

DOI: 10.26693/jmbs03.07.135

УДК 547.787.2 + 535.33/34

Онщенко А. І.¹, Наконечна О. А.¹, Ткаченко А. С.¹,
 Корнієнко Є. М.², Ткачова Т. М.³, Єфімова С. Л.³,
 Рищенко І. М.⁴, Циганков О. В.⁴, Посохов Є. О.⁴

ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН КЛІТИН ЕПІТЕЛІЮ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ НОСА У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГНІЙНИЙ РИНОСИНУЇТ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ

¹Харківський національний медичний університет, Україна

²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

³Інститут скінтиляційних матеріалів НАН України, Харків, Україна

⁴Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Україна

onishchenkoai@ukr.net

У даній роботі було проведено дослідження стану ліпідного бішару цитоплазматичних мембран епітеліальних клітин запаленої слизової оболонки носа хворих на хронічний гнійний риносинусит. Для дослідження був використаний флуоресцентний зонд 2-(2ϕ-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол, молекули якого реагують на зміну фізико-хімічних властивостей мікрооточення. Встановлено, що при хронічному гнійному риносинуситі відбувається збільшення гідратованості мембрани епітеліоцитів слизової оболонки носа в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області жирнокислотних ланцюжків фосфоліпідів, які прилягають до карбонільних груп. Отримані результати дозволяють зробити припущення, що в ході розвитку патологічного процесу в організмі відбувається збільшення гідратації найбільш полярної області цитоплазматичної мембрани епітеліальних клітин слизової оболонки носа: області полярних головок фосфоліпідів.

Ключові слова: епітеліоцити, біомембрана, гнійний риносинусит, флуоресцентний зонд.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Результати, що презентовані у роботі, отримані у ході проведення НДР «Вивчення та моделювання гострих та хронічних патологічних процесів ЛОР-органів для підвищення ефективності їх лікування», № державної реєстрації 0116U004985.

Вступ. Хронічний риносинусит – запалення синоназального тракту, що характеризується обструкцією носових ходів, порушеннями нюху та болем у проекції параназальних синусів [8, 19]. Хронічний риносинусит діагностується коли вищезгадані симптоми тривають щонайменше три місяці. Згідно морфологічних змін, дана хвороба поді-

ляється на дві форми: хронічний поліпозний риносинусит (ХПР) та хронічний гнійний риносинусит (ХГР) [9]. Перша форма характеризується розвитком не-ракових розростань у тканинах носа чи у навколосових пазухах, які мають назву поліпи, у той час як для гнійної форми характерне нейтрофільне запалення без розвитку поліпів [1]. Патогенез обох форм хронічного риносинуситу активно вивчається, однак на даному етапі не існує єдиної загальноприйнятої концепції патогенезу захворювання.

Відомо, що розвиток ХПР та ХГР пов'язаний з бактеріальною та грибовою колонізацією пазух носа та верхніх дихальних шляхів, дефектами епітеліального бар'єру, змінами цитокинового і хемокінового профілів сироватки крові та порушенням їх експресії у тканинах носа та пазух, ремоделюванням позаклітинного матриксу, епітеліально-мезенхімальним переходом, тощо [1, 8, 10, 11]. Однак, особливості стану мембран клітин при хронічному риносинуситі дослідженні слабо, хоча відомо, що цілісність цитоплазматичних мембран необхідна для підтримання бар'єрної функції та життєдіяльності клітин [2]. Зокрема, у попередніх роботах було продемонстровано, що при розвитку як ХПР, так й ХГР спостерігається порушення структури ліпідного бішару мембран еритроцитів [12, 13].

Метою роботи було дослідження стану ліпідного бішару мембран епітеліальних клітин слизової оболонки носа хворих на ХГР за допомогою флуоресцентного зонда 2-(2ϕ-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол (зонд О10), молекули якого нековалентно зв'язуються з мембранами клітин і реагують на зміни мікрооточення.

Матеріали та методи дослідження. Було обстежено 10 хворих на ХГР, що знаходилися на стаціонарному лікуванні в оториноларингологічному

відділенні КЗОЗ «ЦЕНТР ЕМП і МК» м. Харкова. Діагноз верифікували за допомогою клініко-інструментальних методів. Дослідження проводили відповідно до положень Конвенції Ради Європи «Про захист прав людини і людської гідності в зв'язку з застосуванням досягнень біології та медицини: конвенція про права людини та біомедицину (ETS № 164)» від 04.04.1997 р та Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації (2008 г.). Контрольна група складалася з 10 здорових людей з викривленням носової перегородки. Всі пацієнти та практично здорові люди з контрольної групи підписували інформовану згоду на участь у дослідженні.

У хворих на ХГР та представників контрольної групи проводився забір фрагментів слизової оболонки порожнини носа з подальшим виготовленням суспензії епітеліальних клітин.

У даній роботі ми використовували флуоресцентний зонд 2-(2 ϕ -ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол (зонд О1О), який вже успішно застосовувався раніше для дослідження біомембран [14–17].

Вибір флуоресцентного зонда О1О для дослідження мембран епітеліальних клітин слизової оболонки носа обумовлений тим фактом, що флуоресцентні характеристики даного зонда залежать від фізико-хімічних властивостей його мікрооточення, а саме від протонодонорної здатності, полярності та в'язкості мікросередовища [4–7].

У даній роботі ми вимірювали флуоресценцію зонда у суспензіях клітин слизового епітелію синоназального тракту хворих на ХГР та умовно здорових представників контрольної групи, а також у розчині, що не містить клітин (фізіологічний розчин). Вибір клітин для дослідження обумовлений тим, що саме епітеліальні клітини верхніх дихальних шляхів безпосередньо контактують з мікробіомом, віромом та мікобіомом верхніх дихальних шляхів, виконуючи бар'єрну функцію.

Флуоресцентний зонд розчиняли в ацетонітрилі до початкової концентрації 2×10^{-4} моль/л, потім додавали 50 мкл розчину зонда до 2 мл суспензії епітеліальних клітин слизової оболонки носа, а також до 2 мл фізіологічного розчину. Кінцева концентрація зонда у суспензії сягала 5×10^{-6} моль/л. Молярне відношення ліпід/зонд у суспензіях становило 200:1. Вимірювання спектрів флуоресценції проводилось на спектрофлуориметрі «Lumina (Thermo Fisher Scientific)» через 1 годину після додавання зонда до суспензії епітеліоцитів. Спектри флуоресценції зонда вимірювали в області 360–600 нм при ширині щілин монохроматоров збудження і флуоресценції 5 і 5 нм відповідно, і довжині хвилі збудження 330 нм.

Для порівняння цифрових значень флуоресценції зонда, що були отримані у контрольній групі

та у хворих на ХГР, використовували програму «Graph Pad Prism 5» з розрахунком критерію Манна-Уїтні. Числові дані представлені у вигляді медіани та інтерквартильного розмаху. Результати вважались статистично достовірними при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Для даного дослідження мембран епітеліальних клітин слизової оболонки носа хворих на ХГР було застосовано орто-гідроксилохідне 2,5-дифеніл-1,3-оксазолу – флуоресцентний зонд О1О, що є чутливим до змін протонодонорної здатності, полярності і в'язкості мікросередовища [4–7]. На рис. 1 показана очікувана локалізація і орієнтація зонда О1О у ліпідній мембрані. Про локалізацію і орієнтацію зонда судили на основі його флуоресцентних властивостей у ліпідних мембранах [14, 16–18], на основі розрахунків локалізації зонда у ліпідній мембрані методом молекулярної динаміки [18] і на основі його структурної подібності з флуоресцентними зондами з відомою локалізацією у ліпідних мембранах [3]. Зонд О1О локалізується в області гліцеринових залишків фосфоліпідів (ближче до центру ліпідного бішару), в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області жирнокислотних ланцюжків фосфоліпідів, прилеглих до області карбонільних груп (рис. 1).

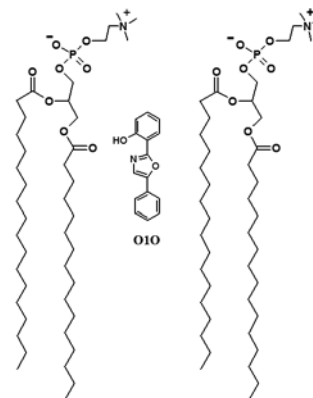


Рис. 1. Очікувана локалізація і орієнтація флуоресцентного зонда О1О у ліпідній мембрані. Для позначення локалізації зонда показані дві молекули фосфатидилхоліну із зовнішнього моношару

Результати вимірювань флуоресценції зонда у суспензіях, що містять клітини епітелію слизової оболонки носа пацієнтів з ХГР та епітеліоцитів контрольної групи, наведені на рис. 2.

Як видно з рис. 2, при розвитку ХГР спостерігаються зміни спектра флуоресценції зонда О1О в порівнянні з відповідним спектром для клітин умовно здорових людей з контрольної групи. При ХГР спостерігаються такі зміни спектра: (а) коротковольовий зсув довгохвильової (~ 465 нм) флуоресценції (флуоресценція фототаутомерної форми

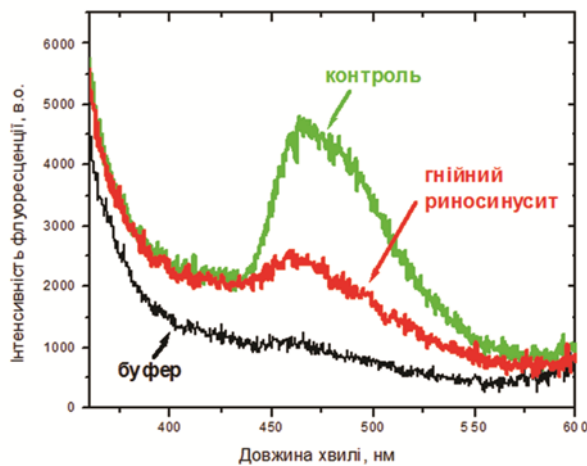


Рис. 2. Спектри флуоресценції зонда O1O у суспензіях, що містять клітини епітелію слизової оболонки носа здорових людей з викривленням носової перетинки (контрольна група); клітини епітелію слизової оболонки носа пацієнта з ХГР (дослідна група); не містять епітеліоцитів (фізіологічний розчин)

зонда [7]) – ця зміна є індикатором збільшення полярності мікросередовища; (б) значне зменшення інтенсивності довгохвильової смуги флуоресценції зонда (на довжині хвилі 465 нм інтенсивність флуоресценції у контрольній групі дорівнювала 4632 [4535; 4797] в.о. на фоні 2418 [2351; 2477] в.о. у хворих на ХГР, $p < 0,0001$), яке в даному випадку вказує на зменшення в'язкості оточення зонда у ліпідній мембрані.

Найбільш імовірною причиною вищезгаданих збільшення полярності і зменшення в'язкості мікросередовища зонда при розвитку ХГР є збільшення гідратованості мембрани епітеліоцитів слизової оболонки носа в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області жирнокислотних ланцюжків фосфоліпідів, прилеглих до карбонільних груп.

Обговорюване збільшення гідратованості перерахованих областей мембрани дозволяє припустити, що ХГР супроводжується збільшенням гідратації більш поверхневої області мембрани, а саме – найбільш полярної області мембрани епітеліоцитів слизової оболонки носа: області полярних головок фосфоліпідів.

Висновки

1. Встановлено, що при ХГР відбувається збільшення гідратованості мембран епітеліоцитів слизової оболонки порожнини носа в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, карбонільних груп фосфоліпідів та жирнокислотних ланцюжків фосфоліпідів, прилеглих до карбонільних груп.
2. Отримані результати дозволяють зробити припущення, що в ході розвитку ХГР відбувається збільшення гідратації найбільш полярної області цитоплазматичної мембрани клітин епітелію слизової оболонки носа: області полярних головок фосфоліпідів.

Перспективи подальших досліджень. Отримані нами дані обумовлюють необхідність дослідження можливих шляхів корекції порушень структури мембран епітеліоцитів слизової оболонки носа для лікування ХГР.

References

1. Chalermwatanachai T, Vilchez-Vargas R, Holtappels G, Lacoere T, Jáuregui R, Kerckhof F, Pieper DH, Wiele TR, Vaneechoutte M, Zele TP, Bachert C. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is characterized by dysbacteriosis of the nasal microbiota. *Scientific Reports*. 2018; 8: 7926. PMID: 29784985. PMCID: PMC5962583. doi: 10.1038/s41598-018-26327-2
2. Choi M-K, Son S, Hong M, Choi MS, Kwon JY, Lee J. Maintenance of membrane integrity and permeability depends on a patched-related protein in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2016; 202(4): 1411-20. PMID: 26857627. PMCID: PMC4905546. doi: 10.1534/genetics.115.179705
3. Dobretsov GE. *Fluorescence probes in cell, membrane and lipoprotein investigations*. Moscow: Nauka; 1989. 277 p. [Russian]
4. Doroshenko AO, Posokhov EA. Proton phototransfer in a series of ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3-oxazole and 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole in polystyrene films. *Theor Exper Chem*. 1999; 35: 334-7. [Russian]
5. Doroshenko AO, Posokhov EA, Shershukov VM, Mitina VG, Ponomarev OA. Intramolecular proton-transfer reaction in an excited state in a series of ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diaryloxazole. *High Energy Chemistry*. 1997; 31(6): 388–94. [Russian]
6. Doroshenko AO, Posokhov EA, Verezubova AA, Ptyagina LM. Excited state intramolecular proton transfer reaction and luminescent properties of the ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole. *J Phys Org Chem*. 2000; 13: 253-65. DOI: 10.1002/1099-1395(200005)13:5<253::AID-POC238>3.0.CO;2-D
7. Doroshenko AO, Posokhov EA, Verezubova AA, Ptyagina LM, Skripkina VT, Shershukov VM. Radiationless deactivation of the excited phototautomer form and molecular structure of ES IPT-compounds. *Photochem Photobiol Sci*. 2002; 1: 92-9. DOI: 10.1039/B107255M
8. Hulse KE, Stevens WW, Tan BK, Schleimer RP. Pathogenesis of nasal polyposis. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2015; 45(2): 328-46. PMID: 25482020. PMCID: PMC4422388. doi:10.1111/cea.12472

9. Oakley GM, Harvey RJ, Lund VJ. The role of macrolides in chronic rhinosinusitis (CRSsNP and CRSwNP). *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017; 17(5): 30. PMID: 28429305. doi: 10.1007/s11882-017-0696-z
10. Onishchenko AI, Lupyr AV, Tkachenko AS, Gorbach TV, Nakonechna OA, Gubina-Vakulyck GI. Epithelial-to-mesenchymal transition and some parameters of extracellular matrix remodeling in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *HVM Bioflux* 2018; 10(3): 128-32.
11. Onishchenko AI, Nakonechna OA, Tkachenko AS, Kalashnik YuM. The content of MCP-1 and MMP-9 in blood serum of patients with chronic polypoid rhinosinusitis. *The Journal of VN Karazin Kharkiv National University. Series "Medicine"*. 2017; 33: 23-6.
12. Onishchenko AI, Nakonechna OA, Tkachenko AS, Kalashnik YuM, Korniyenko YM, Stetsenko SA, Posokhov YO, Doroshenko AO. Investigation of erythrocyte membranes in exacerbation of chronic rhinosinusitis without nasal polyps by the method of fluorescent probes. *Buk Med Bul.* 2018; 22, 1 (85): 79-85. doi: <http://dx.doi.org/10.24061/2413-0737.XXII.1.85.2018.12>
13. Onishchenko AI, Nakonechna OA, Tkachenko AS, Korniyenko YM, Gorbach TV, Bondarenko VA, Posokhov YO, Doroshenko AO. Investigation of erythrocyte membranes in chronic rhinosinusitis with nasal polyps by the method of fluorescent probes. *JMBS.* 2017. 3, 1(10): 169-73. [Russian] DOI: 10.26693/jmbs03.01.169
14. Posokhov EA, Abmanova NA, Boyko TP, Doroshenko AO. Ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3-oxazole and 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole as fluorescent probes for medical and biological research. *Kharkov University Bulletin.* 1999; 454: 188-90. [Russian]
15. Posokhov YeO, Tkachenko AS, Korniyenko YeM. Influence of carrageenan (E 407) on the membrane of enterocytes investigated by fluorescent probes. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine.* 2013; 1(98): 229–33.
16. Posokhov YO. Ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3-oxazole and 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole as fluorescent probes for toxicological study of the cells of olfactory analyzer of rats. *Kharkov University Bulletin. Chemical Series.* 2011; 20 (43): 92-9. [Russian]
17. Posokhov YO. Ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3-oxazole and 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole as fluorescent probes for toxicological investigations of model biomembranes. *Kharkov University Bulletin. Chemical Series.* 2001; 7 (30): 192-94. [Russian]
18. Posokhov YO, Kyrychenko A. Location of fluorescent probes (2-hydroxy derivatives of 2,5-diaryl-1,3-oxazole) in lipid membrane studied by fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulation. *Biophysical Chemistry.* 2018; 235: 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.01.005>
19. Sánchez-Vallecillo MV, Fraire ME, Baena-Cagnani C, Zernotti ME. Olfactory Dysfunction in Patients with Chronic Rhinosinusitis. *International Journal of Otolaryngology.* 2012; 2012: 327206. doi:10.1155/2012/327206

УДК 547.787.2 + 535.33/34

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГНОЙНОМ РИНОСИНУСИТЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Онищенко А. И., Наконечная О. А., Ткаченко А. С., Корниенко Е. М., Ткачева Т. Н., Ефимова С. Л., Рыщенко И. М., Цыганков А. В., Посохов Е. А.

Резюме. В настоящей работе было проведено исследование состояния липидного бислоя мембран эпителиальных клеток воспаленной слизистой оболочки носа больных хроническим гнойным риносинуситом. Для исследования был использован флуоресцентный зонд 2-(2ϕ-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол, молекулы которого реагируют на изменение физико-химических свойств его микроокружения. Установлено, что при хроническом гнойном риносинусите происходит увеличение гидратированности мембраны эпителиоцитов слизистой оболочки носа в области глицериновых остатков фосфолипидов, карбонильных групп фосфолипидов и жирнокислотных цепочек фосфолипидов, прилегающих к карбонильным группам. Полученные результаты позволяют сделать предположение, что в ходе развития патологического процесса в организме происходит увеличению гидратации наиболее полярной области мембраны эпителиальных клеток слизистой оболочки носа: области полярных головок фосфолипидов.

Ключевые слова: эпителиоциты, биомембрана, гнойный риносинусит, флуоресцентный зонд.

UDC 547.787.2 + 535.33/34

A Study of Nasal Epithelial Cell Membrane in Patients with Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps Using a Fluorescent Probe

Onishchenko A. I., Nakonechna O. A., Tkachenko A. S., Korniyenko Y. M., Tkacheva T. N., Efimova S. L., Ryshchenko I. M., Tsygankov A. V., Posokhov Y. O.

Abstract. Chronic rhinosinusitis is characterized by sinonasal inflammation lasting for at least three months. According to its morphological features, there are two types of rhinosinusitis: chronic rhinosinusitis with nasal

polyps (CRSwNP) and chronic rhinosinusitis without nasal polyps (CRSsNP). Despite numerous efforts at elucidating the mechanisms that underlie the pathogenesis of chronic rhinosinusitis, the generally recognized theory of its pathogenesis has not yet been elaborated. In particular, little is known about changes in the state of nasal epithelial cell membranes in patients with CRSsNP.

The purpose of the research was to study the state of membrane phospholipid bilayer in nasal epithelial cells in patients with CRSsNP. We used the 2-(2 ϕ -OH-phenyl)-5-phenyl-1,3-oxazole (O1O) fluorescent probe, which is an ortho-hydroxy derivative of oxazole. Its molecules are sensitive to the changes in the physicochemical properties of their microenvironment.

Materials and methods. Ten patients with CRSsNP were enrolled in our research. Diagnosis was verified and they were treated at Kharkiv Regional Clinical Hospital. Ten conditionally healthy individuals with deviated nasal septum were recruited as control subjects.

All manipulations with patients were performed in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* and *Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine (ETC 164)*. All representatives of both groups signed a written informed consent.

Nasal tissue samples were collected from patients with CRSsNP and control subjects with the subsequent preparation of nasal epithelial cell suspension.

The fluorescent probe 2-(2 ϕ -OH-phenyl)-5-phenyl-1,3-oxazole (O1O) was selected to study the state of membrane phospholipid bilayer in nasal epithelial cells of patients with CRSsNP.

Results and discussion. It was found out that the microenvironment of O1O probe was characterized by a higher polarity and lower viscosity in patients with CRSsNP compared with control subjects. Such changes are indicative of a higher hydration of nasal epithelial cell membranes in the regions of phospholipid glycerol heads and fatty acid chains located near carbonyl groups. Thus, our findings support that CRSsNP is accompanied by an excessive hydration of the most polar region of nasal epithelial cell membranes, namely the region of phospholipid polar heads.

Conclusions. The development of CRSsNP is associated with the increased hydration of nasal epithelial cell membranes. The increase in hydration mentioned above indicates a higher fluidity of membranes in nasal epithelial cells in patients with CRSsNP.

Keywords: epitheliocytes, biomembrane, chronic rhinosinusitis without nasal polyps, fluorescent probe.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 02.09.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування