

DOI: 10.26693/jmbs03.01.169

УДК 547.787.2 + 535.33/.34

Онищенко А. И.<sup>1</sup>, Наконечная О. А.<sup>1</sup>, Ткаченко А. С.<sup>1</sup>,  
Корниенко Е. М.<sup>2</sup>, Горбач Т. В.<sup>1</sup>, Бондаренко В. А.<sup>2</sup>,  
Посохов Е. А.<sup>3</sup>, Дорошенко А. О.<sup>2</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИСУТЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

<sup>1</sup>Харьковский национальный медицинский университет, Украина

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, Украина

<sup>3</sup>Национальный технический университет  
«Харьковский политехнический институт», Украина

yevgenposokhov@gmail.com

В настоящей работе было проведено исследование состояния липидного бислоя мембран эритроцитов больных хроническим полипозным риносинуситом. Для исследования были использованы флуоресцентные зонды – орто-гидроксипроизводные оксазола, молекулы которых реагируют на изменение физико-химических свойств их микроокружения. Установлено, что при хроническом полипозном риносинусите не происходит изменений в области глицериновых остатков фосфолипидов, в области карбонильных групп фосфолипидов и в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов мембран эритроцитов. Результаты, полученные в случае применения наиболее гидрофобного зонда, а именно RH7, позволяют сделать предположение, что в ходе развития патологического процесса в организме происходит увеличение гидратации наиболее полярной области мембраны эритроцита: области полярных головок фосфолипидов.

**Ключевые слова:** эритроциты, биомембрана, полипозный риносинусит, флуоресцентный зонд.

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Результаты, представленные в статье, получены в ходе проведения НИР «Изучение и моделирование острых и хронических патологических процессов ЛОР-органов для повышения эффективности их лечения», № гос. регистрации 0116U004985.

**Введение.** Хронический риносинусит является одной из наиболее распространенных нозологических единиц в практике оториноларингологов [9]. Известно, что существенную роль в патогенезе хронического риносинусита играют свободнорадикальные процессы, окислительный стресс и активация синтеза провоспалительных цитокинов клет-

ками иммунной системы, которые могут усиливать генерацию активных форм кислорода (АФК), что усугубляет степень окислительного повреждения компонентов тканей [1, 8, 17]. В многочисленных работах показано, что как полипозный, так и гнойный хронический риносинусит сопровождается локальными и системными изменениями цитокинового профиля [10–12]. Системные изменения при риносинуситах, в частности увеличение провоспалительных цитокинов в крови, могут приводить к повреждению клеток, находящихся вне зоны воспаления [2], принимая во внимание способность некоторых интерлейкинов индуцировать генерацию АФК. Мы предположили, что при хроническом полипозном риносинусите могут происходить изменения в структуре мембран эритроцитов. Детекция вышеуказанных изменений может использоваться в диагностических целях.

**Целью** настоящей работы явилось исследование состояния липидного бислоя мембран эритроцитов больных хроническим полипозным риносинуситом. Для этого были использованы флуоресцентные зонды – орто-гидроксипроизводные оксазола, молекулы которых нековалентно связываются с мембранами клеток и реагируют на изменения микроокружения [13, 15, 16].

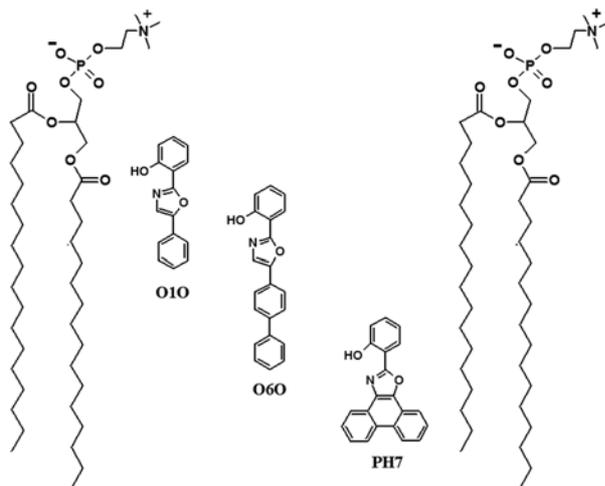
**Материалы и методы исследования.** Нами было обследовано 20 больных хроническим полипозным риносинуситом, находившиеся на стационарном лечении в оториноларингологическом отделении КУОЗ «ЦЕНТР ЭМП и МК» г. Харькова (Украина). Диагноз верифицировали клинико-инструментальными методами. Исследование проводили в соответствии с положениями Конвенции Совета Европы «О защите прав человека и человеческого достоинства в связи с применением

достижений биологии и медицины: конвенция о правах человека и биомедицине (ETS № 164)» от 04.04.1997 г. и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2008 г.). Все пациенты подписывали информированное согласие. Контрольная группа состояла из 20 здоровых людей с искривлением носовой перегородки.

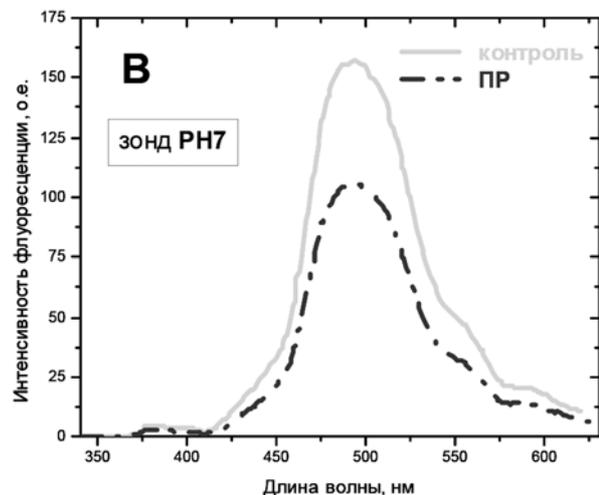
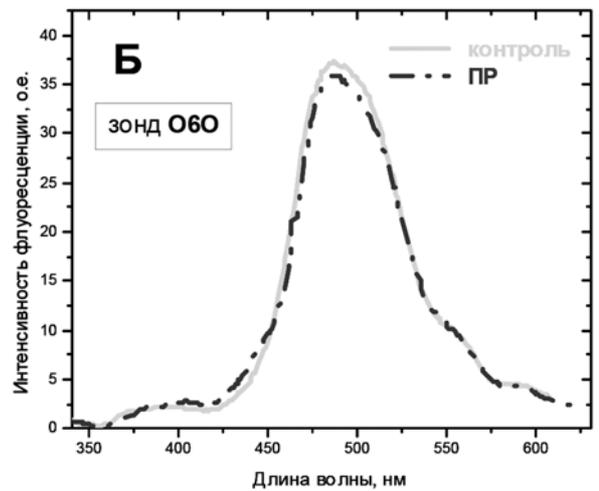
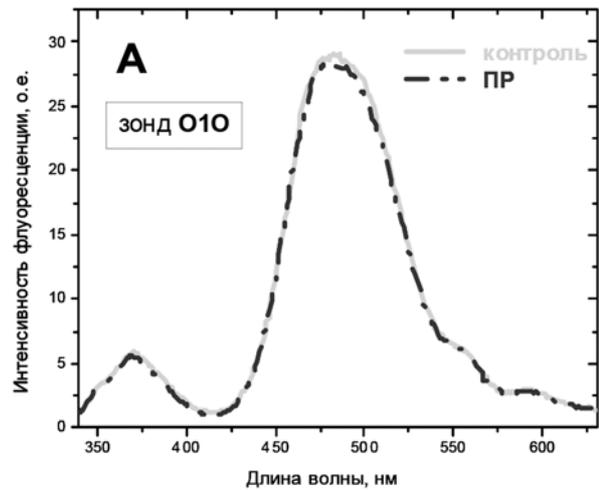
Для исследования состояния липидного бислоя мембран эритроцитов пациентов нами использовались флуоресцентные зонды, успешно применявшиеся ранее для исследований биомембран [13–16]: 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол (зонд **O1O**), 2-(2'-ОН-фенил)-5-(4'-фенил-фенил)-1,3-оксазол (зонд **O6O**) и 2-(2'-ОН-фенил)-фенантр (10,11)-1,3-оксазол (зонд **PH7**).

Выбор флуоресцентных зондов **O1O**, **O6O** и **PH7** (орто-гидроксипроизводные 2,5-диарил-1,3-оксазола) для исследования мембран эритроцитов обусловлен тем фактом, что флуоресцентные характеристики этих зондов зависят от физико-химических свойств их микроокружения: от протондонорной способности, полярности и вязкости среды [4–7].

В настоящей работе были проведены измерения флуоресценции зондов в физиологических растворах, содержащих: (а) эритроциты пациентов с хроническим полипозным риносинуситом (опытная группа); (б) эритроциты здоровых людей с искривлением носовой перегородки (контрольная группа).



**Рис. 1.** Ожидаемая локализация и ориентация флуоресцентных зондов **O1O**, **O6O** и **PH7** на основе их флуоресцентных свойств в липидных мембранах [15, 16] и на основе их структурного подобия с флуоресцентными зондами с известной локализацией в липидных мембранах [3]. Для обозначения локализации зондов показаны две молекулы фосфатидилхолина из внешнего монослоя



**Рис. 2.** Спектры флуоресценции зондов **O1O** (А), **O6O** (Б) и **PH7** (В) в растворах, содержащих эритроциты: (а) контрольная группа (сплошная линия); (б) пациенты с хроническим полипозным риносинуситом (пунктирная линия)

Флуоресцентные зонды растворяли в ацетонитриле до начальной концентрации  $2 \times 10^{-4}$  моль/л, затем 50 мкл каждого из соответствующих растворов зонда добавляли к 2 мл суспензии эритроцитов. Конечная концентрация каждого из зондов в суспензии исследуемых мембран –  $5 \times 10^{-6}$  моль/л, таким образом, молярное отношение липид/зонд составляло 200:1. Измерение спектров флуоресценции производилось на спектрофлуориметре «Hitachi 850» через 1 час после прибавления зондов к суспензии клеток. Спектры флуоресценции зондов измеряли в области 340–600 нм при ширине щелей монохроматоров возбуждения и флуоресценции 5 и 5 нм соответственно, и длине волны возбуждения 330 нм.

#### Результаты исследования и их обсуждение.

Для настоящего исследования мембран эритроцитов пациентов с хроническим полипозным риносинуситом были применены флуоресцентные зонды - орто-гидроксипроизводные 2,5-диарил-1,3-оксазола, чувствительные к изменениям протондорной способности, полярности и вязкости микро-среды [4–7]. Нами были отобраны орто-гидроксипроизводные оксазола, различающиеся по своей липофильности [13, 15, 16]: ожидается, что области локализации отобранных зондов в мембране различны и соответствуют липофильности зондов (рис. 1) [13, 15, 16]. Ожидаемая локализация и ориентация **O1O**, **O6O** и **PH7** на основе их флуоресцентных свойств в липидных мембранах [13, 15, 16] и на основе их структурного подобия с флуоресцентными зондами с известной локализацией в липидных мембранах [3]: зонд **O1O** – в области глицериновых остатков фосфолипидов (ближе к центру липидного бислоя), в области карбонильных групп фосфолипидов и в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов, прилегающих к области карбонильных групп; зонд **O6O** – в области карбонильных групп фосфолипидов и в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов (вблизи полярной части бислоя); зонд **PH7** – в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов (вблизи центра бислоя) и в центре липидного бислоя мембран (рис. 1).

Результаты измерений флуоресценции зондов в растворах, содержащих эритроциты пациентов с хроническим полипозным риносинуситом и эритроциты контрольной группы приведены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, при изучаемой патологии не наблюдается изменений в области локализации зондов **O1O** и **O6O**, т.е. в области глицериновых остатков фосфолипидов (ближе к центру липидного бислоя), в области карбонильных групп фосфолипидов и в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов. Вместе с тем, при полипозном риносинусите наблюдается уменьшение количества молекул зонда **PH7**, связаных с мембраной эритроцита за 1 час инкубации, что свидетельствует об уменьшении скорости связывания этого зонда с мембраной. Такое уменьшение скорости связывания наиболее липофильного из использованных зондов может быть объяснено увеличением гидратации наиболее полярной области мембраны: области полярных головок фосфолипидов. Обсуждаемое увеличение гидратации, в свою очередь, может быть вызвано нарушением структуры наиболее полярной области мембраны при исследуемой патологии.

#### Выводы

1. Установлено, что у больных хроническим полипозным риносинуситом не происходит изменений в области глицериновых остатков фосфолипидов, в области карбонильных групп фосфолипидов и в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов мембран эритроцитов.
2. Результаты, полученные в случае применения наиболее гидрофобного зонда (**PH7**), позволяют сделать предположение, что при развитии патологического процесса в организме происходит увеличении гидратации наиболее полярной области мембраны эритроцита: области полярных головок фосфолипидов.

#### Перспективы дальнейших исследований.

Полученные данные обосновывают необходимость изучения состояния мембран клеток мерцательного эпителия верхних дыхательных путей методом флуоресцентных зондов при хроническом полипозном риносинусите.

#### References

1. Asher BF, Guilford FT. Oxidative stress and low glutathione in common ear, nose, and throat conditions: a systematic review. *Altern Ther Health Med*. 2016; 22 (5): 44-50.
2. Denburg JA, Keith PK. Systemic aspects of chronic rhinosinusitis. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2004; 24: 87-102. [https://doi.org/10.1016/S0889-8561\(03\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0889-8561(03)00106-1).
3. Dobretsov GE. *Fluorescence probes in cell, membrane and lipoprotein investigations*. Moscow: Nauka; 1989. 277 p. [Russian].
4. Doroshenko AO, Posokhov EA. Proton phototransfer in a series of ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3-oxazole and 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole in polystyrene films. *Theor Exper Chem*. 1999; 35: 334-7. [Russian].
5. Doroshenko AO, Posokhov EA, Shershukov VM, Mitina VG, Ponomarev OA. Intramolecular proton-transfer reaction in an excited state in a series of ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diaryloxazole. *High Energy Chemistry*. 1997; 31 (6): 388–94. [Russian].

6. Doroshenko AO, Posokhov EA, Verezubova AA, Ptyagina LM. Excited state intramolecular proton transfer reaction and luminescent properties of the ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole. *J Phys Org Chem.* 2000; 13: 253-65. DOI: 10.1002/1099-1395(200005)13:5<253::AID-POC238>3.0.CO;2-D.
7. Doroshenko AO, Posokhov EA, Verezubova AA, Ptyagina LM, Skripkina VT, Shershukov VM. Radiationless deactivation of the excited phototautomer form and molecular structure of ES IPT-compounds. *Photochem Photobiol Sci.* 2002; 1: 92-9. DOI: 10.1039/B107255M.
8. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Review: Immunology of sinusitis, trauma, asthma, and sepsis. *Allergy & Rhinology.* 2015; 6 (3): e205-e214. doi: 10.2500/ar.2015.6.0140.
9. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, et al. Chronic rhinosinusitis in European underestimated disease A GA2LEN study. *Allergy.* 2011; 66 (9): 1216–23. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02646.x>.
10. Onischenko AI, Nakonechna OA, Tkachenko AS, Kalashnik YuM. The content of MCP-1 and MMP-9 in blood serum of patients with chronic polypoid rhinosinusitis. *The Journal of VN Karazin Kharkiv National University. Series "Medicine".* 2017; 33: 23-6.
11. Onishchenko AI, Nakonecha OA, Tkachenko AS. Changes in the content of melatonin and IL-12 in serum of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Buk med visnik.* 2017; 21 (2/82): 75-7. DOI: 10.24061/2413-0737/XXI.2.82.2.2017.63. [Russian].
12. Otto BA, Wenzel SE. The role of cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 16 (3): 270-4. doi: 10.1097/MOO.0b013e3282fb2885.
13. Posokhov EA, Abmanova NA, Boyko TP, Doroshenko AO. Ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3-oxazole and 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole as fluorescent probes for medical and biological research. *Kharkov University Bulletin.* 1999; 454: 188-90. [Russian].
14. Posokhov YeO, Tkachenko AS, Korniyenko YeM. Influence of carrageenan (E 407) on the membrane of enterocytes investigated by fluorescent probes. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine.* 2013; 1 (1/98): 229–33.
15. Posokhov YO. Ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3-oxazole and 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole as fluorescent probes for toxicological study of the cells of olfactory analyzer of rats. *Kharkov University Bulletin. Chemical Series.* 2011; 20 (43): 92-9. [Russian].
16. Posokhov YO. Ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3-oxazole and 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole as fluorescent probes for toxicological investigations of model biomembranes. *Kharkov University Bulletin. Chemical Series.* 2001; 7 (30): 192-94. [Russian].
17. Yu Z, Wang Y, Zhang J, Li L, Wu X, Ma R, et al. Expression of heme oxygenase-1 in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps: modulation by cytokines. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015; 5 (8): 734-40. doi: 10.1002/alr.21530.

УДК 547.787.2 + 535.33/.34

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ПОЛІПОЗНОМУ РИНОСИНУСІТІ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ**

**Онiщенко А. І., Наконечна О. А., Ткаченко А. С., Корнієнко Є. М., Горбач Т. В., Бондаренко В. А., Посохов Є. О., Дорошенко А. О.**

**Резюме.** У даній роботі було проведено дослідження стану ліпідного бішару мембран еритроцитів хворих на хронічний поліпозний риносинусит. Для дослідження були використані флуоресцентні зонди - орто-гідрокси-похідні оксазолу, молекули яких реагують на зміну фізико-хімічних властивостей їх мікрооточення. Встановлено, що при хронічному поліпозному риносинуситі не відбувається змін в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області жирнокислотних ланцюжків фосфоліпідів мембран еритроцитів. Результати, отримані в разі застосування найбільш гидрофобного зонда, а саме RH7, дозволяють зробити припущення, що при розвитку патологічного процесу в організмі відбувається збільшення гідратації найбільш полярної області мембрани еритроцита: області полярних головок фосфоліпідів.

**Ключові слова:** еритроцити, біомембран, поліпозний риносинусит, флуоресцентний зонд.

UDC 547.787.2 + 535.33/.34

**Investigation of Erythrocyte Membranes in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps by the Method of Fluorescent Probes**

**Onishchenko A. I., Nakonechna O. A., Tkachenko A. S., Korniyenko Y. M., Gorbach T. V., Bondarenko V. A., Posokhov Y. O., Doroshenko A. O.**

**Abstract.** Chronic rhinosinusitis is one of the most common diseases in the clinical practice of otorhinolaryngologists. It has been reported that free radical processes, oxidative stress and upregulation of proinflammatory cytokines play an important role in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis. Cytokines can

enhance the generation of reactive oxygen species and aggravate oxidative damage to tissues. It has been shown in numerous papers that both chronic rhinosinusitis with nasal polyps and chronic rhinosinusitis without nasal polyps are accompanied by local and systemic changes in the cytokine profile. Systemic changes in rhinosinusitis, in particular, an increase in blood levels of proinflammatory cytokines, can lead to damage to cells outside the inflammatory area, taking into account the ability of some interleukins to induce ROS generation. We have hypothesized that in chronic rhinosinusitis with nasal polyps, changes in the membrane structure can occur and their detection can be used for diagnostic purposes.

*The purpose* of the research was to study the lipid bilayer of erythrocyte membranes in patients with rhinosinusitis with nasal polyps. For the study we used fluorescent probes - ortho-hydroxy derivatives of oxazole, the molecules of which are sensitive to the changes in the physicochemical properties of their microenvironment.

*Materials and methods.* Twenty patients who were treated in the department of otorhinolaryngology at Kharkiv Regional Clinical Hospital were examined. They were diagnosed with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. The control group included twenty healthy individuals with deviated nasal septum.

All manipulations with patients were carried out according to *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* and *Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine (ETC 164)*. All patients signed the informed consent.

To study the state of the lipid bilayer of erythrocyte membranes in patients with chronic rhinosinusitis, we used fluorescent probes: 2-(2 $\phi$ -OH-phenyl)-5-phenyl-1,3-oxazole (**O10** probe), 2-(2 $\phi$ -OH-phenyl)-5-(4 $\phi$ -phenyl-phenyl)-1,3-oxazole (**O60** probe), and 2-(2 $\phi$ -OH-phenyl)-phenanthrene(10,11)-1,3-oxazole (**PH7** probe).

*Results and discussion.* It was found out that in patients with rhinosinusitis with nasal polyps there were no changes in the region of glycerol residues of phospholipids, in the region of carbonyl groups of phospholipids and in the region of fatty acid chains of phospholipids of erythrocyte membranes.

*Conclusions.* The results, obtained in the case of the application of the most hydrophobic probe, namely PH7, enable us to make the assumption that during the pathology there is an increase in hydration of the most polar region of the erythrocyte membrane: the region of the polar heads of phospholipids.

**Keywords:** erythrocytes, biomembrane, rhinosinusitis with nasal polyps, fluorescent probe.

Стаття надійшла 24.11.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування