

**PHENOTYPE MANIFESTATIONS OF ARTERIAL HYPERTENSION IN PATIENTS
WITH INCREASED BODY WEIGHT AND OBESITY**

L.P. Sydorчук, A.A. Sokolenko, A.M. Petrychuk

Abstract. The influence of overweight or abdominal obesity (AO) on the phenotype manifestations of essential arterial hypertension (EAH) have been analyzed. A significant increase in blood pressure (BP) according to the severity of hypertension is not accompanied by unidirectional hemodynamic changes according to AO degrees. The body mass index in patients with EAH with target organ damage and complications determines the systolic and diastolic blood pressure level, the waist and hip circumference in the II and III degree AO patients, only the waist circumference in overweight and the I degree AO patients ($r=0,36-0,72$, $p \leq 0,052-0,001$). An excess body weight increases the risk of the onset EAH of stages II and III 2,5 times ($OR=4,75$, $p=0,026$).

Key words: arterial hypertension, overweight, obesity

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi),
Railway Junction Clinical Hospital of the Chernivtsi Station

Рецензент – д. мед. н. Т.О. Ілащук

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 4 (64). – P. 149-153

Надійшла до редакції 17.09.2012 року

© Л.П. Сидорчук, А.А. Соколенко, А.М. Петричук, 2012

УДК 57.021.616-006.6.

*Л.М. Сківка¹, О.Г. Федорчук², В.В. Позур¹, М.П. Рудик¹,
О.М. Маланчук³, О.Г. Короткий¹*

**АД'ЮВАНТНИЙ ЕФЕКТ ПЕРИПУХЛИННОГО УВЕДЕННЯ ЕКСТРАКТУ
ЦИТОПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН *S. AUREUS* У МИШЕЙ
ІЗ КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНІ ЛЬЮІСА**

¹Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

²Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАНУ, м. Київ

³Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ, м. Київ

Резюме. Досліджували вплив одноразового перипухлинного уведення нефракціонованого екстракту цитоплазматичних мембран *S.aureus* одночасно з трансплантацією пухлинних клітин на ріст і метастазування карциноми легені Льюїса. Показано, що застосований у

дозі 1,6 мкг/г препарат викликає гальмування пухлинного росту (індекс гальмування 34,9) і метастазування (індекс гальмування 47,6) експериментальної пухлини.

Ключові слова: цитоплазматична мембрана *S.aureus*, пухлинний ріст.

Вступ. Екстракт цитоплазматичних мембран *S.aureus* (ЦПМ) належить до патоген-асоційованих молекулярних патернів ПАМП-високо консервативних структурних або секретованих молекулярних компонентів, властивих бактеріям, вірусам, грибам або паразитам, котрі не мають аналогів у клітинах хребетних тварин [6]. Потужна здатність ПАМП ініціювати запалення і активувати адаптивну імунну відповідь дозволила розглядати їх як регуляторів імунної відповіді і терапевтичних агентів за патологічних станів, у число яких входять онкологічні захворювання [9]. ПАМП істотно підвищують імуногенність і, як наслідок, терапевтичну ефективність протипухлинних вакцин [1]. Ці препарати застосовуються також як самостійні терапевтичні чинники у моно- і комбінованій ад'ювантній терапії раку в комплексі з променевою, хіміотерапією та іншими ад'ювантними засобами [12]. Ключовими структурними компонентами ЦПМ є білки (уніпортери, симпортери, антипортери, білки

АТФ-зв'язувальної системи тощо і ліпопротеїни. ЦПМ бактерій містить велике різноманіття жирних кислот [5]. Усі з перелічених конститuentів бактеріальних ЦПМ можуть розглядатися як потенційні імуномодулятори різної спрямованості. Найбільша увага з цього приводу приділяється останнім часом бактеріальним ліпопротеїнам [10]. Імуномодуляторні властивості ЦПМ можуть значною мірою зумовлюватися наявністю в її складі (залежно від методу виділення) ліпотейхоєвою кислотою (ЛТК) [11]. З літератури, однак, відомо, що мембранні білкові фракції L-форм *S. aureus*, що не містять ЛТК, мають здатність стимулювати продукцію прозапальних медіаторів таких, як ФНП [8]. Ад'ювантні властивості структурних компонентів бактеріальної ЦПМ за пухлинного росту практично не вивчені.

Мета дослідження. Дослідити вплив перипухлинного уведення нефракціонованого екстракту ЦПМ *S. aureus* на ріст і метастазування карциноми легені Льюїса в мишей.

© Л.М. Сківка, О.Г. Федорчук, В.В. Позур, М.П. Рудик, О.М. Маланчук, О.Г. Короткий, 2012

Матеріал і методи. Електрофорез. Електрофоретичне фракціонування екстракту цитоплазматичних мембран *S. aureus* проводили в денатуруючих умовах (65⁰, 75⁰, 90⁰С) за методом Лемлі (SDS-PAGE) у 15 % гелі. Для візуалізації електрофореграм застосовували різні барвники залежно від хімічної природи компонентів досліджуваного препарату. Для візуалізації білкових компонентів електрофореграми забарвлювали Кумасі-R250 (Sigma, США) у розчині 10 % оцтової кислоти з додаванням 5 % етилового спирту, після чого гель промивали тим самим розчином без барвника. Для візуалізації ліпотьохоевої кислоти забарвлювали альціановим синім (Santa Cruz, США) у 50 % розчині етанолу з додаванням 10 % оцтової кислоти, після чого гель промивали тим самим розчином без барвника.

Дослідні тварини і бактеріальний препарат. Експериментальні дослідження проведено на мишах лінії С₅₇В1/6 розведення віварію ННЦ «Інститут біології» КНУ імені Тараса Шевченка самицях віком 2-3 місяці, масою 20-24 г. Тварини утримувались у стандартних умовах віварію. Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно з нормами, встановленими законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» і норм, прийнятих в Європейській конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей від 20.09.1985 [4]. Екстракт цитоплазматичних мембран *S. aureus* Wood 46, використаний у роботі, наданий професором Позуром В.К. і отриманий у процесі виділення пептидоглікану за методами, описаними раніше [2].

Моделювання пухлинного росту. Штам пухлини отримано з Банку клітинних ліній та штамів пухлин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Карциному легені Льюїс перещеплювали підшкірно в ділянку крижового відділу по 0,2 мл 20 % клітинної суспензії.

Динаміку росту солідних пухлин при підшкірному перещепленні контролювали за наступними показниками: середня тривалість життя тварин (СТЖ) - термін закінчення дослідження цього показника був лімітований тривалістю життя тварин у групі; індекс модуляції середньої тривалості життя (ІМ СТЖ) розраховували за формулою $ІМ\ СТЖ = \frac{дослід-контроль}{контроль} \times 100\%$; розміри первинної пухлини, які оцінювали за середнім її об'ємом, обчислювали за формулою:

$$V = \frac{1}{6} \pi \left(\frac{d_1 + d_2}{2} \right)^3$$

де d₁ d₂ – взаємоперпендикулярні перетини.

Протипухлинний ефект характеризували за індексом гальмування пухлинного росту, який розраховували за формулою:

$$ІГПР = \frac{(V_k(N_k) - (V_e(N_e))}{V_k(N_k)} \times 100\%$$

де V_k і V_e – середній об'єм пухлини контрольних і дослідних тварин-пухлиноносіїв відповідно; N_k і N_e – середня кількість пухлинних вузлів у легенях контрольних і дослідних тварин-пухлиноносіїв відповідно.

Кількість метастазів підраховували візуально під біокуляром.

Індекс гальмування метастазування (ІГМ, %) розраховували за формулою $ІГМ = \frac{(Д-К)}{К} \times 100\%$, де К та Д – середнє число метастазів у однієї тварини в контрольній та дослідній групах відповідно.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з розрахунком середнього значення (М), середнього квадратичного відхилення (σ) та середньої квадратичної похибки (m). Для визначення вірогідності відмінності показників між дослідом та контролем використовували t-критерій Стьюдента [3]. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при p < 0,05.

Результати дослідження та їх обговорення.

Електрофоретичний аналіз препаратів екстрактів ЦПМ, використаних у роботі при забарвленні Кумасі, показав наявність білкових фракцій з молекулярною масою 200, 97, близько 66 і близько 44 кДа незалежно від умов денатурування (рис.1А). Крім цього, виявлено слідову кількість білкових компонентів із молекулярною масою близько 29 кДа, котра погано візуалізується на електрофореграмі через низький вміст. Забарвлення електрофореграм альціановим синім, котре застосовується для візуалізації вуглеводних субстанцій, виявило відсутність домішок ЛТК у препараті ЦПМ. Як позитивний контроль у цих дослідженнях застосований комерційний препарат ЛТК *S. aureus* (рис. 1В).

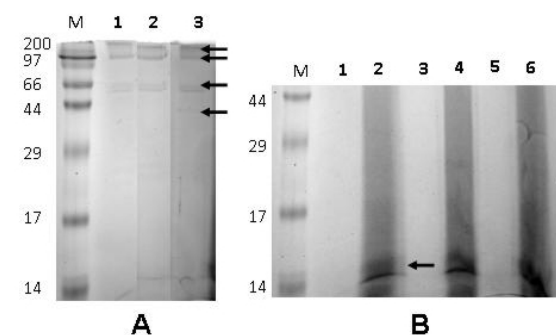


Рис. 1. Характеристика складу екстракту цитоплазматичних мембран *S. aureus* за різних температурних умов денатурації зразка

А – характеристика білкового складу (забарвлення Кумасі): М – маркери молекулярних мас; 1, 2, 3 – денатурація зразка екстракту ЦПМ при 65⁰, 75⁰ і 90⁰С відповідно. В – дослідження вмісту ліпотьохоевої кислоти (забарвлення альціановим синім): 1, 3, 5 – екстракт ЦПМ, денатурація при 65⁰, 75⁰ і 90⁰С відповідно; 2, 4, 6 – ліпотьохоева кислота, денатурація при 65⁰, 75⁰ і 90⁰С відповідно

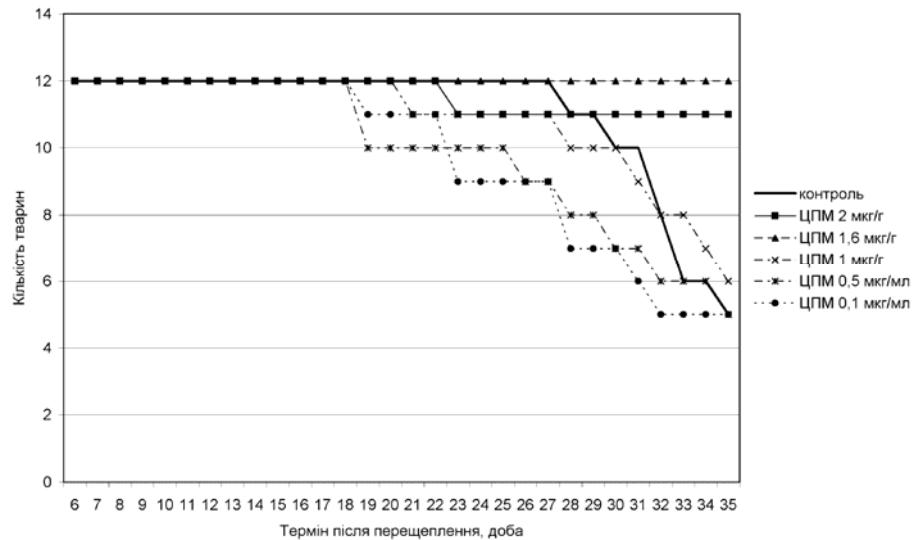


Рис. 2. Тривалість життя тварин з карциномою легені Льюїса, котрим проводили трансплантацію пухлинних клітин у супроводі перипухлинного уведення екстракту цитоплазматичних мембран *S. aureus*. У всіх дослідних групах n=12

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контрольними тваринами-пухлиноносійми

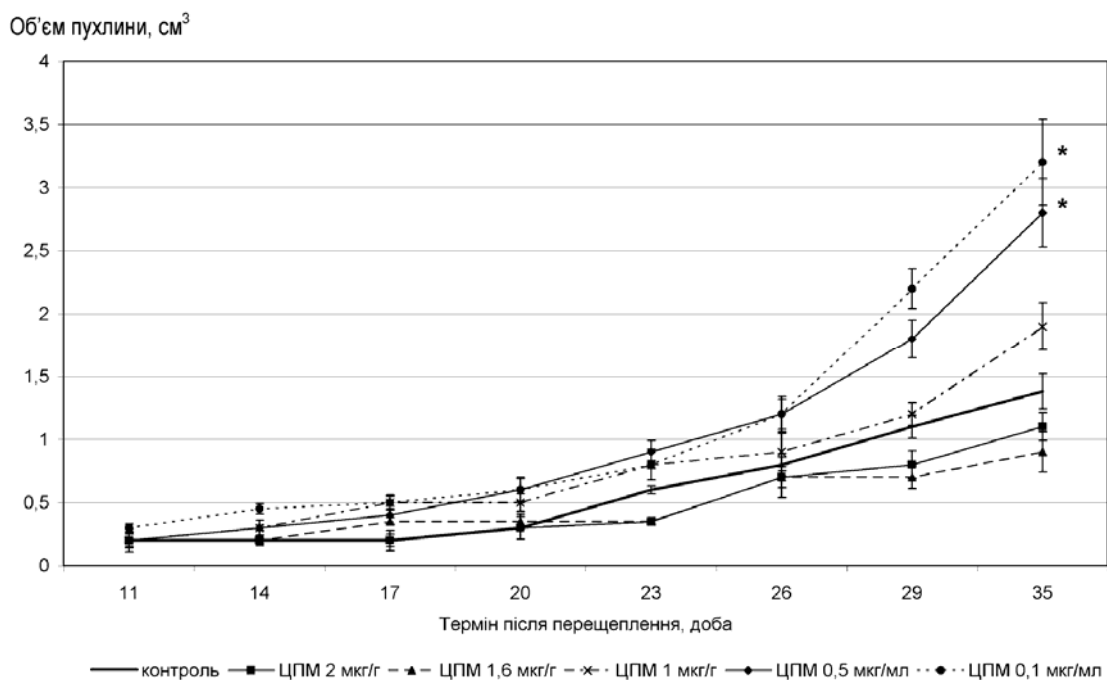


Рис. 3. Динаміка росту карциноми легені Льюїса в мишей, котрим проводили трансплантацію пухлинних клітин у супроводі перипухлинного уведення екстракту цитоплазматичних мембран *S. aureus*. У всіх дослідних групах n=12

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контрольними тваринами-пухлиноносійми

Уведення бактеріальних полімерів проводили одноразово підшкірно в зону трансплантації пухлинних клітин одразу після процедури перещеплення (через 15-30 хв). Така схема досліджу давала нам змогу оцінити динаміку росту трансплантованих пухлин в умовах активованої ПАМП імунної реакції. За відсутності інформації щодо LD_{50} досліджуваного нами препарату ми попередньо визначили цей показник для лінії

мишей C57/Bl6. За результатами наших досліджень він склав 860 мкг/г. Для перипухлинного уведення тваринам після трансплантації пухлинних клітин нами обрано шість доз, які за даними літератури найчастіше застосовуються для різних експериментальних пухлин: 0,1 мкг/г; 0,5 мкг/г; 1 мкг/г; 1,6 мкг/г і 2 мкг/г [7].

Таблиця

Показники метастазування мишей із карциномою легені Льюїса, котрим проводили трансплантацію пухлинних клітин у супроводі перипухлинного уведення екстракту цитоплазматичних мембран *S. aureus*

Група тварин	Кількість мишей без метастазів	Середнє число метастазів у однієї тварини	Індекс гальмування метастазування, %
Тварини-пухлиноносії, яким вводили екстракт ЦПМ у дозі 2 мкг/г, n=12*	0	21,5±4,21	25,9
Тварини-пухлиноносії, яким вводили екстракт ЦПМ у дозі 1,6 мкг/г, n=12	2	15,2±3,04**	47,6
Тварини-пухлиноносії, яким вводили екстракт ЦПМ у дозі 1 мкг/г, n=12	0	27,15±5,85	6,4
Тварини-пухлиноносії, яким вводили екстракт ЦПМ у дозі 0,5 мкг/г, n=12	0	28,9±5,62	0
Тварини-пухлиноносії, яким вводили екстракт ЦПМ у дозі 0,1 мкг/г, n=12	0	38,7 ± 6,14	-34
Контрольні тварини-пухлиноносії, n=12	0	29,0±6,15	-

Примітка. * – визначення ІГМ проводили у 8 тварин, оскільки з 12 тварин, що були в досліді, 4 загинули; ** – $p < 0,05$ порівняно з контрольними тваринами-пухлиноносійми

Як показали результати досліджень, трансплантація пухлинних клітин у супроводі перипухлинного уведення екстракту ЦПМ *S. aureus* у різних дозах по-різному позначилася на тривалості їх життя (рис. 2). Тривалість життя мишей, котрим трансплантували пухлинні клітини в супроводі уведення екстракту ЦПМ у дозах 0,1 та 0,5, була меншою за аналогічний показник у контрольних пухлиноносійв (ІМ СТЖ = 6,1 та – 9,2 відповідно). Натомість, тривалість життя у тварин, котрим вводили екстракт ЦПМ у дозі 1,6 мкг/мл, перевищувала показник контролю (ІМ СТЖ = 6,8). У тварин решти двох груп середня тривалість життя практично не відрізнялася від такої в контрольних пухлиноносійв.

Уведення препарату ЦПМ у різних дозах по-різному позначилося і на динаміці росту карциноми легені Льюїса (рис. 3). Уведений у дозах 0,1; 0,5 і 1 мкг/г препарат ЦПМ викликав прискорення росту первинного пухлинного вузла в мишей-пухлиноносійв. У випадку доз 0,1 і 0,5 мкг/г на момент завершення експерименту розміри пухлин були статистично вірогідно більшими за аналогічні показники в контрольних пухлиноносійв, тоді як у тварин, що отримали препарат у дозі 1 мкг/г, об'єм первинного пухлинного вузла лише незначно перевищував аналогічний показник контрольних тварин із пухлинами. Розміри пухлин у тварин, котрим вводили екстракт ЦПМ у високих дозах (1,6 і 2 мкг/г), були меншими за такі у контрольних пухлиноносійв. Однак вірогідною така різниця була лише за уведення бактеріальних полімерів у дозі 1,6 мкг/г.

Трансплантація пухлинних клітин у супроводі перипухлинного уведення екстракту ЦПМ

позначилася також на процесі метастазування карциноми легені Льюїса (табл.). У тварин, котрим вводили препарат ЦПМ у дозах 1; 1,6 та 2 мкг/г, спостерігалася гальмування системного поширення пухлини, що проявлялося в зменшенні кількості метастазів у легенях дослідних тварин. Однак статистично вірогідним результат був лише у тварин, що отримали екстракт ЦПМ у дозі 1,6 мкг/г. Слід зазначити, що кількісні показники легеневих метастазів у тварин із карциномою легені Льюїса характеризувалися значною індивідуальною варіабельністю. Бактеріальний препарат, уведений у дозі 0,1 мкг/г, викликав посилення процесу метастазування.

Висновок

Вплив одноразового перипухлинного уведення екстракту цитоплазматичних мембран *S. aureus* у момент трансплантації пухлинних клітин на пухлинний ріст мав дозозалежний характер. У низьких дозах бактеріальний препарат ініціював посилений ріст первинного пухлинного вузла і сприяв посиленню метастазування. Застосовані у високих дозах бактеріальні полімери викликали гальмування росту первинного пухлинного вузла і зниження рівня метастазування.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати дають підставу розглядати нефракціонований екстракт ЦПМ *S. aureus* як потенційний чинник для ад'ювантної імунотерапії раку і мотивують необхідність тестувати його ад'ювантні властивості в моно- та комбінованій терапії експериментальних пухлин, а також дослідити механізм пухлиногальмівного ефекту цього бактеріального препарату.

Література

1. Потебня Г.П. Биотерапия рака: достижения и перспективы / Г.П. Потебня, Г.С. Лисовенко // Онкологія. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 237-243.
2. Позур В.К. Гетерогенность бактериальных пептидогликанов / В.К. Позур, Л.А. Михальский // Укр. биохим. ж. – 1995. – № 1. – С. 96-100.
3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
4. Резников О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах / О. Резников // Вісн. НАН України. – 2001. – № 1. – С. 5-7.
5. Мікробіологія: Підручник / М.Г. Сергійчук, В.К. Позур, Ф.І. Вінніков [та ін.]. – К: ВПЦ «Київський університет», 2005. – 375 с.
6. Akira S. Pathogen recognition and innate immunity / S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi // Cell. – 2006. – Vol. 124. – P. 783-801.
7. Adoptive immunotherapy combined with intratumoral TLR agonist delivery eradicates established melanoma in mice / S.M. Amos, H.J. Pegram, J.A. Westwood [et al.] // Cancer Immunol. Immunother. – 2011. – Vol. 60, № 5. – P. 671-683.
8. Cytokine induction by Gram-positive bacteria / C. Draing, S. Sigel, S. Deininger [et al.] // Immunobiology. – 2008. – Vol. 213, № 3-4. – P. 285-296.
9. Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy / N. Goutagny, Y. Estornes, U. Hasan [et al.] // Target. Oncol. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. 29-54.
10. Okuda S. Lipoprotein sorting in bacteria / S. Okuda, H. Tokuda // Annu. Rev. Microbiol. – 2011. – Vol. 65. – P. 239-259.
11. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids / Y.H. Ryu, J.E. Baik, J.S. Yang [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 127-133.
12. Toll-like receptor-4 is expressed in meningiomas and mediates the antiproliferative action of paclitaxel / M.A. Tichomirowa, M. Theodoropoulou, A.F. Daly [et al.] // Int. J. Cancer. – 2008. –

**АДЬЮВАНТНИЙ ЕФФЕКТ ПЕРИОПУХОЛЕВОГО ВВЕДЕНИЯ ЭКСТРАКТА
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН *S. AUREUS* У МЫШЕЙ
С КАРЦИНОМОЙ ЛЕГКОГО ЛЬЮИСА**

Л.М. Сківка, А.Г. Федорчук, В.В. Позур, М.П. Рудик, О.Н. Маланчук, А.Г. Короткий

Резюме. Исследовали влияние одноразового периопухолевого введения нефракционированного экстракта цитоплазматических мембран *S.aureus* одновременно с трансплантацией опухолевых клеточек на рост и метастазирование карциномы легкого Льюиса. Показано, что использованный в дозе 1,6 мкг/г препарат вызывает торможение опухолевого роста (индекс торможения 34,9) и метастазирования (индекс торможения 47,6) экспериментальной опухоли.

Ключевые слова: цитоплазматическая мембрана *S. aureus*, опухолевый рост.

**THE ADJUVANT EFFECT OF A PRETUMOR INTRODUCTION OF *S. AUREUS*
CYTOPLASMIC MEMBRANE EXTRACT IN MICE WITH LEWIS LUNG CARCINOMA**

L.M. Skivka¹, O.H. Fedorchuk², V.V. Pozur¹, M.P. Rudyk¹, O.M. Malanchuk³, O.H. Korotkiy¹

Abstract. The effect of a single unfractionated pretumoral introduction of *S.aureus* cytoplasmic membrane extract was studied simultaneously with tumor cell transplantation on the tumor growth and metastasizing of Lewis lung carcinoma. It has been shown that the use of the preparation in a dose of 1,6 µg/g causes an inhibition of tumor growth (the growth inhibition index is 34,9) and metastasizing (metastasis inhibition index is 47,6) of an experimental tumor.

Key words: *S.aureus* cytoplasmic membrane, tumor growth.

¹Taras Shevchenko National University (Kyiv)

²R.Ye. Kavetskyi Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv)

³Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv)

Рецензент – проф. Р.В. Сенютювич

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 4 (64). – P. 153-157

Надійшла до редакції 18.09.2012 року