДФН-оксидази пухлинно-асоційованих нейтрофілів та пухлинної тканини проводили методом електронного парамагнітного резонансу з використанням спінового уловлювача 1-гідрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидину за кімнатної температури на комп’ютеризованому спектрометрі ЕПР PE-1307 [1, 3]. 1 мг препарату з глини “Бента” (відповідно до методичних рекомендацій МОЗ України від 17.09.2008 р.) розводили в 1 мл дистильованої води, відстоювали. 10 мкл надосаду додавали до нейтрофілів і гомогенату пухлини для дослідження впливу “Бенти” на супероксид-генеруючу активність НАДФН-оксидази та клітин пухлини. Статистичний аналіз виконували за допомогою прикладних ліцензійних програм Origin 7.0 та SPSS 17.0.

Результати дослідження та їх обговорення

У результаті проведених досліджень була з’ясована се-

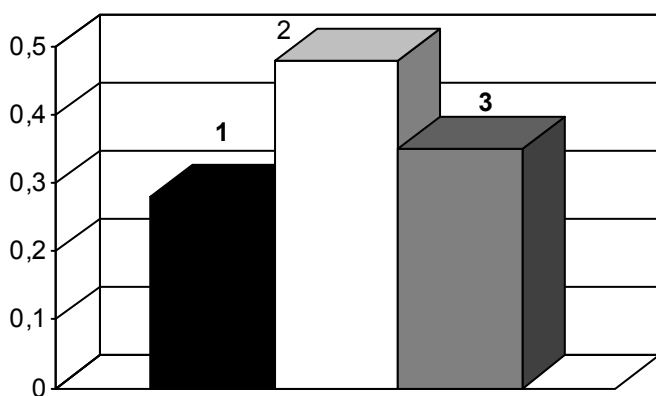


Рис. 1. Швидкість генерування супероксидних радикалів (нмоль/г • хв)

1) Клітини інтактної слизової оболонки прямої кишки; 2) Клітини РПК; 3) Аденокарцинома прямої кишки з додаванням «Бенти» (концентрація 1:10)

редня швидкість генерування супероксидних радикалів мітохондріями слизової оболонки прямої кишки на відстані 4 см від пухлини, клітин РПК та мітохондріями клітин аденокарциноми при додаванні препарату «Бента» (рис. 1), ($p < 0,05$).

Компоненти, які формують склад препарату «Бента» в умовах *in vitro*, проникаючи в мітохондрії клітин пухлини, знижують рівень генерування супероксидних радикалів в електротранспортному ланцюгу. Так, якщо мітохондрії клітин тканини умовно здорової кишки генерують супероксидні радикали зі швидкістю $0,28 \pm 0,04$ нмоль/г пухлинної тк. • хв., аденокарциноми прямої кишки – $0,48 \pm 0,03$ нмоль/г пухлинної тк. • хв. то при додаванні препарату «Бента» цей показник знизився до значень $0,35 \pm 0,05$ нмоль/г пухлинної тк. • хв.

Аналіз отриманих результатів оцінки стану супероксид-генеруючої активності нейтрофілів периферичної крові хворих на РПК та вплив на ці процеси препарату «Бента» свідчить, що складові компоненти препарату мають властивості перехоплювачів супероксидних радикалів, або впливають на процеси переносу електронів на молекулярний кисень, знижуючи за цим механізмом сумарний рівень радикалу кисню. Так, показник активності НАДФ•Н-оксидази у донорів визначався на рівні $0,23 \pm 0,03$ нмоль/ 10^3 клітин • хв., тоді як у хворих на РПК активність нейтрофілів склала $0,63 \pm 0,09$ нмоль/ 10^3 клітин • хв. Додавання препарату «Бента» до суспензії нейтрофілів супроводжувалося зниженням зазначеного показника до $0,45 \pm 0,06$ нмоль/ 10^3 клітин • хв.

Висновки

Таким чином, нами виявлена нова характеристика фармакопейного продукту глини «Бента», а саме її спроможність виступати в якості перехоплювача супероксидних радикалів, генерованих як імунокомпетентними клітинами крові хворих на РПК, так і джерелами клітин паренхіматозних структур, зокрема аденокарциномою прямої кишки. Впровадження використання фармакопейного продукту із глини, який складається із одного або декількох глинистих мінералів – каоліну, монтморилоніту, сапоніту або інших шаруватих алюмо- та магнезієсилікатів є перспективним для застосування у відновлювальних процедурах онкологічних хворих в умовах реабілітаційних центрів і в санаторно-курортних закладах.

Перспективи подальших досліджень

Експеримент виявив спроможність фармакопейного продукту глини «Бента» виступати в якості перехоплювача супероксидних радикалів, генерованих імунокомпетентними клітинами крові хворих, клітинами РПК. У подальшому є цікавим питання щодо з'ясування впливу препарату «Бента» на прогресування злоякісних пухлин в експерименті.

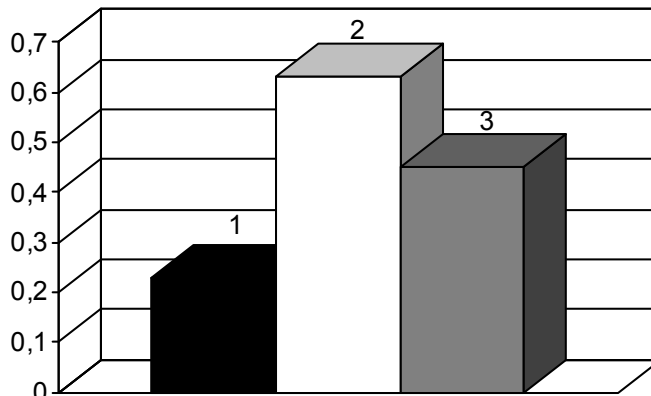


Рис. 2. Швидкість генерування супероксидних радикалів НАДФ•Н-оксидазою нейтрофілів (нмоль / 10^3 клітин • хв): 1 – донорів; 2 – хворих на РПК; 3 – хворих на РПК при додаванні препарату «Бента» (концентрація 1:10)

Література

1. Бурлака А.П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі / А.П. Бурлака, С.П. Сидорик. - К.: Наукова думка, 2006. – 227 с.
2. Успенская М.Е. Минералогия с основами кристаллографии и петрографии: уч. пос / М.Е. Успенская, Т.В. Посухова - М.: Диалог-МГУ, 2006. – 124 с.
3. Effects of radical oxygen species and NO: formation of intracellular hypoxia and activation of matrix metalloproteinases in tumor tissues / Burlaka A.P., Sidorik E.P., Ganusevich I.I. [et al.] // Exp Oncol.- 2006.- Vol. 28.- P. 49–53.
4. Mittal K.C. Electro and physico chemical properties of indian clay loam / K.C. Mittal, O.P. Bansal // Journal für Praktische Chemie.- 1968.- Vol. 38, N. 5-6.- P. 257-259.
5. Lipson S.M. Adsorption of reovirus to clay minerals: Effects of cationexchange capacity, cation saturation, and surface area / S.M. Lipson, G. Stotzky // Appl Environ Microbiol.- 1983.- Vol. 46.- P. 673–682.
6. Abehsera M. The Healing Power Of Clay: The Natural Remedy for Dozens of Common Ailments / M. Abehsera.- Kesington Publishing Corp., New York, 2001.- 185 p.
7. Tocotrienols-induced inhibition of platelet thrombus formation and platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries / Qureshi A, Karpen Ch, Qureshi N, et al. // Lipids in Health and Disease.- 2011.- Vol. 10.- P. 58-71.

Мисяк С.А.¹, Лукин С.М.¹, Голотюк В.В.², Корниенко П.Л.³, Тавокин В.В.³, Волк А.В.¹, Бурлака А.П.¹

Влияние препарата глины «Бента» на скорость генерирования супероксидных радикалов опухолевой тканью и нейтрофилами крови больных раком прямой кишки

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев, Украина
²ГБУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет», г. Ивано-Франковск, Украина

³Научная лаборатория «Гармония», УКРТЕХМЕД, г. Киев, Украина

misyak@gmail.com

Резюме. Цель исследования: выяснить эффективность применения фармакопейного продукта глины «Бента» в качестве перехватчика супероксидных радикалов, генерируемых иммунокомпетентными клетками крови и опухолью у больных раком прямой кишки.

Материал и методы. Исследования были проведены на образцах опухолей и нейтрофилах венозной крови 12 больных умеренно дифференцированной аденокарциномой прямой кишки. Исследовали изменения супероксид-генерирующей активности НАДФ•Н-оксидазы изолированных нейтрофилов венозной крови и опухолевой ткани под влиянием препарата из глины «Бента» методом электронного парамагнитного резонанса с использованием спиновой ловушки 1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипиперидина при комнатной температуре на компьютеризированном спектрометре ЭПР PE-1307. В качестве контроля использовали образцы кишки, отобранные на расстоянии 3-4 см от опухоли и лейкоциты донорской крови.

Результаты. В результате проведенных исследований установлено, что митохондрии клеток ткани условно здоровой кишки

генерируют супероксидные радикалы со скоростью $0,28 \pm 0,04$ нмоль/г опухолевой тк. •мин., аденокарциномы прямой кишки – $0,48 \pm 0,03$ нмоль/г опухолевой тк. •мин. При добавлении препарата «Бента» этот показатель снизился до значений $0,35 \pm 0,05$ нмоль/г опухолевой тк. •мин. Показатель супероксид-генерирующей активности НАДФ•Н-оксидазы у доноров определялся на уровне $0,23 \pm 0,03$ нмоль/ 10^3 клеток•мин., тогда как у больных раком прямой кишки активность нейтрофилов составила $0,63 \pm 0,09$ нмоль/ 10^3 клетин•мин. Добавление препарата «Бента» в суспензию нейтрофилов сопровождалось снижением указанного показателя до $0,45 \pm 0,06$ нмоль / 10^3 клеток•мин.

Выводы. Обнаружена новая характеристика фармакопейного продукта глины «Бента», а именно ее способность выступать в качестве перехватчика супероксидных радикалов, генерируемых иммунокомпетентными клетками крови больных раком прямой кишки и источниками клеток паренхиматозных структур, в частности аденокарциномой прямой кишки.

Ключевые слова: глина, супероксидный радикал, нейтрофилы, рак прямой кишки, реабилитация.

S.A. Misyak¹, S.M. Lukin¹, V.V. Golotiuk², P.L. Kornienko³, V.V. Tavokin³, A.V. Voyk¹, A.P. Burlaka¹

The Influence of Drug Made from Bentonitic Clay on the Rate of Generation of Superoxide Radicals by the Tumor Tissue and Blood Neutrophils in Patients with Rectal Cancer

¹ R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiology, Kyiv, Ukraine

² Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

³ Scientific laboratory "Harmony", UKRTEHMED, Kyiv, Ukraine

Abstract. The objective of the research was to ascertain the efficacy of the pharmacopoeial preparation made from bentonitic clay as an interceptor of superoxide radicals generated by immunocompetent

blood cells and tumor tissue in patients with rectal cancer.

Materials and methods. Research was conducted on tumors and venous blood samples taken from 12 patients with moderately differentiated rectal adenocarcinoma. The superoxide-generating NADPH oxidase activity of isolated neutrophils and tumor tissue under the influence of medical preparation made from bentonitic clay was investigated by means of electron paramagnetic resonance using spin trap 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxypiperidine at room temperature on computerized EPR spectrometer RE-1307. Rectum mucosa samples taken at a distance of 3-4 cm from the tumor and donor leukocytes were used as controls.

Results. The results revealed that the mitochondria of intact colon tissue generated superoxide radicals at a speed of 0.28 ± 0.04 nmol/g•min, while in adenocarcinoma of the rectum the level of generation was 0.48 ± 0.03 nmol/g•min. The addition of medical preparation made from bentonitic clay allowed us to reduce the level of superoxide generation by 0.35 ± 0.05 nmol/g•min. The indicator of the superoxide-generating NADPH oxidase activity of donor neutrophils was determined at the level of 0.23 ± 0.03 nmol/ 10^3 cells•min, and in patients with rectal cancer activity of neutrophils was at the level of 0.63 ± 0.09 nmol/ 10^3 cells•min. The addition of medical preparation made from bentonitic clay to a suspension of neutrophils was accompanied by a decrease of this indicator by 0.45 ± 0.06 nmol/ 10^3 cells•min.

Conclusions. New characteristic feature of the pharmacopoeial preparation made from bentonitic clay was found – its ability to act as an interceptor of superoxide radicals generated by both immunocompetent blood cells and parenchymal tumour cells in patients with adenocarcinoma of the rectum.

Keywords: clay, superoxide radicals, neutrophils, rectal cancer, rehabilitation.

Надійшла 20.04.2015 року.

УДК 618.3+616-06+616-002.4

Остафійчук С.О., Геращенко С.Б., Остафійчук А.Р.

Морфометричне дослідження еритроцитів у вагітних жінок з преєклампсією

Кафедра акушерства і гінекології ім. І.Д. Ланового (зав. каф. – д.мед.н., проф. Генік Н.І.), voloshka76@rambler.ru

Кафедра гістології, цитології та ембріології (зав. каф. – д.мед.н., проф. Геращенко С.Б.)

Івано-Франківського національного медичного університету

Резюме. Проблема преєклампсії в акушерстві продовжує залишатись актуальною у зв'язку з високою частотою даного ускладнення, збільшення відсотку тяжких форм, резистентністю до традиційних методів лікування, значними материнськими і перинатальними втратами. Незважаючи на сучасні досягнення в розкритті механізмів розвитку преєклампсії, окремі його ланки продовжують залишатися недостатньо вивченими, що обмежує патогенетичну спрямованість терапії і не дозволяє досягти бажаного успіху. **Метою** нашої роботи було дослідження морфометричних властивостей еритроцитів у вагітних жінок з преєклампсією. **Матеріали і методи.** Нами обстежено 23 вагітних: 11 жінок з преєклампсією середнього ступеня тяжкості і 12 - тяжкого з термінами гестації 28-39 тижнів. Контролем слугували 11 жінок з фізіологічним перебігом гестації. Середній вік жінок склав $22,9 \pm 0,8$ роки. Морфометричне дослідження еритроцитів проводили за допомогою аналізатора зображень, який складається з мікроскопа Люмам Р-8 з мікрофотонасадкою МФН-10-1, оптичного перехідного пристрою, телевізійної камери Косом (digital CCD color camera КСС-310 ND/PD), фреймграббера з програмним забезпеченням Fly video серії EZ та персонального комп'ютера. Для вимірювання метричних характеристик використовували програмне забезпечення UTHSCSA Image Tool® for Windows® (version 2.00) в інтерактивному режимі з використанням об'єктива x40 і фотоокуляра x1,7. Зображення еритроцитів, отримані шляхом послідовного сканування мазків, забарвлених за Романовським-Гімза, записувались у вигляді окремих *.tiff-файлів. Отриманий цифровий матеріал обробляли статистично з використанням про-

грам Microsoft Excel 2000 та Statistica 5.11. **Результати.** Встановлено, що при преєклампсії середнього ступеня переважають еритроцити середнього і малого діаметру, в яких виявляються ознаки більш вираженої деформації, ніж у клітинах великих розмірів. А при тяжкій преєклампсії виявляється різке зростання еритроцитів великого діаметру, серед яких відзначається виражений анізоцитоз з перевагою клітин з нехарактерними для контролю співвідношеннями площі та коефіцієнту форми профілю. **Висновки.** Відзначено, що з розвитком преєклампсії прогресують зміни морфометричних характеристик еритроцитів у бік збільшення їх дегенеративних форм з обмеженою функціональною спроможністю, що знаходяться в прямій залежності від тяжкості патологічного процесу.

Ключові слова: вагітність, преєклампсія, морфометрія еритроцитів.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Згідно із сучасними уявленнями в етіопатогенезі преєклампсії вагітних важливою ланкою є порушення у системі гемокріорегуляції, генералізація яких призводить до розвитку поліорганної недостатності. Генералізований спазм капілярів, зниження швидкості кровоплину, підвищення в'язкості крові, осідання на внутрішній оболонці судин формених елементів призводить до закупорки термінальних артерій, в результаті чого розвиваються гіперперфузія тканин, гіпоксичні та ішемічні зміни в них [1, 2]. Для діагностики порушень