

the development of postoperative hypocalcemia / S. M. Cherenko, S. A. Sheptuha // *Clinical endocrinology and endocrine surgery*. – 2015. - №1 (49). – P. 14 - 18. DOI: [https://doi.org/10.24026/1818-1384.1\(49\).2015.74440](https://doi.org/10.24026/1818-1384.1(49).2015.74440).

7. An evaluation of the effectiveness of combined cardiac and thyroid surgery of patients with a high perioperative risk / M. Trystuła, B. Kapelak, T. Kruczek [et al.] // *Acta Neuropsychologica*. – 2016. - Vol. 14, Issue 3. – P. 20 - 21. DOI: <https://doi.org/10.5604/17307503.1216043>.

8. Concurrent endocrine and other surgical procedures: an institutional experience / R. Morris, Tina W. F. Yen, K. Doffek [et al.] // *Journ. Surg. Research*. – 2017. – Vol. 211. – P. 107 – 113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.12.013>.

9. Does concomitant thyroidectomy increase risks of parathyroidectomy? / C. M. Kiernan, C. Schlegel, S. Kavalukas [et al.] // *The Journal of*

Surgical Research. – 2016. - № 203 (1). – P. 34–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.03.059>.

10. Laparoscopic cholecystectomy and concomitant diseases / P. Caglia, A. Tracia, L. Amodeo [et al.] // *Ann. Ital. Chir.* – 2016. - Vol. 87. – P. 524 - 527.

Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26898949>.

11. Surgical treatment of concomitant thyroid and parathyroid disorders: analysis of 4882 cases / M. D. Jovanovic, V. R. Zivaljevic, A. D. Diklic [et al.] // *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. – 2017. – Vol. 274, Issue 2. - P. 997 – 1004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4303-z>

12. Thyroid cancer incidence in simultaneous thyroidectomy with parathyroid surgery / S. Emirikçi, B. Özçınar, G. Öner [et al.] // *Ulusal Cerrahi Dergisi*. – 2015. - № 31 (4). – P. 214–217. DOI: <https://doi.org/10.5152/UCD.2015.2666>.

UDC 616-001.17-001.4:547.96:57.084

Натрус Л. В.

доктор медичних наук, професор,

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Мироненко О.І.

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Панова Т. І.

доктор медичних наук, професор,

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Лабудзинський Д. О.

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

Л.В.Натрус¹, О.І.Мироненко¹, Т.І.Панова¹, Д.О.Лабудзинський²

¹ *Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, Київ*

² *Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ*

ОСОБЛИВОСТІ СПОЛУЧНОТКАНИННОГО СИНТЕЗУ NF-KB-ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНІВ У СТАДІО РЕМОДЕЛЮВАННЯ ОПІКОВОЇ РАНИ ШКІРИ ЩУРІВ

Natrus L.V.

doctor of medicine, professor,

Bogomolets National Medical University,

Myronenko O.I.

Bogomolets National Medical University,

Panova T.I.

doctor of medicine, professor,

Bogomolets National Medical University,

Labudzynski D.O.

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU)

L.V. Natrus¹, O.I. Myronenko¹, T.I. Panova¹, D.O. Labudzynski²,

¹ *Bogomolets National Medical University, Kyiv*

² *Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine*

SPECIFICS OF CONNECTIVE TISSUE NF-KB-DEPENDENT PROTEIN SYNTHESIS IN REMODELING STAGE OF BURN WOUND HEALING IN RATS

Анотація. Проведені дослідження динаміки (3,7,14,21 доба) гоєння опікової рани (площа термічного ушкодження шкіри складала 18-20 % поверхні тіла), шкіри білих статевозрілих щурів-самців лінії Вістар масою 180-210 г. Було вивчено в тканині регенерату вміст фосфорильованої за Ser 311 субодиниці р65 ядерного фактору каппа В (NF-κB) субодиниці ІκB-α, фактору росту судинних ендотеліальних клітин

(VEGF) рецептору VEGF (Flt-1) мілопероксидази –MPO, індукцибельної NO-синтази – iNOS та нітрозильованих протеїнів які досліджувалися методом Вестерн-блот аналізу, та виконувався підрахунок формених елементів периферичної крові (ПК).

За отриманими даними можна вважати, що «повторне» залучення до осередку загоювання нейтрофілів з активацією фагоцитозу та їхньої мілопероксидазної функції, а також переважання в тканині ознаки M2-макрофагів у стадії ремоделювання забезпечує функцію елімінації продуктів розпаду колагену вторинного провізорного матриксу (грануляційної тканини) з наступним їх кліренсом шляхом модуляції та завершення лімфоангіогенезу. Таким чином, з 14 по 21 добу в нормі створюються умови для ремоделювання рани, ефективного фізіологічного завершення фагоцитозу, при якому прибираються надлишки фіброзної тканини для відновлення архітекτονіки дерми.

Висновок: Визначена нами динаміка стану регуляторної системи pNF-κB/IκB-α та NF-κB-залежних важливих тканинних протеїнів свідчить про переключення («switch») ролі транскрипційного фактору NF-κB для регуляції фізіологічного загоєння рани. Вірогідно NF-κB об'єднує функцію загального регуляторного протеїну, який за відповідних умов змінює свою роль з прозапального на захисний і визначає успішність репарації сполучної тканини.

Abstract. We provided dynamics studies (on 3,7,14,21 day) of burn wound healing process in the skin of white adult rats (Wistar line, weighted 180-210 g). The area of thermal damage of the skin covered 18-20% of the total body surface. In regenerate tissue, we studied content of phosphorylated on Ser 311 subunit p65 of nuclear factor kappa-B (NF-κB), subunit IκB-α, vascular endothelial growth factor (VEGF), receptor to VEGF (Flt-1), myeloperoxidase (MPO), inducible NO-synthase (iNOS) and nitrosylated proteins by the method of Western-blot analysis. Blood cells were also counted in peripheral blood.

We can suggest that secondary attraction of neutrophils (with activation of phagocytosis and MPO) and predominance of M2-macrophages in remodeling stage of wound healing provide the elimination of collagen degradation products in secondary transitional matrix (granulation tissue). This followed by modulation and completion of lymphatic angiogenesis. Thus, normal conditions are created for wound remodeling from 14 to 21 day by effective physiological completion of phagocytosis, in which excessive fibrous tissue is removed to restore the architectonics of the dermis.

Conclusion: dynamics of regulatory system of pNF-κB/IκB-α and NF-κB-dependent tissue proteins determine the switch role of transcriptional factor NF-κB in regulation of physiological wound healing process. Probably NF-κB combines the proinflammatory function as a common regulatory protein and protective role in successful tissue reparation.

Ключові слова: регуляторні протеїни, мілопероксидаза, лімфоангіогенез, ремоделювання тканини

Keywords: regulatory proteins, myeloperoxidase, lymphatic angiogenesis, tissue remodeling

Загоєння рани є складним, багатокомпонентним процесом, механізми регулювання якого постійно досліджуються для визначення напрямків найбільш ефективного терапевтичного впливу. Пошкодження тканини є ініціувальним фактором, що призводить до активації системи гемостазу за рахунок вивільнення тканинних факторів зсідання крові, продуктів розпаду клітин, а також до розвитку гострого запалення за рахунок ключової події – контакту імунних клітин-резидентів (дендритні клітини, тканинні макрофаги) з PAMPs та/або DAMPs [1]. Таким чином, перша стадія загоювання рани включає формування первинного провізорного (тимчасового) матриксу на основі кров'яного згустку та розвиток запальної реакції із закономірною послідовністю появи клітин-емігрантів у ділянці пошкодження [2, 3]. Наступна стадія проліферації розпочинається після елімінації флогенного чинника та видалення тканинного детриту фагоцитами із розщепленням первинного матриксу – з фібрину та фібронектину – за рахунок секреції активатору плазміногену та матриксних металопротеїназ переважно моноцитами/макрофагами [4, 5].

«Нашаровування» між собою стадій загоювання рани, участь великої кількості клітин, складність біохімічного різноманіття цитокінів,

медіаторів, ферментів потребує інтегрального підходу та пошуку універсальних механізмів регуляції цього процесу. На клітинному рівні саме ядерний транскрипційний фактор каппа-В (NF-κB) відіграє важливу роль у цільній ланці подій: синтезу прозапальних цитокінів, адгезивних молекул, хемотаксинів, вільних радикалів та інших медіаторів; клітинному поділі та проліферації; активації експресії генів циклінів та циклін-залежних кіназ; активації гіпоксієіндуцибельного фактору-1 (HIF-1) та, як наслідок, судинного ендотеліального фактору росту (VEGF); у регулюванні апоптозу, клітинних програм виживання та старіння [6, 7].

При класичному (канонічному) шляху індукції NF-κB, наприклад, під дією LPS або TNFα, через низку проміжних факторів відбувається активація IκB-кінази (IKK), що фосфорилує інгібіторну субодиницю IκB-α, яка зазнає убіквітинування та деградації шляхом протеасомного протеолізу, а NF-κB вивільнюється, фосфорилується (p65 субодиниця за залишком Ser311) та транслокується в ядро, де активує експресію низки генів, у тому числі – IκB-α та протеїну A20, який інгібує активність IKK. Таким чином існують механізми негативного зворотного зв'язку для запобігання надмірної активації NF-κB [8, 9].

Одним із визначальних факторів «успішності» загоєння є неоваскуляризація. Основними джерелами VEGF є тканинні макрофаги, моноцити, нейтрофіли та епітеліальні клітини [10, 14]. Лейкоцити можуть стимулювати неоангіогенез шляхом доставки проангіогенних попередників факторів росту (VEGF-A), а також шляхом синтезу металопротеїназ, які деградують компоненти екстрацелюлярного матриксу, сприяючи вивільненню та активації факторів росту [11, 12]. Активація нейтрофілів супроводжується посиленням їхньої фагоцитарної функції, продукуванням вільних радикалів за рахунок активації мієлопероксидази (MPO) та індукційної NO-синтази (iNOS), лізосомальних ферментів, цитокинів та інших медіаторів, що відіграють велике значення у процесі загоєння рани. При цьому, збільшення рівня 3-нітротирозину в поліпептидах тканини є індикатором посиленого утворення NO та/або вільних радикалів та активації лейкоцитів відповідно [13].

Метою дослідження було вивчення особливостей синтезу NF- κ B-залежних протеїнів в регенераті сполучної тканини шкіри у стадію ремоделювання тканини, при загоєнні опікової рани у шурів.

Матеріали та методи

Дослідження динаміки процесу загоєння опікової рани шкіри проводили на 3, 7, 14, 21 добу після моделювання опіку на шкірі білих статевозрілих шурів-самців лінії Wistar (n=24), вагою 180-210 г, без соматичної патології.

Усі маніпуляції з піддослідними тваринами проводили з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами у відповідності до міжнародних та національних положень стосовно проведення експериментів із залученням тварин: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986); «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (Україна, 2006), засідання Комісії з біоетики НМУ (протокол №94 від 16.03.2016).

Під дією ефірного наркозу моделювали опік шляхом прикладання двох гарячих мідних пластин у вигляді еліпсу, розміром 3,7x4,5 см і площею 0,0052 м² на оголену шкіру спини з експозицією 10 секунд. Загальна площа опіку шкіри складала 18-20 % поверхні тіла, що є цілком достатнім для формування опіку II ступеня – дермального поверхневого опіку. У вказані термін (на 3, 7, 14, 21 добу) шурам одноразово інтраперитоніально робили ін'єкцію летальної дози тіопенталу натрію і виводили з експерименту шляхом декапітації.

Підрахунок формених елементів периферичної крові шляхом візуальної оцінки мазку крові за

стандартною методикою та за допомогою гематологічного аналізатора MicroCC.

В тканині регенерату методом *Вестерн-блот аналізу* визначали вміст фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 ядерного фактору каппа-B (NF- κ B), І κ B- α , фактору росту судинних ендотеліальних клітин (VEGF) та рецептору VEGF (Flt-1), індукційної NO-синтази (iNOS), мієлопероксидази (MPO) та 3-нітропротеїнів. Для приготування зразків фрагменти шкіри (200-250 мг) подрібнювали у порцеляновому тиглі і розтирали за присутності рідкого азоту до гомогенного стану. Наважки тканин шкіри (100 мг) змішували з буфером екстракції протеїнів RIPA (20 mM трис-HCl, pH 7,5; 1% тритону X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% дезоксихолату натрію, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1% Triton-X100, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0,2% DCH) у співвідношенні 1:10 (вага/об'єм) та коктейлем інгібіторів протеїназ і фосфатаз (PIC), інкубували на льоду протягом 20 хв та піддавали ультразвуковій дезінтеграції за допомогою приладу Sartorius (Labsonic® M, ФРН). Отримані гомогенати центрифугували при 16 тис. г протягом 20 хв. за 4 °C. Після центрифугування надосадову рідину збирали та переносили до пластикових пробірок Eppendorf. Концентрацію загального протеїну вимірювали спектрофотометрично за методом Stoscheck з модифікаціями, використовуючи спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ «Спектр», РФ). Протеїнові екстракти змішували з буфером Леммлі (150 mM трис-HCl (pH 6.8), 1% SDS, 0,3% бромфеноловий синій, 20% гліцерил) та проварювали при 95°C протягом 5 хв. для подальшого зберігання.

Електрофоретичне розділення протеїнів зразків шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE електрофорез) проводили у вертикальній камері BioRad (США), використовуючи електродний буфер (25 mM трис-HCl (pH 8,3); 0,192 M гліцину, 0,1% SDS). Кількість загального протеїну, що вносили до лунок гелю, становила 50 мкг. Концентрування зразків проводили при напрузі, що не перевищувала 50 В, розділення – 160 В. Для ідентифікації молекулярних мас протеїнів використовували суміш забарвлених протеїнових маркерів (PageRuler, кат. № 26616, Fermentas, Литва).

Перенесення протеїнів з гелю до нітроцелюлозних мембран (діаметр пор 0.45 мкм, GE Healthcare, Amersham, Велика Британія) проводили у трансфер-буфері (12,5 mM трис-HCl буфер (pH 8,3); 0,198 M гліцин та 20 % метанол) протягом 60 хв. при напрузі 30 В і постійному охолодженні. Після завершення трансферу протеїнів мембрани відмивали від залишків буферу у 50 mM фосфатному фізіологічному буфері, що містив 0,05 % Triton X-100 (PBST) (pH 7,4). Блокування місць неспецифічної сорбції антитіл проводили у 5%-му розчині знежиреного сухого молока (Carnation, США) у PBST протягом 120 хв. при кімнатній температурі. Після блокування

мембрани інкубували зі специфічними антитілами проти VEGF (Merck, ФРН, кат. № 05-1117, 1:2000 у PBST), фосфорильованої за Ser 311 субоднинці p65 NF-κB (Santa Cruz, США, 1:200 у PBST), ІκB-α (Santa Cruz, США, 1:500 у PBST) та Flt-1 (Santa Cruz, США, 1:500 у PBST), протягом 16 год. при 4 °C. Далі мембрани промивали на горизонтальному шейкері у 6 змінах PBST по 5 хв. кожна, після чого інкубували 90 хв. при кімнатній температурі з відповідними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (anti-mouse IgG 1:5000, Abcam, США, кат. № ab197767 або anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate 1:2500, Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Неспецифічно сорбовані вторинні антитіла відмивали у 6 змінах того ж буферу. Детекцію комплексів антиген-антитіло проводили за допомогою методу підсиленої хемілюмінесценції (ECL), використовуючи 0,25 М розчин люмінолу у ДМСО, 0,09 М розчин кумарової кислоти у ДМСО, 0,1 М трис (pH 8,5) та 0,0035 % H₂O₂. Візуалізацію специфічного забарвлення здійснювали на рентгенівських плівках Konica Minolta (Medical & Graphic, Inc, Японія). Отримані плівки сканували для проведення кількісного денситометричного аналізу з використанням програми TL-120 (TotalLab Ltd., США). Відносний вміст фосфоNF-κB p65, ІκB-α, VEGF, Flt-1, iNOS, MPO та 3-нітропротеїнів виражали в умовних одиницях оптичної густини (arbitrary units).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою статистичного пакету IBM SPSS Statistics 23. Розраховували коефіцієнт Пірсона (R), з р-значенням, що відповідає 95%-ому довірчому інтервалу для коефіцієнта кореляції. Для перевірки розподілу на нормальність використано критерій Шапіро-Уїлка. Для порівняння показників на всіх термінах спостереження було використано критерій множинного порівняння – критерій Шеффе.

Результати дослідження

Обрані періоди для дослідження показників відповідали сучасним уявленням процесу загоєння ран, коли на 3 добу припадає завершення стадії запалення та розпочинається проліферація, на 7 добу – на тлі проліферації розпочинається стадія ремоделювання, на 14 добу – стадія проліферації добігає кінця, а процес відновлення архітекtonіки тканини набуває активності, на 21 добу – завершується активне ремоделювання тканини з формуванням щільного сполучнотканинного рубця [1, 2].

В наших попередніх роботах була наведена динаміка рівню фосфорильованої за Ser311 субоднинці p65 ядерного транскрипційного фактору каппа-В (pNF-κB), його інгібуювальної субоднинці ІκB-α, вмісту судинного ендотеліального фактору росту VEGF, його рецептору VEGFR-1 (Flt-1) в сполучнотканинному регенераті опікової рани у динаміці на 3, 7, 14, 21 добу [15]. Ми визначали суттєве та достовірне підвищення pNF-κB, VEGF та Flt-1 в період з 14 до

21 добу. При вивченні динаміки кількості клітин периферичної крові ми також виявили достовірне підвищення вмісту нейтрофілів та моноцитів саме в цей період [16].

Вивчення динаміки рівня індукбельної NO-синтази (iNOS) (Рис.1,А) у тканинному регенераті у процесі загоєння опікової рани показав максимальний рівень iNOS на 7 добу, із поступовим зменшенням вмісту протеїну, який на 21 добу був в 2,8 разів нижчим за показник 7 доби (p<0,05). Досліджено коливання вмісту 3-нітрозильованих протеїнів (3-nitrotyrosine peptides) (Рис.1, Б) у сполучнотканинному регенераті тканини виявило максимальний рівень нітрозильованих пептидів на 3 добу, із поступовим зниженням на 7 та 14 (p<0,05), і підвищенням майже до початкового максимального значення на 21 добу (p<0,05).

Дослідження динаміки рівня мієлопероксидази (MPO) (Рис.1,В) виявило зменшення на 14 добу (p<0,05); на 21 добу відзначалося зростання концентрації MPO в тканині майже у 6 разів відносно 14 доби (p<0,05).

Ми провели кореляційний аналіз за коефіцієнтом кореляції Пірсона динаміки визначених показників тканинного регенерату для виявлення можливих взаємозв'язків та дослідження ймовірних механізмів їхньої регуляції (рис.2).

При вивченні динаміки вмісту вказаних протеїнів протягом усього періоду загоєння рани було визначено що показники регуляторної системи pNF-κB/ІκB-α та вміст NF-κB-залежних протеїнів в сполучнотканинному регенераті рани має характерні особливості саме у стадію ремоделювання тканини з 14 до 21 доби спостереження. В цей термін вміст фосфорильованої форми ядерного фактору pNF-κB несподівано достовірно (p<0,05) підвищувався в 1,4 рази, вміст його гальмівної одиниці ІκB-α відповідно достовірно (p<0,05) знижувався також в 1,4 рази. Рівень в сполучнотканинному регенераті VEGF в цей термін спостереження достовірно (p<0,05) підвищувався в 1,6 рази, а рівень його рецептора Flt-1 підвищувався (p<0,05) в 10 разів. Продукція MPO в сполучнотканинному регенераті в стадії ремоделювання тканини також підвищувалася в 5,8 разів, що корелювало із відносною кількістю нейтрофілів ПК R=0,611, (p<0,01) та відносною кількістю моноцитів ПК R=0,667, (p<0,01). Також в цей термін спостереження підвищувався в 1,6 рази (p<0,05) рівень нітрозильованих протеїнів, але продукція iNOS зменшувалася в 2 рази (p<0,05). За даними візуального спостереження загоєння рани проходило успішно у всіх тварин в жодного із щурів не спостерігалось погіршення загального стану та вигляду рани, що дає підставу стверджувати про відсутність приєднання бактеріальної флори та інфекційного загоєння.

В попередніх роботах ми висловлювали думку відносно можливості існування різнорівневого регуляційного ланцюга, який виникає в

нормальних фізіологічних умовах і забезпечує ангиогенез: ядерний фактор pNF-κB через продукцію факторів росту мієлоїдних попередників в кістковому мозку регулює проліферацію нейтрофілних гранулоцитів та їх вихід із кісткового мозку до ПК. Нейтрофіли, шляхом хемотаксису, потрапляють до пошкодженої ділянки опікової рани експресують ендотеліальні ростові фактори та регулюють експресію рецепторів до вказаних лігандів в сполучнотканинному регенераті, що є базою регульованого ангиогенезу.

Одже, зниження експресії pNF-κB з 3 по 7 добу спостереження є закономірним, адже саме на цей період при неускладненому перебігу загоювання опікової рани припадає завершення власне запальної стадії (альтеративних та ексудативних явищ) в осередку ушкодження та прогресує стадія проліферації з формуванням грануляційної тканини. Як відомо, однією з ключових подій, що «переключає» прозапальні реакції на протизапальні під час проліферації, є поляризація макрофагів, тобто перехід M1-фенотипу в M2-фенотип [1, 14]. Однак, подальше дослідження динаміки вмісту pNF-κB у тканинному регенераті виявило його парадоксальне, на перший погляд, зростання з 7 на 14, а особливо – з 14 на 21 добу спостереження. При цьому, ознак приєднання інфекційного процесу та інших ускладнень перебігу загоювання рани не спостерігалось (Рис.3), що дає можливість припустити наявність у регуляторного протеїну NF-κB іншої ролі ніж відома «традиційна» прозапальна функція, але вона активується у стадію ремоделювання тканини з 14 по 21 добу.

Виявлено, що динаміка збільшення вмісту нейтрофілів у тканині під час ремоделювання має виражений позитивний кореляційний зв'язок з продукцією VEGF. Однак, активний неоангіогенез є характерним для стадії проліферації під час формування грануляційної тканини. До того ж, при типовому перебігу загоювального процесу під час стадії ремоделювання спостерігається зниження числа капілярів при заміщенні тканини сполучнотканинним рубцем. Таким чином, на нашу думку, метою збільшення VEGF є «повторне» залучення нейтрофілів до осередку загоювання, оскільки нейтрофіли, як було показано раніше, мають рецептори VEGFR1 [17]. Ще однією можливою функцією VEGF на цьому етапі є посилення та модуляція лімфоангіогенезу, адже утворення лімфатичних судин, що сліпо починаються в тканині, потребує завершення формування архітекtonіки позаклітинного матриксу, а це припадає саме на стадію ремоделювання опікової рани.

Отже, ми вважаємо, що «повторне» залучення до осередку загоювання нейтрофілів з активацією фагоцитозу та їхньої мієлопероксидазної функції, а також переважання в тканині M2-макрофагів у стадії ремоделювання забезпечує функцію елімінації продуктів розпаду колагену вторинного провізорного матриксу (грануляційної тканини) з

наступним їх кліренсом шляхом модуляції та завершення лімфоангіогенезу. Очищення рани призводить до повного зникнення PAMPs та DAMPs (якими можуть виступати самі продукти розпаду колагену) [18]. За їх відсутності нові нейтрофіли, що знаходяться під впливом VEGF, не активуються (тому і не виявлено явища гострого запалення) та гинуть апоптозом. Апоптичні тільця поглинаються макрофагами, що приводить до інгібування запальної та імунної відповіді та завершення ремоделювання тканини з формуванням щільного рубця.

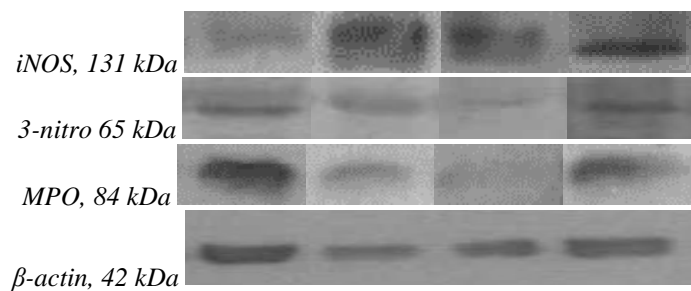
Між pNF-κB та iNOS у тканинному регенераті було продемонстровано значний зворотньопропорційний лінійний кореляційний зв'язок. Вважаємо, що зменшення вмісту iNOS у регенераті тканини з 14 по 21 добу спостереження свідчить про зменшення кількості «класично активованих» M1-макрофагів та переважання субпопуляції «альтернативно активованих» M2-макрофагів. А це співпадає з виявленим зростанням активності NF-κB у цей період. Таким чином, можна зробити висновок, що індукція NF-κB сприяє протизапальній функції у M2-макрофагів.

Цікаво, що зі зменшенням експресії iNOS у тканинному регенераті у стадію ремоделювання вміст продуктів нітрозилування (3-нітропротеїдів) парадоксально збільшувався, що говорить про активність вільнорадикальних реакцій, але джерелом яких вірогідно виступає мієлопероксидаза нейтрофілів. І, дійсно, між MPO та 3-нітропротеїдами виявлено значний кореляційний зв'язок ($R=0,875$, $p<0,05$). Тому зростання експресії MPO нейтрофілів у тканинному регенераті у стадію ремоделювання ми розцінюємо не тільки як свідчення активації фагоцитозу для елімінації компонентів позаклітинного матриксу та відновлення архітекtonіки дерми, але й цілеспрямований механізм активації та/або модуляції протеолітичних протеїнів шляхом їхнього нітрозилування – у першу чергу, низки металопротеїназ.

Ми виявили, що динаміка Flt-1 у тканинному регенераті опікової рани позитивно корелювала із вмістом VEGF та MPO, що вкотре підкреслює провідну роль нейтрофілів в ангиогенезі під час усіх етапів загоювання опікової рани.

Таким чином, ми припускаємо, що при типовому перебігу процесу загоювання опікової рани з 14 по 21 добу, за відсутності ознак інфікування, створюються оптимальні умови для завершення ремоделювання рани та відновлення архітекtonіки дерми шляхом ефективного фагоцитозу та лімфоангіогенезу, при якому прибираються та дренуються продукти деградації провізорного матриксу та надлишки фіброзної тканини. Збільшення вмісту NF-κB у сполучнотканинному регенераті, за нашими даними, збільшується, можна говорити про ефект перемикачності («switch») прозапальних властивостей цього транскрипційного фактору на протизапальні, репаративні (Рис.4).

1



2

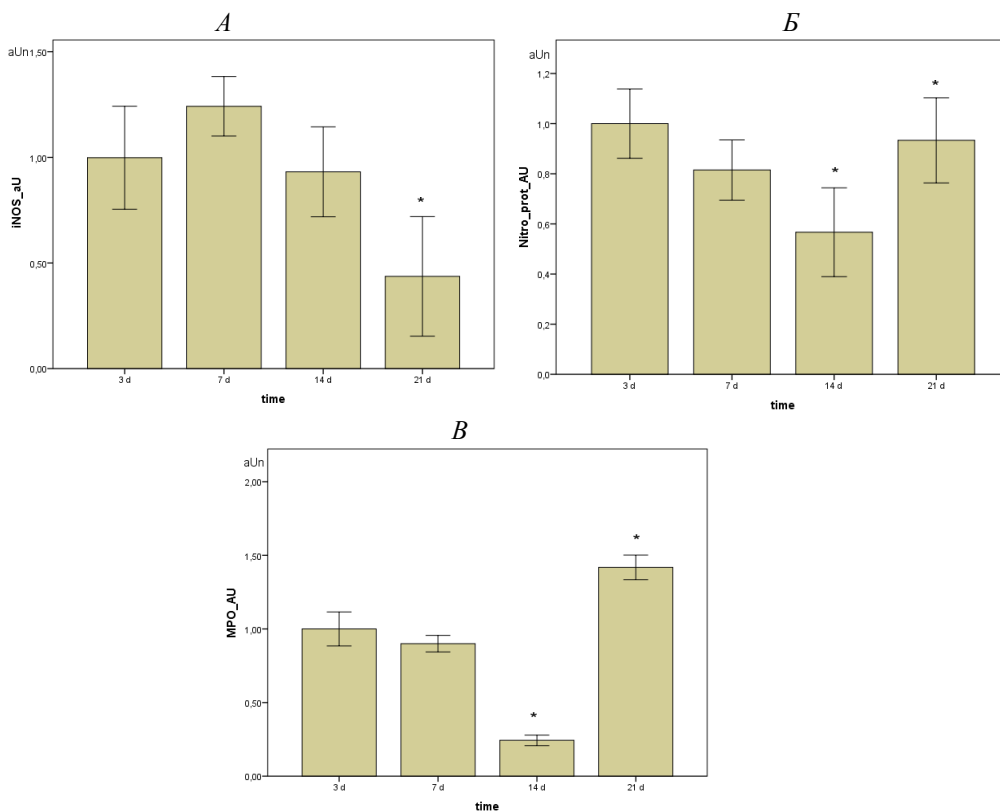


Рис.1. Вміст рNF-κB-залежних протеїнів у регенераті сполучної тканини шкіри щурів в динаміці загоювання опікової рани (3,7,14,21 доба).

(1) Гістограма вмісту протеїнд в ум.од. (А) iNOS, (Б) 3-nitrotyrosine, (В) MPO. (2) Імуноблотограма. * різниця порівняно зі значенням в попередній термін (P<0,001).

R	Nf-kb	Ikb	VEGF	FLT	MPO	iNOS	3-nitro	Neu_PB
Nf-kb	0,00							
Ikb	0,19	0,00						
VEGF	-0,08	0,27	0,00					
FLT	0,67	0,22	0,68	0,00				
MPO	0,60	-0,40	0,38	0,80	0,00			
iNOS	-0,94	-0,47	-0,16	-0,77	-0,50	0,00		
3-nitro	0,46	-0,75	-0,04	0,42	0,87	-0,14	0,00	
Neu_PB	-0,20	-0,42	0,76	0,50	0,63	0,57	0,47	0,00
Mono_PB	-0,13	-0,83	0,31	0,25	0,69	0,18	0,78	0,85

Рис. 2. Таблиця значень коефіцієнта Пірсона, розрахованого при аналізі кореляційних зв'язків між показниками.

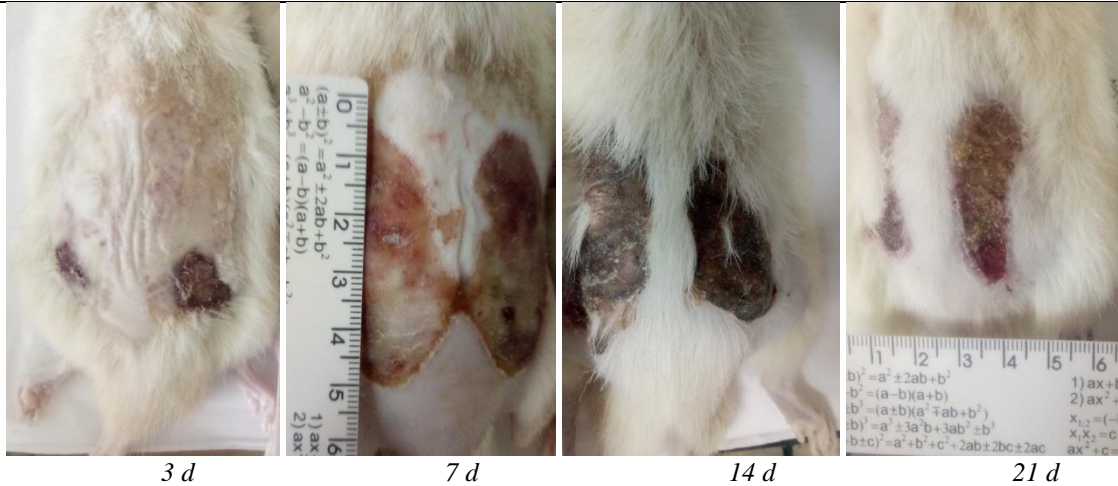


Рис.3. Зовнішній вигляд опікової рани щурів в динаміці загоєння (3,7,14,21 доба).

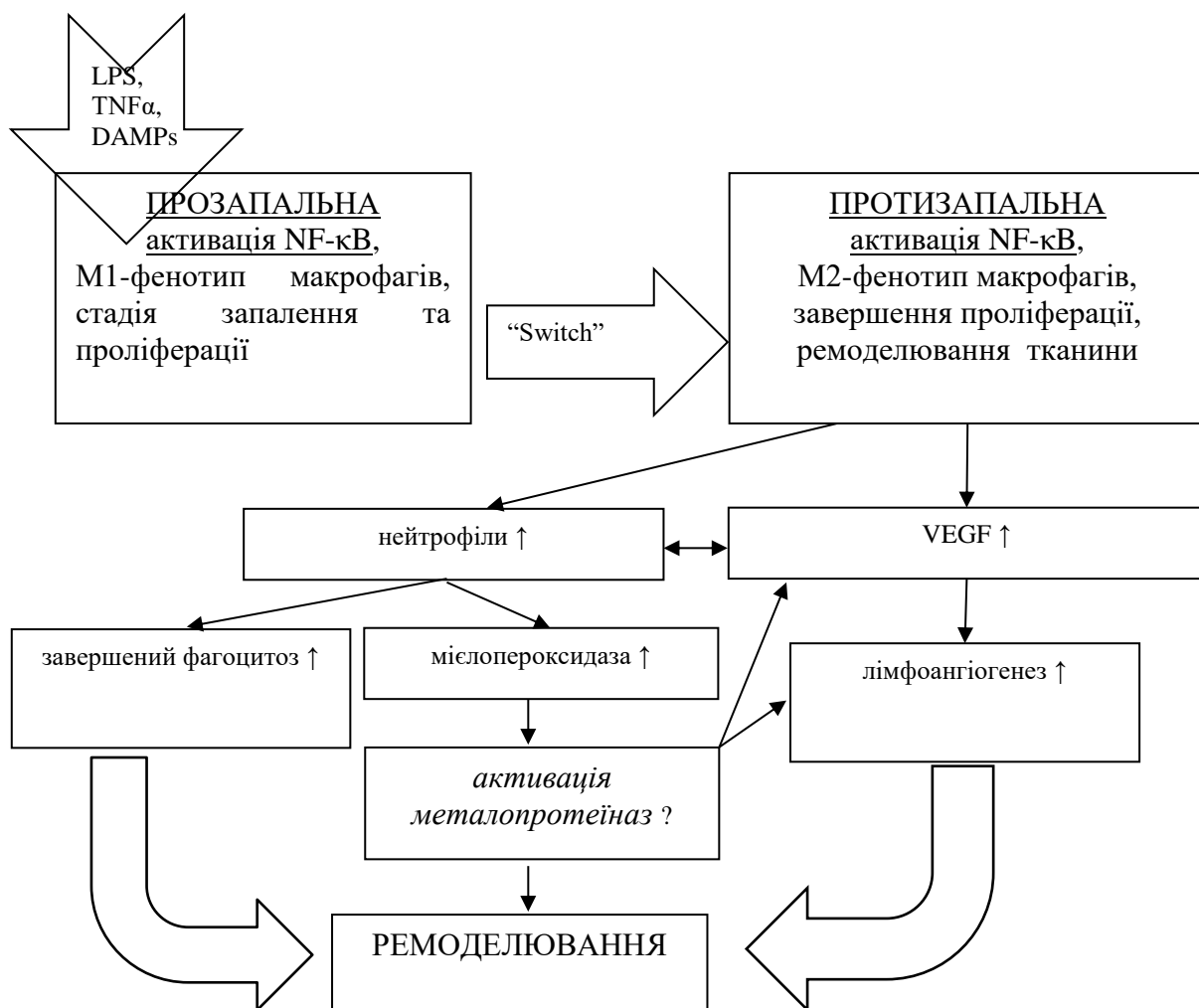


Рис.4. Імовірна схема реалізації протизапальних та репаративних ефектів NF-κB внаслідок перемикання («switch») його функцій у стадію ремоделювання з 14 по 21 добу загоєння опікової рани.

Література

1. Ambrozova N, Ulrichova J, Galandakova A. Models for the study of skin wound healing. The role of NRF2 and NF-κB. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2017; 161(1):1-13.
2. Widgerow A.D. Cellular/extracellular matrix cross-talk in scar evolution and control. Wound Repair Regen. 2011; 19:117–33.

3. Olczyk P, Mencner A, Komosinska K. The Role of the Extracellular Matrix Components in Cutaneous Wound Healing. BioMed Research International Volume. 2014; article ID 747584.

4. Rowan M.P, Cancio L.C, Elster E.A, Burmeister D.M, Rose L.F, Natesan S, Chan R.K, Christy R.J, Chung K.K. Burn wound healing and treatment: review and advancements. Critical Care. 2015; 19:243.

5. Reinke J.M, Sorg H. Wound repair and regeneration. Eur Surg Res. 2012; 49:35–43.
6. Park Y.R, Sultan M.T, Park H.J, Lee J.M, Ju H.W, Lee O.J, Lee D.J, Kaplan D.L, Park C.H. NF- κ B signaling is a key in the wound healing processes of silk fibroin. Acta Biomater. 2018; 67:183-195.
7. Pires B.R, Silva R.C, Ferreira G.M, Abdelhay E. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. Genes. 2018; 9:24; doi:10.3390/genes9010024.
8. Ying Wang, Zhenju Song, Jing Bi, Jie Liu, Lin Tong, Yuanlin Song, Chunxue Bai, Xiaodan Zhu. A20 protein regulates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by downregulation of NF- κ B and macrophage polarization in rats. Molecular Medicine Reports. 2017; 16:4964-4972.
9. Frank Christian, Emma L. Smith, Ruaidhrí J. Carmody. The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. Cells. 2016; 5:12; doi:10.3390/cells5010012.
10. Hayden M.S, Ghosh S. Nf-kappaB, the First Quarter-Century: Remarkable Progress and Outstanding Questions. Genes. 2012; 26:203–234.
11. Reinders S. et al. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. J. Clin. Invest. 2003; 112:1655–1665.
12. Shinohara H. et al. Positive feedback within a kinase signaling complex functions as a switch mechanism for NF-kappaB activation. Science. 2014; 344:760–764.
13. Sandra I. Zittermann, Andrew C. Issekutz. Endothelial growth factors VEGF and bFGF differentially enhance monocyte and neutrophil recruitment to inflammation. Journal of Leukocyte Biology. 2006; 80:247-257.
14. Gong Y, Koh D.R. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. Cell Tissue Res. 2010; 339:437–448.
15. Натрус Л, Рижко І, Панова Т, Осадчук Ю, Концепція регуляції неоангіогенезу при регенерації сполучної тканини в нормі та за умов гіперглікемії ISSN 0201-8489 Фізіол. журн., 2019, Т. 65, № 3 (Додаток)С. 30-31. https://biph.kiev.ua/images/6/69/FiziolZh-3_dod_2019.pdf
16. Рижко І, Натрус Л, Коновалов С., Рижко Д. Вплив гіперглікемії на NF- κ B-залежний ангіогенез сполучної тканини шкіри білих щурів при загоєнні опікової травми East European Scientific Journal, (Warsaw, Poland), 2019, 8 (48), 2019 part 4. 42-51. https://eesa-journal.com/wp-content/uploads/EESA_august_part4.pdf
17. Park Y.R, Sultan M.T, Kaplan D.L, Park C.H. Wound healing via NF- κ B regulated proteins including cyclin D1, fibronectin, and VEGF. Acta Biomater. 2018; 67:183-195.
18. Gurtner G.C, Werner S, Barrandon Y, Longaker M.T. Wound repair and regeneration. Nature. 2008; 453:314–321.

Troyanova E.N.

student of Tver State Medical University

Al-Galban L. N.

student of Tver State Medical University

Poselyugina O.B.

doctor of medicine,

professor of the department of hospital therapy and professional diseases,

Tver State Medical University

DIABETES INSIPIDUS. CLINICAL DISCUSSION

Троянова Екатерина Николаевна

студент ФГБОУ ВО

Тверской государственной медицинской университет Минздрава России,

г. Тверь, Россия

Аль-Гальбан Лина Нахедовна

студент ФГБОУ ВО

Тверской государственной медицинской университет Минздрава России,

г. Тверь, Россия

Поселюгина Ольга Борисовна

доктор медицинских наук,

профессор кафедры госпитальной терапии и профессиональных болезней

ФГБОУ ВО

Тверской государственной медицинской университет Минздрава России,

г. Тверь, Россия

НЕСАХАРНЫЙ ДИАБЕТ. КЛИНИЧЕСКИЙ РАЗБОР

Summary. Central diabetes insipidus is a disease of the hypothalamic-pituitary system caused by a defect in the synthesis or secretion of antidiuretic hormone, which leads to a decrease in the reabsorption of water in the kidneys and the release of excess urine with a low specific gravity. One of the causes of this pathology is surgery