

Арефех Амірі асп., Т. Берегова, д-р біол. наук,
Н. Нікітіна асп., Л. Степанова, канд. біол. наук,
ННЦ "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ НА РАНОЗАГОЮЮЧИЙ ПРОЦЕС У ЩУРІВ

Досліджено вплив нанокристалічного діоксиду церію (*Nanoceria*) на процес загоєння площинної рани у щурів. Швидко й ефективно загоєння ран вимагає скоординованої клітинної реакції, залучення фібробластів, кератиноцитів та ендотеліальних клітин судин (VECs), що стало основною причиною використання *Nanoceria* завдяки його багаторазовим вражаючим функціям (протизапальній, антиоксидантній, захист шкіри та клітин від ультрафіолетових променів – світло, онкотерапія тощо). Тваринам дослідної групи, починаючи з наступного дня після моделювання площинної рани, кожного дня впродовж усіх термінів спостереження наносили на раневу поверхню 0,05 % CeO_2 (розчинений у 0,5 % карбополі) за допомогою металевого шпателя. Унікальною особливістю цих нанокристалів є те, що їх можна застосовувати кілька разів: протягом декількох тижнів збагачені церієм частки повільно повертаються до вихідного стану церію. Майже в усіх випадках частинки залишаються колоїдно стабільними (напру, не агреговані) і можуть застосовуватися декілька разів. Дослідження *in vivo* показують, що наночастинки *Nanoceria* для тканини щурів є непатогенними. Вагається, що наночастинки діоксиду церію добре поглинаються шкірою. Дослідження показали, що після 2 тижнів рани, оброблені нанокристалічним діоксидом церію, досягли значного загоєння приблизно до 100 %. Наші результати показали, що використання нанокристалічного діоксиду церію в лікуванні ран є успішним і перспективним для подальшого дослідження, оскільки прискорює повне загоєння рани та зменшує її ділянку порівняно з необробленими ділянками шкіри тварин.

Ключові слова: нанокристалічний діоксид церію, площинна рана.

Арефех Амири асп., Т. Береговая, д-р биол. наук,
Н. Никитина асп., Л. Степанова, канд. биол. наук,
УНЦ "Институт биологии и медицины",
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ ПРОЦЕСС У КРЫС

В работе исследовано влияние нанокристаллического диоксида церия (*Nanoceria*) на процесс заживления плоскостной раны у крыс. Быстрое и эффективное заживление ран требует скоординированной клеточной реакции, привлечения фибробластов, кератиноцитов и эндотелиальных клеток сосудов (VECs), что стало основной причиной использования *Nanoceria* благодаря его многократным впечатляющим функциям (противовоспалительная, антиоксидантная, защита кожи и клеток от ультрафиолетовых лучей – свет, онкотерапия т. д.). Животным опытной группы, начиная со следующего дня после моделирования раны, каждый день на протяжении всех сроков наблюдения наносили на раневую поверхность 0,05 % CeO_2 (растворенный в 0,5 % карбополе) с помощью металлического шпателя. Уникальной особенностью этих нанокристаллов является то, что их можно применять несколько раз: в течение нескольких недель обогащенные церием частички медленно возвращаются к исходному состоянию церия. Почти во всех случаях частички остаются колоидно стабильными (напр., не агрегированные) и могут применяться несколько раз. Исследования *in vivo* показывают, что наночастицы *Nanoceria* для ткани крыс является непатогенными. Считается, что наночастицы диоксида церия хорошо поглощаются кожей. Исследования показали, что после 2 недель раны, обработанные нанокристаллическим диоксидом церия, достигли значительного закрытия примерно до 100 %. Наши результаты показали, что использование нанокристаллического диоксида церия в лечении ран является успешным и перспективным для дальнейшего исследования, поскольку ускоряет полное заживление раны и уменьшает ее участок по сравнению с необработанными участками кожи животных.

Ключевые слова: нанокристаллический диоксид церия, плоскостная рана.

УДК: 577.27; 618.14-006.363.03- 07:612.017.1

М. Макаренко, д-р мед. наук, Р. Ворона, асист.,
І. Сокол, асист., В. Берестовий, асист., Д. Говсєєв, канд. мед. наук,
Інститут післядипломної освіти
Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Київ,
А. Погрібна, канд. біол. наук, О. Корнелюк, д-р біол. наук, М. Гром, мол. наук, співроб.,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНІВ АВТОАНТИТІЛ КЛАСІВ IGG ТА IGM ДО БАКТЕРІАЛЬНОГО АНАЛОГА HSP60, ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ ТА ЇЇ ОКРЕМИХ ДОМЕНІВ У ЖІНОК ІЗ ФІБРОМІОМОЮ МАТКИ

Фіброміома (лейоміома, міома) – доброякісне новоутворення міометрія, що вражає більшість жінок репродуктивного віку, але при цьому механізми його розвитку досліджені недостатньо. Тирозил-тРНК синтетаза та Hsp60 – білки домашнього господарства, які можуть бути у різний спосіб залучені до патогенезу ряду захворювань. Мета роботи – визначити рівні автоантитіл до Hsp60, тирозил-тРНК синтетази (TyrPC) та її окремих доменів (міні-TyrPC та С-кінцевого домену) у сироватці крові жінок із фіброміомою. Матеріали і методи: рівні автоантитіл класів IgM та IgG до білків Hsp60, TyrPC, міні-TyrPC і С-кінцевого домену у сироватках 5 здорових донорів та 25 жінок із фіброміомою до початку лікування, що визначалось методом твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА). Специфічність реакції IgG автоантитіл проти білків Hsp60 та міні-TyrPC перевірено за допомогою вестерн-блот тесту. Статистичний аналіз даних здійснено за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 10.0. (StatSoft, США). Непараметричні дані порівнювались у тесті Манна-Уїтні (Mann-Whitney U-test). Результати: не часта поява підвищених рівнів автоантитіл класу IgM до усіх 4 білків як у контрольній, так і дослідній групі без будь-якої закономірності. У групі здорових донорів крові не виявлено особин з підвищеними рівнями автоантитіл IgG до жодного з досліджуваних білків. Серед жінок із фіброміомою були серопозитивні до міні-TyrPC 19 із 25 (76 %), до Hsp60 – 18 із 25 (72 %). При цьому 17 зразків дослідної групи (68 %) були позитивні до обох антигенів порівняно зі здоровими донорами. Рівень автоантитіл до міні-TyrPC у жінок із фіброміомою був вищим від рівня здорових донорів у 1,7 раза, для Hsp60 такий показник становив 2,1 раза. Підвищення рівнів автоантитіл проти кожного з 2 білків було статистично значимим зі ступенем достовірності $p < 0,01$. Результати вестерн-блот аналізу підтвердили дані ІФА для Hsp60, але не для міні-TyrPC. Висновок: Високі рівні автоантитіл до міні-TyrPC та Hsp60 у жінок із фіброміомою вказують на дані білки як на перспективних учасників комплексної маркерної панелі моніторингу захворювання.

Ключові слова: Hsp60, TyrPC, фіброміома, автоантитіла.

Вступ. Фіброміома (лейоміома, міома) – доброякісне новоутворення міометрія, що за різними статистичними даними вражає 60–70 % жінок репродуктивного

віку [5]. Незважаючи на високу частоту виявлення новоутворення, молекулярні чинники виникнення та розвитку міоми вивчені недостатньо [5]. Протягом остан-

ніх десятиліть було показано, що багато білків домашнього господарства, які у нормі забезпечують гомеостаз клітини, можуть виконувати й інші функції, зокрема при розвитку різних патологій [14]. Тирозил-тРНК синтетаза та Hsp60 внутрішньоклітинні білки домашнього господарства, які за умов стресу змінюють свою локалізацію, експонуються на поверхню клітини та/або у міжклітинний простір та можуть бути залучені до патогенезу різними способами – впливати на передачу клітинних сигналів, спричиняти автоімунні реакції, здійснювати проангіогенну дію.

Тирозил-тРНК синтетаза належить до аміноацил-тРНК синтетаз – групи консервативних ферментів, які відіграють ключову роль у біосинтезі білка, а також беруть участь у транскрипції, трансляції, сплайсингу, запальних реакціях, ангіогенезі, апоптозі. Повнорозмірний фермент неактивний у передачі клітинного сигналу, але за умов стресу фермент може бути екскретований у міжклітинний простір і розщеплений на два окремі білки, кожен з яких має власні цитокинові властивості [12]. Це пояснюється особливостями структури білка. Амінокислотні послідовності, що відповідають за цитокинові функції обох доменів у повнорозмірному білку просторово недоступні, натомість при розщепленні синтетазі вони експонуються. Зокрема, С-кінцевий домен синтетазі завдяки сигнальному гептапептиду є потужним хемоатрактантом для лейкоцитів і моноцитів, стимулює продукцію тканинного фактора, мієлопероксидазу та фактора некрозу пухлин α , а також спричиняє ангіогенний вплив різної спрямованості [12]. N-кінцевий домен (міні-ТирРС) містить амінокислотну послідовність Glu-Leu-Arg – ELR-мотив, подібний до такого у IL-8, що дозволяє стимулювати міграцію поліморфоядерних клітин і забезпечувати проангіогенні властивості ферменту [6, 12].

Hsp60 є шапероном, який у мітохондріях забезпечує правильне згортання білків, запобігає їх агрегації та денатурації, у цитоплазмі виконує антиапоптичний вплив [1]. Шаперони є високо консервативними білками, а саме: амінокислотна послідовність Hsp60 людини та його бактеріального аналога *E.coli* (GroEL) на 50–60 % ідентична. Під дією стресових факторів білок активно експресується на поверхні клітинної мембрани, а також потрапляє в позаклітинний простір у вигляді вільних молекул або у ліпідних везикулах [2]. Позаклітинний Hsp60 є важливою сигнальною молекулою, що здатна активувати Т- та В-лімфоцити, макрофаги, нейтрофіли, а також індукувати проліферацію В-лімфоцитів, секрецію медіаторів запалення – IL-6, -10, -12, -15, TNF α , IFN- γ , активних форм кисню, протеаз тощо. Шаперон може зв'язувати TLR2 і TLR4 на Т-лімфоцитах, що дозволяє модифікувати активність клітин вродженого та набутого імунітету. Окрім того, Hsp60 бере участь в ангіогенезі, пухлинній інвазії та метастазуванні [1].

Рівні ТирРС та Hsp60, а також автоантитіл до них значно змінюються при різних патологіях [7, 1]. Метою даної роботи було з'ясувати, чи відрізняються рівні автоантитіл до Hsp60 і тирозил-тРНК синтетазі та її окремих доменів у сироватці жінок із фіброміомою – надзвичайно гетерогенним доброякісним новоутворенням, розвиток якого характеризується прозапальними реакціями та надмірною васкуляризацією.

Матеріали і методи. Забір зразків. Обстежено 30 жінок: 5 клінічно здорових і 25 жінок із фіброміомою до операції, яким було проведено лабораторні та інструментальні дослідження згідно з Наказом МОЗ України від 15.07.2011 р. № 417 "Про організацію амбулаторної аку-

шерсько-гінекологічної допомоги в Україні" та отримано поінформовану згоду на дослідження згідно з рішенням Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень при НМУ імені О.О. Богомольця від 10.02.2017. Особи контрольної та дослідної групи були співставні за віком: 45,1 \pm 2,7 та 42,8 \pm 5,3 роки відповідно.

Отримання рекомбінантних білків. Рекомбінантні білки бичачої повнорозмірної тирозил-тРНК синтетазі та її окремих модулів отримували як описано в [8]. Рекомбінантний білок GroEL отримували згідно з [9] із незначними модифікаціями: для гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії використовували TSK-GEL Toyopearl HW-65F, DEAE-Toyopearl 650M відповідно.

Чистоту отриманих білків контролювали методом електрофореза в денатуруючих умовах з використанням градієнта поліакриламідного гелю 7–22 %. Концентрацію рекомбінантного білка визначали спектрофотометрично.

ELISA. Рівні автоантитіл класів IgM та IgG проти рекомбінантних білків GroEL, а також тирозил-тРНК синтетазі та її окремих доменів у сироватках здорових донорів і пацієнок до початку лікування визначали методом ELISA, як описано в [7]. Серопозитивною вважали сироватку, оптична густина якої перевищувала середню величину оптичної густини зразків сироватки крові здорових донорів (M) на два стандартних відхилення (sd) – (M+2sd).

Вестерн-блот аналіз. Специфічність реакції IgG автоантитіл проти GroEL та міні-ТирРС перевіряли методом вестерн-блот аналізу згідно з [7]. Результати реакції фіксували електрохемілюмінісцентним методом на рентгеновську плівку.

Статистична обробка даних. Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 10.0. (StatSoft, США) Непараметричні дані порівнювали в тесті Манна-Уїтні (Mann-Whitney U-test).

Результати та їх обговорення. Сироватки крові 5 здорових донорів та 25 жінок із фіброміомою до оперативного втручання було проскринено методом ІФА на наявність автоантитіл класів IgG та IgM до 4 білків: GroEL, ТирРС, міні-ТирРС та С-кінцевого домену тирозинової синтетазі.

Підвищені рівні автоантитіл класу IgM до всіх 4 білків траплялись не часто як у контрольній, так і дослідній групах без якоїсь закономірності (дані не представлені). Такі результати були передбачуваними, оскільки високі рівні імуноглобулінів класу М вказують на гостру фазу запалення, найчастіше інфекційного походження, тоді як для міоми характерні хронічні запальні процеси.

У контрольній групі здорових донорів крові не було виявлено особин з підвищеними рівнями автоантитіл IgG до жодного з досліджуваних білків. Серед жінок із фіброміомою 19 з 25 (76 %) пацієнтів були серопозитивні до міні-ТирРС, 18 з 25 (72 %) до бактеріального шапероніна. При цьому 17 дослідних зразків (68 %) були позитивні до обох антигенів порівняно зі здоровими донорами. Рівень автоантитіл до міні-ТирРС був вищим, ніж у здорових донорів у 1,7 раза, для GroEL такий показник становив 2,1 раза. Підвищення рівнів автоантитіл проти кожного з 2 білків було статистично значиме зі ступенем достовірності $p < 0,01$.

Натомість рівні імуноглобулінів IgG до білків ТирРС та її С-кінцевого домену статистично значимо не відрізнялись у групі жінок із фіброміомою від когорти здорових донорів. До повнорозмірної ТирРС 7 з 25 (28 %) жінок із фіброміомою були серопозитивні, також статис-

тично значимо підвищені рівні автоантитіл до С-кінцевого домену було відмічено у 4 з 25 (16 %) пацієнток. Зауважимо, що підвищені рівні антитіл до ТирРС і С-кінцевого домену були виявлені у пацієнток, що також були серопозитивними до міні-ТирРС та GroEL.

Слід сказати, що у жінок з фіброміомою були підвищені рівні автоантитіл до одного домену синтетази (міні-ТриРС) значно частіше, ніж до іншого (С-кінцевого) – 76 % порівняно з 16 %. Як вже було зазначено, вважається, що повнорозмірний білок розщеплюється у цитоплазмі на два модулі, відповідно, співвідношення доменів має бути один до одного. Виходячи з цього, можна зробити припущення, що міні-ТирРС є більш імуногенним, ніж інший домен, принаймні, для обстежених пацієнток, адже раніше нами було показано, що при раку простати більшу автореактивність викликав С-кінцевий домен: 46 % серопозитивних пацієнтів порівняно з 30 % позитивних до міні-ТирРС [6]. Можливо, існують і інші, більш тонкі механізми екскреції ТирРС або її окремих модулів з клітини, що дозволяють вивільняти з клітини один чи інший домен синтетази при різних станах, адже цитокінові функції цих молекул, хоча і подібні, але не ідентичні.

Помірна автореактивність до повнорозмірної ТирРС (28 %) у жінок з фіброміомою може бути пов'язана з перехресною реактивністю до міні-ТирРС. На користь такого припущення свідчить те, що всі 7 жінок, у яких були підвищені рівні автоантитіл до повнорозмірного білка, також були серопозитивні до міні-ТирРС. Водночас такі висновки не виключають можливості наявності певних антигенних детермінант, властивих саме ТирРС.

Виявлення автоантитіл проти Hsp60 і ТирРС та її фрагментів непрямо свідчить про експанованість цих білків у міжклітинному просторі. Як шаперонін, так і окремі домени синтетази беруть участь у розвитку запалення та ангіогенних перебудовах, які є характерними для росту і розвитку міоми [3], а отже, можуть бути залучені або до розвитку патології, або до її елімінації організмом. Дослідження ролі даних білків, автоантитіл до них та їхньої взаємодії при розвитку міоми дозволить оцінити роль цих молекул у прогресії патології.

Результати ІФА на автоантитіла класу IgG до білків GroEL та міні-ТирРС було перевірено методом вестерн-блоту. Дані імуноблотинга підтвердили результати ІФА для автоантитіл утворених до GroEL, але не до міні-ТирРС (рис. 2). Відповідність результатів аналізів для автоантитіл до GroEL узгоджується з літературними даними та свідчить про переважне утворення антитіл до лінійної антигенної детермінанти (або кількох лінійних епітопів) [15, 4]. При ІФА автоантитіла з сироватки приєднуються до нативного білка у третинній структурі, коли на поверхні білка експоновані як лінійні, так і просторові антигенні детермінанти, тоді як при імуноблоті білки розділяють у поліакриламідному

гелі при денатуруючих умовах, коли білок перебуває у розгорнутому стані, тому зберігаються тільки лінійні епітопи. Результати ІФА та імуноблотингу для автоантитіл проти міні-ТирРС узгоджуються не в усіх зразках. Це можна пояснити утворенням автоантитіл при фіброміомі до різних епітопів на поверхні білка. Можливо, у зразках для яких результати отримані різними методами аналізів співставні, переважають антитіла до лінійних антигенних детермінант, а у зразках, результати для яких відрізняються в ІФА та вестерн-блоті – антитіла до просторових епітопів.

Статистично значиме підвищення рівнів антитіл проти GroEL та міні-ТирРС у сироватці більшості жінок із фіброміомою (72 та 76 %, відповідно) порівняно зі здоровими донорами крові дозволяє розглядати дані молекули як перспективні діагностичні та прогностичні маркери. Різними авторами показано прогностичну роль зміни експресії HSP60 або автоантитіл до даного шапероніну при раку шийки матки, раку простати, при колоректальному раку, раку молочної залози [11]. X. Zhou зі співавторами розглядають ТирРС як потенційний неінвазивний маркер аденокарциноми легень [16]. У роботі [7] було показано підвищення рівнів автоантитіл до С-кінцевого домену тирозил-тРНК синтетази при раку простати. Білкові маркери для діагностування фіброміоми не потрібні, адже пухлини виявляють або завдяки виразним гінекологічним симптомам, або випадково, при ультрасонографічному або радіологічному обстеженні. Натомість використання прогностичних маркерів для моніторингу патології після хірургічного втручання або для оцінки ефективності медикоментозної терапії міомою може бути зручним неінвазивним методом при веденні пацієнтів з даною патологією. За відсутності специфічних та надійних маркерів при фіброміомі ми розділяємо погляд *Levi та ін.* [10] щодо перспективності використання маркерної панелі білків.

Слід зазначити, що нами було обстежено два донори, які були позитивні до GroEL, а один з них був позитивний до міні-ТирРС. Позитивна реакція на GroEL може бути пояснена для одного донора наявністю у сімейному анамнезі по материнській лінії артеріальної гіпертензії, для другого автоімунним тиреоїдитом, при яких показано підвищені рівні автоантитіл до цих білків [13, 2, 8].

Отже, розглядаючи автоантитіла проти GroEL та міні-ТирРС як потенційні маркери для моніторингу стану патології у жінок з фіброміомою, необхідно враховувати те, що наявність антитіл до цих білків у сироватці крові може бути пов'язана і з іншими ускладненнями анамнезу. Натомість, можливо саме використання більш широкої панелі маркерних білків, виявлення зміни співвідношення між окремими показниками, дозволить більш точно визначати зміни у розвитку даної патології.

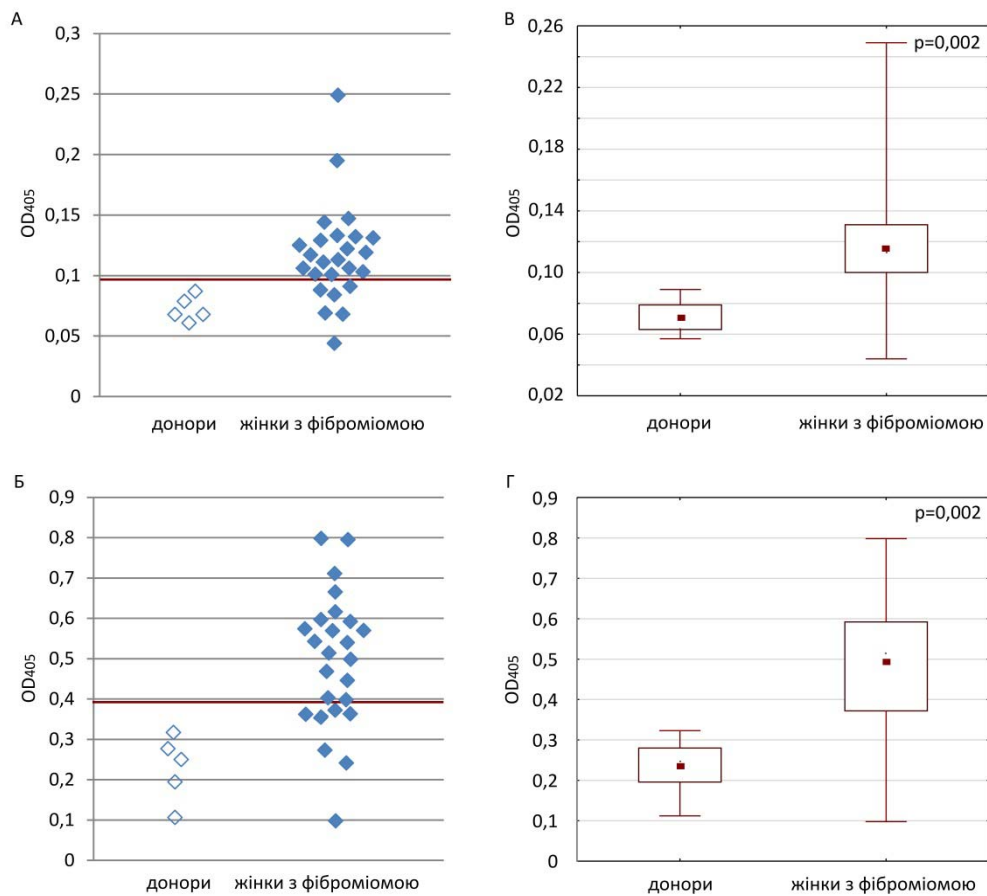


Рис. 1. Рівні автоантитіл проти міні-ТирРС (А, В) і GroEL (Б, Г) у сироватці крові жінок із фіброміомою та здорових донорів. Вище маркерної лінії (А, Б), яка чисельно дорівнює середньому значенню плюс 2 стандартні відхилення відповідної донорської групи, розташовані позитивні зразки сироватки. Графіки (В, Г) відображають середнє, максимальне та мінімальне значення, а також діапазон у якому знаходиться 50 % значень для кожної вибірки



Рис. 2. Імунореактивність сироватки здорових донорів крові (зразки 1–5) і жінок із фіброміомою до оперативного втручання (зразки 6–30) до GroEL (А) та міні-ТирРС (В) за результатами вестерн-блот аналізу

Висновки

Таким чином, високі рівні автоантитіл до міні-ТирРС та GroEL у жінок із фіброміомою вказують на дані білки як на перспективних учасників комплексної маркерної панелі для моніторингу захворювання.

Список використаних джерел

1. *Hsp60* chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents / F. Cappello, A. Gammazza, A. Piccionello et al. // *Expert Opin. Ther. Targets*, 2014. – Vol. 18, N 2. – P. 185–208.
2. *Exosomal HSP60*: a potentially useful biomarker for diagnosis, assessing prognosis, and monitoring response to treatment / C. Caruso Bavi-

sotto, F. Cappello, A. Macario et al. // *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2017. – Vol. 17, N 9. – P. 815–822.

3. *Activin-A* and myostatin response and steroid regulation in human myometrium: disruption of their signaling in uterine fibroid / P. Ciarmela, E. Bloise, P. Gray et al. // *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. – Vol. 96, N 3. – P. 755–765.

4. *Deniset J. F.* Heat Shock Proteins: Mediators of Atherosclerotic Development / J. Deniset, G. Pierce // *Curr Drug Targets*, 2015. – Vol. 16, N 8. – P. 816–26.

5. *Molecular* and clinical attributes of uterine leiomyomas / D. Dvorska, D. Brany, Z. Danková et al. // *Tumor Biology*, 2017. – Vol. June. – P. 1–16.

6. The novel fragment of tyrosyl-tRNA synthetase, mini-TyrRS, is secreted to induce an angiogenic response in endothelial cells / Y. Greenberg, M. King, W. Kiosses et al. // FASEB J., 2008. – Vol. 22, N 5. – P. 1597–605.

7. Tyrosyl-tRNA synthetase and its separated domains are suppositional components of prostate cancer pathogenesis / M. Grom, L. Yakovenko, L. Sidorik et al. // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of Physiological Functions Regulation, 2016. – Vol. 1, N 20. – P. 38–44.

8. Autoantibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its separated domains at essential hypertension / M. Grom, L. Yakovenko, V. Granich et al. // Biopolymers and Cell, 2015. – Vol. 31, N 4. – P. 255–63.

9. Obtaining recombinant chaperon GroEL and its immunological cross-reactivity with Hsp60 / L. Kapustian, R. Kyyamova, V. Gryshkova et al. // Biopolymers and Cell, 2006. – Vol. 22, N 2. – P. 117–120.

10. Biomarkers in uterine leiomyoma / G. Levy, T. Plowden, W. Catherino, A. Armstrong // Fertil Steril., 2013. – Vol. 99, N 4. – P. 1146–1152.

11. Lianos G. The role of heat shock proteins in cancer / G. Lianos, G. Alexiou, A. Mangano // Cancer Lett., 2015. – Vol. 360, N 2. – P. 114–8.

12. Wakasugi K. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase / K. Wakasugi, P. Schimmel // Science, 1999. – Vol. 284. – P. 147–151.

13. Anti-Hsp60 antibodies in patients with arterial hypertension and persons with a complicated heredity for hypertension / L. Yakovenko, Yu. Smalyuk, L. Kapustian et al. // Medical case, 2015. – Vol. 3-4. – P. 43–52.

14. Yao P. Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease / P. Yao, P. Fox // EMBO Mol Med., 2013. – Vol. 5, N 3. – P. 332–43.

15. Autoantibodies against chaperonin CCT in human sera with rheumatic autoimmune diseases: comparison with antibodies against other Hsp60 family proteins / Sh. Yokota, D. Hirata, S. Minota et al. // Cell Stress & Chaperones, 2000. – Vol. 5, N 4. – P. 337–46.

16. Proteomics-based identification of tumor-relevant proteins in lung adenocarcinoma / X. Zhou, L. Xue, L. Hao et al. // Biomed Pharmacother, 2013. – Vol. 67, N 7. – P. 621–7.

References (Scopus)

1. Cappello F., Marino Gammazza A., Palumbo Piccionello A., Campanella C., Pace A., Conway de Macario E., Macario A. Hsp60 chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents. Expert Opin. Ther Targets. 2014;18(2):185-208.

2. Caruso Bavisotto C., Cappello F., Macario A., Conway de Macario E., Logozzi M., Fais S., Campanella C. Exosomal HSP60: a potentially useful biomarker for diagnosis, assessing prognosis, and monitoring response to treatment. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2017;17(9):815-22.

3. Ciarmela P., Bloise E., Gray P., Carrarelli P., Islam M., De Pascalis F., Severi F., Vale W., Castellucci M., Petraglia F. Activin-A and myostatin response and steroid regulation in human myometrium: disruption of their signaling in uterine fibroid. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(3):755–765.

4. Deniset J., Pierce G. Heat Shock Proteins: Mediators of Atherosclerotic Development. Curr Drug Targets. 2015;16(8):816-26.

5. Dvorská D., Brány D., Danková Z., Halašová E., Višňovský J. Molecular and clinical attributes of uterine leiomyomas. Tumor Biology. 2017;39:1–16.

6. Greenberg Y., King M., Kiosses W., Ewalt K., Yang X., Schimmel P., Reader J., Tzima E. The novel fragment of tyrosyl-tRNA synthetase, mini-TyrRS, is secreted to induce an angiogenic response in endothelial cells. FASEB J. 2008;22(5):1597–605.

7. Grom M., Yakovenko L., Sidorik L., Kornelyuk A., Grygorenko V., Vikarchuk M. [Tyrosyl-tRNA synthetase and its separated domains are suppositional components of prostate cancer pathogenesis]. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of Physiological Functions Regulation. 2016;1(20):38-44.

8. Grom M., Yakovenko L., Granich V., Dobrohod A., Torbas O., Radchenko G., Sirenko Yu., Sidorik L., Kornelyuk A. Autoantibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its separated domains at essential hypertension. Biopolym and Cell. 2015;31(4):255–63.

9. Kapustian L., Kyyamova R., Gryshkova V., Terentiev A., Filonenko V., Sidorik L. Obtaining recombinant chaperon GroEL and its immunological cross-reactivity with Hsp60. Biopolymers and cell. 2006; 22(2):117-120.

10. Levy G., Hill M., Plowden T., Catherino W., Armstrong A. Biomarkers in uterine leiomyoma. Fertil Steril. 2013;99(4):1146–52.

11. Lianos G., Alexiou G., Mangano A., Mangano A., Rausei S., Boni L., Dionigi G., Roukos D. The role of heat shock proteins in cancer. Cancer Lett. 2015;360(2):114-8.

12. Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. Science. 1999;284:147–151.

13. Yakovenko L., Smalyuk Yu., Kapustian L., Chornyi S., Pogribna A., Granich V., Dobrohod A., Torbas O., Radchenko G., Sirenko Yu., Sidorik L. [Anti-Hsp60 antibodies in patients with arterial hypertension and persons with complicated heredity for hypertension]. Medical case. 2015;3-4:43-52.

14. Yao P., Fox P. Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease. EMBO Mol Med. 2013;5(3):332-43.

15. Yokota Sh., Hirata D., Minota S., Higashiyama T., Kurimoto M., Yanagi H., Yura T., Kubota H. Autoantibodies against chaperonin CCT in human sera with rheumatic autoimmune diseases: comparison with antibodies against other Hsp60 family proteins. Cell Stress & Chaperones. 2000;5(4):37–46.

16. Zhou X., Xue L., Hao L., Liu Sh., Zhou F., Xiong H., Qi X., Lin D., Shao Sh. Proteomics-based identification of tumor-relevant proteins in lung adenocarcinoma. Biomed Pharmacother. 2013;67(7):621-7.

Надійшло до редколегії 19.03.2018

Отримано виправлений варіант 23.04.2018

Підписано до друку 23.04.2018

Received in the editorial 19.03.2018

Received a revised version on 23.04.2018

Signed in the press on 23.04.2018

М. Макаренко, д-р мед. наук, Р. Ворона, ассист.,
И. Сокол, ассист., В. Берестовой, ассист., Д. Говсеев, канд. мед. наук,
Институт последипломного образования

Національного медичного університету імені А.А. Богомольця, Київ, Україна,
А. Погребная, канд. биол. наук, А. Корнелюк, д-р биол. наук, М. Гром, мл. научн. сотруд.,
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЕЙ АУТОАНТИТЕЛ КЛАССОВ IGG И IGM К БАКТЕРИАЛЬНОМУ АНАЛОГУ HSP60, ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗЕ И ЕЕ ОТДЕЛЬНЫМ ДОМЕНАМ У ЖЕНЩИН С ФИБРОМИОМОЙ МАТКИ

Фибромиома (лейомиома, миома) – доброкачественное новообразование миометрия, которое поражает большинство женщин репродуктивного возраста, однако механизмы его развития изучены недостаточно. Тирозил-тРНК (ТирРС) синтетаза и Hsp60 – белки домашнего хозяйства, которые могут быть вовлечены в патогенез ряда заболеваний различными способами. Целью данной работы стало определение уровней аутоантител к Hsp60, ТирРС и её отдельным доменам (мини-ТирРС и С-конечному домену) в сыворотке крови женщин с фибромиомой. Материалы и методы: уровни аутоантител классов IgM и IgG к белкам Hsp60, ТирРС, мини-ТирРС и С-конечному домену в сыворотке крови 5 здоровых доноров и 25 женщин с фибромиомой до начала лечения, что определялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Специфичность реакции аутоантител класса IgG с белками Hsp60 и мини-ТирРС проверялась при помощи вестерн-блот теста. Статистический анализ данных проведен при помощи программного обеспечения STATISTICA 10.0. (StatSoft, США). Непараметрические данные сравнивались в тесте Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Результаты: повышенные уровни аутоантител класса IgM к каждому из 4 изучаемых белков идентифицировали не часто как в контрольной, так и опытной группе без определенной закономерности. В группе здоровых доноров не были обнаружены образцы с повышенными уровнями аутоантител IgG ни к одному из исследуемых белков; среди женщин с фибромиомой были серопозитивны к мини-ТирРС 19 из 25 (76 %), а к Hsp60 – 18 из 25 (72 %). При этом 17 образцов опытной группы (68 %) были позитивны к обоим антигенам по сравнению с такими у здоровых доноров. Уровень аутоантител к мини-ТирРС был повышен у женщин с фибромиомой в 1,7 раз по сравнению со здоровыми донорами, для белка Hsp60 соответствующий показатель составил 2,1. Повышение уровней аутоантител к мини-ТирРС и Hsp60 было статистически значимым со степенью достоверности $p < 0,01$. Результаты иммуноблота подтвердили данные ИФА для Hsp60, но не для мини-ТирРС. Вывод: высокие уровни аутоантител к мини-ТирРС и Hsp60 у женщин с фибромиомой свидетельствуют о перспективности исследуемых белков как участников комплексной маркерной панели мониторинга заболевания.

Ключевые слова: Hsp60, ТирРС, фибромиома, аутоантитела.

M. Makarenko, M. D., R. Vorona, Assist. Prof., I. Sokol, Assist. Prof., V. Berestoviy, Assist. Prof., D. Govsiiev, Ph. D., Bogomolets National Medical University, Postgraduate Education Institute, Kyiv, Ukraine, A. Pogribna, Ph. D., Res., A. Kornelyuk, D. Sci., M. Grom, J. Res. Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

THE INVESTIGATION OF LEVELS OF IGG AND IGM AUTOANTIBODIES AGAINST BACTERIAL ANALOG OF HSP60, TYROSYL-TRNA SYNTHETASE, AND ITS SEPARATED DOMAINS IN SERA OF WOMEN WITH UTERINE LEIOMYOMA

Uterine leiomyomas are common gynecologic tumor in reproductive-aged women. The molecular mechanisms behind the origin of leiomyomas are still relatively unknown. Tyrosyl-tRNA synthetase (TyrRS) and Hsp60 are housekeeping proteins that could be involved into different pathologies in various ways. The aim of the study was to investigate the levels of antibodies to Hsp60 and TyrRS and its distinct domains: mini-TyrRS and C-terminal domain in sera of patients with uterine leiomyoma (UL). Materials and methods: Specific IgG and IgM autoantibodies in sera of 25 women with UL before therapy and 5 healthy subjects were measured by ELISA. The specificity of the reaction of IgG autoantibodies against the Hsp60 and mini-TyrRS proteins was checked using a western blot assay. Statistical analysis was performed using the STATISTICA 10.0 software. (StatSoft, USA). Non-parametric data were compared in the Mann-Whitney U-test. Results: The elevated levels of IgM autoantibodies against all the proteins studied occur frequently neither in control nor in experimental cohort. In the group of healthy donors, individuals with elevated levels of IgG autoantibodies against any of the proteins studied were not detected. Meanwhile 19 of 25 (76 %) and 18 of 25 (72 %) women with UL had significantly increased serum levels of autoantibodies to mini-TyrRS and Hsp60 respectively. Intriguingly, 17 of 25 samples from women with uterine fibroids (68 %) were positive against mini-TyrRS and Hsp60 analog simultaneously. The levels of autoantibodies to mini-TyrRS in sera of women with UL were 1.7 times higher than in sera of healthy donors, for Hsp60 the corresponding index was 2.1. Increasing levels of autoantibodies against each of the two proteins was statistically significant with a degree of reliability of $p < 0.01$. The data obtained by ELISA were confirmed by western-blot analysis for Hsp60 but not for mini-TyrRS. Conclusion: We propose that elevated levels of autoantibodies to Hsp60 and mini-TyrRS in sera of persons with UL may serve as element of panel of protein markers for monitoring of pathology.

Key words: Hsp60, TyrRS, uterine leiomyoma, autoantibodies.

УДК:616.155.392:544.475:615.616-085

І. Дмитренко, канд. біол. наук, І. Дягель, д-р мед. наук, Ж. Мінченко, д-р біол. наук, З. Мартіна, канд. мед. наук, В. Федоренко, канд. мед. наук, Т. Шляхтиченко, канд. мед. наук, В. Шолойко, канд. біол. наук, О. Дмитренко, канд. біол. наук, Державна установа "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", Київ, Україна

ПРОГНОСТИЧНІ ФАКТОРИ ВІДПОВІДІ НА ТЕРАПІЮ ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗ В УКРАЇНСЬКІЙ КОГОРТІ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ХРОНІЧНОЮ МІЄЛОЇДНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ

Порівняно динаміку редукції BCR/ABL-позитивного клону у пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією (ХМЛ) при тривалій терапії іматинібом (ІМ) і нілотинібом (НІ) і сформовано комплекс ініціальних прогностичних факторів, що впливають на редукцію лейкоїчного клону і тривалість життя хворих на ХМЛ. Із загальної когорти 1095 хворих на ХМЛ, обстежених за період 2002–2018 рр., у 937 пацієнтів на терапії ІМ та 72 пацієнтів на терапії НІ оцінено ефективність терапії за рівнем експресії гена BCR/ABL1 до показниками виживаності. Для визначення прогностичних факторів, асоційованих з кращою відповіддю на терапію та виживаністю, використано метод регресії Кокса. На 12-й міс. терапії відсоток пацієнтів, які досягли редукції пухлинного клону до рівня великої молекулярної відповіді (ВМВ), був істотно вищим в групі пацієнтів, які отримували НІ, ніж в групі пацієнтів на терапії ІМ (61,0 % vs 23,7 %, $p < 0,001$). На 24-му міс. терапії зниження рівня експресії гена BCR/ABL1 до рівня глибокої молекулярної відповіді (МВ4) було зареєстровано у 38,3 % пацієнтів, які отримували НІ, і лише у 12,4 % пацієнтів, які лікувалися ІМ ($p < 0,001$). Медіана часу досягнення ВМВ і МВ4 була меншою для пацієнтів, які отримували НІ, порівняно із пацієнтами на ІМ ($p < 0,001$). Доведено, що відмінності в ефективності ІМ і НІ виражалися тільки в динаміці відповіді, але не в показниках виживаності. Найбільш впливовим чинником прогресії, загальної та безпідійної виживаності виявилася тривалість періоду лікування до початку терапії ІМ та НІ. Нілотиніб обумовлює глибшу і швидшу редукцію пухлинного клону. Проте затримання зі своєчасним призначенням терапії інгібіторами тирозинкіназ призводить до зниження ефективності терапії як іматинібом, так і нілотинібом.

Ключові слова: ХМЛ, інгібітори тирозинкіназ, термін передлікованості, ефективність терапії.

Вступ. Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – клональне мієлопроліферативне захворювання, яке становить 20 % уперше діагностованих випадків лейкемії у дорослих. У країнах Європи і Північної Америки це захворювання за частотою займає третє місце серед лейкемії (після гострих лейкемії і хронічної лімфобластної лейкемії).

За даними реєстру EUTOS (European Treatment and Outcome Study), що включає 2904 пацієнти з діагнозом ХМЛ, установленим в 2008–2012 рр., захворюваність на ХМЛ у країнах Європи коливається від 0,69 на 100 тис. населення, в Польщі, Італії до 1,39 на 100 тис. [1]. Кількість випадків ХМЛ зростає з віком. Медіана віку на час встановлення діагнозу ХМЛ в країнах Європи в середньому дорівнює 56 років [1].

Згідно з "Показниками діяльності гематологічної служби України в 2016 році" протягом останнього десятиріччя в Україні захворюваність на ХМЛ становила 0,93–1,11 на 100 тис. населення. У 2016 р. в Україні вперше діагностовано ХМЛ у 279 пацієнтів, а загальна чисельність хворих була 2323. [2].

Розкриття молекулярного патогенезу ХМЛ сприяло розвитку таргетної терапії із застосуванням специфічних інгібіторів тирозинкіназ (ІТК). Перші клінічні випробування іматинібу у хворих на ХМЛ почалися у червні 1998 р. Їх результати виявилися настільки переконливими, що вже в травні 2001 р. препарат був дозволений для широкого використання. На сьогодні за даними міжнародного дослідження IRIS загальна виживаність пацієнтів на 8 років терапії іматинібом перевищує 80 % [3], тобто тривалість життя пацієнтів з ХМЛ, які отримують терапію ІТК, стала порівнянною з тривалістю життя здорових людей.

Поява ІТК 2-го і 3-го покоління ще більше розширило можливості терапії ХМЛ. Вони відрізняються спектром кіназ, які інгібують, а також більш високою афінністю до BCR/ABL-тирозинкінази. У світі на сьогодні пройшли клінічні випробування і використовуються в практиці п'ять ІТК: іматиніб, нілотиніб, дазатиніб, бозутиніб та понатиніб.