

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М.І. ПИРОГОВА

ОНИЩЕНКО АНАТОЛІЙ ІГОРОВИЧ

УДК: 616.211/.216 – 036.12 – 078: 57.088.6 (043.3)

**РОЛЬ ПРОФІБРОТИЧНИХ, ПРОЗАПАЛЬНИХ ТА ПРООКСИДАНТНИХ
ЧИННИКІВ В БІОХІМІЧНИХ МЕХАНІЗМАХ РОЗВИТКУ ХРОНІЧНИХ
РИНОСИНУСИТІВ**

14.01.32 – медична біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Вінниця – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Харківському національному медичному університеті МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Наконечна Оксана Анатоліївна, Харківський національний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри біологічної хімії.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Непорада Каріне Степанівна
Вищий державний навчальний заклад України
«Українська медична стоматологічна академія», завідувач кафедри біологічної та біоорганічної хімії.

доктор медичних наук, доцент
Мельник Андрій Володимирович
Вінницький національний медичний університет
ім. М.І. Пирогова МОЗ України, професор кафедри біологічної та загальної хімії.

Захист відбудеться «31» травня 2019 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 05.600.05 при Вінницькому національному медичному університеті ім. М.І. Пирогова (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова за адресою: 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

Автореферат розісланий «9» квітня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 05.600.05
кандидат медичних наук

О. А. Назарчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Хронічний риносинусит (ХРС) характеризується довготривалим запальним ураженням синопазального тракту. Дана патологія є однією з найбільш поширених в Україні та світі й зустрічаються у 5-15% населення розвинених країн (Fokkens W.J. et al., 2012; DeConde A.S., Soler Z.M., 2016). Однак, справжня кількість хворих на дану патологію є більшою, адже часто запальні процеси у біляносових пазухах проходять латентно, що ускладнює діагностику захворювання (Стагниева И.В. и др., 2015). Поряд з високою розповсюдженістю хронічних риносинуситів чітко визначається тенденція до збільшення частоти захворюваності серед населення. Показано, що за останнє десятиріччя кількість хворих на синусити збільшилась вдвічі (Пискунов Г.З. и др. 201).

В залежності від ендоскопічної картини виділяють дві форми хронічного риносинуситу – поліпозну та без назальних поліпів (Lam K. et al., 2015; Cho S.H. et al., 2016), діагностика яких проводиться з використанням клінічних та інструментальних методів. Важливою проблемою сьогодення є недостатня розробка клініко-лабораторних тестів та критеріїв оцінки важкості хронічних риносинуситів, що до певної міри зумовлено невирішеністю питань патогенезу розвитку цих захворювань.

За даними літератури суттєву роль в етіопатогенезі ХРС відіграють бактеріальна та грибкова колонізація порожнини носа та синусів, розлади імунної функції епітелію верхніх дихальних шляхів, індукція запальної реакції, порушення мукоциліарного кліренсу, зміни в експресії про- та протизапальних цитокінів (Stevens W.W. et al., 2015; Hirschberg A. et al., 2016; Chalermwatanachai T. et al., 2018).

Однією з ключових ланок патогенезу будь-якого хронічного запалення є активація процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів, що розвивається на тлі дисбалансу в системі ферментативної та неферментативної ланок про- та антиоксидантної систем (Reuter S. et al., 2010; Mittal M. et al., 2014). Поряд з цим за даними експериментальних та клінічних досліджень показано, що на тлі хронічного запалення часто виникає дисбаланс між про- та антифібротичними факторами (Schieren G. et al., 2010; Avraham Y. et al., 2012), що супроводжується зміною зі сторони екстрацелюлярного матриксу, інтенсифікацією проліферативних процесів та розвитком фіброзу (Arroyo A.G., 2010; Ueha S. et al., 2012). Однак, роль цих патогенетичних чинників у розвитку різних форм хронічного риносинуситу залишається невивченою.

Тому, поглиблені дослідження молекулярних механізмів розвитку різних форм хронічних риносинуситів, а саме ролі про- та антифібротичних факторів, різних видів клітинної смерті (апоптозу/некрозу), оксидантно-антиоксидантної системи, порушень в системі регуляції імунної відповіді, є актуальним завданням сучасної медичної біохімії та оториноларингології, адже це дозволить ідентифікувати нові важливі біохімічні маркери для діагностики даної патології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано згідно з НДР Харківського національного медичного університету «Вивчення та моделювання гострих та хронічних патологічних процесів ЛОР-

органів для підвищення ефективності їх лікування», № державної реєстрації 0116U004985.

Мета дослідження – встановити роль оксидативного стресу, фіброзу, імунозапальних порушень, апоптозу та некрозу лейкоцитів у механізмах розвитку хронічних риносинуситів і на цій основі запропонувати нові біохімічні маркери для діагностики захворювання.

Завдання дослідження:

1. Дослідити інтенсивність процесів ліпідної пероксидації та стан антиоксидантної системи у хворих на хронічний гнійний та хронічний поліпозний риносинусити (ХГР та ХПР).

2. Оцінити стан мембран еритроцитів та епітелію синопазального тракту хворих на ХГР та ХПР за допомогою флуоресцентних зондів.

3. Дослідити вміст цитокінів та хемокінів у сироватці крові хворих на ХПР та ХГР у стадії загострення.

4. Вивчити особливості стану системи фіброз/антифіброз у пацієнтів з хронічним риносинуситом.

5. Дослідити експресію білку мезенхімальних клітин віментину, морфологічні особливості поліпів та слизової оболонки синопазального тракту у хворих на ХПР та ХГР.

6. Оцінити значення апоптозу лейкоцитів у розвитку різних форм хронічних риносинуситів.

Об'єкт дослідження - молекулярні механізми розвитку хронічного поліпозного та хронічного гнійного риносинуситу у стадії загострення.

Предмет дослідження - біохімічні показники ліпідної пероксидації, стан антиоксидантної системи, вміст цитокінів та хемокінів, стан мембран еритроцитів та епітелію синопазального тракту, вміст моноцитарного хемоатрактантного протеїну-1 (MCP-1) та матриксної металопротеїнази-9 (ММП-9), експресія віментину, активність апоптозу лейкоцитів.

Методи дослідження: клініко-лабораторні, біохімічні, морфологічні, імуногістохімічні, метод флуоресцентних зондів, метод проточної цитометрії, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Проведено комплексне дослідження біохімічних механізмів розвитку різних форм хронічних риносинуситів. Встановлено, що ХГР та ХПР супроводжуються розвитком оксидативного стресу – зростає в 1,6-2,2 рази вміст продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ): ТБК-активних продуктів, дієнових кон'югатів, 8-ізопростану на тлі зниження загальної антиоксидантної активності крові на 21,2-39,4% та сироваткового рівня мелатоніну в 2,27-3,0 рази, порівняно з контролем.

Вперше за допомогою флуоресцентних зондів доведено, що розвиток ХГР та ХПР викликає зміни стану мембран клітин синопазального тракту та еритроцитів, а саме реєструється зростання ступеня гідратації в області полярних голівок фосфоліпідів.

Встановлено особливості продукції імунозапальних медіаторів за різних форм ХРС. Вперше показано, що при обох формах ХРС реєструється вірогідне

підвищення сироваткової концентрації ІЛ-12, ФНП- α , ІЛ-1 β , фракталіну (в 2-3,6 рази) на тлі зростання в сироватці крові рівня ІЛ-8 при ХГР та зниження його вмісту при ХПР.

Доведено, що ХРС асоціюється з порушенням процесів ремоделювання позаклітинного матриксу синопназального тракту. При обох формах ХРС реєструється вірогідне зростання в сироватці крові вмісту профібротичного фактору МСР-1 (в 6,9-8,8 рази) та антифібротичного фактору ММП-9 (в 1,5-2,4 рази). За цих умов достовірно збільшується співвідношення МСР-1/ММП-9 (в 3,7 рази за гнійної форми та 4,7 рази за поліпозної форми), що свідчить про активацію процесів проліферації та фіброзу сполучної тканини.

Вперше показано, що різні форми ХРС, особливо ХПР, супроводжуються зростанням експресії віментину в клітинах назального епітелію, що свідчить про розвиток епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП). З'ясовані відмінності в активності апоптозу лейкоцитів при різних формах ХРС: за ХГР зростає кількість ранньо- та пізньоапоптотичних лейкоцитів відповідно в 5,5 та 2,3 рази, а за ХПР – лише кількість ранньоапоптотичних клітин у 2,4 рази, порівняно з контролем.

Практичне значення одержаних результатів. Проведене дослідження поглиблює сучасні уявлення про біохімічні механізми розвитку ХРС, а саме ролі оксидативного стресу, фіброзу, імунозапальних порушень, апоптозу в пошкодженні клітин синопназального тракту.

Патогенетично обґрунтовано доцільність визначення рівня прозапальних цитокінів (фракталіну, ІЛ-8, ІЛ-12), співвідношення МСР-1/ММП-9, а також застосування флуоресцентних зондів РН7 та 010 з метою діагностики різних форм хронічних риносинуситів.

Отримані результати впроваджено у навчально-педагогічний процес кафедри медичної, біоорганічної та біологічної хімії Української медичної стоматологічної академії, кафедри отоларингології Харківського національного медичного університету та практичну роботу отоларингологічного відділення Комунальне неприбуткове підприємство Харківської обласної ради «Обласна клінічна лікарня» м. Харкова, Комунальний заклад охорони здоров'я Зміївської центральної районної лікарні.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом обґрунтовано концепцію роботи, визначено мету, завдання, об'єкти дослідження, обрано комплекс методів, які використовували, проведено аналіз одержаних результатів та підготовлені матеріали до друку. Експериментальні дані, представлені в дисертації, одержані особисто автором. Дисертант самостійно статистично обробив та проаналізував отримані результати. Дослідження стану мембран еритроцитів та епітелію слизової оболонки носу було проведено в Інституті сцинтиляційних матеріалів Національної академії наук України, а визначення видів клітинної смерті лейкоцитів периферичної крові в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Морфологічні дослідження було проведено разом із професором Губіною-Вакулик Г.І. (Харківський національний медичний університет). У дисертації не використовували ідей або концепцій, які належать співавторам опублікованих наукових праць.

Апробація результатів роботи. Матеріали дисертацій оприлюднені і обговорені на Республіканській науково-практичній конференції «Актуальные проблемы медицины» та 26-й Підсумковій науковій сесії «Гомельского государственного медицинского университета» (Гомель, Республіка Білорусь, 3–4 листопада 2016 р.), IV Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих вчених «ВІМСО» (Чернівці, Україна, 05-07 квітня 2017р.), науково-практичній конференції «Актуальні проблеми клінічної та фундаментальної медицини» (Харків, Україна, 13-14 квітня 2017р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної хімії» (Миколаїв, Україна, 20-22 квітня 2017р.), науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю з дня народження І. Г. Герцена «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (для студентів та молодих вчених) (Одеса, Україна, 27-28 квітня 2017р.), III Конференції молодих вчених біохіміків і молекулярних біологів з міжнародною участю «Сучасні проблеми біохімії та молекулярної біології» (Гродно, Республіка Білорусь, 11-12 травня 2017р.), міжвузівській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії» (Харків, Україна, 22 травня 2017 р.), підсумковій X науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвячена 60-річчю ТДМУ) (Тернопіль, Україна, 14 червня 2017 р.), 8-й Конференції з експериментальної і клінічної біохімії (Люблін, Польща, 18-20 вересня 2017р.), IV Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клінічної біології» (Дніпро, Україна, 5–6 жовтня 2017р.), XI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні питання клінічної медицини» (Запоріжжя, Україна, 27 жовтня 2017р.), Республіканській науково-практичній конференції «Актуальные проблемы медицины» та 27-й підсумковій науковій сесії «Гомельского государственного медицинского университета» (Гомель, Республіка Білорусь, 2–3 листопада 2017р.), міжвузівській конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» (Харків, Україна, 22-24 січня 2018 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної хімії» (Миколаїв, Україна, 24-25 травня 2018р.), науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Актуальні питання лабораторної медицини» (Харків, Україна, 20-21 листопада 2018р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 25 наукових робіт, у тому числі 10 статей (7 у фахових журналах України та 3 надруковані у закордонних фахових виданнях, з яких одна в журналі, що індексується в базі Scopus). Результати роботи також представлені у 15 тезах в збірниках матеріалів наукових конференцій України та інших країн.

Структура і обсяг роботи. Матеріали роботи презентовані на 166 сторінках машинописного тексту та складаються зі вступу, аналітичного огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, обговорення та узагальнення отриманих результатів, переліку використаних джерел літератури, що включає 277 джерел (з них 46 – кирилицею, 231 –

латиницею) та додатків. Перелік використаної літератури займає 36 сторінок. Дисертація включає 6 таблиць, 28 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У цьому розділі описані сучасні уявлення про етіологію та патогенез хронічного риносинуситу: роль бактеріальної та грибової колонізації порожнини носа та синусів, утворення біоплівки, порушення імунної функції епітелію верхніх дихальних шляхів та мукоциліарного кліренсу, зміни в експресії цитокінів та хемокінів, ремоделювання позаклітинного матриксу. Розглянуті сучасні уявлення щодо діагностики та лікування хворих з хронічними риносинуситами.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведено за участі 52 пацієнтів з хронічним гнійним риносинуситом у стадії загострення та 51 хворого з хронічним поліпозним риносинуситом, які знаходились на стаціонарному лікуванні в оториноларингологічному відділенні КЗОЗ «ОКЛ ЦЕМП та МК» м. Харкова. Групу контролю склали 50 практично здорових людей з викривленням носової перетинки. Діагнози верифікувалися за допомогою клініко-анамнестичних та інструментальних методів відповідно до протоколу №181 про надання медичної допомоги хворим з хронічним синуситом, що затверджений наказом МОЗ України від 24.03.2009 р.

При виконанні даного дослідження керувалися загальноприйнятими світовими та вітчизняними нормами біоетики відповідно до пунктів Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997 р), Гельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2000 рр.) та наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р., що засвідчено комісією з питань етики та біоетики ХНМУ (протокол № 6 від 06.06.2018 р.).

Біохімічні методи дослідження виконані в сироватці крові. Забір крові проводили в стерильних умовах шляхом пункції ліктьової вени вранці натще. Венозну кров об'ємом 5 мл збирали у пробірки, центрифугували протягом 10 хв. при 3000 обертів/хв і отримували сироватку, яку зберігали в мікропробірках при -51°C до проведення аналізу.

Показники осидантно-антиоксидантної системи. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (Федорова Т.М. и др., 1983), ДК - за світлопоглинанням ліпідного екстракту крові при довжині хвилі 232 нм (Гаврилов В.Б., 1983), загальну антиоксидантну активність сироватки крові оцінювали спектрофотометрично (Клебанов Г.И. и др. 1999). Рівень 8-ізопростану та мелатоніну досліджували імуноферментним методом з використанням наборів реактивів фірми «IBL-Hamburg GmbH» (Гамбург, Німеччина).

Визначення цитокінового профілю проводили методом імуноферментного аналізу з використанням наборів реактивів різних фірм виробників за допомогою імуноферментного аналізатора «Stat Fax 303 Plus» (США). Рівень ФНП- α , ІЛ-1 α , ІЛ-4 та ІЛ-8 визначали наборами реактивів «Вектор-Бест» (Російська Федерація), вміст фракталкіну - набором реактивів фірми «RayBiotech» (США), концентрацію

ІЛ-12 - тест-системою фірми «Orgenium» (Фінляндія), а рівень ІЛ-10 - набором реактивів фірми «eBioscience» (Відень, Австрія).

Дослідження про- та антифібротичних факторів. Концентрацію MCP-1 та MMP-9 визначали імуноферментними методами з використанням наборів «eBioscience» (Відень, Австрія).

Дослідження стану цитоплазматичних мембран проводили методом флуоресцентних зондів за допомогою спектрофлуориметра «Hitachi 4010». При дослідженні еритроцитів використовували зонди O1O (2 - (2 - ОН- феніл) -5- феніл -1 ,3- оксазол) і РН7 (2 - (2 - ОН- феніл)-фенантрен [10,11]-1,3-оксазол), а епітелію слизової оболонки носа – зонд 010. Вимірювання проводилось через 1 годину після додавання зондів. Спектри флуоресценції зондів вимірювали в області 340-600 нм при ширині щілин монохроматорів збудження і флуоресценції 5 і 5 нм відповідно, й довжині хвилі збудження 330 нм (Посохов Е.А., 2011).

Метод протокової цитометрії використовували для дослідження стадій клітинної смерті лейкоцитів за допомогою цитофлуориметра «FACS Calibur» від «Becton Dickinson» (США). Оцінка стадій апоптозу/некрозу проводилася шляхом одночасного додавання маркерів: ФІТЦ-міченого анексину V, фікоеритрин-мічених мишиних моноклональних антитіл до CD45 (CD45 PE) та 7-аміноактиноміцину (7-AAD). Оцінка результатів була проведена за допомогою програм «CELLQuest Pro» та «WinMDI Version 2.9».

Гістологічне дослідження мікропрепаратів поліпів та фрагментів тканин синоназального тракту, зафарбованих гематоксиліном та еозином, пікрофуксином за Ван Гізон (Лилли Р., 1969) проводили на мікроскопі «Axiostar-plus» (Zeiss, Німеччина).

Імуногістохімічний аналіз проводили з використанням мишачих моноклональних антитіл до віментину виробництва фірми «Thermo Fischer Scientific» (Великобританія). Після інкубації з первинними антитілами до віментину, мікрорізи обробляли антимишачими IgG, кон'югованими з пероксидазою хрину. Візуалізацію комплексу антиген-антитіло виконували з використанням 3,3'-діамінобензидину.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою комп'ютерної програми «Graph Pad Prism 5». Для порівняння показників двох незалежних груп використовувався метод розрахунку непараметрического U критерію Манна-Уїтні та параметричного t-критерію Ст'юдента. При використанні непараметрического U критерія цифрові дані представлені в вигляді медіани (Me) та інтерквартильного розмаху [25%, 75%]. Граничним значенням статистичної достовірності отриманих результатів вважалося $p < 0,05$. Для визначення кореляції між двома незалежними показниками використовувався непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена (Ллойд Э., 1989).

Результати дослідження та їх обговорення. *Дослідження процесів ліпідної пероксидації, стану антиоксидантної системи у пацієнтів з хронічними риносинуситами.* У хворих на поліпозну та, особливо, гнійну форми ХРС відмічається розвиток оксидативного стресу (табл. 1), доказом чого є зростання в сироватці крові вмісту продуктів ліпопероксидації - 8-ізопростану (в 1,8 та 2,2 рази

відповідно, $p < 0,001$), ТБК-активних продуктів (в 1,6 та 1,9 рази відповідно, $p < 0,0001$), ДК (в 1,65 та 2,1 рази відповідно, $p < 0,001$), порівняно з показниками контрольної групи.

Таблиця 1 - Параметри ліпідної пероксидації у сироватці крові пацієнтів з хронічним риносинуситом (Ме [25%; 75%])

Групи	ТБК-активні продукти, мкмоль/г білка	Дієнові кон'югати, мкмоль/г білка	8-ізопростан, нг/мл
Контрольна група (n=20)	3,72 [2,85; 4,27]	1,61 [1,47; 2,02]	2,16 [1,16; 2,78]
ХГР, (n=20)	7,06 [5,48; 8,07] $p < 0,0001$	3,39 [2,33; 4,01] $p < 0,001$	4,84 [3,89; 6,67] $p < 0,0001$
ХПР, (n=20)	5,95 [4,69; 7,01] $p < 0,0001$	2,65 [2,06; 3,76] $p < 0,001$	3,94 [3,32; 5,22] $p < 0,001$

Примітка. p - достовірність відмінностей порівняно з показниками контролю.

Хронічні риносинусити супроводжуються порушенням стану ферментних та неферментних антиоксидантних систем крові. За вказаної патології реєструється зменшення ЗАА крові (табл. 2) на 39,4 та 21,2% відповідно при гнійній та поліпозній формах, порівняно з таким показником в контрольній групі пацієнтів. Поряд з цим відмічається зниження рівня ендogenous антиоксиданту мелатоніну. Так, при ХПР та ХГР вміст мелатоніну в сироватці крові становить відповідно $14,5 \pm 1,97$ та $11,0 \pm 1,75$ пг/мл і є достовірно меншим в 2,3 та 3,0 рази ($p < 0,0001$), порівняно з контрольною групою (його рівень становить $33,0 \pm 1,35$ пг/мл).

Таблиця 2 - Загальна антиоксидантна активність крові у пацієнтів з хронічним риносинуситом (Ме [25%; 75%])

Групи	Загальна антиоксидантна активність, од/мл
Контрольна група (n=20)	0,33 [0,30; 0,41]
ХГР, (n=20)	0,20 [0,17; 0,25] $p < 0,01$
ХПР, (n=20)	0,26 [0,19; 0,29] $p < 0,05$

Примітка. p - достовірність відмінностей порівняно з показниками контролю.

Оцінка стану мембран еритроцитів та епітелію синоназального тракту методом флуоресцентних зондів.

Дослідження стану мембран еритроцитів у пацієнтів з ХГР та ХПР показало (рис. 1), що за обох форм захворювання відмічаються однотипові зміни фосфоліпідного бішару. За цих умов не виявлено змін в області розташування зондів О1О і О6О. Поряд з цим спостерігалось зменшення кількості молекул зонду РН7, що зв'язались з мембраною еритроцита в ході інкубації, причому зміни в області локалізації зонда РН7 були більш вираженими при ХПР. Отже, зниження швидкості зв'язування найбільш ліпофільного (РН7) зонду може бути обумовлено збільшенням ступеня гідратації найбільш полярної області мембрани: області

полярних голівок фосфоліпідів та області ацильних залишків.

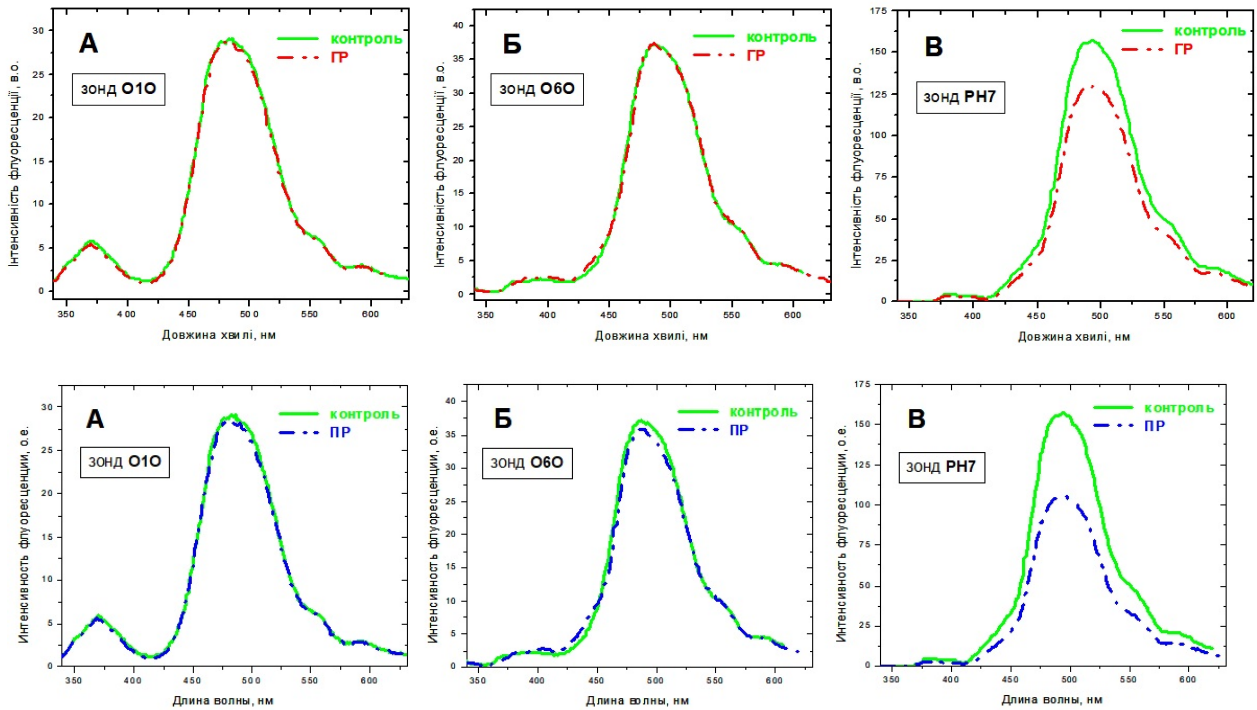
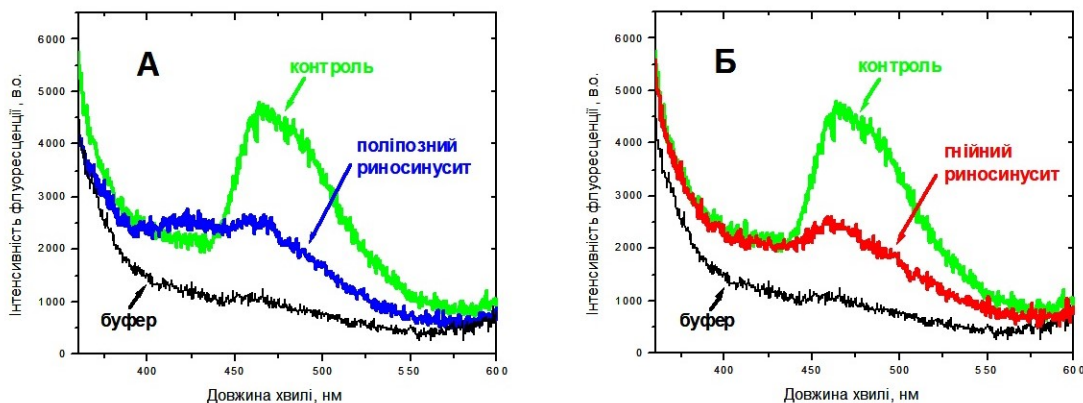


Рисунок 1 - Спектри флуоресценції зондів О1О (А), О6О (Б) і РН7 (В) у суспензіях еритроцитів: а) контрольна група (суцільна зелена лінія); б) пацієнти з ХГР (червона пунктирна лінія); в) пацієнти з ХПР (синя пунктирна лінія).

Дослідження стану мембран епітелію синоназального тракту показало, що при обох формах ХРС відмічаються зміни спектра флуоресценції зонда О1О, порівняно з відповідним спектром у контрольній групі (рис. 2). За цих умов реєструється зменшення інтенсивності довгохвильової смуги флуоресценції зонда, що вказує на збільшення протонодонорної здатності та зменшення в'язкості оточення зонда в ліпідному шарі.



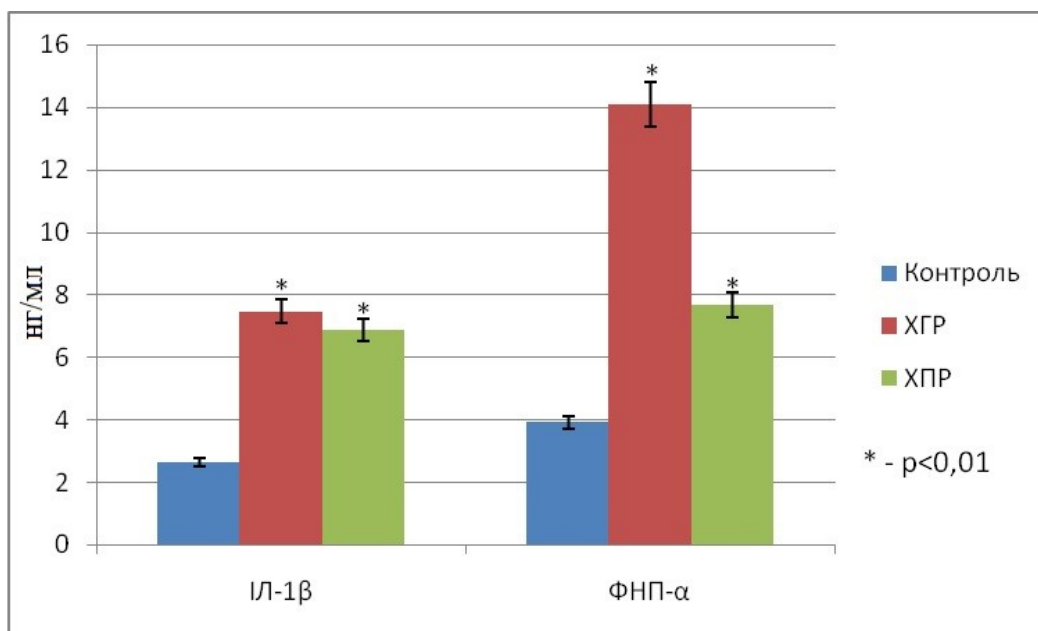
Примітка 1. Панель А – хронічний поліпозний риносинусит.

Примітка 2. Панель Б – хронічний гнійний риносинусит.

Рисунок 2 - Спектри флуоресценції зонда О1О у суспензіях, що містять клітини епітелію слизової оболонки носа хворих з ХПР, ХГР, контрольної групи та в буферному розчині.

Отримані дані свідчать про те, що при ХРС відбувається збільшення гідратованості мембрани епітеліальних клітин слизової оболонки носа в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, карбонільних груп фосфоліпідів та жирнокислотних ланцюжків фосфоліпідів, які є прилеглими до області карбонільних груп.

Вивчення спектру цитокінів та хемокінів сироватки крові при хронічному риносинуситі. Встановлено, що у сироватці крові хворих на ХГР і ХПР відмічається зростання вмісту ФНП- α (в 3,6 та 1,9 рази відповідно, $p < 0,001$) та ІЛ-1 β (в 2,8 та 2,6 рази відповідно $p < 0,001$). Так, рівень ФНП- α у сироватці крові хворих з ХГР становив 14,1 [8,93; 18,32] нг/мл, у пацієнтів з ХПР - 7,68 [5,93; 8,84] нг/мл, проти 3,92 [1,19; 6,89] нг/мл у контрольній групі. В той же час сироваткова концентрація ІЛ-1 β у пацієнтів з ХГР становила 7,46 [2,83; 13,72] нг/мл, у хворих з ХПР - 6,87 [4,35; 11,77] нг/мл, проти 2,64 [0,84; 5,43] нг/мл у контрольній групі. Підвищення вмісту ФНП- α та ІЛ-1 β у сироватці крові пацієнтів з ХРС може бути наслідком індукції їх експресії під впливом активних форм кисню.



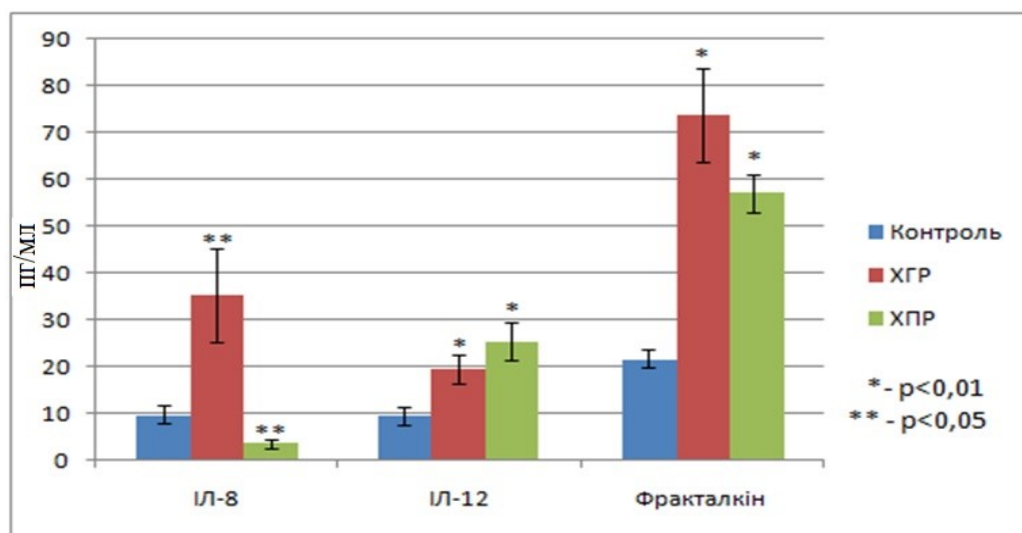
Примітка. * - $p < 0,01$ відносно контролю.

Рисунок 3 - Рівень ІЛ-1 β та ФНП- α у сироватці крові хворих з ХГР, ХПР та групі контролю.

Дослідження вмісту ІЛ-8 у сироватці крові показало (рис. 4), що у хворих з ХГР достовірно ($p < 0,05$) підвищувався рівень цього цитокіну в 3,6 рази у порівнянні з контрольною групою і становив $35,3 \pm 6,7$ пг/мл (проти $9,77 \pm 1,32$ пг/мл у контрольній групі). В той же час, у хворих на ХПР спостерігалось статистично достовірне ($p < 0,05$) зниження даного показника у 2,65 рази, рівень ІЛ-8 у сироватці крові становив $3,68 \pm 0,40$ пг/мл.

Аналіз вмісту ІЛ-12 у сироватці крові встановив (рис. 4), що у пацієнтів з ХПР відмічається підвищення рівня цього цитокіну в 2,6 рази ($p < 0,001$), а у пацієнтів з ХГР в стадії загострення цей показник перевищував контрольний в 2,3 рази

($p < 0,001$). Поряд з цим за гнійної та поліпозної форми ХРС реєструється зростання вмісту фракталкіну у сироватці крові відповідно в 3,4 та 2,6 рази ($p < 0,001$), порівняно з контролем. Так, у пацієнтів з ХГР рівень сироваткового фракталкіну становив $73,7 \pm 10,29$ пг/мл, у хворих на ХПР - $57,3 \pm 4,56$ пг/мл, проти $21,7 \pm 0,54$ пг/мл в контролі.



Примітка 1. * - $p < 0,01$ відносно контролю.

Примітка 2. ** $p < 0,05$ відносно контролю.

Рисунок 4 - Вміст ІЛ-8, ІЛ-12, фракталкіну у сироватці крові хворих з ХГР, ХПР та групі контролю.

Під час аналізу вмісту протизапальних цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-10 встановлено, що ХГР у стадії загострення та ХПР не супроводжується достовірними ($p > 0,05$) змінами даних цитокінів в крові.

Вміст про- та антифібротичних біохімічних маркерів у сироватці крові хворих на хронічний риносинусит. Визначення рівнів МСР-1 у сироватці крові пацієнтів показало (табл. 3), що обидві форми захворювання супроводжуються статистично значущим ($p < 0,001$) підвищенням його вмісту у порівнянні з контролем, що вказує на активацію фібротичних процесів. Так, при розвитку поліпозної форми захворювання рівень МСР-1 у сироватці крові зростав в 6,9 рази, тоді як при гнійній формі захворювання даний показник підвищувався в 8,8 рази, порівняно з показником контрольної групи.

Таблиця 3

Вміст МСР-1 та ММП-9 у сироватці крові хворих з хронічним риносинуситом та групі контролю ($M \pm m$, $n=60$)

Показники, одиниці вимірювання	Контрольна група	ХГР	ХПР
	n=20	n=20	n=20
МСР-1, пг/мл	$50,7 \pm 0,74$	$445 \pm 64,3^{**}$	$351 \pm 41,0^{**}$
ММП-9, нг/мл	$3,28 \pm 0,47$	$7,72 \pm 0,40^{**}$	$4,81 \pm 0,19^*$

Примітка 1. * - $p < 0,05$ відносно контролю.

Примітка 2. ** $p < 0,01$ відносно контролю.

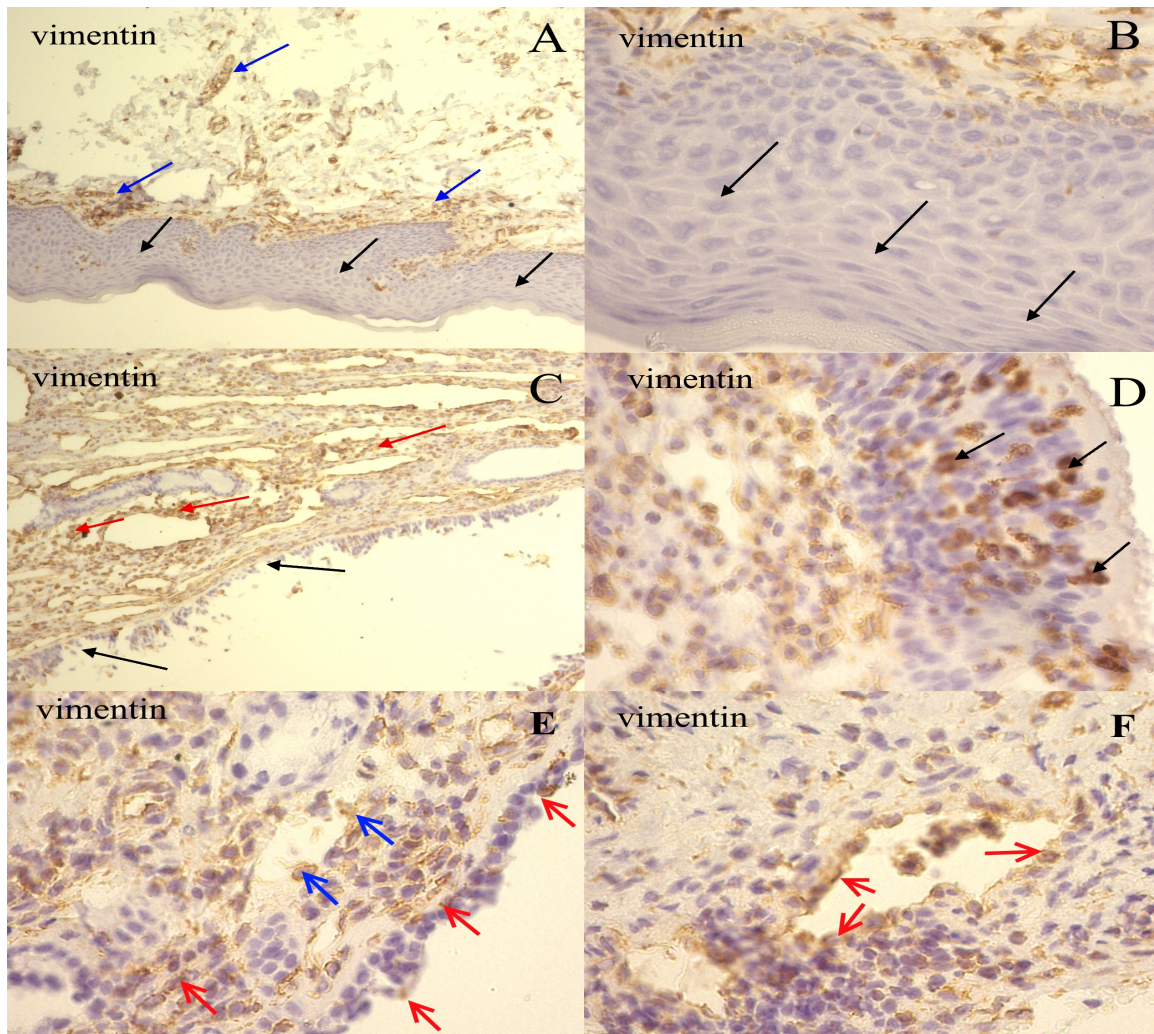
Дослідження рівня антифібротичного протеолітичного ферменту ММП-9 в сироватці крові хворих з ХРС показало (табл. 3), що за ХПР його вміст вірогідно зростав у 1,5 рази ($p < 0,05$), а при гнійній формі захворювання – у 2,4 рази ($p < 0,01$), порівняно з показником контрольної групи. Отримані дані свідчать про те, що ХРС супроводжуються активацією процесів деградації колагену позаклітинного матриксу.

З метою кількісної оцінки стану системи фіброзу/фібролізу при обох формах ХРС було розраховано співвідношення МСР-1/ММП-9. У хворих на ХГР відношення МСР-1/ММП-9 перевищувало показник контрольної групи в 3,7 рази і становило 57,6 (проти 15,5 в контролі). Натомість у пацієнтів з ХПР це співвідношення перевищувало контроль в 4,7 рази і становило 73,0. Беручи до уваги профібротичну роль МСР-1 і антифібротичну активність ММП-9, підвищення коефіцієнту МСР-1/ММП-9 за різних форм ХРС розглядалось як схильність сполучної тканини до проліферації та розвитку фіброзу.

Імунногістохімічна оцінка експресії віментину у пацієнтів з хронічним риносинуситом. При оцінці експресії маркеру ЕМП віментину у синоназальному тракті встановлено, що його експресія майже не спостерігається в назальних епітеліальних клітинах у пацієнтів групи контролю (рис. 5А, рис. 5В). Натомість, за різних форм ХРС реєструється зростання експресії білка віментину у носовому епітелії (рис. 5С, рис. 5D, рис. 5Е, рис. 5F).

Порівняльний аналіз експресії віментину у тканинах синоназального тракту за ХГР та ХПР виявив досить суттєві відмінності. Показано, що більш інтенсивна експресія білка віментину як у стромі, так у шарі назального епітелію спостерігається саме при поліпозній формі, порівняно з гнійною формою захворювання. Отримані дані свідчать про більш виразну активність процесу епітеліо-мезенхімального переходу у хворих з поліпозною формою ХРС, ніж за гнійної форми захворювання.

Дослідження видів клітинної смерті та стадій апоптозу лейкоцитів у хворих на хронічний риносинусит методом протокової цитометрії. Встановлено, що ХГР та ХПР характеризується підвищенням відповідно в 5,5 та 2,5 рази ($p < 0,0001$) кількості анексин V-позитивних 7-ААД-негативних ранньоапоптичних лейкоцитів крові, порівняно з показником контрольної групи (табл. 4; рис. 6). Поряд з цим за ХГР відмічалось зростання в 2,3 рази ($p < 0,001$) кількості анексин V-позитивних 7-ААД-позитивних клітин, що свідчить про збільшення числа пізньоапоптичних/некротичних лейкоцитів у цієї групи пацієнтів (табл. 4; рис. 6). Натомість за ХПР не спостерігалось статистично достовірних змін кількості анексин V-позитивних 7-ААД-позитивних клітин у порівнянні з контролем. Таким чином, поліпозна форма хронічного риносинуситу характеризується менш вираженою активацією апоптозу лейкоцитів у порівнянні з ХГР.



Примітка 1. А - слизова оболонка سینونазального тракту особи контрольної групи. Експресія віментину практично не спостерігається в епітелії (позначено чорними стрілками). Декілька віментин-позитивних клітин добре видно у власній пластинці (позначені синіми стрілками).

Примітка 2. В - слизова оболонка سینоназального тракту представника контрольної групи. У клітинах назального епітелію відсутні ознаки експресії віментину. Віментин-негативні назальні епітеліальні клітини позначені чорними стрілками.

Примітка 3. С - слизова оболонка سینоназального тракту пацієнта з ХПР. Відзначається атрофія носового епітелію (позначена чорними стрілками). Надмірна експресія віментину у власній пластинці (позначена червоними стрілками).

Примітка 4. D - слизова оболонка سینоназального тракту пацієнта з ХПР. Експресія віментину спостерігається в клітинах епітеліального шару, що вказує на епітеліо-мезенхімальний перехід (позначений чорними стрілками).

Примітка 5. E - Слизова оболонка سینоназального тракту пацієнта з ХГР. Клітини, що експресують віментин, виявляються в атрофічному епітеліальному шарі (позначені червоними стрілками).

Примітка 6. F - фрагмент слизової оболонки سینоназального тракту хворого на ХГР. Зовнішній шар судинної стінки (марковано червоними стрілками) багатий на періцити, що експресують віментин.

Рисунок 5 - Імуногістохімічна реакція на віментин в слизовій оболонці سینоназального тракту у пацієнтів контрольної групи, осіб з ХПР та ХГР.

Таблиця 4 - Стадії клітинної смерті лейкоцитів периферійної крові при ХРС (Ме [25-ий перцентиль; 75-ий перцентиль])

Групи	Анексин V ⁻ , 7-AAD ⁻ , %	Анексин V ⁺ , 7-AAD ⁻ , %	Анексин V ⁺ , 7-AAD ⁺ , %	Анексин V ⁻ , 7-AAD ⁺ , %
Контрольна група (n=10)	95,93 [95,13; 96,89]	2,06 [1,65; 2,78]	1,00 [0,65; 1,42]	0,89 [0,72; 1,08]
ХГР (n=12)	85,24 [82,53; 86,85] p<0,0001	11,40 [9,89; 14,02] p<0,0001	2,34 [2,07; 3,08] p<0,001	0,86 [0,75; 1,11] p>0,05
ХПР (n=11)	93,47 [92,45; 93,90] p<0,001	4,91 [4,58; 5,67] p<0,0001	0,83 [0,69; 0,91] p>0,05	0,65 [0,39; 0,70] p>0,05

Примітка. p - достовірність відмінностей порівняно з показниками контролю.

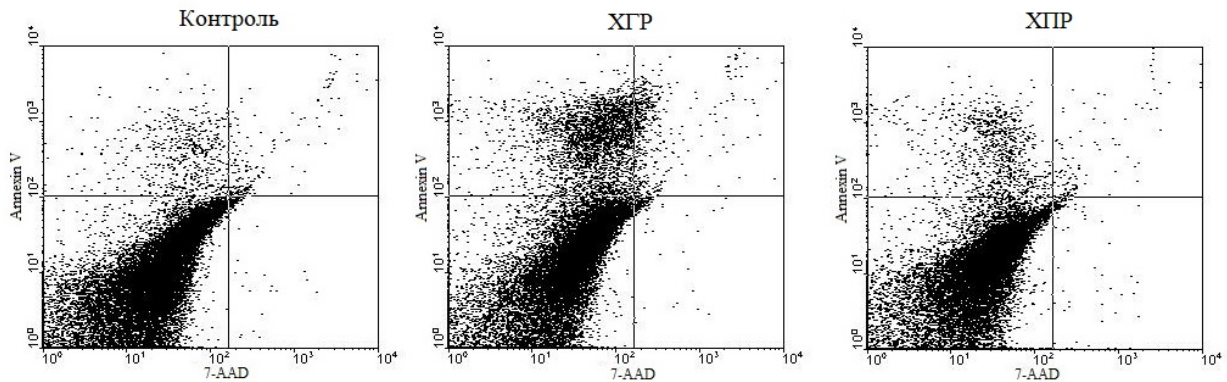


Рисунок 6 - Типова цитограма з візуалізацією ранньоапоптичних, пізноапоптичних/некротичних та мертвих некротичних лейкоцитів периферичної крові у хворого на ХГР та ХПР і представника контрольної групи.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення наукового завдання: на основі встановлення біохімічних механізмів розвитку хронічного риносинуситу, а саме ролі оксидативного стресу, фіброзу, імунозапальних порушень, апоптозу та некрозу лейкоцитів в пошкодженні тканин синопазального тракту, ідентифіковані нові маркери для оцінки перебігу захворювання.

1. У хворих на хронічний поліпозний та гнійний риносинусит реєструється розвиток оксидативного стресу: в сироватці крові зростає вміст 8-ізопростану (в 1,8 та 2,2 рази відповідно, p<0,001), ТБК-активних продуктів (в 1,6 та 1,9 рази відповідно, p<0,0001), ДК (в 1,65 та 2,1 рази відповідно, p<0,001) на тлі зниження загальної антиоксидантної активності крові (на 21,2 та 39,4% відповідно, p<0,05) та рівня мелатоніну (в 2,3 та 3,0 рази відповідно, p<0,001), порівняно з контролем.

2. За поліпозної та гнійної форми хронічного риносинуситу спостерігається порушення стану цитоплазматичних мембран клітин – зростає гідратація мембрани епітелію слизової оболонки носа в області гліцеринових

залишків фосфоліпідів, карбонільних груп та жирнокислотних ланцюжків фосфоліпідів (доказом є зміни спектру флуоресценції зонда 010) та мембрани еритроцитів в області ацильних залишків фосфоліпідів (доказом є зменшення зв'язування зонда RH7).

3. Хронічний риносинусит супроводжується розвитком імунозапальних порушень: за умов гнійної та поліпозної форми захворювання в сироватці крові зростає вміст прозапальних цитокінів ФНП- α (в 3,6 та 1,9 рази відповідно, $p < 0,001$), ІЛ-1 β (в 2,8 та 2,6 рази відповідно $p < 0,001$), ІЛ-12 (в 2,3 та 2,6 рази, $p < 0,001$), фракталкіну (в 3,4 та 2,6 рази відповідно, $p < 0,001$), порівняно з контролем. Поряд з цим у хворих на ХГР зростає сироватковий вміст ІЛ-8 в 3,6 рази, $p < 0,05$, а у хворих на ХПР його рівень зменшується у 2,7 рази ($p < 0,05$), порівняно з контрольною групою.

4. В патогенезі хронічних риносинуситів важливу роль відіграє дисбаланс між про- та антифібротичними чинниками: при ХГР та ХПР в сироватці крові зростає вміст МСР-1 (в 8,8 та 6,9 рази відповідно, $p < 0,001$), ММП-9 (в 2,4 та 1,5 рази відповідно, $p < 0,05$) та співвідношення МСР-1/ММП-9 (в 3,7 та 4,7 рази відповідно, $p < 0,001$).

5. У хворих на хронічний риносинусит зростає експресія віментину в тканинах синоназального тракту та активується епітеліально-мезенхімальний перехід. За ХПР експресія віментину є більш виразною у стромі та епітеліальних клітинах, порівняно з такою при ХГР.

6. При хронічному риносинуситі активується апоптоз лейкоцитів, що підтверджується підвищенням кількості ранньоапоптотичних лейкоцитів крові (при ХПР в 2,3 рази, $p < 0,0001$; при ХГР в 5,5 рази, $p < 0,0001$) та пізньоапоптотичних/некротичних клітин (при ХГР у 2,3 рази, $p < 0,001$), порівняно з контрольною групою.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Наконечная О. А., **Онищенко А. И.**, Горбач Т. В., Ткаченко А. С., Чубукова Т. Н. Содержание некоторых хемокинов в сыворотке крови пациентов с обострением хронического гнойного риносинусита // Проблемы здоровья и экологии. 2017. №2(52). С. 30–33. *(Особистий внесок – проаналізував літературу, провів визначення хемокінів в сироватці крові (ІЛ-8, фракталкін), брав участь в аналізі і узагальненні одержаних результатів, статистично опрацював, підготував до друку).*

2. **Onischenko A. I.**, Nakonechna O. A., Tkachenko A. S., Kalashnik Yu. M. The content of MCP-1 and MMP-9 in blood serum of patients with chronic polypoid rhinosinusitis // The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University Series «MEDICINE». 2017. №33. P. 23–26. *(Особистий внесок – проаналізував літературу, провів визначення МСР-1, ММП-9, брав участь в аналізі та узагальненні одержаних результатів, статистично опрацював, підготував публікацію до друку).*

3. **Онищенко А. И.**, Наконечная О. А., Ткаченко А. С. Изменения содержания мелатонина и ИЛ-12 в сыворотке крови больных хроническим полипозным риносинуситом // Буковинський медичний вісник. 2017. Т.21, №2. С.

75–77. *(Особистий внесок – проаналізував літературу, провів визначення ІЛ-12 та мелатоніну, брав участь в аналізі та узагальненні одержаних результатів, статистично опрацював, підготував публікацію до друку).*

4. **Онищенко А. И.,** Наконечная О. А., Ткаченко А. С. Информативность определения содержания сывороточного моноцитарного хемоатрактантного белка-1 (MCP-1) при хроническом гнойном риносинусите // Вестник КазНМУ. 2017. №4. С. 134–136. *(Особистий внесок – проаналізував літературу, провів визначення MCP-1, брав участь в аналізі та узагальненні одержаних результатів, статистично опрацював, підготував публікацію до друку).*

5. **Онищенко А. И.** Диагностичне значення вмісту інтерлейкіну-12 у крові хворих на хронічний поліпозний риносинусит // Український журнал медицини, біології та спорту. 2017. № 4(6). С. 98–101.

6. **Онищенко А. И.,** Наконечная О. А., Ткаченко А. С., Корниенко Е. М., Горбач Т. В., Бондаренко В. А., Посохов Е. А., Дорошенко А. О. Исследование мембран эритроцитов при хроническом полипозном риносинусите методом флуоресцентных зондов // Український журнал медицини, біології та спорту. 2018. Т 3, № 1(10). С. 169–173. *(Особистий внесок – проаналізував літературу, брав участь у визначенні рівня флуоресценції зондів, аналізі одержаних результатів, статистичному опрацюванні та підготовці публікації до друку).*

7. **Онищенко А. И.,** Наконечная О. А., Ткаченко А. С., Корниенко Е. М., Ткачова Т. М., Єфімова С. Л., Рищенко І. М., Циганков О. В., Посохов Є. О. Дослідження цитоплазматичних мембран клітин епітелію слизової оболонки носа у хворих на хронічний гнійний риносинусит методом флуоресцентних зондів // Український журнал медицини, біології та спорту. 2017. Т 3, № 7(16). С. 135–139. *(Особистий внесок – проаналізував літературу, брав участь у визначенні рівня флуоресценції зондів, аналізі одержаних результатів, статистичному опрацюванні та підготовці публікації до друку).*

8. **Онищенко А. И.,** Наконечная О. А., Ткаченко А. С., Калашник Ю. М., Корниенко Е. М., Стеценко С. О., Посохов Є. О., Дорошенко А. О. Дослідження еритроцитів при хронічному гнійному риносинуситі у стадії загострення методом флуоресцентних зондів // Буковинський медичний вісник. 2018. Т. 22, № 1(85). С. 79–85. *(Особистий внесок – проаналізував літературу, брав участь у визначенні рівня флуоресценції зондів, аналізі одержаних результатів, статистичному опрацюванні та підготовці публікації до друку).*

9. **Онищенко А. И.** Окислительный стресс и матриксная металлопротеиназа-9 при обострении хронического гнойного риносинусита // Український журнал медицини, біології та спорту. 2018. Т. 3, № 6(15). С. 129–133.

10. **Onishchenko A. I.,** Lupyr A. V., Tkachenko A. S., Gorbach T. V., Nakonechna O. A., Gubina-Vakulyck G. I. Epithelial-to-mesenchymal transition and some parameters of extracellular matrix remodeling in chronic rhinosinusitis with nasal polyps // HVM Bioflux. 2018. Vol. 10. №3. P. 128–132. *(Особистий внесок – проаналізував літературу, провів визначення MCP-1 MMP-9, брав участь у проведенні морфологічного дослідження, аналізі результатів, статистичному опрацюванні, підготував публікацію до друку).*

11. Наконечная О. А., **Онищенко А. И.** Содержание интерлейкина-8 и матриксной металлопротеиназы-9 в крови больных с обострением хронического гнойного и полипозного риносинюита // Актуальные проблемы медицины : сборник научных статей Республиканской научно-практ. конф. и 26-й итоговой научной сессии Гомельского государственного медицинского университета, 3–4 ноября 2016 г., Гомель. 2016. С. 536–539. (*Особистий внесок – провів визначення ІЛ-8, ММР-9, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез*).

12. Набатян К. А., **Оніщенко А. І.**, Нечипорук І. А., Ткаченко А. С. Вміст фракталкіна в сироватці крові хворих з загостренням хронічного гнійного риносинюїта // Хист. 2017. Вип. 19. С. 55. (*Особистий внесок – провів визначення фракталкіна, статистичний аналіз, написання тез*).

13. **Оніщенко А. І.** Активність матриксної металопротеїнази-9 у хворих з загостренням хронічного гнійного риносинюїта // Актуальні проблеми клінічної та фундаментальної медицини: збірник наук.-практ. конф., 14 квітня 2017 р., Харків. 2017. С. 154–155.

14. **Онищенко А. И.** Содержание фракталіна и ІЛ-8 у больных хроническим гнойным риносинюитом // Актуальні проблеми сучасної хімії: Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих науковців, 20–22 квітня 2017р., Миколаїв. 2017. С. 54–55.

15. **Онищенко А. И.** Содержание матриксной металлопротеиназы-9 у больных хроническим полипозным риносинюитом // Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини: тези доповідей наук.-практ. конф. з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю з дня народження І. Г. Герцена, 27–28 квітня 2017р., Одеса. 2017. С. 36.

16. **Онищенко А. И.**, Калашник Ю. М. Содержание интелейкина-12 в сыворотке крови больных хроническим полипозным риносинюитом // Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии: сборник материалов III Конференции молодых ученых биохимиков и молекулярных биологов с международным участием, 11–12 мая 2017 г., Гродно. 2017. С. 95–96. (*Особистий внесок – провів визначення ІЛ-12, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез*).

17. **Оніщенко А. І.**, Набатян К. А., Нечипорук І. А. Зміни сироваткової ММР-9 у хворих на хронічний поліпозний риносинюїт // Актуальні проблеми експериментальної і клінічної біохімії : мат. VI Міжвузівської навчально-практ. конф. з міжнародною участю, 22 травня 2017р., Харків. 2017. С. 17–18. (*Особистий внесок – провів визначення ММР-9, статистичний аналіз, написання тез*).

18. **Оніщенко А. І.**, Ткаченко А. С. Визначення факторів, що впливають на диференціювання незрілих CD4+ клітин у хворих на хронічний поліпозний риносинюїт // Здобутки клінічної та експериментальної медицини: Підсумкова LX наук.-практ. конф., 17 червня 2017р., Тернопіль. 2017. С. 204–205. (*Особистий внесок – провів визначення ІЛ-12, мелатоніну, статистичний аналіз, написання тез*).

19. **Onishchenko A.** Diagnostic significance of serum interleukin-12 determination in patients with exacerbation of chronic purulent rhinosinusitis // 8th Lviv-

Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, 18–20 september 2017. Lublin. 2017. P. 68.

20. Наконечна О. А., **Онiщенко А. І.**, Ткаченко А. С. Дiагностичне значення iнтерлейкiну-12 при загостреннi хронiчного гнiйного риносинуйту // Актуальнi проблеми сучасної бiохiмiї та клiнiчної бiологiї : мат. IV Мiжнародної наук. конф., 5–6 жовтня 2017 р., Днiпро. 2017. С. 60–61. *(Особистий внесок – провiв визначення бiохiмiчних показникiв (ІІ-12), брав участь у статистичному аналізі та узагальненнi матерiалу, написаннi тез).*

21. **Онiщенко А. І.** Содержание СХЗСL1 в сыворотке крови больных с хроническим полипозным риносинуситом // Актуальнi питання клiнiчної медицини : матерiали XI Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених, 27 жовтня 2017р., Запорiжжя. 2017. С. 50–51.

22. **Онiщенко А. І.** Использование моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) в качестве диагностического маркера хронического полипозного риносинуйта // Актуальные проблемы медицины : сборник научных статей Республиканской научно-практ. конф. и 27-й итоговой научной сессии Гомельского государственного медицинского университета, 2–3 ноября 2017г., Гомель. 2018. С. 582–583.

23. **Онiщенко А. І.**, Посохов Є. О., Ткаченко А. С., Корнiєнко Є. М. Оцiнка стану лiпiдного бiшару мембран еритроцитiв при хронiчному полiпозному риносинуситi: дослiдження за допомогою флуоресцентного зонда RH7 // Медицина третього тисячолiття: збiрник тез мiжвузiвської конф. молодих вчених та студентiв, 22–24 сiчня 2018 р., Харкiв. 2018. С. 51. *(Особистий внесок – брав участь у визначеннi рiвня флуоресценцiї зондiв, статистичному аналізі та узагальненнi матерiалу, написаннi тез).*

24. **Онiщенко А. І.**, Ткаченко А. С., Моїсеєнко Л. В., Іншина Є. О. Вмiст 8-iзопростану у сироватцi кровi при хронiчному гнiйному риносинуситi // Актуальнi проблеми сучасної хiмiї: Матерiали II Всеукраїнської наук.-практ. конф. студентiв, аспiрантiв та молодих науковцiв, 24–25 травня 2018р., Миколаiв. 2018. С. 75–76. *(Особистий внесок – провiв визначення 8-iзопростану, статистичний аналіз, написання тез).*

25. **Онiщенко А. І.** Оцiнка вiдсотка ранньоапоптотичних, пiзньоапоптотичних / некротичних та мертвих некротичних лейкоцитiв у хворих на хронiчний полiпозний риносинуйт // Актуальнi питання лабораторної медицини: Матерiали наук.-практ. конф. за участю мiжнародних спецiалiстiв, 20–21 листопада 2018р., Харкiв. 2018. С. 67.

АНОТАЦІЯ

Онiщенко А. І. Роль профiбротичних, прозапальних та прооксидантних чинникiв в бiохiмiчних механiзмах розвитку хронiчних риносинуситiв. – На правах рукопису.

Дисертацiя на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спецiальнiстю 14.01.32 – медична бiохiмiя. – Вiнницький нацiональний медичний унiверситет iм. М.І. Пирогова МОЗ України, Вiнниця, 2019.

Дисертація присвячена дослідженню біохімічних механізмів розвитку хронічного поліпозного (ХПР) та хронічного гнійного риносинусита (ХГР) у стадії загострення, а також виявленню нових потенційних діагностичних маркерів риносинуситів.

Розвиток хронічного риносинуситу (ХРС) супроводжується оксидативним стресом, змінами цитокинового й хемокинового профілів сироватки крові та дисбалансом про- та антифібротичних факторів. За цих умов відмічається зростання вмісту продуктів ліпопероксидації на тлі зниження загальної антиоксидантної активності крові, збільшення концентрації прозапальних цитокінів та хемокинів, підвищення вмісту протеолітичного ферменту ММП-9 та коефіцієнту МСР-1/ММП-9, а також зростання експресії віментину в тканинах синопазального тракту.

За допомогою флуоресцентних зондів доведено, що ХГР та ХПР супроводжується порушеннями стану мембран клітин синопазального тракту та еритроцитів, а саме зростанням ступеня гідратації в області полярних голівок фосфоліпідного бішару та в області ацильних залишків фосфоліпідів.

Аналіз стадій клітинної смерті лейкоцитів периферичної крові показав відмінності активації апоптозу лейкоцитів за різних форм хронічного риносинуситу: при ХГР характерно 5-разове підвищення кількості ранньоапоптотичних та дворазове підвищення пізньоапоптотичних/ некротичних лейкоцитів, тоді як при ХПР зростає лише відсоток ранньоапоптотичних лейкоцитів, порівняно з контрольною групою.

Ключові слова: хронічний гнійний риносинусит, хронічний поліпозний риносинусит, віментин, цитокіни, флуоресцентні зонди, оксидативний стрес, апоптоз.

АННОТАЦІЯ

Онищенко А. И. Роль профибротических, провоспалительных и прооксидантных факторов в биохимических механизмах развития хронических риносинуситов. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.32 – медицинская биохимия. - Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2019.

Диссертация посвящена исследованию биохимических механизмов развития хронического полипозного (ХПР) и хронического гнойного риносинусита (ХГР) в стадии обострения, а также выявлению новых потенциальных диагностических маркеров риносинуситов.

Развитие хронического риносинусита (ХРС) сопровождается оксидативным стрессом, изменениями цитокинового и хемокинового профилей сыворотки крови и дисбалансом про- и антифибротических факторов. В этих условиях отмечается рост содержания продуктов перекисного окисления липидов на фоне снижения общей антиоксидантной активности крови, увеличение концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов, повышение содержания протеолитического фермента ММП-9 и коэффициента МСР-1 / ММП-9, а также

рост экспрессии виментина в тканях синоназального тракта.

С помощью флуоресцентных зондов доказано, что ХГР и ХПР сопровождается нарушениями состояния мембран клеток синоназального тракта и эритроцитов, а именно ростом степени гидратации в области полярных головок фосфолипидного бислоя и в области ацильных остатков фосфолипидов.

Анализ стадий клеточной смерти лейкоцитов периферической крови показал различия активации апоптоза лейкоцитов при различных формах хронического синусита: для ХГР характерно 5-кратное увеличение количества раннеапоптотических и двукратное повышение позднеапоптотических / некротических лейкоцитов, тогда как при ХПР повышался только процент раннеапоптотических лейкоцитов по сравнению с контрольной группой

Ключевые слова: хронический гнойный риносинусит, хронический полипозный риносинусит, виментин, цитокины, флуоресцентные зонды, оксидативный стресс, апоптоз.

SUMMARY

Onishchenko A. I. The role of profibrotic, proinflammatory and prooxidant factors in the biochemical mechanisms of chronic rhinosinusitis development. – Manuscript.

Thesis for a scientific degree of the candidate of medical sciences in speciality 14.01.32 “Medical biochemistry”. – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ministry of Public Health of Ukraine, Vinnytsya, 2019.

In this study, it was shown that the development of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps (CRSwNP and CRSsNP) is accompanied by an increase in the content of 8-isoprostan in serum (1.8 and 2.2 times, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively), TBA-reactive substances (1.6-fold and 1.9-fold, $p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively), as well as conjugated dienes (1.65-fold and 2.1-fold, $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively), against the background reduced blood total antioxidant activity by 21.2% and 39.4%, respectively ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) compared with control subjects, indicating the development of oxidative stress, which is more pronounced in CRSsNP.

The method of fluorescent probes allowed finding for the first time that in both forms of chronic rhinosinusitis there are similar changes in the phospholipid bilayer of erythrocyte membranes. CRSsNP and CRSwNP were found to be associated with an increase in the degree of hydration of the most polar region of the erythrocyte cytoplasmic membrane, namely polar heads of phospholipids. It was shown that CRSsNP and CRSwNP were accompanied by an increase in hydration of the most polar region of the membrane of nasal epithelial cells: phospholipid polar heads.

In this study, it was demonstrated that the development of CRSsNP and CRSwNP is accompanied by changes in the serum cytokine and chemokine profiles. In patients with both forms of the disease, an increase in the content of proinflammatory cytokines TNF- α by 3.6 and 1.9 times, respectively ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$) was found. IL-1 β levels was 2.8 and 2.6 times elevated ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively), whereas IL-12 concentrations were twice and 2.6-fold higher ($p < 0.001$ and $p < 0.001$) in serum compared with controls. Serum chemokine IL-8 concentration increased 3.6-fold ($p <$

0.05) in exacerbation of CRSsNP and decreased 2.6-fold ($p < 0.05$) in CRSwNP compared with the control group. In both CRSsNP and CRSwNP, a higher serum content of fractalkine was observed (3.4-fold and 2.6-fold, $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively) and MCP-1 (almost 9 and 7 times, $p < 0.001$ and $p < 0.001$) compared with the control group. At the same time, no significant changes ($p > 0.05$) were found in the content of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 in blood serum compared with conventionally healthy individuals.

It was found that the imbalance between pro-fibrotic and anti-fibrotic factors in favor of the former is characteristic of both CRSsNP and CRSwNP. Both forms are characterized by an increase in the content of the proteolytic enzyme MMP-9 in serum (2.35-fold and 1.5-fold, $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) and an increase in the MCP-1 / MMP-9 ratio in 3.7 and 4.7 times, respectively. A comparative analysis of vimentin expression in synonasal tissues of patients with CRSsNP in the stage of exacerbation and CRSwNP showed that a stronger vimentin expression in both the stroma and nasal epithelium is observed in patients with nasal polyps. Vimentin overexpression in nasal epithelial cells indicates the activation of the epithelial-to-mesenchymal transition, which plays an important role in the pathogenesis of the disease.

Analysis of leukocyte cell death modes by flow cytometry showed that the exacerbation of CRSsNP is characterized by a 5.5-fold increase in the number of early apoptotic blood leukocytes compared with the control group ($p < 0.0001$) and twice as high percentage of late apoptotic / necrotic cells ($p < 0.001$) as in the controls. In patients with CRSwNP, the percentage of early apoptotic leukocytes is almost 2.5-fold higher in comparison with the control group ($p < 0.0001$), indicating the activation of leukocyte apoptosis in both forms of chronic rhinosinusitis.

Key words: chronic rhinosinusitis without nasal polyps, chronic rhinosinusitis with nasal polyps, vimentin, cytokines, fluorescent probes, oxidative stress, apoptosis.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДК	– дієнові кон'югати
ЕМП	– епітеліально-мезенхімальний перехід
ІЛ	– інтерлейкін
ЗАА	– загальна антиоксидантна активність
ПОЛ	– перекисне окислення ліпідів
ТБК	– тіобарбітурова кислота
ФНП	– фактор некрозу пухлин
ХГР	– хронічний гнійний риносинусит
ХПР	– хронічний поліпозний риносинусит
ХРС	– хронічний риносинусит
МСР-1	– моноцитарний хемоатрактантний протеїн-1
ММП-9	– матриксна металопротеїназа-9
CRSwNP	– хронічний поліпозний риносинусит
CRSsNP	– хронічний гнійний риносинусит

Підписано до друку 08.04.2019 р. Замовл. № 134.
Формат 60x90 1/16 ум. друк. арк. 0,8 друк офсетний.
Наклад 100 примірників.

Вінниця. Друкарня ВНМУ імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56.

