әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

ӘӨЖ: 576.32/.36:615 Қолжазба құқығында

ЕСЖАН БАНУ ҒАЗИЗҚЫЗЫ

Mcf10A сүт безі клеткаларының энергетикалық метаболизміне Даназол препаратының молекулалық және физиологиялық әсерінің механизмдерін зерттеу

6D060700-Биология

Философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Ғылыми кеңесшілері:
биология ғылымдарының докторы,
профессор Төлеуханов С.Т.,
PhD,профессор Орынбаева З.С.
(Дрексель университеті,АҚШ)

Қазақстан Республикасы
Алматы,2020

МАЗМҰНЫ

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР		4
БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР		5
КІРІСПЕ		6
1	**ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ**	11
1.1	Даназол препаратының құрамы және оның сүт безінің әртүрлі патофизиологиялық жағдайына әсері	11
1.2	Mcf10A (Michigan Cancer Foundation) сүт безі клеткаларына сипаттама	19
1.3	Фиброзды-кистозды мастопатия түрлері мен этиологиялық сипаты	29
1.4	Митохондрия - клетканың энергетикалық орталығы ретінде	45
1.5	Энергетикалық алмасудың реттелуіне гормондардың рөлі	61
2	**ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ**	70
2.1	Зерттеу материалдары	70
2.1.1	Химиялық реагенттер	70
2.1.2	Даназол препаратының дайындалуы	70
2.1.3	Клетка культуралары	70
2.2	Зерттеу әдістері	71
2.2.1	Mcf10A сүт безі клеткаларын культивирлеу, мұздату және еріту әдістері	71
2.2.2	Mcf10A сүт безі клеткаларының морфологиясын бағалау	72
2.2.3	Mcf10A сүт безі клеткаларына даназолдың цитотоксикалық әсерін *Alamar blue* талдамасы арқылыанықтау	73
2.2.4	Mcf10A клеткаларындағы апоптоз процесін анықтау	75
2.2.5	Клетка циклын анықтау	77
2.2.6	Клетканың тотығу-фосфорлану қабілетін өлшеу	79
2.2.7	Митохондрияның мембраналық потенциалын анықтау	80
2.2.8	Жоғары кеңейтілімдегі респирометриялық талдау	81
2.2.9	Тотығу (оксидативті) стресін өлшеу	81
2.2.10	Mcf10A сүт безі клеткаларының цитозольдық кальций деңгейін өлшеу	82
2.3	Нәтижелерді статистикалық талдау	82
3	**ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ**	83
3.1	Даназолдың цитотоксикалық әсері	83
3.2	Даназолдың Mcf10A клеткаларының пролиферациясына әсері	87
3.3	Mcf10A сүт безі клеткаларының тотығу-фосфорлану механизміне даназолдың әсері	91
3.3.1	Митохондрияның мембрана потенциалына даназолдың әсерін бақылау	91
3.3.2	Mcf10A сүт безі клеткаларының тыныс алу қабілетін уақытқа байланысты зерттеу	93
3.3.3	Даназолдың 30мкМ концентрациясын Mcf10A клеткаларына	

пермеабилизация әдістерімен зерттеу 96
3.3.4 Mcf10A клеткаларының тыныс алу мүмкіндіктерін уақытқа байланысты прогестерон қосындысымен зерттеу 100
3.3.5 Даназол концентрацияларының Mcf10A сүт безі клеткаларының тотығу стресіне әсері 102
3.3.6 Даназолдың цитозольдық кальций гомеостазына әсері 106
ҚОРЫТЫНДЫ 108
ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ 109
ҚОСЫМШАА-Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау Министрлігінің Қазақ онкология және радиология ғылыми-зерттеу институтында даназол препаратыныңMcf10A сүт безі клеткаларына әсер ету механизмін зерттеу бойынша енгізу туралы актісі 120
ҚОСЫМША Ә-Оқу процесіне аяқталған ғылыми-зерттеу жұмысын енгізу туралы актісі 121

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР

Бұл диссертациялық жұмыста келесі стандарттарға сілтемелер жасалды:

МЕМСТ 7.32-2001. Ғылыми-зерттеу жұмысы туралы есеп. Құрылымы және дайындау ережелері.

МЕМСТ 7.1-2003. Библиографиялық жазба. Библиографиялық сипаттама. Жалпы талаптар және құрастыру ережелері.

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

АБТ	-	азоттың белсенді түрлері
АҚ	-	амин қышқылдары
АҮФ	-	аденозинүшфосфат
БДҰ	-	бүкіләлемдік денсаулық сақтау ұйымы
ДМСО	-	диметилсульфоксид
ДНҚ	-	дезоксирибонуклеин қышқылы
ҚР БҒМ	-	Қазақстан Республикасының Білім және Ғылым Министрлігі
КЦТФФ	-	карбонилцианид 4-(трифтометокси) фенилгидразон(FCCP)
Mcf10 A	-	michigan cancer foundation
НАД	-	никотинамидадениннуклеотид
НАДН	-	никотинамидадениндинуклеотидтің тотықсызданған формасы
ОБТ	-	оттегінің белсенді түрлері
$O_2^{\cdot-}$	-	супероксид радикалы
$OH^{\cdot}$	-	гидроксил радикалы
ТС	-	тотығу стресі
ФКМ	-	фиброзды-кистозды мастопатия
ФСГ	-	фолликула стимулдеуші гормон
ЭТТ	-	электрон тасымалдау тізбегі

КІРІСПЕ

Зерттеу жұмысының жалпы сипаттамасы.Диссертациялық жұмыс Mcf10Aсүт безі клеткалары энергетикалық механизмінеданазол препаратының әсерін зерттеуге арналған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Фиброзды-кистозды мастопатия әйелдердің60%-ға жуығында кездесетін сүт безінің күрделі патологияларының бірі болып табылады. Фиброзды-кистозды мастопатияның киста түзілу себептері мен молекулалық механизмдері толыққанды зерттелінбеген және тиімді емдеу жолдары кеңінен енгізілмеген [1]. Сонымен бірге фиброзды-кистозды мастопатияның қатерлі ісікке айналу қаупі жоғары деген деректер келтіріледі.

Фиброзды-кистозды мастопатияға ұшыраған науқастар санының артуына байланысты клиникалық зерттеулермен қатар әртүрлі ғылыми-зерттеу жұмыстары көптеп жүргізіле бастады және мұндай жұмыстар әлі де жалғасуда. Осындай зерттеу нәтижесінде қазіргі таңда синтетикалық және табиғи емдік заттардың түрлері көптеп ұсынылуда. Дегенмен олардың бірде біреуі осы уақытқа дейін нақты емдік нәтиже бермей отыр. Ауру сипатының күрделілігімен қатар аурудың пайда болуы да жас талғамайтын сипатқа ие екені анықталған. Фиброзды-кистозды мастопатияның туындау жиілігі 30 жастан асқан соң жоғарылайтыны туралы статистикалық мәліметтер бар.

Фиброзды-кистоздымастопатияныңэтиопатогенетикалық механизмдерінің көптүрлілігін және олардың метаболизм үрдістерінің дамуына да елеулі әсер ететінін ескере отырып, мастопатияны емдеу кезеңдері де бірнеше сатылы болады. Фиброзды-кистозды мастопатия ауруын емдеуде сүт безінің клетка метаболизміне жан-жақты әсері мен гормональды статусын ескере отырып табиғи факторға сәйкес келетін ем жүргізілуі ғана жақсы нәтиже беретіні ұйғарылған[2,3].Дегенмен де кейбір дерек көздерінде аталған сырқаттың жасөспірім қыздар мен бойжеткендер арасында да пайда болу қаупінің жоғарыкөрсеткіші анықталған.Сондықтан да сүт безінің қатерлі ісігінің алғы шарттары аталған сырқаттың асқынуларынан пайда болуы да мүмкін деген болжамдар көптеп кездеседі.

Фиброзды-кистозды мастопатия-әйелдердегі сүт безінің түйін түрінде түзілістермен ерекшеленетін қатерсіз өзгерісі. Аурудың асқыну деңгейлерін анықтау және алдын алу үшін жергілікті емдеу мекемелерінде әйел тұрғындарының жылына екі рет маммолог маманның тексерілуінен өтуін қадағалап отырады[4].

Сүт безіндегі пайда болған кистаның көлемі мен қатерлі ісік ауруына күдік болған жағдайда аспирациялық биопсия жасауды ұсынып, биоптат нәтижесіне қарай қатерлі ісік деңгейін сипаттайды.

Әдетте ауруды бәсеңдету үшін, көп жағдайда, ибупрофен және ацетоаминофен секілді препараттарқабылдайды.Фиброзды-кистозды мастопатия жағдайында сонымен бірге киста көлеміне қарай сұйықтықты

арнайы инелермен сорып алып тастап, ауырсынуды бәсеңдету үшін гормональды препараттар тағайындалады. Солардың бірі-даназол препараты.

Даназолды тұрақты түрде қолданған уақыттар аралығында мастодиния кезінде де сүт безі ұлпаларының гиперплазиясының кішірейгені анықталған.Ал мастопатия түрлерін емдеу барысында андрогендер эстроген антогонисі ретінде қолданылады. Зертханалық жануарларға жасалған тәжірибелерде даназол әсерінің негізінде овариальды стероидогенез кезеңдерінде кейбір эссенциальды энзимдер мен гонодотропты гормонның синтезін төмендететін мүмкіндігі зерттелінген[5,6].

Даназол препараты науқастарға қолданылып келеді, дегенменде жанама әсерлерінің болуына қарай сырқаттар көп жағдайда қабылдаудан бас тартып жатады. Препараттың ағзадан сіңуі және шығарылу жолдары, мөлшері, сақтау мерзімі секілді басты талаптары көрсетілген. Дегенменде клиникада кеңінен қолданыс тапқанымен, клеткалық деңгейдегі әсер ету механизмдері туралы мәліметтер кездеспейді.

Осы мәселелерге орайMcf10A сүт безі клеткаларының энергетикалық метаболизміне әсерін бақылап, зерттеу үшінданазолдың әсері қарастырылды.

Зерттеу материалдары. Зерттеу материалы ретінде фиброзды-кистозды мастопатия сырқатымен ауыратынәйелдерден алынған Mcf10A сүт безі клеткалары қолданылды.

Зерттеу әдістері. Клеткаларды *in vitro*жағдайында өсіру, ағынды цитометрия (*BD Accuri C6),*жоғары дәлдікті респирометрия (*Oroboros Oxygraph-2k*), флуоресцентті спектроскопия (BioTek Synergy 4), микроскопия (*Leica MZ16F,Motic AE2000*), спектрофотометрия (*NanoDrop*), статистикалық талдау әдістері *(GraphPadPrism*) пайдаланылды.

Зерттеудің мақсаты мен міндеттері. Бұл жұмыстың мақсатыMcf10Aсүт безі клеткаларының энергетикалық метаболизміне даназол препаратының әсерінің механизмдерін зерттеу болып табылады.

Мақсатқа жету үшін келесідей негізгі **міндеттер** қойылды:

1ДаназолдыңMcf10Aсүт безі клеткаларына цитотоксикалық әсерін анықтау.

2Даназол препараты әсерінен Mcf10A сүт безі клеткаларында апоптоз процесі дамуының клеткалық механизмдерін айқындау.

3 Mcf10A клеткалары митохондрияларының мембраналық потенциалына және тыныс алу қызметіне даназол препаратының әсерін анықтау.

4 Mcf10Aсүт безі клеткаларына даназолдың әсерінен туындаған тотығу стресін талдау.

5 Mcf10Aсүт безі клеткаларының цитозолінің Ca^{2+} деңгейіне даназол препаратының әсерін зерттеу.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы

Тұңғыш ретданазол препаратының Mcf10A сүт безі клеткаларының энергетикалық алмасуына нақты әсерін бақылау үшін жүйелі зерттеулер жүргізілді.Mcf10A сүт безі клеткаларынаданазол препаратының цитотоксикалық әсері анықталды.

Алғаш ретданазол препаратының әсерінен Mcf10A сүт безі клеткаларының циклын қай фазада тоқталатыны зерттелді.

Mcf10A сүт безі клеткалары митохондриялық метаболизмінің даназол препараты концентрацияларының әсерінен туындаған өзгерістері анықталды. Яғни, даназол концентрациялары митохондрия мембранасы потенциалына, клетканың фосфорлану процесі мен тотығу стресіне әсері алғашқы рет көрсетілді.

Mcf10A сүт безі клеткалары митохондриясы метаболизміне даназолдың прогестерон гормонының рецепторлары арқылы әсер ететіні белгілі болды.

Жұмыстың теориялық маңызы. Фиброзды кистозды мастопатия сырқатымен ауыратын әйелдерден алынған Mcf10A сүт безі клеткаларының механизміне даназолдың 25,3,10 және 30мкМ концентрацияларының клетканың мембрана потенциалына, тотығу стрессіне, клетка тыныс алу мен пролиферациясына әсері анықталды. Даназолдың 10мкМ және 30 мкМ концентрацияларының Mcf10A клеткаларының клетка циклына сай пролиферативтік процессін G_0/S кезеңдерінде тоқтататыны айқындалды және 30 мкМ концентрациясы Mcf10A клеткаларының мембраналық потенциалын 77%-ға дейін төмендеуін тудырды.Сонымен қатар даназол митохондрияның метаболизміне прогестерон рецепторлары арқылы әсер ететіні анықталды.

Жұмыстың практикалық құндылығы. Mcf10A сүт безі клеткаларының энергетикалық алмасуына әсер ететін даназол препаратының ерекше механизмдері, практикалық медицинаның маммалогия саласындағы сүт безінің функцияларының бұзылысында емдік мақсатта рөл атқарады. Тәжірибелік зерттеу барысында Mcf10A сүт безі клеткаларының фиброзды-кистозды мастопатия сырқаты барысындағы патологиялық өзгерістерінде клеткалық деңгейде толыққанды зерттелініп, жақпай май ретінде қолдануға болады деген тұжырым жасалынды. ҚР Денсаулық сақтау Министрлігінің Қазақ онкология және радиология ғылыми зерттеу институтында даназолдың әртүрлі концентрацияларының тиімділігін байқау үшін *in vitro* жағдайында цитотоксикалық зерттеу әдістерін қолдану практикалық маңызды жаңа әдістемелер ретінде ұсынылды (2018 жылдың 8 қарашадағы № 27 енгізу актісі (Қосымша А).

Зерттеу нәтижелері әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, биология және биотехнология факультетіндегі «Биология» мамандығы, 2 курс студенттері үшін «Жануарлар физиологиясы негіздері» оқу курсының бағдарламасына дәріс ретінде енгізілді (Оқу процесіне аяқталған ғылыми-зерттеу жұмысын енгізу туралы актісі, 2018 жылдың 24 қазанындағы №3 хаттамасы - Қосымша Ә).

Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар

1. Mcf10A сүт безі клеткаларына даназол препаратының цитотоксикалық әсері оның концентрацияларымен байланыстылығы көрсетіледі.

2. Даназол препараты концентрациялары Mcf10A сүт безі клеткаларында апоптоз процесін тудырады.

3. Даназол препаратының Mcf10A сүт безі клеткалары пролиферациясын тежегені анықталды.

4. Mcf10A сүт безі клеткалары тотығу-фосфорлану процесінде, клетканың тыныс тізбегіне даназолдың әсері бар екені көрсетілді.

5. Даназол митохондриялардың метаболизміне прогестерон рецепторлары арқылы әсер ететіндігіанықталды.

6. Фиброзды-кистозды мастопатияны емдеу үшін даназолды жергілікті әсер беретін емдік мақсатта қолдануға болатын препарат ретінде ұсынылды.

Тақырыптың зерттеу деңгейі. Диссертациядағы зерттеу жұмыстары физиологиялық, клеткалық және молекулалық деңгейде орындалды.

Жұмыстың ғылыми зерттеу бағдарламасымен байланыстылығы.Бұл диссертациялық жұмыссүт және қуық асты безінің қатерлі ісігі құрылымын зерттеуге бағытталған«*Cornelius Beukenkamp*»(2013-2016) және «Mary DeWitt Pettit Fellowship»(2013-2016) фондтарының қолдауымен Дрексель университеті, хирургия кафедрасының митохондриялар патофизиологиясы зертханасында жасалды(ғылыми жобаның жетекшісі Дрексель Университетінің профессорыЗ.С.Орынбаева). Сонымен қатарәл-Фараби атындағы ҚазҰУ-нің Биофизика және биомедицина кафедрасының «Биофизика және биомедицинаның өзекті мәселелері» (ғылыми жетекшісі профессор С.Т.Төлеуханов) атты инициативтік тақырыбы бойынша орындалды.

Қорғауға ұсынылатын ғылыми жұмыс нәтижелерінің жинақталуына диссертанттың жеке үлесі. Диссертациялық жұмыстың барлық нәтижелері автордың жеке қатысуымен орындалды. Жұмыстың авторы зерттеу нысанын және концепциясын таңдауда, жұмыстың мақсатын анықтап, зерттеудің міндетін қоюда,сонымен қатар, тәжірибелердің орындалуын жоспарлауда, алынған мәліметтерді жинақтап, өңдеп-талдауға өз үлесін қосты.

Зерттеу нәтижелерін сынақтан өткізу және енгізу.Зерттеу нәтижелері және диссертациялық жұмыстың негізгі қағидалары төмендегідей халықаралық және республикалық конференцияларда баяндалды және талқыланды:

-«Фараби әлемі» студенттер мен жас ғалымымдардың халықаралық ғылыми конференциясы (2017, Алматы, Қазақстан);

- Халықаралық ғылыми-практикалық конференция «Экологиялық генетика мен экспериментальды биологияның өзекті проблемалары» (2017, Алматы, Қазақстан);

-Халықаралық ғылыми-практикалық конференция «Актуальные вопросы медицины» (2018,Баку, Азербайджан);

-XVIIIХалықаралық ғылыми-практикалық конференция «Advances in Science and Technology» (2019, Мәскеу, Ресей);

- Халықаралық ғылыми конференция «Тенденции и перспективы развития науки и образования в условиях глобализации»(2019,Киев,Украина);

-«Фараби оқулары» студенттер мен жас ғалымымдардың халықаралық ғылыми конференциясы (2019, Алматы, Қазақстан).

Басылымдар. Зерттеу жұмысының нәтижелері 13 ғылыми еңбекте жарияланды, оның ішінде 1 мақала *Tomson Reuters* және *Scopus* базасында, 4

мақала ҚР БҒМ саласындағы бақылау Комитеті ұсынған басылымдарда;8 тезис шет ел және халықаралық-республикалық конференция материалдары жинақтарында жарық көрді.

Диссертацияның құрылымы. Диссертациялық жұмыс 122 мәтіндік беттен тұрады және нормативтік сілтемелер, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері,зерттеу нәтижелері және оларды талқылау,қорытынды, 156 пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады, құрамында 22 сурет, 4 кесте және 2 қосымша бар.

1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

1.1 Даназол препаратының құрамы және оның сүт безінің әртүрлі патофизиологиялық жағдайына әсері

Даназол-гипофиздан гонадотропиннің бөлінуін тежейтін гипофиз қосалқысы ретінде антигонодотропты және антиэстрогенді белсенділігі басым синтетикалық стероид болып табылады.Даназолдың сонымен қатар, андрогенді қасиеті де бар. Даназол эндометриозды және сүт бездерінің қатерсіз ісіктерін емдеуде кеңінен қолданылады.Даназол-андроген. Оның әсер ету механизмі андрогенді рецептордың антогонисі ретіндегі қызметіне негізделген.Даназолды химиялық жіктелуі бойынша андростан деп те қарастырылады. Ол-этинил тестостероннан бөлініп алынған синтетикалық андроген. Сонымен қатар даназол гипофиздің фолликуланы стимулдейтін секрециясы төмендеуі есебінен эстрогеннің бөлінуін азайтады және жыныс гормондарының нысана ұлпалардағы рецепторылармен байланысып,антиэстрогендік,анаболикалық және әлсіз андрогенді әсер береді[7,8].

Даназолды қолдануға ұсыныс жасаған кезде оның бірнеше аналогтарын да ұсынады, олар:

Азол	Данол
Цикломен	Дановал
Данатрол	Лагодал
Даназол	Норсиден
Данаокрин	Панакрин

Даназол модифицирленген тестостеронның синтетикалық этистерон туындысы болып табылады. Дәрілік препараттың эндометриозды емдеу бағытында арналып, АҚШ-ның тағам мен дәрі-дәрмекті бақылау басқармасымен мақұлданған болатын, бірақта оның эндометриозды емдеудегі рөлі белгілі бір деңгейде гонадотропин-рилизинг гормондарының антогонистерімен алмастырылды.

Гонадотропиннің ингибиторы ретінде даназол гипофизарлы гонадотропин өндірілуін тежейді. Сонымен бірге фолликула стимулдеуші және лютеиндеуші гормондар өндірілуін тежеп, гипофизарлы гонадотропиннің шығуын баяулатады.Сонымен қатар, даназолдың негізгі механизмдерінің бірі, стероидогенез процесін басып андрогендермен байланыстырады,прогестерон мен глюкокортикоидты рецепторлармен,жыныс гормондарын глобулиндермен байланыстырып, прогестеронның метаболизмі жылдамдығын жоғарылатады.

Эндометриоздың регрессиясы әсерін басатын тағы бір механизмі әртүрлі топқа жататынантидене инфекциясына талдама жасайтын иммуноферменттік талдама арқылы IgG, IgM және IgA концентрацияларын азайту және ол аутоантидене мен фосфолипидтерге де байланысты.

Эндометриозды даназолмен емдеу нәтижесінің барысында аналық жыныс клеткалары қызметінің белсенділігін тежеу үшінқалыпты және эктопиялық ұлпалар белсенділігі төмендеп, атрофияға ұшырай бастайды. Бұл өз кезегінде аменореяға әкеліп, ановуляция үдерісін тудырады

Сүт безінің фиброзды-кистозды патологиялары сырқатында даназол препаратының механизмдері толыққанды зерттелмеген. Дегенменде аналық жыныс клеткаларындағы эстроген стимуляциясы нәтижесінде сипатталады. Сонымен даназолдың бірге сүт безінің ұлпаларының стероидты рецепторларына тікелей әсер етуімүмкін деген тұжырымдар да бар.Бұл дегеніміз, етеккір циклының тежелуімен сипаттала отырып, ауырсынулардың бәсеңдеуімен қатар түзілген түйінді түзілістердің қалпына келуіне ықпал жасайды [9,10]. Нәтижесіндеданазол С1 эстераза ингибиторлары жеткіліксіз сарысулы концентрациясының ұлғаюынан негізгі биохимиялық жеткіліксіздікті түзейді де С4 концентрациясының жоғарылауына алып келеді.

Даназол препараты өз кезегінде антиэстрогенді белсенділікке ие және әлсіз андрогенді қасиеттері бар синтетикалық стероид болып табылатынын жоғарыда айтқан болатынбыз. Даназол эндометриядағы эстроген мен прогестерон гормондарының қызметін төмендетіп, эндометрия атрофиясына,кейбір сырқат әйелдерде етеккірдің тоқтауына да алып келеді. Дегенменде даназолдың ұзақ уақыт бойы қабылдаудан кейін әсер ететін ескеретін болсақ, көп жағдайда жанама әсерлері болғаны да тіркелген. Аталған препараттың анаболикалық стероидты станазолмен байланысына орай қолданылуы күмән тудыруда.Даназолдың фармакологиялық қасиеттерінің бірі гонодотропты гормондардың өндірілуін тежейді деп жоғарыда айтқан болатынбыз.

Ерлер мен әйел адамдардың гипофиз безіндегі лютеин және фолликула стимулдеуші гормондар өндірілуін тежейді. Эстагенді және гестагенді белсенділігі төмен және әлсіз анаболикалық эффектілі андрогенді белсенділігі бар. Сонымен бірге қан плазмасындағы 17β-эстрадиол деңгейінің азаюына және овуляцияның ингибирленуіне әкеледі. Даназолмен емдеуді тоқтатқаннан соңовуляция үдерісінің реттелуі 5 аптаның ішінде лютеин және фолликула стимулдейтін гормондарды қалыпты мөлшерде қатысады[11].

Ағзадағы метаболизміне келетін болсақ абсорбциясы асқазан-ішек жолында жүреді. Бауырда метаболизмге ұшырайды және негізгі метаболиті -2-гидроксиметилтестостерон болып табылады. Сіңуінің толық мерзімі 4,5 сағатты құрайды.

Даназол препараты қолданысқа енгелі ширек ғасырдан астам уақыт өтсе де маңыздылығын жойған жоқ. Химиялық сипаттамасы тұрғысынан,17а-этинилтестостерон туындылары.Яғни, даназол (danazol). 17а -прегна-2,4-диен-20-ино (2,3-) изоксазол-17-ол.

Даназолдың әсер ету механизмін қарастыратын болсақ, гестогенді және андрогенді рецепторлардың парциалды агонисі болып табылады. Яғни, ол осы гормондарға бос рецепторлардың белсенділігін қамтамсыз етеді. Дегенмен де, эндогенді гормондармен сәйкес келген кезде рецепторлармен байланыста болады және тежеуші әсер етеді.Қалыпты жағдайда гонадотропин өнімдерінің

реттелуі кері байланыс механизмі түрінде жүреді. Гонодотропты гормондар әсерінен жыныс гормондары түзіледі, олар өз кезегінде гипофиз бен гипоталамустың беткі қабатындағы рецепторлармен байланысады және гонадотропиндер мен гонадолибериндердің секрециясы мен синтезін тежейді. Жыныс гормондарының концентарциясының төмендеуі кезінде гипофиз және гонадотропин рецепторлары босайды және гонодотропты гормондардың әсері қайтадан жоғарылай бастайды[12,13].

Даназол гипофиз және гипоталамустың беткі рецепторларымен байланысқа түсіп,осы рецепторларды белсендендіреді. Нәтижесінде жоғары секрециялы гонодолиберин және гонодотропты гормондардың мөлшері азаяды. Сонымен қатар тағы бір ерекшелігі даназолдың перифериялық нысана мүшелердің (репродуктивті жол) беткі рецепторларына әсері болмайды. Даназол гонодотропты гормондардың қалыпты жағдайдағы секрециясына да кері әсер етпейді.

Даназолдың фармакологиялық әсеріне тоқталар болсақ,ол жүйелі түрде 60-90 күн қабылданатын болсафолликула стимулдейтін және лютеинді гормондардың патологиялық жоғары деңгейін тиімді түрде төмендетеді.Сонымен қатар, жыныс бездерінің функциясын тежейді. Бұл әсердің екі жақты сипаты бар. Бірі, гонадотропині гормондардың деңгейінің төмендеуімен байланысты болса, екіншісі стероидогенездің тікелей әсеріне байланысты. Даназол 17a-гидроксилаза, 21-гидроксилаза, 11b-гидроксилаза секілді жыныс стероидтары синтезінің соңғы деңгейлерін түзетін ферменттердің белсенділігін төмендетеді.Сол сияқты,даназол стероидогенездің соңғы ферменті P_{450SCC} белсенділігін тежейді де, нәтижесінде глюкокориткостероидтардың да, прогестерон мен андрогеннің де деңгейінің төмендеуіне әкеледі. Даназол метаболиті-этистеронның әлсіз гестогенді және андрогенді әсерге және эндомериоидты тканьдердің дамуы мен өсуін тежей отырып, қалыпты эндометрияның атрофиясын тудырады[14,15].Брутто формула бойынша ол $C_{22}H_{27}NO_2$ деп сипатталады.

Клиникада даназолды эндометриоз,сүт безінің жаңа түзілісі (соның ішінде фиброзды-кистозды мастопатия), меноррагия,етеккір алды синдромы кезінде, ерте жыныстық жетілу және гинекомастияда кеңінен қолданады[16,17].

Әдебиеттерге шолу жасай отырып, фиброзды-кистозды мастопатияға ұшыраған репродуктивті жас кезеңдеріндегі әйелдерде толыққанды ем жүргізілмес бұрын, ультра дыбысты зерттеу немесе маммография және диагностикалық пункция жасалынады. Әйелдерде сүт безі өте сезімтал және стресске бейім мүше болып есептелінеді. Сондықтан патологиялық процестер барысындағы ауырсынулар мен қатар психоэмоциональды стрестер де байқалуы сырқатқа тән белгілер болып табылады.

Кешенді емге көшпес бұрын гормонды емес терапия қолданылады. Яғни тамақтанудың реті қатаң қадағаланады. Себебі көптеген ғылыми зерттеулер барысында, метилксаптинді пайдалану мен фиброзды-кистозды ауру арасында тығыз байланыс бар деген қорытынды жасалынады. Аталған қосылыстар фиброзды ұлпа және кисталарда сұйықтықтың жинақталуы мүмкін деген

түсінік береді. Метилксаптин құрамдас тағамдық өнімдер кофе,шай,шоколад, кола өнімдерінде көптеп кездеседі.Сондықтан фиброзды-кистозды мастопатияны емдеудің алғышарттары емдәмнің қатаң қадағалануынан басталуы керек деп ғалымдар нұсқама береді.

Сонымен қатар, витаминді,зәр айдайтын, қан айналымын жақсартатын емдік іс-шаралар мен қатар негізгі ем түрі-гормональды ем қолданылады.Даназолды тұрақты түрде қолданған уақыттар аралығында мастодиния кезінде де сүт безі ұлпаларының гиперплазиясының кішірейгені анықталған.

Ал мастопатия түрлерін емдеу барысында андрогендер эстроген антогонисі ретінде қолданылады. Зертханалық жануарларға жасалынған тәжірибелерде даназол әсерінің негізінде овариальды стероидогенез кезеңдерінде кейбір эссенциальды энзимдерінің және гонодотропты гормонның синтезін төмендететін мүмкіндігі зерттелінген.

Даназолды 3 ай көлемінде 100-250 мг мөлшерде қабылдау шегі тағайындалады. Терапиялық әсері 2/3 жағдайда обьективті түрде сүт безі тканьдерінің рентгендік көрсетікштерінде тығыздығының тегістелгені, макроциттің қайталанбалы түзілісінің тежелгені анықталады. Сондықтан да даназолды қабылдаған кездегі жағымсыз әсерлерге себорея, гирстуизм, дауыстың өзгеруі айқындау болып табылады. Сонымен қатар, ұйқысыздық, құрысулар кездеседі[18,19].

Кейбір деректерде, фиброзды-кистозды мастопатия қатерлі ісіктің бастапқы күйінің кезеңдері деген ғылыми тұжырымдамалар зерттелініп, анықталуда. Бұл түсінік морфологиялық сипатқа ие. Сондықтан карционманың пайда болуымен және эпителийдің ішкі түтік аралық атипті өсінділеріндегі өзгерістерді де жатқызуға болады.

Төмендегі көрсетілген белгілер байқалған жағдайда арнайы маманға тексерілу ұсынылады:

- сүт безінің терісінде немесе тканьдерінде түйін пайда болғанын байқаған жағдайда;
- сүт безінің ұштарында ойық жара тәріздес жарақаттардың пайда болуы кезінде;
- сүт безі ұлпаларының ісінуі және ауырсынуы кезінде;
- сүт безінің формаларының өзгеруі барысында;
- терінің қызаруы мен қатты ауырсынулар байқалғанда және т.б.

Кез-келген препараттық өнімді қолданған кезде қосымша әсерлері болатынын да білеміз. Даназолдың қарсы көрсетілімі,порфирия(аурудың тереңдеу мүмкіндігі), сүт безінің қатерлі ісігі, андрогенге тәуелді ісіктер, жүрек қызметінің жеткіліксіздігі және жүктілік кездерінде қолдануға тиым салады.

XX ғасырдың соңына қарай миелодиспластикалық синдром терапиясында андрогендер кеңінен қолданыла бастады.Солардың ішінде синтетикалық препараттардың бірі болып, даназол ұсынылды. Миелодиспластикалық синдром кезіндегі андрогендердің толыққанды механизмі белгісіз. Даназолды қолданған кездегі әсер ету механизмдерінің көрсеткіші бойынша цитопения

компонентіндегі аутоиммунды жағдайдағы иммунодепрессивті әсері анықталған[20].

Сонымен қатар бақылаулар нәтижесінде, моноциттердің Fcγ-рецепторларының синтезінің азайғаны байқалады. Нәтижесінде, моноциттердің антиденелермен өзара әрекеттесуінің төмендеуі анықталған даназол механизмінің тағы бір ерекшелігі TNF-а синтезін ингибирлейді[21].

Сонымен бірге, эндометриальды және эндометриойдты ұлпаларда даназол прогестерон және андроген рецепторларымен байланысып,клетка полиферациясы мен атрофиясын тежейді. Бұл процес эндометриозды емдеу барысында анықталған. Препаратты қолданудың қалыпты мөлшері тәулігіне 800мг-нан 4 ай бойы қабылдануы тиіс. Дегенмен де, андрогендік және әлсіз метаболикалық жанама әсерлеріне байланысты емделушілер үшін тиімділігі аз болған.

Алданазолды жатыр миомасы кезінде қолдану алғаш рет 1983 жылы қолға алынған. Ультрадыбысты зерттеулер нәтижесі барысында миома мөлшерінің азайғаны тек 3 ай мерзім өткеннен кейін байқалған. Нақты нәтижелері жарияланбағандықтан даназолдың тиімділігі белгісіз болып отыр. Ғылыми зерттеу жобаларының бірінде даназолдың 400мг мөлшерінен 4-6 ай бойы 164 науқасқа және бусерелин препаратын 900 мкгинтерназальды түрде осы мерзім аралығында 83 науқастағы жатыр миомасы кезінде қолданып тәжірибе ұсынылған. Нәтижесінде даназолға қарағанда бусерелин препаратының жатыр миомасының мөлшерін азайтуда әсері даназолмен салыстырғанда жоғары болғаны анықталды. Пайыздық мөлшері бойынша айтар болсақ, 76 және 57 % көрсеткен. Эстрадиол және прогестеронның сарысу концентрациясы да даназолмен салыстырғанда бусерелин қабылдағандарда төмен екені анықталған[22,23].

Осындай мәліметтермен, даназол препаратының құрамы, әсер ету механизмдеріне сай әдеби деректерге шолу жасай отырып, фармакологиялық маңызы да қарастырылды.Даназол антигормональды препарат ретінде протеиннің бөлінуін үдетеді де андрогенді әсер етеді.Даназол капсула түрінде шығарылады және пластикалық ыдыста сақталады.

Препараттың фармакологиялық әсері жоғарыда айтылды.Дегенмен толықтыра айтар болсақ, ол эндометрия ұлпаларының атрофиясын туғызады, пролиферацияны бәсеңдетеді.Бірақта осы үрдістің толық түсіндірмесі туралы мәліметтер жоқтың қасы. Даназол препаратын жүктілік және бала емізу және порфирия кезінде қолдануға болмайтыны қатаң ескеріледі.

Әдеби мәліметтерде порфирияқан мен ұлпалардағы жоғары мөлшерде порфиннің болуымен сипатталатын пигментті алмасу бұзылуының тұқымқуалаушылық күрделі бұзылысы екендігі көрсетіледі[24].

Сонымен қатар,қант диабеті, жүректің және бауыр мен бүйректің бұзылыстарында қолдану қатаң талап етіледі[25,26]. Жанама әсерлеріне тахикардияның туындауы, артериялық гипертензия, асқортыу жолдарының патологиялық өзгерістері-холестатикалық сарғаюы, бауыр ферменттерінің

көбеюі, жүйке жүйесі қызметінде ұйқының бұзылуы, жалпы әлсіздік, тремор,бас айналу секілді үдерістерді туындатады.

Қолданудағы тағы бір негізгі ерекшеліктері аталған препаратты антикаогулянттар мен құрысуларға қарсы дәрі-дәрмекпен қоса қабылдау ескеріледі. Өйткені даназол осы үдерістердің қызметін күшейтеді.

Даназол химиялық құрылымы жағынан гипоталамофитозгонадальды білікті ингибирлейтін стероидты изоксазол болып табылады. Кейбір зерттеулер барысында лабораториялық жануарларға ішке қабылдатқанда антиэстрогенді әсер етіп, антикортикоидты белсенділігі төмен болғаны анықталған[27].

Сонымен бірге даназолдың анаболикалық белсенділікті баяу андрогентәрізді әсері де бар екені белгілі. Аталған препараттың фармакологиялық белсенділігі физиологиялық әсері-мен қатар гормональды маңызына қарай зерттелінген.Даназолдың гипоталамо-гипофиз және гонадальді жүйеге әсері.Даназолдың эндокринді әсерін анықтау барысында жүргізілгенбірқатар зерттеулерде егеуқұйрықтарға тері астына енгізілген жағдайда гипофизарлы-гонодотропты әсері байқалған. Зерттеулер барысында даназол экзогенді гонадотропин әсерін баса алмаған. Аталған дәрілік препаратты жануарларға қолдану арқылы жүргізілген тәжірибелер барысында егеуқұйрықтар мен маймылдарда лютеиндеуші гормондар мен фолликуластимулдеуші гормондарды ингибирлегені анықталған[28].

Ұрғашы егеуқұйрықтарға перроральды түрде енгізген жағдайда етеккір циклының төмендеуі мен тежелуі даназол әсерінен байқаған[29].

Биотрансформация ағзадағы органикалық қоспаларды синтездеуге қатысатын негізгі үдерістердің бірі болып табылады. Стереоселективті синтез барысында биосинтездерді қолдану химиялық синтезбен қатар жоғары қасиетке ие. Көп жағдайда микробты себінділер биокатализ ретінде кеңінен қолданылады. Өйткені микробты себінділер көптеген химиялық реакцияларды катализдейтін ферменттерден және тотығу, гидрооксилдеу, қалпына келтіру секілді реакциялармен ерекшеленеді. Биокатализдік реакциялар, тиімді әрі экологиялық тұрғыдан таза болып келеді. Биокатализдер ретінде саңырауқұлақтар да микробты үлгі ретінде пайдаланылады.Стероидтарды стереоселективті гидроксилдеуді әртүрлі себінділерді саңырауқұлақтармен жүргізілген болатын. Осы орайда алынған даназолдың химиялық құрамы гетероциклды стероидты дәрілік препарат болып табылады. Бұл 17α-этинилтестостеронның синтетикалық аналогы болып саналады. даназол эндометриядағы ісік клеткаларының өсуі мен инвазивті белсенділігін басады. Сондықтан эндометриозды емдеу мен гипофизарлы гонадотропин әсерін басу үшін перроральды қабылдау тиімді. Сонымен қатар ол ертежыныстық жетілумен қатар фиброзды- кистозды мастопатияны емдеудің тиімділігі жоғары препараттардың бірі болып есептелінеді[30].

Қатерлі ісіктер адам өліміне алып келетін бірден бір себептердің бірі. Көптеген қатерлі ісікке қарсы доксорубицин секілді заманауи химиялық препараттар жоғары токсикалық құрамды болып ДНҚ механизмдерін зақымдауға негізделген. Көптеген препараттардың әсерінің жоғарылығына

қарамастан қатерлі ісік клеталарының дәріге төзімділігі де жоғары болып отыр. Дегенмен де қатерлі ісікке қарсы гормональды терапия ДНҚ зақымдалуына байланысты емес түрінде әсер етуде.Осы орайда жатыр мойынының қатерлі ісігі кезінде алынған HeLa клеткалар линиясына жүргізілген тәжірибелерде химиялық қосылыстардың қатерлі ісіктерге қарсы потенциалын анықтау ретінде қолданылған болатын. Осы тәжірибелер барысында даназолперроральды қолдану барысында өте жақсы цитотоксикалық әсер көрсеткен[31-33].Биологиялық стероидты қоспалардың биотрансформациясын бағалауда жүргізілген бұл тәжірибелерде даназолға үш түрлі метаболит қолданылған.

Даназолдың қарсы көрсетілімдері және жанама әсерлері. Қандайда бір химиялық қоспа 2-гидроксиметилтестостерон болмасын, кез келген дәрілік препараттар, синтетикалық қоспаларда қарсы көрсетілімдер болады. Зерттеу жұмыстарымызда қарастыратын даназол препаратының қарсы көрсетілімдері бауыр және бүйрек, жүрек, порфирия, тромбоэмболиялық бұзылыстар, андрогенге тәуелді ісіктер туындауы, жатыр ішілік қан кетулер, жүктілік және бала емізетін кезеңдерде қабылдауға қатаң тиым салынады.

Сол сияқты, бүйрек және бауырында сырқаты бар науқастарға, артериялық гипертензиясы, қант диабеті, эпилепсия, май алмасу үдерісінің бұзылысы т.б. жағдайларда қабылдау барысында қатаң қадағалауды талап етеді. Ал, балалар мен қарт адамдарға және жүкті мен бала емізетіндерге қабылдауға болмайды[34].

Эндокринді жүйе тұрғысынан жанама әсерлеріне аменорея, капиллярлардың жарылуы, тершеңдік, сүт бездері көлемінің кішіреюі, либидо өзгерісі, вагинит, ашушаңдық, акне, май бездерінің секрециясының ұлғаюы, гирсутизм, ісіктер, дене салмағының артуы, дауыстың жуандауы, андрогенді аллопеция, сперматогенез бұзылысы және тағы басқалар жатады.

Асқорыту жүйесінің тұрғысынан туындайтын жанама әсерлерге ас қорыту жүйесінің бұзылысы, бауыр ферменттерінің белсенділігі, холестериндік сарғаю туындаса, жүйке жүйесінің жұмысының өзгеруіне әкелетін жанама әсерлерге бас ауруы, бас айналу, тремор, депрессия, әлсіздік, ұйқының бұзылуы, бас қаңқасы ішіндегі сұйықтықтың қысымының өзгеруіне алып келетін үдерістерді жатқызамыз.

Қан жасайтын жүйелерге қызметіне қарай жанама әсерлеріне қарай қан клеткаларының азаюы немесе көбеюі жатады.

Даназолдың тері жабындыларына жанама әсеріне терінің беткі қабатындағы әртүрлі бөртпелердің пайда болуы жатады[35].

Ал даназол препаратын қабылдаған әйелдердегі зат алмасу жүйесіндегі туындаған жанама әсерлергегиперглюкагонемия, глюколизға тәуелділіктің бұзылуы, холестерин сарысуы концентрациясы мөлшерінің көбеюі және тағы басқаны жатқызуға болады.

Жүрек-қан тамырлары жүйесінің жанама әсерлеріне тахикардия, артериальды гипертензия жатады. Сол сияқты сирек те болса, бұлшықет

спазмы, арқа бұлшықеттерінің ауырсынуы, құрысулар және көру жүйесінің уақытша нашарлауы туындайтын жайттар да кездеседі.

Даназолды қабылдау тәртібінде тәулігіне 800 мг-нан аспауды қатаң ескертеді[36].

Даназолдың жүктілік кезеңдерінде әйелдердегі өздерінің жүкті екенін білмей тұрып қабылдаған жағдайында үнемі дәрігердің қадағалануында болып, құрсақтағы нәрестенің пренатальды даму кезеңдері де бақылауда болуы керек.

Ғылыми зерттеулер бойыншаданазолды пероральды қабылдаған жануарларда эмбриотоксикалық және тератотоксикалық әсерлер адамдарға беретін мөлшермен қарағанда 7-15 ретке жоғары көрсеткішке ие болған.

Ал әйелдерде гирсутизм, дауыс ырғағының өзгеруі, т.б. күрделі патологияларға алып келген. Ал емізетін аналарға даназолды қабылдауға қатаң тиым салынады.

Даназолдың қолданылуы барысындағы метаболизмі, жанама әсерлерінің жекелей жүйкелерге әсерін бағалау барысында көптеген мәліметтер алынды.

Жалпы препараттың тек қана қарсы көрсетілімдері мен жанама әсерлерінен бөлек емдік әсері мен дәрілік сипатына келер болсақ, аталған препарат әйелдерде кіші жамбас қуысының ауруларында, фиброзды-кистозды мастопатияда, тұқым қуалайтын ангиодистрофияда қолданады[37].

Даназолдың жекелей патологияларда қолданылуында әртүрлілік сипатқа ие бола отырып әсер етеді. Мысалы фиброзды-кистозды мастопатиядағы оның рөлі аналық жыныс бездерінен бөлінген гормондар санының азайуын қамтамасыз етеді. Бұл гормондар ағза жұмысының бұзылысына алып келіп ағза қызметінің әлсіреуін тудырады[38,39].Ал ангиодистрофияны емдеу барысында даназол арнайы белоктардың мөлшерінің ұлғаюына алып келеді.

Осы аталған жанама әсерлерге байланысты науқастың сырқатына орай тағайындалған дәрілік препараты қабылдаудан бас тартып жататын жағдай да тіркелген. Дәріні тағайындаған уақытта оның жанама әсерлерінің барлығын міндетті түрде қатаң ескертеді, дегенмен де ағза жүйелеріндегі өзгерістерді байқаған сырқаттар ауырлық сезіміне шыдап жүре бергенді жөн көріп көп жағдайда қабылдаудан бас тартады[40].

Сырқаттарданазолды қабылдамас бұрын аллергиялық аурулары бар жоқ екендігіне аса назар аударуы керек, сонымен қатар даназолдың жеке құрамдас бөліктеріне жоғары сезімталдық болған жағдайда дәрігерге алдын ала ескеру керектігі ескертіледі.

Бұл мәселе өз кезегінде фармакология саласы мамандарының препараттың жанама әсерінің басымдылығы айқын көрінбейтін, химиялық құрамы бойынша және метаболизмдік ерекшеліктеріне орай препараттың жаңа құрамды бөлігін қарастырып ғылыми тәжірибелер түрінде зерттеу ойластырылған[41].

Ғылыми зерттеу жұмыстарымыздағы негізгі рөл атқарып отырған даназол препаратының жан-жақты зерттеу, жанама әсерлерінің ерекшеліктері, ағзаға сіңімділігі, метаболизмдік уақыты, науқастарға қабылдаған жағдайдағы жанама әсерлерінің сипаты, өзге де препараттармен бірге қабылдауға рұқсат етілген жайттары, тағы да басқа мәліметтер туралы әдебиеттерге шолу жасай отырып

қарастырылды. аназол препаратының сүт безінің қатерсіз ісіктері яғни мастопатияның түрлерінде қабылдауға бағытталған препарат, фиброзды-кистозды мастопатияның созылмалы сырқаттары барысында сұйықтыққа толы қалта түзе отырып, ағза жүйелеріндегі күрделі өзгерістерге алып келеді. Аталған патологияда даназолды тағайындаған сырқаттарда ұзақ уақыттарға қабылдау нәтижесінде күрделі жанама әсерлер туындағаны анықталған. Дәрілік препараттың қабылдау мерзімінің ұзақтығы нәтижесінде әйелдерде ағзасында гирсутизм, дауыстың жуандауы, т.б. жанама әсерлер байқалған. Сондықтанда мұндай өзгерістерден гөрі ауырсынуларға шыдауға бейім болады. Сонымен бірге даназол препаратының клиникада ұзақ қолданыста болуына қарамастан клеткалық деңгейдегі әсері толыққанды зерттелмеген болып отыр. Зерттеу жұмыстарымыздың негізгі мақсат-міндеттерінің бірі де осы бағытқа негізделеді.

Қорыта айтқанда,даназол препаратының фармокологиялық, физиологиялық тағы да басқа қасиеттерін қарастыра отырып, аталған препараттың маңыздылығы мен клиникалық жағдайда қолданылуының ерекшеліктерімен таныстық.

1.2 Mcf10A сүт безі (Michigan Cancer Foundation) клеткаларына сипаттама

Жалпы клетка культураларын өсіру әдістері үдерісіне in vitro жағдайында эукариот және прокариот клеткаларын бақылай отырып өсіруді айтамыз. Клетка өсіру технологиясының тәсілдері мен әдістері ұлпалар мен біртұтас мүшелерді өсіру технологиясымен де тікелей байланысты [42].

Клетка өсіру тәсілдері XIX ғасырдан бастау алған. Ағылшын физиологы С.Рингер ең алғаш рет құрамында калий, натрий, кальций және магний бар құрамды ерітінді дайындап жануарлар жүрегінің ағзадан тыс соғуын қамтамасыз ету үшін сол ортаға салып жасаған тәжірибесі бар екенін білеміз. Ал 1985 жылы В.Ру тауық эмбрионының сүйек кемігінен клетка ала отырып ұлпаларды өсіру әдісін ұсынса, Р.Гранвилл Харисон Дж.Хопкинс медициналық мектебінде кейіннен Йель университетінде ұлпалардың сыртқы ортада өсірілуі туралы алғаш тәжірибелер жасап, дәлелдеген. 1910 жылы П.Раусс деген ғалым балапандардың саркомасы клеткаларын зерттей отырып, дені сау жануарларда қатерлі ісік клеткаларын өсірген болатын. Аталған тәжірибе араға елу жылдай уақыт өткенде оның авторында 1966жылы Нобель сыйлығы берілді [43].

Клеткаларды өсіру тәсілдері барысында жүргізілген ғылыми тәжірибелер жалпы биология, медицина салаларында айтарлықтай үлкен жетістіктерге жете отырып, көптеген сырқаттарға ем ретінде жасалынатын препараттарды зерттеуде, қатерлі ісік клеткаларының табиғатын танып білу мен алдын алу барысындағы жүргізілген көптеген ғылыми жұмыстарға бастама болды. Тағы да тарихи мәліметтерге қарайтын болсақ, 1940-50 жылдарда вирусология саласы бойынша қарқынды даму кезеңдерінен өтті. Вирустарды өсіру арқылы вакцина материалдары алынды. Осы зерттеулер барысында 1952 жылы

адамның қатерлі ісік клеткаларының культуралары HeLa клеткалары бойынша Нобель сыйлығына ұсынылған болатын.

Клетканы өсіру барысында бірнеше әдіс-тәсілдер қолданылады. Клеткалар қаннан да алынады, дегенмен лейкоцит клеткалары ғана өсіруге өте қолайлы болып табылады. Ал көп ядролы клеткалар жұмсақ ұлпалардан алынып, коллагеназа, трипсин, проназа секілді клетка сыртындағы матриксті зақымдайтын ферменттер қолданады.

Сонымен қатар, қоректік ортаға ұлпа кесінділері мен басқа да материалдарды салуға болады [44].

Клетка культураларының бірден обьектіден алынуы біріншілік өнім деп аталады. Көптеген бірінішілік өнімдер, қатерлі ісік клеткалары да қолданылуының арнайы қатаң мерзімдері бар. Клеткаларға тәжірибе жасау барысында бірнеше рет бөлінген клеткалар бірте-бірте қартайып бөлінуі күрделілене түседі, сонда да тіршілік әрекеті төмендемейді.

Бір қызығы мүлдем өлімге ұшырамайтын, шексіз бөліне беретін клеткалар түрлері де бар. Қатерлі ісік клеткаларының көпшілігі осы қасиетке ие, сондықтан олар кездейсоқ мутацияға ұшырайды [45].

Клетка өсіру ортасының клетка тіршілік әрекеті мен ғылыми жұмыстарға жүргізілетін лабораториялық жұмыстардың да маңызы өте жоғары болып табылады. Өсімдік клеткаларының өсу ортасы үнемі жарық пен жылуды қажет ететін болса, ал жануарлар клеткасы үшін арнайы газды орта мен клетка культураларының арнайы инкубаторлық ортасы болуы керек.

Сонымен бірге клетка өсіретін ортаның қоректік өнімдерінің өзі арнайы сипатта және қатаң санитарлы-гигиеналық талаптарға сай болған кезде ғана клетка тіршілік әрекетінің ретті жүруіне әсер етеді. Мысалы, pH (сутектік көрсеткіш) ортасына қарай, глюкоза концентрациясына, өсу факторларының құрамына тікелей байланысты [46].

Өсу факторының қоректік ортасы ретінде жануарлар клеткасы үшін көп жағдайда қан сарысуының қосындысымен қолданылады. Өсу факторы құрамының тағы бір ерекшелігі вирустармен немесе приондармен зақымдалуы болып табылады. Ал клетка өсіру әдістерінің негізгі қатаң талаптарының бірі клетка культураларының клетка құрамын зақымдайтын қоспаларды аз қосу немесе қатаң қадағалауда болуы керек. Дегенмен бұл мәселе үнемі кездесіп отырады. Ғылыми тәжірибелер барысында тәжірибенің нәтижелігінің деңгейі жоғары болу мақсатында өсу факторының таза түрін қолдану әдістері қарастырылады [47].

Клеткаларды өсіру тәсілдерінің бірнеше түрлері бар, өйткені олар арнайы суспензияларда өсіріледі. Кейбір клеткалар линиясы клетка тығыздығын ұлғайту мақсатында беткі қабатта өсіріледі.

Жұмсақ ұлпалардың клеткалары көп жағдайда адгезивті болып келеді. Ал өз кезегінде адгезивті клеткалардан органотипті клеткалар культуралары бөлініп алынады. Клетканы культивирлеудің бұл түрі, арнайы лабораториялық ыдысқа қарағанда үш түрлі өсіру ортасынан тұрады. Бұл тәсілдер физикалық және биохимиялық тұрғыдан қарағанда өзіндік техникалық күрделі тұстары да

бар. Мысалға айтатын болсақ, мұндай клеткалар диффузияны қажет етеді. Сондықтан да аталған үдерістердің алдын алу мақсатында клеткаларды электрстимулдеу үшін, адгезивті культуралар үшін және клеткадан тыс матриксті ұлпа үшін инженерлік конструкцияда роторлы және биореакторлар, механикалық биореакторлар, гидростатикалық қысымды биореакторлар қолданылады [48].

Клетка өсірудің ерекшеліктері. Клетка культураларын өсірудің айтарлықтай ерекшеліктері мен тәсілдері бар. Өйткені клеткаларды барысында күрделі техникалық қауіпсіздік ережелерін сақтаумен қатар, биохимиялық құрамының қатаң мөлшерде қадағалануы қамтамсыз етіледі.

Клеткаларды өсіру барысында мынандай мәселелер туындауы мүмкін:

-клетканың қоректік ортасында дақылдық ортаның шамадан тыс мөлшері болуы, соның ішінде токсикалық заттардың болуы;

-клетка культураларының ортасында тіршілік әрекеті тоқтаған клеткалар да кездеседі.

Клетканың өсу ортасында клеткалар санының шамадан көп болуы клетка циклына әсер етеді. Осы себептерден клетка дифференциясы басталуы мүмкін. Клетканы өсіру барысында өсу ортасының құрамын бірқалыпты ұстап тұру мақсатында үнемі орта құрамын алмастырып, пассаждап және трансфекция жасап отырады. Клетка құрамының бактерия, ашытқылар немесе басқа да клеткалар линиясымен зақымдалмауының алдын алу үшін асептикалық талаптарға сай орындалуы керек. Ол үшін клетка өсу ортасының микрофлорасы төмендету үшін антибиотиктер (пенициллин, стрептомицин) және саңырауқұлаққа қарсы препараттар амфотерацин В қолданылады.

Клеткалардағы pH ортасының төмендеуі көрсеткіштерін сипаттап отыратын метаболизм өнімдерінің бірі- қышқылдар. Осы қышқылдық үдерісін бақылау барысында pH индикаторлары қолданылады. Егер де клетка ортасы адгезивті болса қоректік ортаны толығымен ауыстыру керек [49].

Клеткаларды бөлу немесе пассаждау әдістері клетка құрамынан бір бөлігін алып келесі бір ортада ғылыми тәжірибе мақсатында бөлек өсіру үдерісі болып табылады. Егерде клетка тез өсетін болса, мұны үнемі қайталап отыру керек. Өйткені клетканың қоректік ортасында қоректік заттардың азаюы және метаболизм өнімдерінің жинақталуы әбден мүмкін. Суспензирленген клетка культураларын бөлу өте ыңғайлы және жеңіл, өйткені олардан аздаған клеткалар алынып жаңа қоректік ортаға салынып отырады. Ал адгезивті клеткаларды бірінші бөліп, ерітіп, субстарттан бөлек қойып, олардың жинақталуына қарай бөлініп алынады. Көбінесе осы тәжірибелік жұмыстар барысында трипсин және физиологиялық ерітіндідегі ЭДТА (Версен ерітіндісі) немесе басқада ферменттік қоспалар қолданылады [50].

Зерттеу жұмыстарына Mcf10A клеткалары линиясының сериясы фиброзды-кистозды мастопатиямен ауыратын әйелдердің сау ұлпаларынан алынады (кесте 1).Американдық типтік дақылдар коллекциясының (American Type Culture Collection–ATCC; Манассас, АҚШ) рұсқат етілген хаттамасы бойынша зерттеуге алынады[51].

Клеткалардың жекелей ерекшеліктерінің бірі цитокератин, сиаломуцин және антигенглобулин секілді(клетка аралық филаменттері эпителиальды филаменттерден тұратын белоктар)сүтті майларға тиімді әсер етеді. Сонымен қатар олардың жекелей ерекшеліктеріне белсенді коллагенді өсу ерекшелігін де айтуға болады. Mcf10A клеткаларының тәжірибелік жұмыстарда осы клеткалар линиясына жататын басқа клеткалармен салыстырмалы түрде көптеген зерттеулер жүргізілгені кездеседі. Сол сияқты зерттеу жұмыстарының кейбірінде аталған клетка линиясының терминалды дифференциация немесе қартаюға ұшырамағаны клетканың жекелей қасиеттерінің бірі болып табылады.

Кесте 1- Сүт безінен алынған клеткалар линиясының жіктелуі [41;43,с. 163]

Клетка линиясы	Толық аталуы	Алынған ағза	Ұлпа	Морфология	Ескерту және сілтемелер
Mcf -7	*Michigan Cancer Foundation-7*	адам	сүт безі	сүт безі түтіктерінің инвазивті карциномасы	ER+, PR+
Mcf10A	*Michigan Cancer Foundation*	адам	сүт безі	Эпителий	ATCC
MDA-MB-231	M.D. Anderson - Metastatic Breast	адам	сүт безі	қатерлі ісік	ECACC
MDA-MB-468	M.D. Anderson - Metastatic Breast	адам	сүт безі	қатерлі ісік	ECACC
MDA-MB-435	M.D. Anderson - Metastatic Breast	адам	сүт безі	меланома немесе карцинома	Cambridge PathologyECACC

Mcf10A клеткалары линиясы қатерлі емес эпителиальді клеткалар болып табылады.

Mcf10A клеткаларының өсіру барысындағы қоспаларына тоқталсақ, инсулин, глюкокортикоидтар, холера энтеротоксині және өсудің эпидермальды факторы қолданылады. Клеткалардың элетронды микроскоппен қарағандағы сипаттамсына, клеткаларда люминальды өзекшелердің болумен ерекшеленеді. Сонымен қатар, Mcf10A клеткалары қалыпты реакциялар нәтижесінде MFA-Breast және MC-5 секілді моноклональды антиденелермен бірге сүт бездеріне

тән қарсы денелер түзетіні, клетканы өсіру ортасында кальцийдің болуы клетканың морфологиясына күрделі әсер ететіні туралы мәліметтер бар[52].

Mcf10 клеткалары алғашқы рет 1984 жылы, тамыз айнында сүт безінің сырқаттарының жиі кездесетені түрлеріфиброзды-кистозды мастопатиямен ауыратын әйелдердің *mastectomy* ұлпаларынан алынған болатын. Алғашында Mcf10M өлімге жиі ұшырайтын клеткалар жиынтығы ретінде қарастырылған. Өйткені, аталған клеткалар жиынтығындағы өсіру қоспа құрамындағы кальций әсерінен клеткалардың қартаю туындағаны байқаған болатын.

Mcf10 клеткалары құрылымына сипаттама жасасақ, эпителиальды клеткаларға тән әртүрлі формада (жалпақ, кубтәріздес, цилиндрлі) кездеседі.Клетканың құрылымдық белсенділігіне сәйкес,ядроларының саны өсу уақытына байланысты болып келеді. Аталған клетканың ядросы көбінесе базальді полюске жақын орналасады. Сонымен қатар клеткалар құрамындағы органоидтардың орналасуы, мысалы Гольджи аппараты, митохондрий және эндоплазматикалық тор триада құрып дамыған. Mcf10 клеткаларының арнайы органоидтарының бірі ұсақ жіпшелерден тұратын тонофеломент немесе тонофибрильдер цитокератин белоктарынан тұрады. Ал, цитокератиндердің тек қана эпителиальды клеткаларға ғана тән белок аралық феламент екенін білеміз. Сонымен бірге, тонофибрильдер цитоскелет құрамына кіретіндіктен ешқақан клетканың шекарасынан шығып кетпейді, яғни десомальды аймақтан (клеткаралық байланыс) десмосомды және жартылайдесмосомды байланыс түзе отырып базальды мембранамен байланыста болады.

Mcf10 клеткаларының бұл құрылымдық сипаттамаларын тринокулярлы микроскоппен зерттеу барысында айқын көруге болады. Сонымен бірге клеткалардың көлемін үлкен етіп көрсететін беткі микроворсинкаларының болуынан клеткалардың қозғалысы да қамтамасыз етіледі.

Осы клеткалар қартаймайтын екі сублинияға Mcf10A және Mcf10F бөлініліп алынып, арнайы өсіру ортасында сақталып, тәжірибелік зерттеулерге қолданылды.

Сонымен бірге Mcf10 клеткалары линиясына агерсивті клеталар линиясы Mcf10AT1 (MCF10AT) және онкогенді клеткалар түрі Mcf10CA(Mcf10CA1a) бөлінеді, бұл клеткалар жиынтығы өз кезегінде *in vivo*әдістерімен бақылау нәтижелерінде PIK3CA H1047R гендерінің мутациясына алып келгенін анықталған.

Сондықтан да Mcf10 клеткалар линиясынан алынған Mcf10A клеткалары тәжірибеге тиімді, өсу барысында күрделі қиыншылықтар тудырмайтын, өсу деңгейінің жоғарылығымен сипатталатын тиімді модель ретінде ұсынуға болады.

Осыған орай Mcf10 сүт безі клеткаларының морфологиялық, гендік, тағы да басқа салыстырмалы сипаттамаларын алуға бағытталған зерттеу жұмыстарынаMcf10A және Mcf10CA1клеткаларын E746-A750 (EGFR-DEL) гендеріне онкогенді мутациясын анықтауға арналған тәжірибелік жұмыстар, Mcf10A мен бірге HRAS геномын белсендіру арқылы алынғанMcf10AT(қатерлі

ісік алды клеткалар линиясы), MCF10CA1h жәнеMcf10CA1a,Mcf10AT линияларынан ксенотрансплатталған) зерттеу жұмыстарын алуға болады.

Көріп отырғанымыздай, Mcf10A клеткалары өсу жылдамдығы, морфологиялық құрылымы зерттеу жұмыстарына тиімділігімен ерекшеленіп отыр.Электронды микроскопиялық сипаттамаларына зер салсақ, миоэпителиалдық емес, люминалды өзекшелі клеткалалық сипатпен көрінеді.

Mcf10 клеткалары өсу барысында үздіксіз дамитындығымен ерекшеленеді. Өсу ортасының құрамындағы күлгін түсті фенол, гидрокартизон, және эпидермальды өсу факторын сақтай отырып, Вестерн блот әдістері де жасалынды. Клетка сипаттарына қарай Mcf10M жәнеMcf1010MS деп бөлінуі қатерлі ісік клеткаларының сарысусыз ортада және әртүрлі ақпаратты тасымалдайтын қосымша құрамды ортада өсірілуіне байланысты ажыратылады.

Mcf10A клеткаларының жекелей өзіне, сонымен бірге салыстырмалы түрде қарастыра отырып жүргізілген тағы бір зерттеулерден байқағанымыз канцерогенезді зерттеуде кеңінен қолданылады екен.Осындай зерттеулердің бірінде Mcf10A клеткаларын өсіру ортасын өзгеріссіз қалдырған жағдайды бақылағанда клетканың үздіксіз өсетіні байқалған. Клетка культурасының лабильді компоненттері азайса да клетка трансформациясының жалғасуы таң қалдырған. Осы жайттарды ескере отырып Mcf10A клеткаларынан трансформациясына әсер ететін факторларды анықтауға тырысқан. Осы жұмыстардың нәтижесінде Mcf10A клеткасының өсу ортасындағы қызыл түсті фенолдың, гидрокортизонның және өсудің эпидермальды факторы деңгейлерінің өзгерісі клеткадағы тотығу стерссіне алып келетіні анықталған. Сонымен қатар вестерн блотт әдістері нәтижелерінде EGF (EGFR) және Erain рецепторларының ассоциациясына әкеп отыр.Осы зерттеу жұмыстары Mcf10A клеткаларына тотығу стерсі нәтижесінде ER және EGFR рецепторлары үлкен рөл атқаратынтрансформация моделін ұсынады.

Сүт безінің қатерлі ісігі аталған бездің қатерлі емес эпителиалды өзекшелерінің гиперплазиясы нәтижесінен генетикалық өзгерістерге, сүт безі өзектерінің атипті гиперплазиясы, инвазивті ісік, лимфа түйіндерінің қызметінің өзгерісі, жақын жатқан мүшелерге метастаз беру жиілігіне де байланысты туындауы мүмкін деген тұжырымдарға да келіп отыр. Сондықтан да аталған патологиялық сырқаттараға сипаттарға нақты жауап беретін, тиімді нысан ретінде сүт безінің Mcf10A клеткалары линиясына бақылау жасау тиімді болмақ. Ал, Mcf10CA 1 клеткалар линиясы толығымен қатерлі ісік тудыратын және метастаз беретін клеткалар болып табылады.

Mcf10 клеткалар түрі адамдардың сүт бездері ұлпаларындағы туындаған молекулалық өзгерістерді дер кезінде анықтауға, сонымен қатар генетикалық құрылымының да гетерогенділігін бақылауға мүмкіндік беретін бірден бір зерттеу тиімділігі жоғары клеткалар линиясы болып табылады.

Сүт безінің қатерлі ісігіне жан-жақты зерттеулер барысында рентгенді зерттеулерде сүт безі ұлпаларындағы мастопатия кезінде пайда болған ұлпалардағы тығыздық әсерінен аз мөлшердегі қатерлі ісік клеткаларын ажырату қиынға соғады деген материалдар кездеседі. Фиброзды-кистозды

мастопатиядан туындаған сүт безінің қатерлі ісігін зерттеу барысында рентгенологиялық семиотикалық әдістерді толыққанды меңгеру маңызды болып табылады екен.Сүт безінің қатерлі ісігінің фиброзды–кистозды мастоптаиядан туындаған кіші формаларында рентгендік зерттеулерде маммографияның сезгіштігі 62 %-ды ғана көрсететіні анықталған [53].

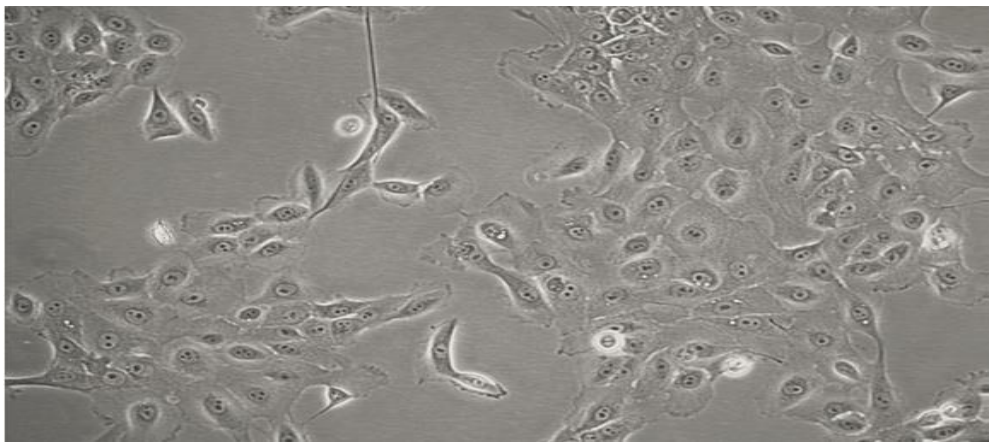
Сондықтан да Mcf10A клеткаларын зерттеу материалы ретінде алуға, тақырыптың өзектілігі ретінде қарастыруға, сонымен қатар басқа да заманауи әдістерімен жан-жақты зерттеу сүт безінің басқа да күрделі патологияларының алдын алуға мүмкіндік беретін ғылыми жаңалықтарға жол ашады.

Жоғарыда аталған клеткалар линиясының тағы бір назар аудартатыны, кумулятивті яғни, жинақталып өсу ерекшелігі болып табылады. Бұл өз кезегінде фиброзды-кистозды мастопатия патологиясындағы киста немесе қоймалжың сұйықтыққа толы қалта түзуіне байланысты болса керек деген тұжырымдар бар(сурет 1).

Әлем бойынша сүт безінің қатерлі ісігінен көз жұмған әйелдердің саны артпаса кемімей отырған статистикалық мәліметтер денсаулық саласы мамандарының дабыл қағып отырған күрделі мәселелерінің бірі болып табылады.

Бүкіл әлемдік денсаулық сақтау ұйымының мәліметтеріне сүйенсек, әлемде жылына сүт безінің патологиясы бойынша 1,38 млн жағдай тіркеледі екен. Ал Ресейде 2011 жылы 100 әйелдің 45,2 пайызында сүт безінің қатерлі ісігі тіркеліп, жалпы онкологиялық аурулардан қайтыс болатындардың 20 %-ы сүт безінің қатерлі ісігінен деп мәлімделген.

Осы сырқатты алдын алу, тоқтату, емдеу шаралары барысында көптеген зерттеу жұмыстары жүргізіліп келеді. Осы тұрғыда сүт безінің қатерлі ісігі кезіндегі метастаз берілуі, клеткалардың дәрілік препараттарға сезімталдығы тағы да басқа жағдайларды ескере отырып жүргізілген жұмыстарда клеткалардың көптеген үлгілері пайдаланылады.



а)

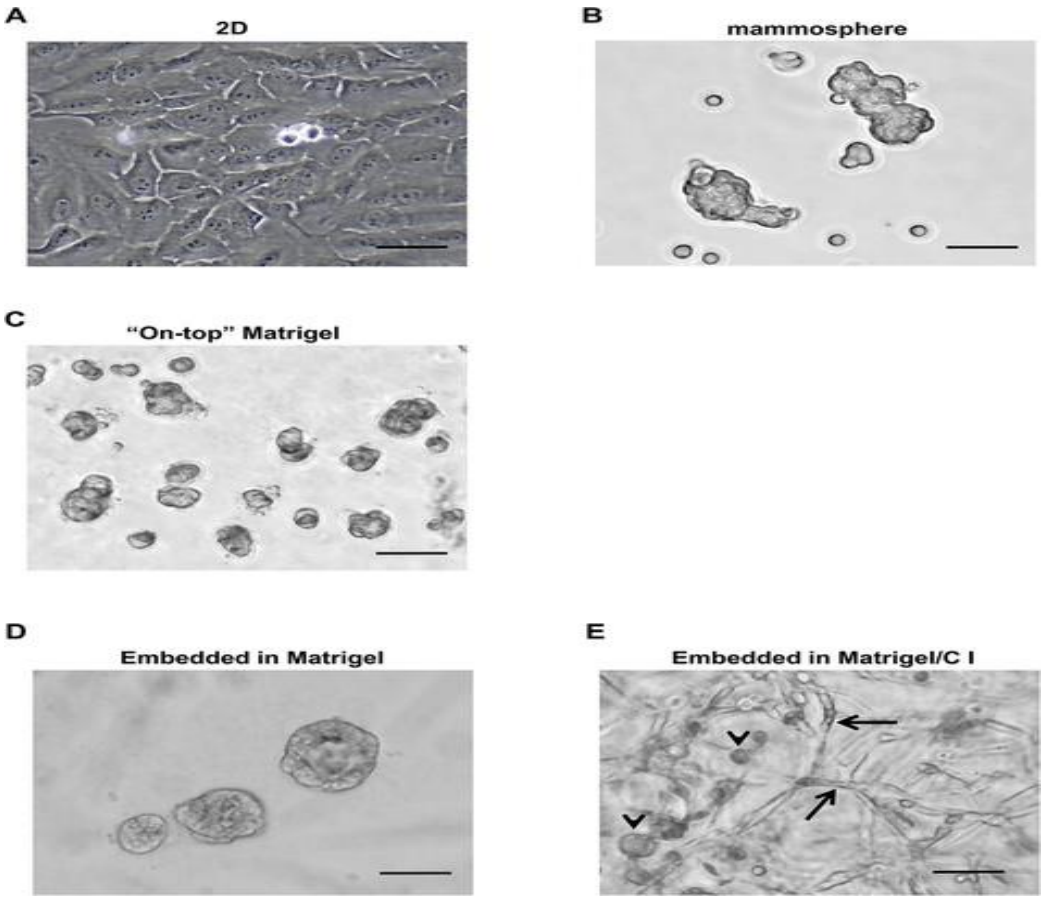
Сурет 1- Mcf10A сүт безі клеткаларының 24 (А) және 48 (Ә) сағаттан кейінгі өсуінің салыстырмалы бейнесі [54], бет 1



ә)

Сурет 1, бет 2

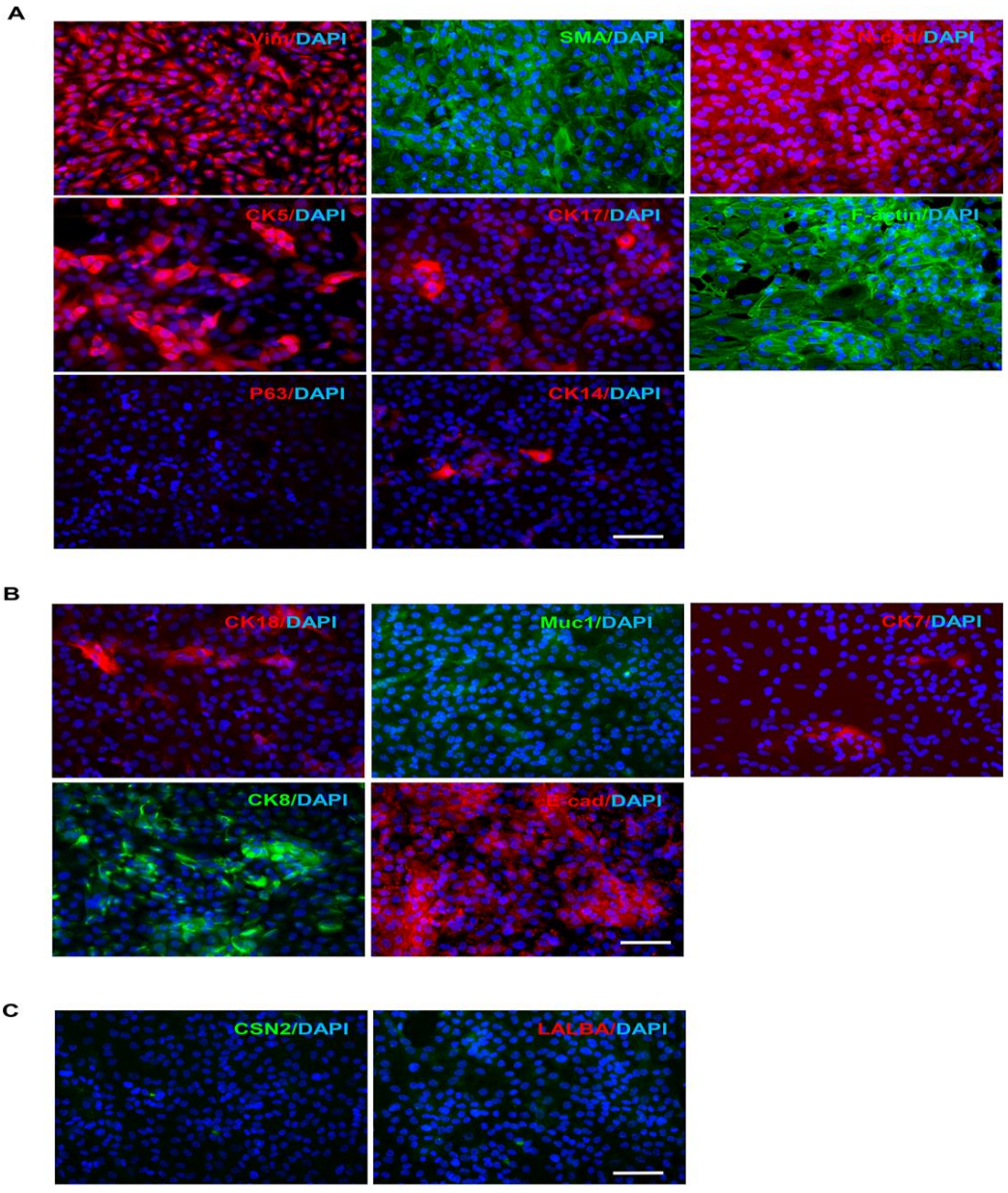
Осындай зерттеу жұмыстарында Mcf10A сүт безі клеткаларын әртүрлі ортада өсіріп қолданғаны көрсетіледі. Тәжірибелерде, аталған сүт безі клеткаларының бір қабатты (моноқабатты немесе маммосфералы культура),3 қабатты матригель (3D) аралас қоспалы ортада өсірілген (суреттер2,3).



Сурет 2- Mcf10A сүт безі клеткаларының әртүрлі араслас ортада өсірілуінің бейнесі [55]

Мұндағы А суретте-моноқабатты культурадағы клеткалар; В- MammoCult ортасымен өсірілген клеткалар; С - Mcf10A сүт безі клеткаларына матригель қоспасының беткі қабатына қосылған ортасы; D- Матригельдегі Mcf10A сүт безі клеткалары; Е- Mcf10A сүт безі клеткаларына матригель мен коллаген аралас қоспасымен өсірілген ортасы.

Зерттеулер барысында 3D культурада өсірілген Mcf10A сүт безі клеткаларын иммунофлуоресцентті бояулармен бақылап, иммуногистохимиялық зерттеулерге қолданған. Сонымен қатар, зерттеуге алынған клеткаларды белок маркерлеріне де зерттеу жүргізген.



Сурет 3- 3D культурада өсірілген Mcf10A клеткалары маркерлерінің иммунофлуоресцентті боялуы көрінісі[55]

Нәтижесінде Mcf10A сүт безі клеткаларынан базальды, люминальды және прогениторлы маркерлер дайындалған. Яғни, зерттеу қорытындыларында

көрсетілгендей, моносферада және 3D ортада өсірілген клеткалардан базальды және люминалды маркерлер алынған. Зерттеудегі ерекшеліктердің бірі 3D ортада өсірілген Mcf10A клеткалары базальды маркерлерге де және β-казеин мен α-лактальбумин секілді сүт белоктарына да тиімді болып келеді.

Сонымен бірге, аталған клеткалар сүт безінің жиі кездесетін патологияларының бірі фиброзды-кистозды мастопатиямен ауыратын әйелдерден алынғандығы жоғарыда айтылды. Осы аурудың таралу жиілігі, түрлері жастық ерекшелікері, тағы да басқа көрсетілген мәліметтерге қарасақ, 65 жастан асқан әйел адамдардың көпшілігінде кездеседі.Аталған сырқатты жан-жақты карастырып, зерттеу барысында әйелдердің 83.6% сүт безінің қатерлі ісігіне ұшыраған болса, 16.4% -нда қатерсіз түрлері анықталған. Сол сияқты, 5.3%-нан алыс жастқан мүшелерге метастаз берілгені анықталды. Сырқаттардың 86% -ы хирургиялық ем алды. Зерттеулердегі бір назар аударатын жағдай, абцесс және фиброзды-кистозды мастопатия өте жиі кездесетін патологиялар болып отыр. Сонымен қатар, сүт безінің қатерлі ісігіне ұшыраған әйелдердің көпшілігінің мастопатияның түрлерімен ауырғандығы сырқаттың анамнезінде көрсетілген. Бұл дегеніміз, фиброзды-кистозды мастоптаияның қатерлі ісікке ауысуы қауіпі жоғары екенін дәлелдейтін ақпараттардың бірі болып табылады.

Осыған орай, ғылыми жұмыстарымызды жүргізу барысында алынған Mcf10A клеткалар линиясы, АҚШ, Пенсильвания штаты, Дрексель университеті мен жеке клиниканың келісім шарты негізінде, сүт безінің фиброзды-кистозды сырқатымен ауыратын әйел адамдардан алынған болатын.

Тағы бір ескере кететін жайттардың бірі клетка культураларының жоғары тығыздығы болған жағдайда төмен тығыздықтағы ортамен салыстырғанда клеткалар тез өсуіне мүмкіндік мол. Бұл өзгерісті клеткалардың pH өзгерісінен анықтап білуге болады.Клетка ортасының pH көрсеткіштерінің төмендеуі клетка ортасы тығыздығының жоғары деңгейін көрсетеді, ал pH көрсеткіші 7мен 6 ортасында болса, клетка өтуі тежеледі. Ал, клетка ортасы сутектік көрсеткішінің шамасы 6,5-6 болса ең тиімді орта болып есептеледі.

Адам клеткаларының культураларының өсірілуі мен пассаждау тәсілдері өте күрделі әрі арнайы қатаң талаптар мен құқықтық мәселелерге байланысты болып келеді. Өйткені пациенттер өз ағзасынан алынған биоматериалдардың ғылыми тәжірибелерге қолданысына байланысты өзіндік шешімі мен талаптары болғандықтан, пациенттің рұқсатынсыз алыну жеке құқығын бұзу болып есептеледі. Ең алғаш рет осы мәселе бойынша жарлық АҚШ-нда бірінде орындалған болатын. Яғни аталған биоматериалдар қолданысқа немесе ғылыми зерттеу тәжірибелеріне ұсынылмас бұрын пациенттің жеке келісімі заңды түрде көрсетілуі тиіс.

Сүт безінің қалыпты эпителиальді клеткаларының үлгісі ретінде Mcf10A сүт безі клеткаларының линиясы бағалау. Mcf10A сүт безі клеткаларының линиясы көп жағдайда тәжірибе жасауға ыңғайлы түрлерінің бірі болып есептелінеді. Біздің ғылыми зерттеу жұмыстарымыздың барысында әдеби

деректерге шолу жасай отырып, аталған клеткаларға жасалынған бірқатар жұмыстар кездестірдік [56].

Танымдылығы жоғары қызықты материалдардың бірі аталған клеткаға холера токсин қосу арқылы өсіру барысында жүргізілген жұмыстар. Жалпы ана сүтіндегі Na^+концентрациялары туралы нақты мәліметтер жоқтың қасы. Осы жұмысты зерттеу барысында алынған N клеткалар эпителиальді натрийдің EnaC каналдарына белсенділігін көрсетеді.Mcf10Aсүт безі клеткаларының линиясы өсіру барысында холератоксинді қоқыс пассаждау кезінде уақытқа байланысты амилоридке жоғары сезімталдық байқалған.

Біздің зерттеулерімізде де клетка линиясын дақылдау үшін, DMEM/F-12, бұқа сарысуы, инсулин, пенициллин эпидермальды өсу факторы, гидрокартизон алынды.Mcf10A сүт безі клеткалары «Michigan Cancer Foundation»деген толыққанды сипаттамаға ие, сүт безінің жиі кездесетін патологияларының бірі фиброзды-кистозды мастопатия түрімен ауыратын сырқат әйелдерден алынған, тәжірибелік маңызы өте зор және зерттеулер жасауға тиімді клеткалар линиясы болып табылады[57].

Яғни, зерттеуге алынған Mcf10A клеткалары сүт безі клеткаларын жан-жақты зерттеуде қолдануға болатын тиімді үлгі ретінде алынуға болады деген тұжырымдар жасалынған.

Зерттеу жұмыстарымызда аталған клетка линиясына даназол препаратының әртүрлі концентрацияларын қолдана отырып жүргізілген зерттеу жұмыстарымыз аталған патологияға қолданатын препараттың фармакологиялық сипаттамалармен қатар клеткалық деңгейдегі әсерін клетканың жекелей ерекшеліктеріне қарай зерттедік.

Сонымен, диссертациялық жұмысымызда әйелдердегі сүт безінің жиі кездесетін сырқаттарының бірі кисталы немесе сұйықтыққа толы қалта түзе отырып, ағза жүйелерін зақымдайтын патологияның алдын алу мақсатында нысан ретінде алынған Mcf10A сүт безі клеткалары құрылымы, клетканың басқа клеткалармен салыстырмалылығын өсу ортасы мен өсу жиілігі ерекшеліктеріне қарай отырып жалпы клетка туралы мәліметтер алынды.

1.3 Фиброзды-кистозды мастопатия түрлері мен этиологиялық сипаты

Фиброзды-кистозды мастопатия сырқатымен ауыратын әйелдердің еліміздегі статитикалық мәліметеріне қарайтын болсақ жалпы саны 3335 нәзік жандылартіркелген.Солардың ішінде сүт безінің қатерлі ісігі кездесу жиілігі жағынан бірінші тұрса, фиброзды-кистозды мастопатияның кездесуі мастопатияның яғни сүт безінің басқа патологияларымен салыстырғанда қатерлі ісіктен кейінгі орынды алатынын көреміз. Маммографиялық зерттеулер нәтижесі бойынша АҚШ, Шотландия, Канада, Швеция секілді алпауыт мемлекеттердің өзінде скринингтік мәліметтер негізінде сүт безінің қатерлі ісігі елуден асқан әйелдердің 1/3 бөлігінде тіркелген.

Қазақстанда 2008 жылдан бері сүт безінің қатерлі ісігінің алдын алу мақсатында арнайы бағдарламалар негізінде диагностикалық бақылаулар

жүргізілуде. ҚР ұлттық скрингтік бағдарламада сүт безінің қатерлі ісігінің ерте кезеңдеріндегі даму деңгейінің алдын алуға бағытталған.

Әйел адамдардағы сүт безінің қабыну процесттері барысында туындайтын аурулардың ішінде жиі кездесетін мастопатияны қарастыруымыздың басты себептерінің бірі, аурудың баяу дамитын үдерісімен қатар әйел адамдардың қауіптілігін ысырып қойып назардан тыс қалдырып, патологияның асқыну салдарынан қатерлі ісік сипатына айналуына дейін жеткізіп алуына да тікелей байланысты[58].

Сүтбезі (лат. glandula mammaria немесе mamma) - жұп ағза, апокринді тері бездерінің түріне жатады. Жыныстық жағынан жетілген әйелдердің сүт бездері алдыңғы көкірек аймағының үшінші және алтыншы немесе жетінші қабырға аралығында орналасады. Әрбір без өзінің үлкен бөлігімен үлкен көкірек бұлшық еттіне барып жалғасады (m. pectoralis major) және жиі алдыңғы тісшелі бұлшық етте. Сыртқы жағынан сүт бездерінің арасында иілу бар,оны қойнау деп атайды.

Әрбір көкіректің ортасынан сәл төмен, шамамен төртінші немесе бесінші қабырғалық деңгейінің бетінде үлкен емес шығыңқы—көкірек емізігі болады. Босанбаған әйелдерде ол конус тәрізді формада болады, ал босанған әйелдерде цилиндрлі болады. Ол диаметрі 3-5 сантиметр болатын ареоламен қоршалған. Емізік және ареола басқа терілердің түсінен өзіндік пигментациясымен, яғни каралау болып ерекшеленеді. Босанбаған әйелдерде- қызғылт немесе қара-қызыл, ал босанғандарда - қою қара. Жүктілік кезінде пигментацияның интенсивтігі артады. Жыныстық қозу кезінде, сонымен қатар овуляция фазасында, оның эректильдігі және сезімталдығы артады. Емізік эрекциясы бұлшық ет талшықтарының тарылуынан, қанайналымына және клитор эрекциясына қатыссыз жиырылады.

Емізік дөңгелегінің айналасында үлкен емес рудиментарлы сүт бездері Монтгомер бездері болады. Емізік терісі майда әжімдермен жабылған. Емізіктің ұшында үлкен емес тесік болады - сүт поралары, олардың соңы сүт жолы, сүт бөліктеріне баратын сүт жолдарының диаметрі 1,7 ден 2,3 мм дейін болады. Кейбір сүт жолдары бір бірімен айқасып жатады, сол себептен көп жағдайда сүт тесіктері, сүт жолдарына қарағанда аз болады (олар 8-ден 15-ке дейін болады).

Сүт безі, әйел кеудесінің негізі және сүт безі денесі, тығыз дене, дөңестік дискті денесі бар, майлы қабатпен қапталған.Сүт безінің денесі 15-20 жеке конус тәрізді бөліктерден тұрады, олар көкірек емізігін айнала орналасқан.

Әрбір бөлік, өз кезегінде үлкен және ұсақ бөліктерден тұрады. Сүт безініңқанменқамтамасыз етілуі негізінен ішкі кеуде және кеуде қырындағы артериялармен қамтамасыз етіледі[59].Емшек бездерден, тіректік тіндерден және майдан тұрады. Бездерде майда түтікшелер немесе арнайы қуыстар арқылы емшек ұшына қарай жылжитын сүт өндіріледі. Емшек ұшына жетпей тұрып түтікшілер кеңейеді және сүт жиналатын «сүт қойнауы» құрылады. Емшек ұшында сенсорлы жүйкелер көп, яғни емшек ұшы өте сезімтал. Бұл сүт келіп түсуіне әсерін тигізетін рефлекстердің пайда болуына ықпалы бар ең

маңызды фактор. Емшек ұшының айналасында ареола деп аталатын қаралау түсті емшек емізігінің шеңберлі аймағы болады. Емшек емізігінің шеңберлі аймағының бетінде майда төмпешіктер бар екенін байқауға болады. Бұл-май тәріздес сұйық бөліп шығаратын бездер. Май емшек ұшы терісін нәзік етіп және жақсы қалыпта сақтауға көмектеседі. Емшек емізігінің шеңберлі аймағының астында сүт қойнауы орналасады.

Сүт бездері ауруларының мәселесі жыл сайын артып отыр. Бүгінгі күні 100 әйелдердің ішінде 30-40-ы бұл мүшенің қандай да бір патологиясына ұшырайды. Әрбір әйел дерлік ғұмырында бұл мәселе бойынша дәрігерге бірнеше рет қаралуына мәжбүр болады.

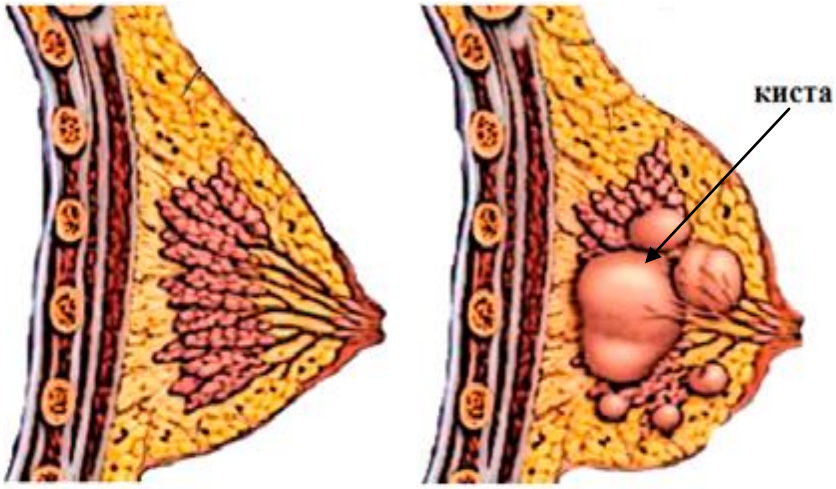
Ауру көрсеткіштерінің өсу себептері көп. Ең жиі кездесетін себептердің жиынтығын қауіп-қатер тобына жатқызады. Бұған жататындар: сүт бездерін соғып алу жағдайлары, ерте (18 жасқа дейінгі) жасанды түсіктер, бірнеше рет қайталанатын гинекологиялық және эндокринді аурулар. Тұқымқуалаушылық та белгілі орынға ие.Статистика мәліметтері жағымсыз экологиялық жағдайы бар ірі өндірісті орталықтарда аурудың көрсеткіші жоғары болатына көз жеткізеді[60].

Қолтық астында ұлғайған лимфа түйінін немесе сүт безінде тығыздануларды байқағанда, уақытты созбай маманға қаралу керек және де өз бетімен емдеу шараларын қолданбаған жөн.

Маммологиялық диспансерге шағымдармен қаралған барлық әйелдердің тек 3-5% ғана сүт безінің обыры болатынын және әйелдердің ерте қаралуына байланысты емделу мүмкіншілігі де жоғары екендігін тәжірибе көрсетуде. Олардың 8-10% қатерсіз ісіктер болады да, хирургиялық емді әрдайым қажет етпейді. Қаралудың көбі әртүрлі мастопатиялардың диагнозымен немесе қандай да бір түрі екендігімен аяқталады.

Маманға уақытында қаралу үшін сүт бездерін өз бетімен бақылауды дұрыс жүргізуді үйрену қажет. Бұны айына бір рет етеккір басталғанға дейінгі 6-12 күн бұрын жасау керек. Етеккірі жоқ әйелдер бақылауды өздері белгіленген айдың бір күнінде жүргізуі шарт.

Жалпы сүт безінің дисгормональды дисплазиясының көптеген анықтамалары бар. Оларға: мастопатия, фиброзды-кистозды ауруы, фиброаденоматоз, масталгия, мезоплазия, созылмалы кистозды мастит, Шиммельбуш, Минц және Реклю аурулары тағы басқа жатады. Мастопатия негізінен жыныс жүйесінің қабынуларымен тығыз байланысты. Ал фиброзды кистозды түрінде киста түзу ерекшелігімен сипатталады және ерекшеленеді (сурет4).



а ә

Сурет4 - Сүт безінің қалыпты (а) және фиброзды-кистозды мастопатия кезіндегі түзілген киста (ә) бейнесі [60,б. 34]

Мастопатия грек тілінен аударғанда mastos-емшек ішкі секреция бездері бөлетін гормондар қызметінің бұзылуынан сүт бездерінде (емшекте) әр түрлі түйіндердің пайда болуы. Мастопатия кезінде сүт безінің ісініп, қатты ауырсынуларымен қатар бездің алғашқы кезде ісініп, кейіннен оның үстіңгі жақ бөлігінде көлемі мен мөлшері әр түрлі ұсақ бұршақ тәрізді түйіршіктер мен түйіндер пайда болғаны байқалады. Мұндай түйіршіктер мен түйіндерді қолмен басқанда көбіне ауырады. Мастопатия әсіресе, етеккір келердің алдында не келген кезде қатты сыздап ауырып, түйіндердің ұлғаюы мүмкін. Бұл кезде емшек ұшынан су сияқты кейде қызыл-қоңыр, қоймалжың сұйықтық бөлінеді. Сұйықтықтың мөлшері, түсі, т.б. дерттің сүт жолдарында орналасқан жеріне, қуыстың тарылу мөлшеріне тығыз байланысты.

Кейбір деректерде аталған аурудың аса қауіпті емес екені көрсетіледі, дегенмен, кей жағдайларда қатерлі ісікке ауысып кетуі мүмкін деп те айтылады. Сүт безінің анатомиялық құрылымының сипаттамасын қарастыратын болсақ, орналасуы бойынша кеуде қуысының алдыңғы бөлігінде үшінші және жетінші қабырғалар тұсында орналасқан жұп мүше. Құрылымы жағынан он бес жиырмаға жуық бөліктерден тұратын бездер арасында дәнекер ұлпалары мен қатар жүйке талшықтарымен бірге қан тамырларымен жабдықталған. Сүт бездерінің қанмен қамтамсыз етілуі кеуде тармақтарымен қатар қабырға аралық артериялармен жабдықталады [61].

Сүт безінің қандай да бір патологиясын анықтау мақсатында диагностика тәсілдерінің бірқатарына: анамнез жиынтығы,сүт безін тексеру, қандай да бір ісіктің болмауын қадағалау секілді зерттеу әдістері кеңінен жүргізіледі. Анамнез жиынытығына әйелдердің етеккір циклының реттілігінен бастап, жүктілік кезеңдеріндегі өзгерістер, циклдың бұзылуы, сүт безінің жарақаттары, аталған бездің қатерлі ісік түріндегі формаларының туыстық кездесу жиілігі т.б мәліметтер қарастырылса, сүт безін тексеру барысында әйел адам денесінің

тігінен және көлденең жатқан күйінде бездің формасы мен тері жабындыларының және қанмен жабдықталуының тармақтарына дейін толыққанды қарастырылады. Сүт безін зерттеудің әмбебап әдістерінің бірі пальпация әдісі бездер түйінінің қозалғыштығын анықтауға мүмкіндік береді. Ал сүт безінің өзектерінің патологялық сипаттарының бар жоқтығын анықтау барысында бөлінетін бөлінділермен қатар Прибрама, Краузе, Кениг ауруларының белгілерімен қатар ареолалар деформациясын да анықтайды.

Диагностикалық құралдармен сүт безінің белгілі бір патологияларын анықтау барысында сүт безінің трансиллюминациясы (патологиялық ошақтардың бар жоғын тексеретін жарық арқылы жүргізілетін әдіс), маммография, ультрадыбысты зерттеулер, радионуклидттер енгізумен жүргізілетін радиоизотопты әдістер қолданылады[62].

Сүт безінің патологияларына ісіктер, қабыну және дисгормональды аурулар, зақымдалу, даму кезіндегі кемістіктер т.б. жатады.

Сүт безінің әртүрлі патологияларында гипомастия яғни эндокринді алмасулардың бұзылысына орай сүт безінің дұрыс жетілмеуі.

Гипермастия, бұл жағдайда керісінше сүт безінің гипертрофты дамуынан болады. Қыз балалардағы екінші реттік жыныстық жетілу сатысында болатын гормональды бұзылыстан туындайтын патология.

Гинекомастия-ер адамдардағы сүт безіні ұлғаюымен сипатталатын гормональды аурулар.

Мастит кең таралған сүт безінің ауруы. Бала емізу кезеңдерінде жиі қабынатын жағымсыз жағдай.

Телит-сүт безінің ұштарының қабынуы. Сирек кездесетін, дегенменде қабыну үдерісінің жоғарғы деңгейінде маститке дейін ұласып кетеді.

Сүт безінің туберкулезі. Туберкулезге қарсы препараттармен емделетін, сирек кездесетін, арнайы цитологиялық және гистологиялық зерттеулер нәтижесінде ғана анықталатын сүт безінің қабынуы.

Актиномикоз. Актиномицит саңырауқұлақтарының әсерінен туындайтын инфекциялық ауру. Емі ота жасау, антибиотиктер және рентгенотерапиялық.

Сүт безінің қатерсіз ісіктері.Эпителиальды өзгерістер нәтижесінде туындайтын- сүт безі өзегінің аденомасы,папиломасы,фиброаденома, т.б.

Сүт безінің қатерлі ісіктері. Көп жағдайда алғашқы жүктілік 35 жастан асқан соң анықталған жағдайда, етеккір циклінің 17 жастан кейін келуі, менапауза уақытының кеш туындауы, бала көтермеген әйел адамдарда, тұқымқуалаушылық сипаттағы жайларда тіркеледі.

Мастопатия. Сүт безі ұлпаларының тығыздалуынан туындайтын кең таралған патологиялық өзгеріс. Сипатына қарай бірнеше түрлерге бөлінеді .

Дәл осы жерде назар аударатын жайттардың бірі сүт безінің жоғарыдағы аталған патологиясы болып отыр. Өйткені диссертациялық жұмыста негізі болып отырған препараттың қолданылу жиілігі матопатияның фиброзды-кистозды түрінде кеңінен қолданыс алғаны, аталған сырқаттың маңыздылығы, ауырлық сипаты, кездесу жиілігі, дәрілік заттың әсері мен клеткалық деңгейдегі механизмдерін толыққанды қарауды назар аудартады.

Осы патологияларға, әсіресе сүт безінің қатерлі ісігінің фиброзды-кистозды мастопатияның әртүрлі патологияларында туындауы өзекті мәселелердің бірі болып отыр[63].

Фиброзды-кистоздымастопатияның этиопатогенетикалық механизмдерінің көптүрлілігін және олардың метаболизм үрдістерінің дамуына да деңгейлі әсер ететінін ескере отырып, мастопатияны емдеу кезеңдері де бірнеше құрылымды болатыны сөзсіз. Клетка метаболизіміне жан-жақты әсері мен гормональды статусын ескере отырып табиғи факторға сәйкес келетін ем жүргізілуі ғана жақсы нәтиже беретіні ұйғарылған[64].Фиброзды-кистозды мастопатияға ұшыраған науқастар санының артуына байланысты клиникалық зерттеулермен қатар әртүрлі ғылыми-зерттеу жұмыстары көптеп жүргізіле бастады және әліде жалғасуда. Осы мақсаттар барысында синтетикалық және табиғи емдік заттар түрлері көптеп ұсынылуда. Дегенмен бірде бірі осы уақытта нақты емдік нәтиже бермей отыр.

Ауру сипатының күрделілігімен қатар аурудың пайда болуы да жас талғамайтын сипатқа ие екені анықталған.

Аталған патологияға ем қолданудағы күрделі мәселелер негізі-кешенді терапия барысында ағзаның детоксикациясы ескерілуі керек. Яғни, бұл дегеніміз әртүрлі улы заттардың химиялық және биологиялық әдістермен жою немесе заласыздандыру[65].

Біржағынан әртүрлі экологиялық факторлардан туындаған, екінші жағынан гормональды тепе-теңдіктің ұзақ бұзылыстарынан кейін туындаған эндоинтоксикация осы патологияның негізгі этиогенетикалық факторы болып есептелінеді.

Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы мастопатияның эпителиальды және дәнекер-ұлпалы құрылымының бұзылумен сүт безі ұлпаларындағы пролиферативті және регрессивті өзгерістеріне сәйкес фиброзды - кистозды ауру деген атауды ұсынды.

Сипатына қарай қатерсіз ісіктер тобына жатқанымен фиброзды-кистозды мастопатияны ісік ауруларының түріне жатқызады.

Әдеби деректердегі және зерттеу материалдарына сәйкес мастопатиямен ауыратын әйел адамдардың көпшілігі 3-4 есе сүт безінің қатерлі ісігіне шалдықса, ал сүт безінің пролиферативті-эпителиальды өзгерістері кезінде бұл жиілік 30-40 есеге дейін жоғарылайды.Дегенмен де қазіргі күнге дейін мастопатия мен қатерлі ісік аурулары кезінде қолданылатын нақты онкомаркерлер жоқтың қасы десек те болады.

Статистикалық мәліметтерге шолу жасайтын болсақ, ТМД бойынша сүт безінің қатерлі ісігі салдарынан 50 мың-ға жуығы тіркелсе, 23 мыңға жуық жандар обырдың осы түрінен көз жұмады екен[66].

Осы қатерлі ісікке алмасу қауіпі назарды аудартып отырған фиброзды - кистозды мастопатия сырқатының әйел адамдардағы кездесу жиілігі де жас кезеңдеріне байланысты ерекшеліктерге ие екенін көреміз.

Сондықтан, мастопатияның түрлерінің алдын алу және емдеу барысында әйел адамдардың онкопатологиясының да алдын алу мүмкіндігі жоғары болып

табылады. Сүт безінің қатерсіз ісіктерін жіктелуіне қарай мынадай топтарға бөлеміз.

Мастопатия-сүт бездерінің дисгормональды аурулары, майлы некроз-әртүрлі жарақаттардың әсерінен май ұлпаларының некроз ошағының пайда болуы, мастит- сүт безінің қабынуы, олеогранулема - сүт безіндегі бөгде заттың пайда болуынан туындайтын қабыну ісігі.

Өз кезегінде сүт безінің қабыну процестері барысында туындайтын ісіктерді де жекелей қарастыратын болсақ:сүт безінің липомасы-май ұлпасының қатерсіз ісігі, фиброаденома-сүт безі ұлпаларының қатерсіз ісігі, цистоаденопапиллома-сүт безінің өзектерінде пайда болатын қатерсіз ісіктер.

Фиброзды-кистозды мастопатияға ұшыраған науқастар санының артуына байланысты клиникалық зерттеулермен қатар әртүрлі ғылыми-зерттеу жұмыстары көптеп жүргізіле бастады және әлі де жалғасуда. Осы мақсаттар барысында синтетикалық және табиғи емдік заттар түрлері көптеп ұсынылуда. Дегенмен бірде бірі осы уақытта нақты емдік нәтиже бермей отыр[67].

Ауру сипатының күрделілігімен қатар аурудың пайда болуы да жас талғамайтын сипатқа ие екені анықталған.Әйелдердегі кистозды мастопатияның сүт безінің қатерлі ісігіне алмасу қауіпі жоғары болып отыр. Көптеген зерттеулерде аталған мәселені жан-жақты қарап, зерттеп, талқылауға салуда. Фиброзды-кистозды мастопатияның туындау жиілігі 30 жастан асқан соң жоғарылайтыны туралы статистикалық мәліметтер бар[68].

Фиброзды-кистозды мастопатияныңэтиопатогенетикалық механизмдерінің көптүрлілігін және олардың метаболизм үрдістерінің дамуына да деңгейлі әсер ететінін ескере отырып, мастопатияны емдеу кезеңдері де бірнеше құрылымды болатыны сөзсіз. Клетка метаболизміне жан-жақты әсері мен гормональды статусын ескере отырып табиғи факторға сәйкес келетін ем жүргізілуі ғана жақсы нәтиже беретіні ұйғарылған[69].Дегенмен де аталған сырқаттың кейбір дерек көздерде жасөспірім қыз балалар мен, жастар арсында да пайда болу қауіпінің жоғары мәліметтері анықталған.

Сондықтан да сүт безінің қатерлі ісігінің алғы шарттары аталған сырқаттың асқынуларынан пайда болуы да мүмкін деген болжамдар көптеп кездеседі.

Фиброзды-кистозды мастопатия әйелдердегі сүт безінің түйін түрінде түзілістермен ерекшеленетін қатерсіз фиброзды-кистозды өзгерісі.

Жағымсыз жайлар тудыру сипатымен аурудың әсерінен кеуде тұсында ауырсынулар туындауы аурудың басты сипаттарының бірі. Ағзаның білгілі бір физиологиялық алмасу кезеңдерінде ғана айқындалатын және ауырсыну жағдайлары басым болатын бұл патологиялық күй қатерлі ісікке алмасуы күрделі болып табылады[70,71].

Фиброзды-кистозды мастопатияның туынду себептері неге байланысты деген сауал төңірегінде назар аударатын болсақ, кеудедегі түйіндер себептерінің басты сипаты аналық жұмыртқа клеткаларындағы гормондық өзгерістерден болып табылады.Осы гормондар әсеріне байланысты түйіндердің пайда болып, ісіну туындауы айқындалады. Ауырсыну сезімінің басты

байқалатын кезеңдері көп жағдайда етеккір циклінің басталу кезеңдерімен тұспа-тұс келеді. Осы мерзімдерде киста әсерінен туындағын түйіндердің саны немесе тығыздығы бірден байқалады[72].

Аурудың асқыну деңгейлерін анықтау және алдын алу барысында әлем елдерінде әйел тұрғындарының жылына екі рет маммолог маманның тексерілуінен өтуін қадағалап отырады.

Сүт безіндегі пайда болған кистаның көлемі мен қатерлі ісік ауруына күдік болған жағдайда аспирациялық биопсия жасауды ұсынып, биоптат нәтижесне қарай қатерлі ісік деңгейін сипаттап береді.

Аурсынуларды бәсеңдету барысында, көп жағдайда ибупрофен жән ацетоаминофен секілді препараттарды қабылдап жатады. Фиброзды-кистозды мастопатия жағдайында сонымен бірге киста көлеміне қарай сұйықтықты арнайы инелермен сорғызып алып тастап ауырсынуды бәсеңдетуге немесе гормональды препараттар тағайындалады[73].

Аталған аурудың алдын алу барысында кофеин құрамдас сусындарды, майлы және алмастырылмайтын май қышқылдарын қабылдауды шектеу арқылы аурудың алдын алуға болады деген қате түсінік те бар.

Қатерлі ісік бар екенін көзбен көріп қана айтуға болмайтыны жақсы білеміз. Ал негізгі сырттай бақылауға болатын мәселелерге қатты ауырсыну сезімі мен қатар, сүт безі маңының терісінің қатпарлануы,ондағы түйіндер санының көбеюі, іріңді,кейде қан аралас сұйықтықтың бөлінуі жатады [74].

Сүт безінің кистозды сырқаты кезіндегі асқынулар салдары қатерлі ісікке алып келіп соғуы мүмкін деген болжамды анықтау барысында жүргізілген тәжірибелер барысында британ және венгер әйелдеріне зерттеулер кистадан алынған сұйықтықтарды эстроген позитивті және Mcf-7 MDA-MB-231 сүт безінің қатерлі ісігі клеткаларымен зерттеулер жүргізілген. Нәтижелерді анықтауға радиометрлік әдістер қолданылады.

Аталған патологияға ем қолданудағы күрделі мәселелер негізі-кешенді терапия барысында ағзаның детоксикациясы ескерілуі керек. Яғни, бұл дегеніміз әртүрлі улы заттардың химиялық және биологиялық әдістермен жою немесе заласыздандыру[75].

Фиброзды-кистозды мастопатия кезіндегі ауырсыну бір безден екінші безге беріле отырып мазалайды. Сырқаттың ауырсыну градиенттері бойынша сипаттама берер болсақ, нәзік жандылардың аурудың бастапқы кезеңдерінде мән бермеуінің салдарынанқалыпты тіршілік-әрекетін жалғасыра бергенімен бірте бірте клеткалық деңгейдегі үдерістердің бұзылу себептеріненауырсыну белгілері белең ала бастайды[76]. Осы сипаттарға қосымша сүт безінің ауырсынулары ондағы түзілген сұйықтыққа толы кистаның көлемінің өзгерісіне байланысты менструальды циклдың уақыты кезінде, болмаса басқа да өткір және созылмалы сырқаттармен қатар жүре отырып белсенділік танытып, жұмысқа жарамсыздыққа әкеп соғады.Себебі зақымдалулар терең ұлпалар мен лимфа түйіндеріндегі күрделі бұзылыстар нәтижесінде жүреді. Сонымен қатар өлім дағдайларына дейін әкелетіні туралы мәліметтер тіркелген. Фиброзды-кистозды мастопатия сырқатының ауырсыну градиенттер сипатына

қарай: 0 - қалыпты іс-әрекет,1 - ауырсыну белгілері, 2- 50% жұмысқа жарамсыздық,3 - мүгедектік күрделі формалары,4 - қозғалыстың шектелуі,5 - өлім жағдайы градиенттік мөлшерді көрсетіп отыр[77].

Фиброзды-кистозды мастопатия қатерлі ісіктен негізгі айырмашылықтарының бірі киста көлемінің өте баяу өсуі. Ағзадағы гормональды өзгерістердің тербелісіне байланысты ауырсыну кезеңдері де алмасып отырады[78]. Ал қатерлі ісік клеткаларына тән негізгі ерекшеліктердің бірі клетка мөлшерінің тез өсу мен метастаздық қасиетінің тым белсенді екенін білеміз. Сонымен қатар фиброзды-кистозды мастопатия киста көлемі секілді шектеулі қалтамен қоршалмағандықтан, тез жайылып, жақын жатқан ұлпаларға, қан тамырларына және лимфа түйіндеріне таралуы әбден мүмкін. Сүт безінің қатерлі ісігі кезіндегі сыртқы сипатына суреттеме беретін болсақ, көлемінің тім кішірейіп кеткенін немесе шектен тыс ұлғайыпкеткенін байқауға болады[79].

Ал фиброзды-кистозды мастопатия кезінде бұл сипаттар түйін саны мен қаттылығы және ауыртпалық белгілерімен анықталады. Ультра дыбысты зерттеулер арқылы ғана маммографиялық кескін мен биопсиялық материалдан соң ондағы түйінің көлемі мен тығыздығының мөлшерін нақты анықтауға болады.

Сонымен, сүт безінің құрылымы мен клеталық деңгейдегі зақымдануларынан туындайтын патологиялық аурулар аталған мүшенің қатерлі ісік түрлерімен салыстырғанда қатерсіз ісік түрінде өте жиі кездеседі. Науқастарға маммография, ультра дыбысты зерттеу, кеуде бөлімінің магнитті резонансты томографиясы, пункциялық биопсиялар түрлерін қолдана отырып сүт безінің қатерсіз ісігін анықтап, хирургиялық тәсілдер қолданбай-ақ емдеу жолдары ұсынылады[80].

Аталған сырқаттың қатерлі ісік түрлері әйелдерде өмірінің кінші онжылдық кезеңдерінен басталып, төртінші және бесінші он жылдық кездерінде яғни менапаузалық кезеңдерде қарқынды дамитыны зерттелінген.

Сүт безінің фиброзды-кистозды түрінің қатерлі ісікке алмасу қауіпі бар болғандықтан аталған аурулардың кездесу жиілігі, емдеу жолдары, әйел адамдар өміріне қауіптілігі жақтарынан әдеби деректерге, ғылыми мақалаларға сілтеме жасай отырып сипаттама беруге тырыстық[81].

Қатерлі ісік ауруларының қазіргі кезде ғасыр дертіне айналып отырғаны даусыз. Әлемнің дәрігерлері мен ғалымдарының назарын аударып отырған бұл сырқаттың алдын алу мен емдеу жолдары бағытында қаншама еңбектер жасалынып, ғылыми зерттеу жұмыстары жан-жақты жүргізілуде[82]. Емдік нәтижелерінің жан-жақтылығы, сырқаттың клеткалық деңгейінен басталып, дәрілік препараттарды толыққанды жүйелі қолдана отырып, сырқаттың адам ағзасының өзге жүйелері мен мүшелеріне зақымын тигізбеу мақсатында мүшені хирургиялық ота жасау арқылы алып тастау жолдарына дейін қарастырылуда.

Сүт безінің рагы немесе қатерлі ісігі басқа да қатерлі құрылымды ісіктер секілді ағзада қалыптасады. Бір немесе бірнеше майлы ұлпалардың мутациялық өзгерістерінің нәтижесінде жылдам көбеюінен ісіктер пайда болды. Өз

кезегінде ол ісіктер жақын жатқан ұлпаларға көшіп немесе метастаздық қабілетінің нәтижесінде ісіктің ошақтарына айналады[83].

Көп жағдайда сүт безінің қатерлі ісіктері сүт безінің сүт жолы немесе өзектеріне туындайтындықтын онколог дәрігерлер өзекті карцинома деп те атайды. Көп жағдайда қатерлі өсінділер сүт безінің түйіндерінен пайда болатындықтан қатерлі ісіктердің мұндай сипатпен кездесуін лобулярлы карцинома деп атайды. Дегенмен де қатерлі ісіктің өсінділері май ұлпаларының басқа да ұлпаларынан дамитынында ескеруіміз жөн[84].

Сүт безінің қатерлі ісігінің нақты даму этиологиясы туралы ақпарат жоқтың қасы. Сондықтан да туындауға себеп болатын факторларды атап кетер болсақ: жас ұлғаюы, гормональды препараттарды ретсіз қолдану,сүт безінің жарақаттары, радиациялық сәулелер әсері, менструалды циклдың ерте басталуы бедеулік,шылым және алкогольді ішімдіктер пайдалану, қант диабеті,анасы немесе әпке-сіңілілерінде қатерлі ісіктің болуы, туыстарының бірінде сүт безі немесе жұмыртқалық бездеріндегі қатерлі ісіктің болуы, BRCA-1немесе BRCA-2 гендерінде мутациялық өзгерістердің туындауы, сүт безіндегі қатерсіз түзінділердің болуы (мастопатия), т.б.

Әдебиеттерде сүт безінің қатерлі ісігінің дамуына себепші негізгі факторлардың біріне жас кезеңдерінің ұлғаюын атап көрсетеді. Сандық мәліметтерге қарайтын болсақ, 40 жастан асқан әйелдерде 0,5 %-ыяғни 231 әйелдің бірі қатерлі ісікке душар болса, 40-60 жас аралығындағы әйелдердің 4 %-ы, яғни 25 әйелдің біреуі, ал 60-80 жас аралығында 7%-ы бұл дегеніміз 15%-ға жуығы осы жас кезеңдерінде аталған дертке шалдығады екен. 90 жасқа дейінгі өмір сүретін әйел адамдардың әрбір жетіншісі (14,3%) осы дерттен жапа шегетіні анықталған [85].

Ал, елімізде сүт безінің қатерлі ісігі басқа ісік түрлерімен салыстырғанда 20,3 пайыздық көрсеткішпен бірінші орында тұрса, өлім жағынан екінші орынды құрайды.

Сүт безінің қатерлі ісігі кезінде алғашқы белгілердің байқалмауы басқа да қатерлі ісіктің белгілеріне сай заңдылықтардың бірі болып келеді.

Көп жағдайда алғашқы белгілері қолтық асты бөліктерде түйіндердің пайда болуы мен ауырсынулары арқылы байқала бастайды[86].

Бұл сипаттары фиброзды-кистозды аурудағы белгілерге тән және басқа да қатерсіз өсінділер кезінде де осы ерекшеліктер байқалады.

Сүт безіндегі патологиялық өзгерістердің пайда болу қауіпі туындаған кезде үй жағдайындағы бақылау, менструальды циклдың аяқталған кезінде бақылау тиімді болмақ. Ауырсыну деңгейінің артуы мен қауіп туындаған жағдайда дәрігер маммологқа көріну, қажет болған жағдайда биопсиялық материал тапсыру сырқаттың алдын алуға тиімді болады[87].

Сүт безінің қатерлі ісігінің тән сипаттарға тоқталатын болсақ: сүт безі маңындағы терінің қатаюы,сүт безі маңындағы терінің тартылыуы, тері эрозиясы, терінің қызаруы, сүт безінің симметриясының өзгеруі, сүт безінде түйіннің болуы.

Сүт безінің қатерлі ісігін емдеу барысындағы жүргізілетін ем-домдар қатерлі ісіктің деңгейі немесе дәрежесіне тікелей байланысты. Химиотерапиялық ем ретінде қолданылатын препараттар қатерлі ісіке қарсы оларды жоюға бағытталған негізде болады. Химиотерапияның тиімділігі туралы сауалдарға келетін болсақ, оның әсерін 1-2 аптадан кейін-ақ байқауға болады. Дегенмен жүрек айнуы, қанның зақымдалуы және шаштың түсуі секілді жанама әсерлері де жоқ емес.Сүт безінің қатерлі ісігі кезінде қолданылатын химиотерапияның екі түрі болады. Олар: адъювантты және емдік химиятерапия деп ажыратылады[88] .

Адъювантты химиятерапияны қосымша немесе профилактикалық деп те атайды. Ол операцияға дейін де кейін де қолданылады. Бұл терапияның негізгі мақсаты, ісіктің химиялық препараттарға сезімталдылығын анықтау болып табылады. Бұл әдістің әлсіз тұстары сол ота уақытын шегеруге, ісіктің гистологиялық сипатын анықтау барысында қиыншылықтар тудыратыны және прогестерон мен тестостерон рецепторларын анықтаудағы қиындықтар тудыратындығында[89].

Қатерлі ісік кезіндегі қолданылатын емдік химиятерапия алыс жатқан мүшелерге метастаз берген кезде қолданылады. Ал индукциялы химиотерапия сүт безіндегі жергілікті ісік көлемінің мөлшерін азайтуға, ота жасауға кеңінен қолданылатын шараның бір түрі.

Ал фиброзды-кистозды мастопатия кезінде көп жағдайда гормональды препараттармен емдеу бағытталған. Сонымен қатар емдеу барысында кеңінен қолданылған препараттардың бірі-даназол препараты. Емдік әсерінің нәтижелілігін ұзақ уақыт пайдаланғаннан кейін ғана көруге болатын бұл дәрілік заттың жанама әсеріне байланысты, фиброзды мастопатиядан зардап шегушілердің көпшілігі қолданудан бас тартқан. Ұзақ қолданыстан соң дауыс ырғақтарының жуандауы және ер адамдарға тән мұрттың қалыңдауы (маскулинизация) секілді өзгерістер нәтижесінен соң қабылдауды тоқтатқаны туралы да деректер жиі кездеседі.

Сонымен, қорытындылай келе әйелдердегі сүт безінің сырқаттарының ағза жүйелерінің қызметінің төмендеуіне әкеліп қана қоймай өміріне қауіп төндіретіні де толығымен ғылыми негіздемелерге сүйене отырып түсіндіріледі. Көп жағдайда сүт безінің фиброзды-кистозды мастопатиясы кезіндегі сырқаттық сипатқа қарамастан назар аудармау, ғасыр дерті болып отырған қатерлі ісікке әкелетіні анықталып отыр[90].

Ағза мүшелері мен жүйелерінің құрылымының физиологиялық жұмысының бұзылуына әкелетін негізгі факторларға сыртқы орта стрестік жағдайларымен қатар, дұрыс тамақтанбау, ұйқының ретсіздігі, салауатты өмір салтын сақтамау және т.б. жағдайлар тікелей әсер ететін ескерсек, уақытында дәрігерлік тексерулерде өту деқатерлі ісік аураларының алдын алуға мүмкіндік береді.

Фиброзды-кистозды мастопатияның ауырлық сипаттарының бірі қайталанбалылығында. 70%-ға жуық әйелдерде сүт бездерінің қабынуы, айлық белгілер сипатына қарай да асқынып ерекше сипатқа ие болып отырады[94].

Тағы бір ерекшелігі 20-30%-ға жуық нәзік жандыларда іріңді сұйықтытың тартылуы мен ісіктің мөлшерінің азаяюы өздігінен басылып, көлемінің азайғаны, біртіндеп сырқаттың қайтқаны көрініс алатын жайттар да кездеседі.

Аталған тақырып барысында жүйелі түрде әдеби деректерге шолу жасау барысында, сырқаттың клиникалық белгілері мен қатар клеткалық деңгейдегі өзгерістеріне де мән бере отырып, қолданылатын емдік іс-шаралардың түрдеріне де назар аударып отырдық. Яғни тек қана Отандық деңгей көлемінде ғана емес, АҚШ, Ұлыбритания секілді алпауыт елдердің де дәрілік препараттарының аталған сырқат барысындағы емдік нәтижелері мен жанама әсерлері де қарастырылды.

Нәтижесінде, көптеген препараттардың ауру басатын әсерлерімен ғана тиімділігі жоғары нәтиже көрсететін, көптеген елдерде осы ауру барысында кеңінен қолданыатын препарат түрлеріне де кездестірдік. Сонымен қатар, әсер етуі ұзақ мерзімді қажет ететін препараттар мен бірге, жанама әсері өте қатты байқалатын дәрілік заттар түрін де кездестірдік.Олардың ішінде: антибиотиктер, бромкриптин, пероральді контрацепті дәрі-дәрмектер, даназол, зәр айдайтын препараттар, гестагендер, қабынуға қарсы стероидты емес препараттар, торемифен т.б. Аталған дәрілердің ішінде даназол, тамоксифен, торемифен, гонадорелин аналогтары және гестринон айқын жанама әсерлер тудырады[91].

Орынбасушы гормональды препараттар терапиясы қатерлі ісік қауіпін тудыруы, венозды трамбоэмболия, өт жолының аурулары секілді бірқатар созылмалы дерттерге алып келуі әбден мүмкін. Ал, пиридоксин, диуретиктер, гестаген,тиболон және көптеген антибиотиктер мастопатияны емдеу барысында қолданылуға болмайтын препараттар қатарына жатқызылды. Осылардың ішінде әсіресе тиболон сүт безінің қатерлі ісігін тудырушы бірден бір препарат деп назар аударуды қатаң қажет етеді.

*Фиброзды-кистозды мастопатиянының пролиферативті және пролиферативті емес түрлері арасындағы салыстырмалы ерекшеліктері***.** Фиброзды-кистозды мастопатиянының пролиферативті және пролиферативті емес түрлері арасындағы салыстырмалы ерекшеліктеріне сипаттама беру барысында 210-ға жуық жағдайлар 7 топқа бөліне отырып қарастырылып,толыққанды зерттелінген. Ғылыми зерттеулер ұзақтығы 9 айға жалғасқан жұмыс барысында жекелей бақылаулар жүргізілген. Мониторинг жоспарына сырқаттардың жас топтары,сүт бездеріндегі түйіндердің ұлғаюы мен кішіреюі сипаттары, киста мөлшері, фиброзды ұлпа құрылымы, дәрі-дәрмектерге төзімділігі т.б. жағдайлар толығымен назарда болған. Нәтижесінде тамоксифен және данаазол препараттарын қабылдаған науқастар арасында мастодинияның 90% жағдайында төмендегені, бромкриптин мен линестренол қабылдағандарда 70%, ал утрогестан қабылдаған 15 ке жуық науқастарда 50% төмендегені көрініс алған.Дегенмен де сырқаттардың жастық еркшеліктері мен киста мөлшері тағы да басқа ерекшеліктеріне орай емделгендер арасында айтарлықтай айырмашылықтар, жанама әсерлерге де байланысты байқалды.

Зерттеу қорытындыларына назар аударғанда урогестан, бромкриптин қабылдап,бақылауда болғандарда ауырсыну мөлшері бәсеңдегені ғана байқалды және гормональды емдеу терапиясы гистопатологиялық емдеу негізінде толыққанды жүргізілуі керек деген шешім қабылданды.

*Фиброзды-кистозды мастопатияның белгілері***.**Бастапқыда фиброзды-кистозды мастопатияны сүт безінің онкологиялық аурулар тудыратын сырқаттар қатарына қатысты деп қарастырылмады. Бірақта соңғы кездердегі ғылыми зерттеулер нәтижесі мастопатияның қай түрі болмасын қатерлі ісік ауруларының алдыңғы күйі деп, қатерлі ісікке алмасу қауіпі бар сырқаттар қатарына жатқызды. Фиброзды-кистозды мастопатия сүт безінің қатерлі ісігін тудыру мүмкіндігі бірнеше факторларға байланысты болып келеді. Мысалы, сырқаттың ұзақтығына, кезеңдеріне,белсенділігіне, пайда болу айқындылығына т.б көптеген факторларға байланысты. Сырқат анамнезіндегі кисталардың ірілігі мен көптігі,фиброаденомалары, аденоз, гиперплазия және пролиферативті мастопатиялар қатерлі ісік дамуын 2-4 рет жоғарылатуы мүмкін. Фиброзды-кистозды мастопатия қатерсіз ісік ауруларының қатарынан болғанымен кей жағдайларда қатерлі ісік туындауына әкелетін аралық үрдіс болып табылады. Сондықтан, осы сырқатпен зардап шегетін науқастардың жай-күйін ұзақ бақылау жолдары сүт безінің онкологиясындағы негізгі талаптардың бірі болып табылады.

Фиброзды-кистозды мастопатия клиникалық сипаттамаларына ауырсынулар мен сүт бездерінің қатаюы, сүт безінің жолдарынан сұйықтықтардың бөлінуі айқын байқалады. Қолмен пальпаторлы зерттеулер жасаған кезде ұсақты-ірілі түзілістер, сүт безінің айналасындағы ұлпалардың қатаюы анық білінеді.Ауырсыну белгілері бірден байқалуы да немесе аяқ астынан басталуы, қол тигізбестей қатты ауырсынулар болады.Ауырсыну белгілері иық буынына немесе қолтық асты бөлімдеріне қарай тартып ауру сипатында берілуі мүмкін. Көп жағдайда сырқаттар уыз түстес сарғыш бөліндінің жасыл немесе сарғыш түсте болуын айтады[92].

Бастапқы белгілер етеккір циклінің басталуы мен немесе етеккір алдындағы белгілер барысында туындайтындықтан бастапқы кезеңдердее қалыпты физиологиялық үрдіс деп мән бермей асқынуларға дейін алып баратын жағдайлар да кездеседі. Бірте-бірте аталған циклға қатыссыз сырқаттың үдеуі қолды көтере алмауға дейін немесе сырттай жанасуларға тітіркену туындайтындықтын жұмысқа қабілеттіліктің төмендеуі мен төсек тартып жатып қалатын жағдайға дейін әкеледі.

*Фиброзды-кистозды мастопатия кезіндегі ауырсынулар***.**Аталған сипат кезінде ауырсыну белгілерінің болмауы сирек кездесетін жайттардың бірі. Көп жағдайда сүт бездері сырқырап, сыздап, шаншу сипаттағы ауырсынулармен сипатталады.Ауырсынулар етеккір келер алдындағы гормондар қызметінің үдеуіне байланысты артуына байқалып, иық буынына, жауырын асты бөлімдері мен қолтықастына қарай беріледі.

Бір ерекшелігі аталған сырқатпен зардап шегетін көптеген нәзік жандылар ауырысынуларды әртүрлі сезінеді екен. Мастопатияның әртүрлерінде

әйелдердің 10%-ында ауырысыну белгілері жанға бата қоймаса, ал кейбіреулері айлық белгілер барысында ғана байқайды,кейбіреулері мүлдем үнемі ауырсыну сезімімен жүруді әдетке айналдырып алғаны соншалық асқынулар үрдісі басталған соң ғана дәрігер көмегіне жүгінеді екен. Аурудың асқыну себептеріне жүйке ұштарына түскен қысым мен ауыру сезімдерін сезінудің жекелей ерекшеліктеріне де тікелей байланысты. Сонымен бірге ауырсыну белгілері тек қана сүт бездерінде ғана емес жақын орналасқан лимфа түйіндерінің ұлғаюына да байланысты болып келеді[93].

Фиброзды-кистозды мастопатия кезіндегі бөлінулер. Фиброзды-кистозды мастопатия кезіндегі сүт безінен бөлінетін бөлінулер сырқаттың барлық кезеңдерінде байқалмауы мүмкін. Бұл жекелей жағдай болып табылады. Өйткені кейбір әйел адамдарда аталған сырқат барысында бөлінулер мүлдем болмауы мүмкін де кейбірінде сұйықтық мөлшерінің көп бөлінуімен сипатталса, кейбірінде сүт безінің ұшына қысым түсіргенде ғана бөлінді байқалады. Бөліндінің сипатына қарайтын болсақ, арнайы иісі жоқ, түссіз сұйықтық, сарғыш және сырқат сипатына қарай жасыл болып келеді. Кей жағдайдажүктілік кезде және босанғаннан кейінгі алғашқы күндері бөлінетін уызға ұқсас сипатта болады. Ескере кететін бір жайт, кей жағдайларда сүт безінің осы патологиясында бөлінетін сұйықтықтар қоңыр немесе қан аралас бөлінетін жағдайлар да кездеседі. Бұл өте назар аудартатын және дәрігерлік тексерулерге жүгінетін жайттар болып есептеледі. Өйткені сүт бездерінің каналдарында ұсақ қан тамырлар мен қантамырлар қабырғаларының зақымдалулары және қатерлі өсінділер бар екенінің бірден-бір себептері болуы әбден мүмкін.Сүт бездерінен бөлінетін қандай бөлінді болмасын, ол қан аралас болған жағдайда да арнайы мамандардан заманауи құрылғылардан тексерістен өткеннің ешқандай артықшылығы жоқ. Өйткені фиброзды-кистозды мастопатия қарапайым белгілеріне мән бермеу барысында үлкен ауыртпашылықтарға ұшырап, қатері ісік жағдайына дейін жеткізу адамдардың денсаулығына салғырттығына тікелей байланысты.

Фиброзды-кистозды мастопатия және жүктілік және лактация кезеңдері. Фиброзды-кистозды мастопатия сырқаты барысында жүкті болуға бола ма деген сауалдарға мамандар оң кеңестерін береді. Өйткені нәресте өсіп дамып жатқан уақытта ағзадағы гормональды өзгерістердің максималдыжүруіне байланысты әйел ағзасында айтарлықтай физиологиялық үрдіс орын алады. Бұл гормондар тұрақтылығын тудырып, көп жағдайда аурудың дамуының тежелуіне әкеледі[94,б. 45]. Сондықтан да гинеколог мамандар фиброзды-кистозды мастопатия кезеңдерінің қай сатысында болмасын жүкті болуға және нәрестені емізу дұрыс деп кеңес айтады.Себебі лактация кезеңдері аурумен күрес болатын негізгі кезеңдерге жатқызады. Баланы неғұрлым ұзағырақ емізетін болса,кистозды түйіндер мен өсінділердің толығымен қайтып кету мүмкіндігі жоғары екені дәлелденген. Жүктілік және лактация кезеңдерінің тұрақтылығы немесе жиілігі фиброзды-кистозды мастопатия алдын алатын процестер болып та саналады. Егерде фиброзды-кистозды мастопатия сырқатынан емделіп жүріп жүкті болған жағдайда сырқат

кезіндегі қабылдайтын гормональды препараттарды қабылдауды тоқтату жайында дәрігермен ақылдасу керек, өйткені гормональды статустың өзгерісін болдырмау керек.Ал фиброзды-кистозды мастопатия сырқатымен ауыратын әйел адамдардағы баланы емізу мерзімі мен ретін дәрігер-маммолог маманы тағайындауы керек. Өйткені аурудың кезеңдері және ағзаның физиологиялық ерекшелігіне тікелей байланысты әр адамда әртүрлі болып келеді. Көп жағдайда сырқаттың алдын алу мен аурудың түйін түзу немесе туындайтын басқа да патологиялық процестердің алдын алу үшін баланы көп уақытқа дейін емізуге рұқсат етеді.Мұндағы маңыздылық, лактациялық мерзім әйелдер ағзасындағы арнайы физиологиялық процестерге, оның ішінде фиброматозды түйіндер мен кисталар түзуіне тікелей әсер ететін жекелей антидене түзетін сүт бездерінің эпителиальды клеткаларының өсуі мен көбеюін белсендіреді[95]. Ұзақ уақыт емізу барысында сүт бездерінің жай күйін үнемі бақылауда ұстау және арнайы мамандардан тексеруден өтіп, киста мен фиброматозды түйіндер құрылымы мен көлемін бақылап отыру керек.

*Фиброзды-кистозды мастопатия және қатерлі ісік***.**Соңғы кездердегі ғылыми зерттеулер мәліметтеріне орай, фиброзды-кистозды мастопатияны қатерлі ісік туындау қауіпі бар сырқат ретінде қарастыруда. Бұл түсініктің эпителий клеткаларының өсінділері мен карцинома пайда болуы секілді морфологиялық сипаттары бар.Сүт бездерінің құрылымы мен сыртқы сипатына орай төмендегі белгілер байқалған жағдайда арнайы мамандар кеңесіне жүгіну керек. Сүт бездерінің терісінде немесе ұлпаларында түйіндік тығыздалулар, әсіресе ұлпалармен немесе өзара бірігіп кеткен тығыз түйіндердің болуы, сүт безінің емізігі айналасында, тері жабындысында ойық жара секілді жарақттардың пайда болуы және сүт безі ұлпаларының жекелей ошақтанып ісінулер, ұсақ капиллярлардың білеуленіп айқын көрінуі,сүт безінің өзектерінен қоңыр, қан аралас бөлінділердің ағуы. Сонымен бірге тері мен тері жабындыларында қызарулардың пайда болуы, сүт безінің және емізік айналасындағы қалыпты құрылымының өзгеруі, түйіндердің пайда болуы, тағы да басқа көзге көрінетін үдерістердің барлығы осы сырқаттың барлығын айқындайды.Аталған сипаттар байқалған жағдайда кешіктірмей дәрігер көмегіне жүгіну ауыр қатердің алдын алуға мүмкіндік береді.

*Диффузды фиброзды-кистозды мастопатия.*Фиброзды-кистозды мастопатияның диффузды түрінде сүт безінің зақымдалуы дәнекер ұлпаларының шамадан тыс артық өсуімен сипатталады.Мұндай жағдайда сүт безінің өзектері құрылымы бұзылып,ұсақ кистозды түзілістер пайда бола бастайды. Диффузды мастопатияның этиологиясы әртүрлі болып келетіндіктен, генетикалық сипатқа да, экологиялық және де басқа факторларға байланысты. Аталған сырқатты анықтайтын себептерге нейрогуморальды процестердің бұзылуы, эстроген бөлінуінің жоғарылауы мен прогестерон гормонының жетіспеушілігі де жатады.Ұлпаларды зақымдау сипаты мен құрылымына қарай диффузды мастопатияның мынадай түрлерін ажыратамыз.Олар:безді құрылымның басымдылығынан туындайтын патология(аденоз), фиброзды құрылымның басымдылығымен туындайтын патология (фиброаденоматоз),

кистозды құрылым басымдылығынан туындайтын патология (кистоз),фиброзды-кистозды мастопатияныңаралас түрі[96].

Ағзадағы осы байқалған бұзылыстардың жылдамдығы мастопатияның қай түрі екенін анықтауға және білінбейтін, баяу және анық түрлеріне бөліп қарастыруға мүмкіндік береді.

*Түйінді фиброзды-кистозды мастопатия***.**Түйінді фиброзды-кистозды мастопатия түріне кей кездері ошақты фиброзды-кистозды мастопатиядеген термин береді. Түйінді мастопатия дәнекер ұлпалы бөлімдердің өсуінен жекелей немесе көптеген түйіндер түзуімен ерекшеленеді. Аталған сырқатта пальпация арқылы арнайы шеттері бар бір немесе бірнеше түйінді сезуге болады. Етеккір циклы жақындаған кезде түйіндер ісініп, ауырсыну белгілері үдей түседі. Айлық белгілер мерзімі өткен соң түйіндер құрылымы мен формаларын қолмен анықтауға болады.Қолмен бақылау көлденең жатқан жағдайда анық байқалады.Перифериялық түйіндер мүлдем байқалмайды. Ауырсынулар білінбеуі немесе мүлдем болмауы мүмкін. Сондықтан да ауруды көп жағдайда арнайы тексерілуге келген кезде ғана анықтауға болады.Түйінді мастоптаия диффузды мастопатияның түзілуіне әкелетін бірден бір түрі болып табылады.

*Пролиферативті емес фиброзды-кистозды мастопатия***.** Пролиферативті емес фиброзды-кистозды мастоптаия термині медициналық ұғымда пролиферациялық белгілері байқалмайтын, бездегі ұлпалық өсінділер мен жаңа түзілістер және клеткалардың белсенді бөлінуі байқалмайтын түрі болып саналады. Бұл ауруда басқа патологиялық өзгерістермен салыстырғанда ұлпа мен мүшелердің құрылымдық элементтерінің саны ұлғаймайтынымен ерекшеленеді. Дегенмен де жаңа түзілістер емес, бірақта ұлпалардың аздаған немесе шоғырланған түрлері кездеседі. Пролиферация деп қандайда бір қабыну барысындағы сау ұлпалар мен зақымдалған ұлпаларды ажыратуға болатын жағдайдағы клеткалардың көбею үрдісін айтады. Фиброзды-кистозды мастопатия пролиферативті емес түрі қатерсіз болғанымен үнемі медициналық бақылау мен емді қажет ететін түрі болып есептеледі.

*Аралас фиброзды-кистозды мастопатия***.**Аралас фиброзды-кистозды мастопатиядасырқаттың барлық сипаттамалары тән болып келеді. Диффузды фиброзды-кистозды мастопатия сүт безіндегі әртүрлі сұйықтыққа толы түзілістердің пайда болуымен (қалталар немесе киста) сипатталады [97].Фиброзды мастопатияның сүт безіндегі дәнекер ұлпалы бөлімдерінде өсінділердің пайда болуы, сүт бездерінде аденоздың пайда болуы (безді құрылымның өсуі)-безді ұлпалардың шамадан тыс өсуі,сүт безінің көлемінің ұлғаюымен сипатталады.

Сонымен, фиброзды-кистозды мастопатия жайында әдеби деректерді саралай келе аталған сырқаттың кездесу жиілігінің жастық ерекшеліктерін, ауырлық деңгейлерін, жұмысқа қабілеттілікті төмендетуден бастап қатерлі ісік деңгейіне дейін жекізіп, летальды жағдайға да алып келетін ағза жүйелерінің патологиялық зақымдалуының клеткалық деңгейден бастап зерттеуді талап ететін маңызды материал екенін топшыладық.

1.4 Митохондрия - клетканың энергетикалық орталығы ретінде

Биология ғылымының әр саласы тірі ағзадағы үдерістердің клеткалық, клетка органоидтарының құрылым, қызметтерін меңгеруде әр тіршілік иесінің ағза жүйелерінің зерттелінген, әлі де толыққанды зерттеуді қажет ететін маңыздылығын арттыра түседі.

Зерттеу жұмыстарымызға арқау болып отырған митохондриялар және олардың клеткалардағы атқаратын қызметіне сәл шолу жасап, еске түсіретін болсақ, митохондриялар алғаш рет цитологтармен XVIII ғасырлардың орта шенінде құрылымдық сипаттамасы алынды. Тыныс алу ерекшеліктерін тәжірибе түрінде зерттей бастағанда және цитохром *с* оксидазаны сипаттауды бірінші рет 1930 жылдары О.Варбург жарияланған болатын [98].

Бұл органоид клетка ішінде энергетикалық метаболизмінде маңызды рөл атқаратыны,клетканың тыныс алу үрдісіне қатысып,басқа құрылымдары пайдалана алатын түрдегі энергия бөліп шығаратыны толыққанды сипат алды. Сондықтан, митохондрияны «клетканың энергетикалық ортасы, қуат қоры станциясы» деп те атап келеді.

Клетканың энергетикалық орталығы болып табылатын бұл органоидтардың саны клетканың түріне қарай өзгермелі болады және шамамен клеткалардың энергия қажеттіліктеріне сәйкес келеді.Мысалы ретінде айтар болсақ, жануарлардың аталық жыныс клеткаларында митохондриялардың саны 20-дан 70-ке дейін, ал ер адам ұрық клеткаларында 16 және аналық жыныс клеткаларда 100000 дейін, бауыр клеткаларында 2500 дейін митохондриялар кездеседі.

Митохондриялар клетканың цитоплазмасында біркелкі, ал кей жағдайларда, әсіресе, патология кезінде, ядроның айналасына немесе цитоплазманың шетіне қарай орын табады. Клетка цитоплазмасында клетка қосындылары (мысалы гликоген, май) көп болған жағдайда олар митохондрияларды клетканың шетіне ығыстырады. Митохондриялар митоз процесінде ұршық жіпшесінің айналасына шоғырланып, клетка бөлінгенде олар жас клеткаларға тең беріледі. Негізінде митохондриялар АҮФ керек жерлерге миофибриллдерге жақын, ал сперматозоидтерде талшыққа қарай орналасады. Сонымен, митохондриялардың саны клетканың түріне және оның атқаратын қызметіне байланысты болады деп сипатталады.

Митохондриялардың тотығу-фосфорлану арқылы эндогендік клеткалық оттегінің белсенді түрінің көп мөлшерін түзеді. Қалыпты физиологиялық жағдайларда,оттегінің белсенді түрлері өндірісі І кешеннің белгілі бір бөлігімен жоғары деңгейде реттеледі[99].

Энергетикалық зат алмасу- бұл клеткадағы органикалық заттардың ыдырау реакцияларының жиынтығы, солардың нәтижесінде қосылыстардың макроэргиялық байланыстарымен (яғни АТФ молекуласының екі макроэргиялық фосфорлы-оттек байланыстарымен) синтезі жүреді

Клеткадағы энергетикалық зат алмасуды үш кезеңге жіктеуге болады:

1) дайындық кезеңі; 2) анаэробты (оттексіз) кезең; 3) аэробты (оттегілік немесе тыныс алу) кезең.

1) Дайындық кезеңі.

Бұл дайындық кезеңі көпклеткалы организмдердің ішек-қарын жолдарында жүреді. Күрделі макромолекулалар асқорыту ферменттерінің көмегімен қарапайым заттарға дейін ыдырайды:

- крахмал – глюкозаға дейін;
- белоктар – аминқышқылдарға дейін;
- майлар – үш атомдық спирт глицерин мен май қышқылдарына дейін.

Бұл үрдістер ішек қуысында да, және гликокаликсте де олардың эпителиалды клеткаларында жүреді. Энергия бұнда аз бөлінеді, және ол жылу түрінде бөлінеді (АТФ синтезделмейді).

Ыдыраған өнімдер ішек клеткаларымен сіңіріледі де, қанға өтеді. Кейін олар клеткалрдың цитоплазмасына түседі.

Зат алмасуда ең көп қолданылатыны бұл глюкоза, дегенмен бастапқы материал болып, басқа да гексозалар, май қышқылдар, амин қышқылдар болуы мүмкін. Бұндағы амин қышқылы ең соңынан қолданылады, себебі олар клеткалар үшін өте бағалы материал болып табылады.

2) Анаэробты (оттексіз) кезең.

Ол клеткалардың гиалоплазмасында жүреді. 6-көміртекті қант глюкозаның ыдырау реакциясының жиынтығы гликолиз деп аталады және ол рет-ретімен жүретін 10 жуық ферментативті реакцияларды қамтиды. Гликолиз үрдісінде фосфорлану, дегидрогенерациялану, дефосфорлану реакциялары жүреді. Осы реакциялардың нәтижесінде бейорганикалық фосфатты (Фб) және АДФ қолдану арқылы АТФ синтезделеді. Осыдан жалпы төрт молекула АТФ түзіледі, бірақ олардың екеуі гликолиздің бірінші сатысында шығарылады, сол себепті гликолизде таза түрінде екі молекула АТФ синтезделеді.

Глюкозаның бір молекуласының (Сб-қосылысы) ыдырауынан 2 молекула пируват-пирожүзім қышқылы (ПЖҚ, С3-қосылыс) түзіледі, ал глюкозаның дегидрогенерациялану нәтижесінде сутегі атомдары $НАД^+$(никотинамидадениндинуклеотид-тотыққан) ко-субстратына өтеді де, $НАДН^{\bullet}Н^+$ ($НАД^+$ тотықсызданған формасы) түзіледі.

НАДН – қоректік заттар молекулаларының тотығуы кезінде бөлінетін протондар мен $е^-$ ең басты акцепторы болып табылады. $НАДН^{\bullet}Н^+$ әрбір молекуласы жәй $Н^+$ атомын тасып қана қоймайды, ал гидрионды, яғни Н атомын $е^-$ қоса тасымалдайды.

$$H:^- + H^+ \rightarrow H_2$$

Клеткада оттегі жетіспеген жағдайда гликолиз пирожүзім қышқылынан (ПЖҚ) түзілетін сүт қышқылының (лактат) түзілуімен бітеді. Бұл қайтымды реакция болып табылады. Егер оттегі ұзақ уақыт болмаған жағдайда клтекада лактат жиналады да, лактоацидоз (сүт қышқылының жоғары деңгейі) дамиды. Сүт қышқылы өте токсикалық болып табылады және клеткалардың қызметінің бұзылуын тудырады, яғни ең алдымен жүйке және бұлшықет қызметін.

Гликолизді сумарлы түрде төмендегідей келтіруге болады:

$$Глюкоза\ (С6) + 4НАД^+ + 2АДФ + 2Фб \rightarrow 2ПВК\ (С3) + 4НАДН^{\bullet}H^+ + 2АТФ$$

O_2 болған жағдайда эукариотты клеткалардағы энергетикалық зат алмасу митохондрияларда жүретін аэробты сатыға өтеді.

3) Аэробты кезең.

Аэробты немесе оттегілік кезеңіде ПЖҚ мен май қышқылдарының CO_2 мен H_2O дейін ыдырауы жүреді және АТФ молекуласының үлкен мөлшері (36) синтезделеді және бұл реакцияларының көпшілігі митохондриялардың ішкі мембранасында, оның кристалары мен матриксінде жүреді [100].

Аэробты кезең немесе тыныс алу бірнеше сатыға бөлінеді және олардың кезектілігін жалпы алғанда, төмендегідей келетіруге болады.

1. Митохондриялардың ішкі мембраналарының белгілі бір белоктық тасымалдау жүйелері пируват, май қышқылдары және НАДН молекулаларын гиалоплазмадан митохондриялардың матриксіне тасымалдайды. Май қышқылдарын тасымалдау үшін алдымен кофермент А, ацетил-КоА кешендері синтезделеді және олар матрикске тасымалданады.

2. Тотығу декарбоксилдену үдерісінде пируватдегидрогеназа ферментінің көмегімен пируваттың (ПЖҚ) ацетил-КоА айналуы жүреді және бұл НАДН коферментінің тотықсызданууымен, CO_2 бөлінуімен болады:

$$ПЖҚ\ (С3) \rightarrow ацетил\text{-}КоА\ (КоА\text{-}S\sim CO\text{-}CH_3) + НАДН^{\bullet}H^+ + CO_2$$

Ацетил-КоА–бұл бір субстраттан екінші субстратқа ацетилдік топтамаларды таситын тасымалдағыштар болып табылады.

3. Параллелді түрде май қышқылдарының ацетил-КоА дейін β-тотығу үрдісі жүреді, және бұл НАДН пен $ФАДН_2$ коферменттерінің тотықсызданууымен ұштасады.

4. Лимон қышқылының циклінде (Кребс циклі) ацетил-КоА $СO_2$ дейін тотығуы жүреді, және бұл НАДН пен $ФАДН_2$ коферменттерінің тотықсызданууымен ұштасады. Ол митохондриялық матриксте жүретін 7 ферментативтік реакциялардан тұрады, және бұл кезде декарбоксилдену, яғни CO_2 түрінде екі көміртегі атомының жойылуы мен үшкарбон қышқылының дегидрогенирациялануы немесе сутегі атомының ыдырауы жүреді. Бұл кезде Н атомдары $НАДН^+$-және ФАД-коферменттерімен акцептрленеді (НАД - никотинамидадениндинуклеотид, құрамында никотин қышқылы бар; ФАД - флавинадениндинуклеотид, В2 витаминінің туындысы болып табылады) және 1 молекула АТФ (ГТФ арқылы) синтезделеді.

Жалпы алғанда, Кребс циклінің реакцияларын төмендегідей келтіруге болады:

$$CH_3CO\sim КоА + 2H_2O + 3НАД^+ + ФАД \rightarrow\rightarrow КоА + 2CO_2 + 3НАДН^{\bullet}H^+ + ФАДН_2 + АТФ$$

НАДН•H^+ пен $ФАДН_2$ дегидрогеназа ферменттерінің кофакторлары болып табылады және митохондриялардың ішкі мембранасында орналасқан және электрондарды молекулалық оттегіге тасымалдауға қатысатын тыныс алу тізбегінің ферменттеріне протондар мен электрондарды таситын тасымалдағыш қызметін атқарады.

5. Тыныс алу үрдістері кезінде электрондар НАДН пен $ФАДН_2$ молекулалық оттегіге митохондриялардың ішкі мембранасындағы электрон тасымалдау тізбегімен тасымалданады, соның нәтижесінде протон қозғаушы күші қалыптасады.

6. Протондық градиент митохондриялардың ішкі мембранасында АТФ синтездеу үшін АТР синтетаза (F_0F_1 кешені) ферментімен пайдаланылады.

Тыныс алу тізбегінің ферменттері электрондарды тасымалдау тізбегін (ЭТТ) немесе тыныс алу тізбегін түзеді және тотығу-тотықсыздану потенциалының өзгеру деңгейі бойынша, яғни электрондарды қосып алу (тотықсыздану) немесе беру (тотығу) қабілеті бойынша белгілі бір ретпен орналасқан 40 жуық әртүрлі белоктарды қамтиды [101].

Тыныс алу тізбегінің компоненттеріне НАД- пен ФАД-тәуелді дегидрогеназалар, ко-фермент Q, цитохромдар, темір-күкіртті белоктар мен мысқұрамды белоктар жатады. Кесте 1 митохондриялық электрон тасымалдау тізбегінің протеинді компоненттері мен олардың қасиеттері көрсетілген. Сонымен бірге, 3-суреттеэлектрон тасымалдау тізбегі мен тотығу фосфорлану ферменттерінің орналасу сызбанұсқасы көрсетілген.

*Тыныс алу тізбегінің кешендері. Кешен I (НАДН-убихинон-оксидоредуктаза, НАДН-КоQ-редуктаза немесе НАДН дегидрогеназа)*тыныс алу ферменттері кешендерінің ішінен ең ірісі болып табылады, салмағы 800 кДа асады және құрамында 42-ден астам әртүрлі полипептидтік тізбектер бар, соның ішінде ФМН-құрамды флавопротеин мен кем дегенде алты темір-күкіртті орталықтары бар. Кешен I құрылымы L-пішінді екі «қолдан» тұрады: ішкі митохондриялық мембрананың липидті қабатында орналасқан, «ұзын қолды» гидрофобты мембраналық белоктан және матрикске шығыңқырап тұратын және құрамында ФМН мен НАДН байланыстыратын белсенді орталығы бар «қысқа қолды» гидрофилді бөлігінен тұрады.

Кешен I бір уақытта екі байланысқан үрдістерді катализдейді: (1) матрикстегі НАДН пен протоннан гидрид-ионды убихинонға экзоргоникалық берілуі,

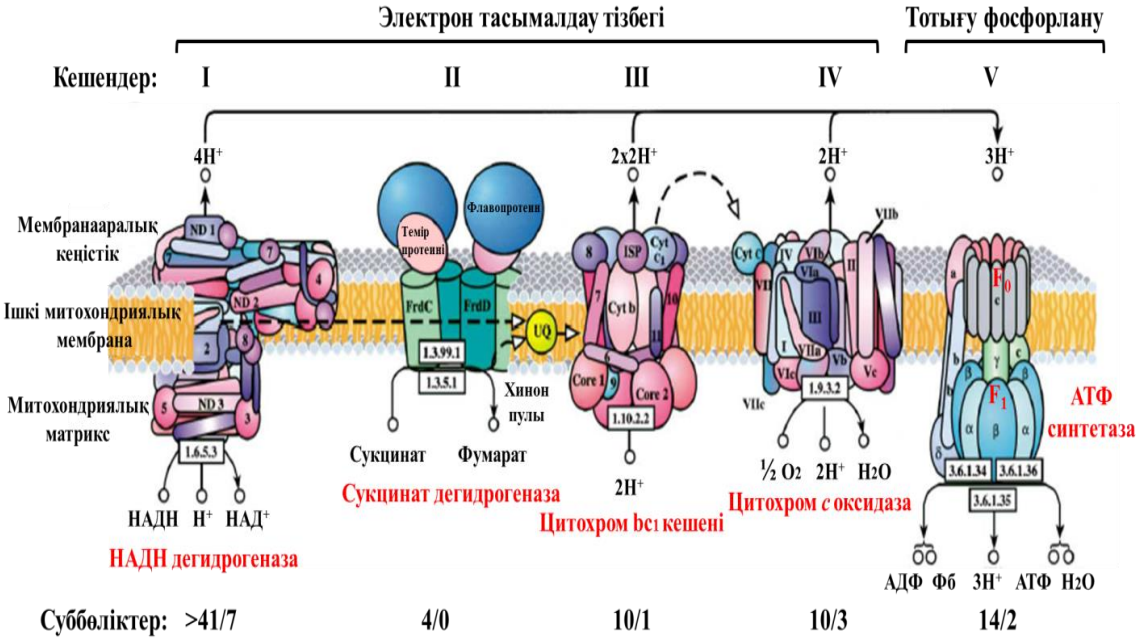
$$НАДН + H^+ + Q \rightarrow НАД^+ + QH_2$$

және (2) матрикстен мембранааралық кеңістікке төрт протонның эндергоникалық берілуі.

Сондықтан, кешен I электрондарды тасымалдау энрегиясына байланысты протондық сорғы қызметін атқарады, және ол катализдейтін реакция, векторлы болып табылады: ол протондарды бір жерден (матрикс, протондардың кетуіне байланысты ол теріс зарядталған болады) басқа бір жерге (мембранааралық кеңістік, оң зарядталғанға айналады) белгілі бір бағытта жылжытады. Сонымен,

кешен I НАД-Н тотықтырады, яғни одан екі электронды тартып алады да, липидтерде еритін убихинонға тасымалдайды, содан соң убихинон мембрана ішінде кешен III диффузияланады.

Убихинон (KoQ, Q) – липидтік фазада еритін ұзақ бүйірлік изопреноидты тізбегі бар бензохинон болып табылады, және ішкі мембрананың биқабатты фосфолипидтерінің әрбір екі қабатында да диффузия арқылы жылжитын және мембраналық белоктардың арасында электрондардың шатлдық тасымалдауын қамтамасыз ететін қабілеті бар (сурет 5).



Сурет 5 – Сүтқоректілердің электрон тасымалдау тізбегініңжәне тотығу фосфорлануының сызбанұсқасы[102]

Электрондар НАДН немесе сукцинаттан, тиісінше I немесе II кешенге ағады да, содан соң убихинон пулына түседі (сары түсті). Содан кейін, электрондар убихиноннан III және IV кешендері арқылы соңғы акцепторы молекулалық оттегіге өтеді. Электрон ағыны, ішкі мембранадағы I, III және IV кешендері арқылы протондар қозғалысымен жалғасады. Нәтижесінде алынған протонды градиент АТФ өндіру үшін V кешен арқылы жиналады. Митохондриялық/ядролық геномдармен кодталатын суббірліктер саны суреттің төменгі жағында көрсетілген.

Кешен II (сукцинатдегидрогеназа; сукцинат-убихинон оксидоредуктаза)– митохондриялық тыныс алу тізбегінің фрагменті ретінде қызмет атқаратын лимон қышқылы циклінің (Кребс циклі) мембранамен байланысқан компоненті болып табылады. Кешен II молекулалық салмағы 125-140 кДа. Кешен II – интегралды белок – құрамында мембраналық сыртқы доменінде орналасқан ковалентті байланысқан ФАД пен темір-күкіртті орталықтары бар, және сукцинаттан убихинон мен цитохром b геміне (гидрофобты мембраналық доменінде орналасқан) электрондардың берілуін катализдейді. Сонымен қатар,

ол төрт түрлі протеинді суббірліктерді қамтиды. С және D суббірліктерінің әрқайсысы үш трансмембраналық спиралі бар интегралды мембраналық белоктар болып табылады. Олар гем тобы (гем b) мен убихинонмен байланысатын сайтын (кешен II катализденетін реакциясындағы электрондардың қорытынды акцепторы) қамтиды.

А және В суббірліктері матрикске қараған жерінде тұрады; олар құрамында үш 2Fe-2S орталықтары, байланысқан ФАД және сукцинат субстратымен байланысатын сайты бар. Электрондардың сукцинат-байланыстырушы сайтынан ФАД-қа, содан кейін Fe-S орталықтары арқылы Q-байланыстырушы сайтына тасымалдану жолы, ұзындығы 40 Å артық болып табылады, бірақ жеке электрон-тасымалдау қашықтықтарының ешқайсысы шамамен 11 Å асырмайды, бұл электрондарды жылдам тасымалдау үшін жеткілікті қашықтық болып табылады. QH_2 осы барлық реакциялардан кешен III тотығады[103].

Сонымен, комплекс II протондарды өзінен өткіздірмейді, бірақ сукцинаттың тотығу салдарынан қосымша электрондардың тізбекке кірістірілуін қамтамасыз етеді.

Кешен III (цитохром bc_1 кешені, убихинон-цитохром с оксидоредуктаза) кем дегенде 10-11 әртүрлі полипептидтік тізбектерден тұрады, солардың ішінен үшеуі тотығу-тотықсыздану реакцияларына қатысады. Сонымен қатар, кешен III екі бөлек домендерімен убисемихинонның екі молекуласы байланысқан. Кешен III димер ретінде болуы мүмкін және молекулалық массасы 400-500 кДа дейін жетеді. Әрбір мономерлер цитохромдармен байланысқан үш гемнен және темір-күкіртті белоктан тұрады. Кешен убихиноннан электрондарды қабылдайды да, цитохром *с* береді, содан кейін цитохром *с* оларды цитохромоксидаза кешеніне (кешенді IV Cu_A орталығына) тасымалдайды.Убихинон 2 электронды тасымалдайды, ал цитохромдар бір циклде электрондарды бір-бірлеп жеткіздіреді.

Цитохром *с* ішкі мембрананың мембранааралық кеңістікке қараған жағында орналасқан перифериялық белогы болып табылады, және ол тұзды ортада оңай ериді.

KoQ-дан кешен III жылжитын екі сутегі атомдарынан әрі қарай, тізбек бойымен тек электрондар ғана тасымалданады, екі протондар (H +) кешен III мембранааралық кеңістікте шығарылады, сонымен бірге матрикстен кешенмен ұсталынатын тағы бір жұп протондар да мембранааралық кеңістікте өтеді. Осылайша, кешен III жалпы мөлшерде мембранааралық кеңістікте 4 протондарды шығарады. Сондықтан, кешен III кешен I сияқты протондық генератор болып табылады, және оның да қызметі $\Delta\mu H^+$ қамтамасыз ету болып табылады. Цитохром bc_1 кешені тотығу-тотықсыздану тізбегінің (редокс-тізбегінің) ең баяу құрамдас бөлігі болып табылады. Оның *in situ* жұмыс істеуінің максималды жылдамдығы әдетте 10 мс аспайды.

Кешен IV (цитохром с оксидаза; цитохромоксида; цитохром с-O_2 оксидоредуктаза)–митохондриялардың тыныс алу тізбегінің қорытынды катализаторы. Кешен IV цитохром *с* 4 молекуласынан 4 электрондардың

O_2берілуін катализдейді, сонымен бірге 2 протонды мембранааралық кеңістікке өткізіреді, ал қалған 2 протонды судың түзілуіне жібереді.Кешен IV митохондрияның ішкі мембранасының үлкен ферменттерінің бірі болып табылады (13 суббірлік; молекулалық салмағы - 204 кДа). Кешен цитохром *а*мен*а3* тұрады, ал олар құрамында геммен қатар, мыс иондары да бар. Митохондриялық суббірлік II екі ядролық орталығында (Cu_A) Cys екі қалдықтарының SH-топтарымен біріккен екі мыс иондарын (Cu) қамтиды.

Суббірлік I *а* және a_3 ретінде белгіленетін екі топ гемнен, және тағы бір мыс иондарынан (Cu_B) тұрады. Гем a_3 пен Cu_B гем *а* электрондарды қабылдайтын және оларды гем a_3 байланысқан O_2 тасымалдайтын екінші екі ядролы орталығын қалыптастырады. Электрон кешен IV арқылы цитохром *с* Cu_A орталығына, гем а, Cu_B орталығының гем a_3, және ең соңында O_2 тасымалданады.

Цитохромдар, темір-күкіртті орталықтар және мыс атомдары бір уақытта тек бір электронды ғана тасымалдауға қабілетті. Сонымен қатар, НАДН әрбір молекуласы екі электронды береді және O_2 әрбір молекуласы су молекуласын түзу кезінде төрт электрондарды қабылдауы тиіс

Кешен V (АТФ-синтетаза, АТФ-синтаза) - митохондрияның ішкі мембранасында орналасқан және 500 кДа артық молекулалық салмағы бар интегралды белоктық кешен. Электрондарды тасымалдау энергиясына байланысты мембранааралық кеңістікте шығарылған протондар митохондриялық матрикске қайта өтеді. Бұл үрдіс Н +-тәуелді АТФ-синтетаза (H^+-АТФ-синтаза) ферменті арқылы жүзеге асырылады.

Фермент екі негізгі компоненттерден тұрады: ішкі митохондриялық мембрананың матрикске қараған жағында орналасқан суда еритін каталитикалық бөлігінен (F1) және мембранаға батырылған протондық каналдан (F_o, бұндағы «о» индексі - нөль емес, ал «о» әрпін білдіреді, яғни АТФ-синтетаза молекуласының бұл бөлігі олигомицин токсинді антибиотигін байланыстырады, олигомицин – осы ферменттің мықты ингибиторы, демек тотығу фосфорлану ингибиторы да болып табылады) тұрады. Протондар жылжыған кезде F_1-фрагменті белсендіріледі, бұл F_1-фрагменті АДФ пен бейорганикалық фосфаттан АТФ синтезінің реакциясын катализдейді.

Энергияның 40% АТФ синтезі үшін пайдаланылады, ал 60% жылу ретінде босап шығады[104]. Қалыпты жағдайларда F_1 мембраналық F_o фрагментімен байланысқан. Суда еритін F_1 белогын мембранада ұстап тұруда электростатикалық өзара әрекеттесулер маңызды рөл атқарады. Хлоропластарда F_1 мен F_o арасындағы берік өзара байланысуларына желім ретінде ықпал ететіндер - Mg^{2+} иондары болып табылады. F_1 түйісу факторын салыстырмалы түрде F_o мембраналық фрагменттінен оңай бөліп алуға болады. F_1 жою электрондық тасымалдау тізбегі бойынша электрондардың тасымалдануына кедергі келтірмейді, бірақ энергияны түзетін органеллалардың мембраналары, бұл кезде толымсыз болады, яғни электрондық тасымалдау АТФ синтезіне әкелмейді. Мембранада қалған F_o фрагменттері, өз бетімен АТФ синтездеуге де, не гидролиздеуге де қабілеті емес. Сонымен қатар, суда жақсы

еритін оқшауланған F_1 белогы АТФ-азалық қызметін, яғни АТФ гидролиздеуін катализдейтін қызметін сақтайды[105]. Алайда, мембранадан жеке F_1 түйісу факторы АТФ синтездеуге қабілетті емес. Осылайша, АТФ синтездеу қабілеті - бұл мембранаға кірістірілген бірегей F_oF_1-кешенінің қасиеті болып табылады .

H^+-АТФ-синтетазакешенінің F_o мембраналық фрагменті арнайы протондық канал қызметін атқарады, онда осы канал арқылы сутегі иондары F_1 түседі. Фосфорлану субстраттары (АДФ пен Фб) болмаған жағдайда F_oF_1-кешендері арқылы протондардың ағылып кетуі салыстырмалы шағын ғана болады. Бұл жағдайда, F_1 қызмет етпейтін фрагменті протондар жолын жабады, бұлар F_1 болмаған кезде F_o протон өткіздіруші канал арқылы еркін өте алатын еді. Мембранадан суда еритін F_1белогін бөліп алған кезде, түйіндесетін мембрана сутегі иондары үшін өткізгіш түріне айналады. Бұл жағдайда, F_o мембраналық фрагментімен түзілетін протондық канал, осының нәтижесінде түйіндесетін мембрананың екі жағында сутегі иондарының концентрациясы тураланады.

Тотығу фосфорлану (ТФ, Митчелдің хемиосмостық теориясы)- митохондриялардың ішкі мембранасында жүретін іргелі метаболикалық реакциялардың бірі болып табылады. ТФ - митохондрияларда тыныс алу тізбегі (ұлпалық тыныс алу) бойымен электрондардың жылжуы кезінде АДФ пен Фб АТФ түзілу үрдісі болып табылады.

Тыныс алу тізбегінің (тотығу фосфорлану) жұмыс істеу үрдісінде босаған энергияны сақтау механизмі осы уақытқа дейін әлі толық анықталмаған. Тотығу фосфорланудың үш негізгі гепотезасы бар: химиялық түйісу гипотезасы, тотығу фосфорланудың конформациялық теориясы және хемиоосмотикалық түйісу гипотезасы. Осы гипотезалардың ішінен ерекше маңызды орынды 1961 жылы П.Митчеллмен ұсынылған хемиоосмотикалық гипотезасы алады. Өткен ғасырдың 70-жылдары П. Митчелл осы жаңалығы үшін биохимия бойынша Нобель сыйлығын алды.

Хемиоосмотикалық гипотезасының негізіне П.Митчеллдің митохондриялардың тыныс алуы (оттегінің сіңірілуі) олар орналасқан pH ортаның төмендеуімен жүретінін байқаған бақылаулары жатады.

Хемиоосмотикалық гипотеза басты үш постулаттарға негізделеді:

1. Тотығу фосфорлану ішкі митохондриялық мембранамен шектелген жабық кеңістікте жүреді.
2. Ішкі митохондриялық мембрана протондар үшін өткізгіш емес.
3. Ішкі митохондриялық мембранада протондардың тасымалдауын қамтамасыз ететін протондық насостар бар.

Қазіргі уақытта, бірнеше протондық насостар бар екені анықталынған. Олардың біріне митохондриялық тыныс алу тізбегі жатады. Тыныс алу тізбегі бойымен электрондың тасымалдану үрдісі кезінде бөлінетін энергия, бастапқыда ішкі митохондриялық мембрана арқылы матрикстен мембранааралық кеңістігіне протондарды шығарып тастау үшін шығындалады.Митохондриялардың басқа протондық насосы ретінде H^+-АТФ-аза ферменті атқарады. Ішкі митохондриялық мембранаға орныққан бұл фермент, АТФ гидролизі реакциясын катализдейді. Осы реакция барысында

босап шыққан энергия, ішкі митохондриалық мембрана арқылы протондарды тасымалдау үшін пайдаланылады.

Субстрат тыныс алу тізбегіне 2 H^+мен $2e^-$береді. Тыныс алу тізбегі бойымен екі е жылжуы нәтижесінде, матрикстен мембранааралық кеңістікке 8 - 10 протондар (H^+) тасымалданады, яғни мембранааралық кеңістікте протондардың (H^+) электрохимиялық градиентінің генерациясы-$\Delta\mu H^+$ құрылады. Митохондриялардың матриксінде эндогенді судың диссоциациясы жүреді:

$$H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$$

Тыныс алу тізбегі бойымен екі электрондардың жылжуы кезінде осы протондар (H^+) мембранааралық кеңістікке өтеді.

Нәтижесінде, мембранааралық кеңістік жағына қаратылған ішкі мембрананың сыртқы беті оң (+) зарядталады, ал ішкі беті теріс (-) зарядталады. Электрохимиялық потенциал түзіледі, яғни ол матрикске протондық АТФ-аза (H^+-АТФ-синтаза) арқылы протондардың транслокациясына (өтуіне) әкеледі. Тыныс алу кешендері арқылы өтетін электрондардың тотығу-тотықсыздану потенциалының төмендеуінің химиялық бос энергиясы, H^+ электрохимиялық градиенттін ($\Delta\mu H^+$потенциалын) құру үшін пайдаланылады, және ол протон-қозғаушы күші $-\Delta p$ ретінде электрлік потенциалының бірлігі арқылы белгіленеді және төмендегі теңдеу бойынша есептелінеді:

$$\Delta p \text{ (мВ)} = \Delta\psi_m - (2.3\ RT/F)\ \Delta pH,$$

мұндағы: $\Delta\psi_m$ – ішкі митохондриялық мембрананың трансмембранды электрохимиялық потенциалы, ΔpH – ішкі мембранадағы pH градиенті; R, T, және F - тиісінше тұрақты, абсолютті газ температурасы және Фарадей тұрақтысы. 37˚C температурада $\Delta p = \Delta\psi m - 60\Delta pH$. Δp құру кезінде негізгі үлесін көп жағдайда, мөлшері шамамен 150-180 мВ болатын $\Delta\psi_m$ құрайды, Δp 200-220 мВ тең. Δp – АДФ фосфорлану процесінің және бақыланатын метаболикалық жағдайларындағы (АДФ болмаған кезде) электрондар ағынының тежелуінің қозғаушы күші болып табылады. $\Delta\mu_H$ протондық потенциалы екі компоненттерден тұрады: 1) электрлік ($\Delta\psi_m$) және 2) химиялық немесе осмостық (ΔpH)[106]. Протондық электрохимиялық потенциал, бұл митохондриялардағы энергияны сақтаудың бастапқы түрі болып табылады. Кейін бұл энергия төмендегі мақсаттар үшін пайдаланылуы мүмкін:

– АТФ синтезі (тотығу фосфорлану);

– жылы қанды жануарларда (термогенез) жылу түзу;

– механикалық жұмысы;

– ішкі митохондриялық мембрана арқылы зарядталған молекулалардың бағытталған тасымалдауы.

Бұнда клеткадағы әмбебап энергия көзі ретіндегі АТФ синтезі маңызды мәнге ие[107].

*АДФ фосфорлануында электрохимиялық потенциалдың және F_1-АТФ-азалық молекулалық ротордың рөлі.*Тотығу фосфорлану ішкі митохондриялық мембрананың тұтастығы бұзылмаған жағдайда ғана жүруі мүмкін, яғни егер бұл мембрана толық жабық түзіліс болған жағдайда орындалады. Ішкі митохондриялық мембранадағы кез келген үзілістер мен жарықшақтар оның тотығу фосфорлану қабілетінен айырыды, бірақ дегенмен, бұл жағдайда электрондардың субстраттан оттегіге тасымалдануы жалғаса берілуі мүмкін.Үрдістің бірінші бөлігі НАДН химиялық потенциалының және янтарь қышқылының (сукцинат) тотығу энергиясының H^+ электрохимиялық градиентке түрлендірілуімен болады, ал үрдістің екінші бөлігі протондық градиенттің энергиясын қолдану есебінен АТФ-синтазамен катализденетін АТФ эндэргоникалық синтезделу мәнісіне байланысты. Бұл үрдіс термодинамикалық тұрғыда болуы мүмкін, өйткені ЭТТ бойымен электрондардың тасымалдануы кезінде бөлінетін энергия және протондық қозғаушы күші ~ 32 кДж талап ететін АТФ бір молекуласын қайта синтездеуге әкелу үшін жеткілікті бос (еркін) энергияны сақтауына байланысты.

Тотығу фосфорлану,сондай-ақ мембрананың өткізбеушілік қасиетіне де байланысты. Егер мембрана зақымдалса немесе егер ол қандай да бір әсерлер нәтижесінде кенеттен H^+, OH^-, K^+, Cl^-үшін немесе басқа кейбір иондар үшін оңай өтімді болса, онда бұл кезде тотығу фосфорлану үрдісі жүрмей қалады. Бұл аталған байқаулар, ішкі митохондриялық мембрананың екі бетінің арасындағы иондық құрамындағы немесе концентрациясындағы айырмашылық АТФ синтезінде маңызды рөл атқаратынын көрсетті[108].

*Ішкі митохондриалық мембрана арқылы АТФ, АДФ және фосфаттың тасымалдануы.*Протон-қозғаушы күш, АТФ синтезі үшін энергия көзі ретінде ғана қызмет етпейді, сонымен қатар мембранааралық кеңістіктен АДФ пен Фб айырбасы үшін тотығу фосфорлану үрдісі кезінде митохондриялардың матриксінде синтезделген АТФ молекуларын ішкі мембрана арқылы тасымалдауын да қамтамасыз етеді.

Тотығу фосфорлану үрдісі үнемі жүріп тұру үшін қажетті бұндай алмасу, митохондрияның ішкі мембранасында екі тасымалдаушы белоктармен жүзеге асырылады.

1) фосфат тасымалдаушысы (HPO_4^{2-}/OH^- симпорт);

2) АТФ/АДФ антипорты.

Фосфат транспортері (тасымалдаушысы) матрикстің ішіне HPO_4^{2-}бір ионының транслокациясын және бір гидроксил ионын OH^- митохондрияның матриксінен сыртқа түйістіреді. Дәл осылай, АТФ/АДФ антипортыАДФ бір молекуласын матрикстің ішіне тасымалдайды және бір уақытта АТФ бір молекуласын матрикстен сыртқа транслокациялайды. Митохондрияның ішкі мембранасының 10-15% белоктарын құрайтын АТФ/АДФ антипорттары ең көп кездесетін митохондриялық белоктар болып табылады.

Сыртқа шығарылған гидроксил-иондары (OH^-)матрикстен электрондық тасымалдау жүйелерімен айдап шығарылған протондармен (H^+) қосылады, соның нәтижесінде су молекулалары - H_2O қалыптасады. Судың түзілуі

протондардың және гидроксил-иондарының градиенттерін, транспорттық антипорттардың үздіксіз жұмыс істеуін қамтамасыз ететін деңгейінде ұстап тұруы үшін қажет.

Төрт транслокацияланған протондардың үшеуі АТФ синтезі үшін пайдаланылады, ал төртіншісі екі транспорттық антипорттардың бірлескен жұмысы нәтижесінде осы АТФ молекуласының шығарылуына жұмсалады. Нәтижесінде, клетканың цитозолында АТФ концентрациясының жоғары деңгейіне жетеді, ал бұл содан кейін әртүрлі энергияға тәуелді клеткалық үрдістерінде пайдаланылады .

*Энергетикалық баланс.*Тотығу фосфорлану үрдісінде НАДН•H^+ бір молекуласы 3 АТФ синтезін қамтамасыз ете алады, ал ФАД•H_2 молекуласы – 2 АТФ синтезін қалыптастырады. Бір глюкоза молекуласының ($C_6H_{12}O_6$) ыдырауының энрегетикалық балансы 10 молекула НАДН•H^+ пен 2 молекула ФАД•H_2 береді, және олардың энергиясы 34 молекула АТФ синтезі үшін жетеді. Сонымен қатар, ГТФ (АТФ) 2 молекуласы Кребс циклінде түзіледі және 2 молекула АТФ гликолизде түзіледі. Нәтижесінде анаэробты және аэробты этаптардың энергетикалық потенциалы бір молекула глюкозаға 38 АТФ синтезін қамтамасыз етеді, бірақ егер гликолиздің пируват пен НАДН•H^+ (лактат емес) түзілуімен бітетін жағдайында ғана болады[109].

Сонымен, энергетикалық зат алмасуда бір глюкозаға жалпы 38 молекула АТФ түзіледі:

1) гликолизде – 2 АТФ және 2 НАДН•H^+ = 8 АТФ;
2) аралық сатысында – 2 НАДН•H^+ = 6 АТФ;
3) Кребс циклінде - 6 НАДН-Н+ және 2 ФАД.+ 2 ГТФ =18+4+2 = 24 АТФ.

НАДН дегидрогеназа және одан әрі қарай, яғни I, III, IV кешендері арқылы субстраттардың тотығу жағдайында, 3 молекула АТФ түзіледі. Сукцинатдегидрогеназа және одан әрі, яғни II III, IV кешендері арқылы субстраттардың тотығуы кезінде 2 молекула АТФ қалыптасты.

*Электрон тасымалдау тізбегінің және тотығу фосфорланудың ингибиторлары.*Электрон тасымалдау механизмдері негізінен арнайы ингибиторлардың әсерін зерттеу арқылы анықталды, ал содан кейін ол тотығу-тотықсыздану компоненттерінің стандартты тотықсыздану потенциалдарын өлшеумен расталды. Электрон тасымалдау ингибиторлары – тыныс алу тізбегінің компоненттерімен өзара байланысатын және сол арқылы олардың қызметін бұзатын заттар. Олар клеткалық токсиндер болып табылады және ұлпалық гипоксияны туғызады. Митохондрийлардың суспензиясымен тұтынылатын O_2 жылдамдығы электрон тасымалдау тізбегі қызметінің сезімтал өлшеуі болып табылады.

Электрондар тасымалдауының белгілі бір кезеңдерін тежейтін қосылыстарға (олардың O_2 тұтыну әсерлеріне байланысты) мыналар жатады: ротенон, пиерицидин, амитал (барбитурат), дифенилен иодоний, теноилтрифторацетон, малонат, оксалоацетат, антимицин А, цианид, азид және т.б.Электрон тасымалдау тізбегінің кейбір ингибиторлардың құрылымдары 1-суретте келтірілген. Сондай-ақ осы агенттермен тежелу сайттары 2-суретте

көрсетілген. Кешенді I белсенділігі ротенонмен, пиерицидинмен, амиталмен және дифенилен иодониймен(DPI)тежеледі. Ротенон кешен I (НАДН-КоQ-редуктаза) электрон тасымалдауын қатты тежейтін кең тараған инсектициді болып табылады. Ротенон кейбір өсімдік түрлерінің тамырларынан алынады. Бұл сондай-ақ амазондық үндістерімен балық уы ретінде пайдаланылған. 65% тежелу үшін 1гмитохондриялық белокқа, 33 нМ ротенон жеткілікті. Амитал барбитурат болып табылады және жоғары концентрацияда НАДН-гидрогеназаны тежейді[110]. Пиерицидин А– Streptomyces туысының бактерияларымен синтезделетін антибиотик. Бұл убихинонның құрылымдық аналогы болып табылады, сондықтан электрондарды тасымалдау үшін олармен бәсекелеседі. 50% тежелу 1г митохондриялық белокқа 20 нМ концентрациясында қол жеткізуге болады. Сондай-ақ, кеңінен белгіленетін ауру басатын демерол да, НАДН-дегидрогеназы тежейді. Бұл қосылыстардың барлығы НАДН-КоQ-редуктазаның Q коферментінің төмендеуін және Fe-S кластерлердің тотығуын тежейді. Сондай-ақ, DPI митохондриялық кешен I (НАДН-убихинон-оксидоредуктазаны) тежейтіні жайлы және бұның нәтижесінде тотығу фосфорланудың төмендеуіне әкеп соғатыны жайлы жарияланған болатын. Majander және оның әріптестері, әрі қарай DPI кешен I темір-күкіртті кластерлерін ФМН қайтымсыз реакциясы арқылы төмендеуіне кедергі келтіруі мүмкін екендігін көрсетті. DPI тежелу нәтижесінде, митохондриалық ОБТ өндірісі тежейлетіні көрсетілген**.**

Кешен II электрондардың тасымалдануы теноилтрифторацетонмен, малонатпен, оксалоацетатпен, сонымен бірге3-нитропропиондыққышқылменжәнекарбоксинментежеледі. Малонат сукцинатдегидрогеназа ферментінің бәсекелестік ингибиторы болып табылады: малонат ферментінің белсенді сайтымен әсер тигізбей байланысады, және сондқтан сукцинатпен, яғни ферменттің кәдімгі субстратымен бәсекелеседі.

Малонатсукцинатдегидрогеназаның бәсекелестік ингибиторы болып табылатындығы жайлы бақылаулар, осы ферментінің белсенді сайтының құрылымын шығару үшін қолданылған. 3-нитропропион қышқылы, митохондриалық тыныс алуының кешен II ингибиторы болып табылады және ферменттің белсенді орталығында аргининнің каталитикалық негізімен ковалентті аддукт түзеді.

Кешен III антимицинмен, нафтохинонмен, миксотиазолмен, стигматтелинменжәне гипогликемиялық агенттермен тежеледі. Антимицин А (АМА) Streptomyces Kitazawensis өндірілетін химиялық қосылыс (антибиотик) болып табылады.АМА цитохром *b* және *c* арасындағы митохондриялық электрондар тасымалдауын тоқтататын электрон тасымалдау тізбегіндегі убихинолдың тотығуын тежеу үшін, митохондриялық кешен III цитохром *c* редуктазаның Qi сайтыменбайланысатыны белгілі.Электрон тасымалдануының тежелуі ішкі митохондриялық мембрана арқылы протондық градиенттің ыдырауын тудырады, ал бұл митохондриялық мембраналық потенциалын (ΔΨm) жоғалуына әкеледі. Кешен III тежелу салдарына ОБТ өндірілуінің арттырылуы мен клеткалық АТФ деңгейінің төмендеуі жатады.Тежелу төмен

концентрацияларда, яғни 1 моль ингибитордың 1 моль ферментімен байланысу кезінде жүреді[111].

Кешен IV цианидпен, азидпен және көміртек тотығымен (CO) тежеледі, әрі барлық үш жағдайларда да, ингибиторлар цитохром a_3 өзара байланысады.Цианид (CN^-иондары) және азид –a_3феррицитохромының Fe^{3+}-мен координациялық (үйлестірулік) кешенін қалыптастырады және ЦХО Fe^{2+} дейін тотықсызданууын тежейді. Көміртегі тотығы (CO)-ЦХО тежейді, яғни геммен (Fe^{2+}) байланысу арқылы оның оттегімен өзара байланысуын тоқтатады.Осы сайтта цианид пен азидтің тежеуіші әсері өте күшті болып табылады, ал көміртегі тотығының негізгі улылығы оның гемоглобиндегі темірге ұқсастығынан туындайды. Бұл цианид пен көміртегі тотығының улы әсерлері арасындағы маңызды айырмашылық болып табылады. Жануарлар (адамдарды қоса алғанда) гемоглобин молекулаларын өте көп таситын болғандықтан, олар көміртегі тотығынан (көмірқышқыл газынан) өлу үшін көп мөлшерде одан дем жұтуы тиіс. Алайда, бұл организмдерде цитохром a_3молекулалары салыстырмалы түрде өте аз. Демек, цианидтің шектеулі әсері өлім қауіпіне әкелуі мүмкін. Азидтің, цианидтің және CO әсері кезінде 50% тежелу, тиісінше 0,7; 0,5; 40 мМконцентрацияларында болғанда іске асады.

Кешен V (АТФ-синтетаза) олигомицинмен (F_o және CF_o тежейді), вентурицидинмен (F_o және CF_o тежейді), ауровертинмен (F_1 тежейді) және дициклогексилкарбодиимидпен (F_o және CF_o арқылы протондық ағынын тежейді) тежеледі. АТФ-синтетазаның кейбір ингибиторларының құрылымдары көрсетілген.Олигомицин, сондай-ақ F_o арқылы протондар қозғалысын тежейді. АТФ синтезінің олигомицин А тежелуі электрон тасымалдау тізбегі арқылы электрондар ағынын азайтады; алайда, электрондардың ағыны протондық ағылу немесе митохондриялық ажыратылу үрдістері салдарынан толық тоқталмайды [28,p. 301]. Ауровертин – химиялық құрылымы бойынша полиендік пирондарға жататын антибиотиктер тобы. Митохондриялардағы тотығу фосфорланудың F_1 фракциясының күшті ингибиторы. N, N-дициклогексилкарбодимид (DCCD) F_oF_1-АТФ-синтазаның (F_oF_1)классикалық ингибиторы болып табылады, F_o фракциясында протеолипидтік суббірліктің (*c* суббірлігінің) жоғары консервативтік карбон қышқылымен ковалентті байланысады және канал арқылы протондар ағынын тежейді[112].

Тотығу фосфорланудың ажыратқыш заттектері.F_1 факторы кеңістігінің өзгеруі, соның нәтижесінде АТФ-пен оның кешенінің мүмкін болатын диссоциациялануы, ішкі митохондриялық мембранада протондық градиенттің жеткілікті көлемінде ғана жүреді. Протондық градиент көлемінің төмендеуі, тыныс алу тізбегі бойымен электрондарды тасымалдаумен түйіндескен АТФ синтезін мүмкін емес етеді, сөйтіп, тыныс алу және тотығу фосфорлану үрдістерінің ажырауына әкеледі. Бұндай әсерді тудыратын заттар тотығу фосфорланудың ажыратқыштары деп аталады.

Тотығу фосфорланудың барлық ажыратқыштары ішкі митохондриялық мембрана арқылы протондарды тасымалдаушылар (протонофорлар) ретінде қызмет етеді, осылайша, олар протондық градиентті бұлдіре алады. Бұл

ажыратқыштардың молекуласының митохондриялардан тыс протондар есебінен қайтымды протондалуына байланысты болады және мұндай түрде мембрананың матрикстік бетіне оның гидрофобты қабаты арқылы электрофоретикалық түрде жылжиды. Митохондриялық мембрананың ішкі бетінде ажыратқыштардың депротонденуы жүреді. Бұл кезде босап шыққан протон матрикске өтеді.

Бұл жағдайда, яғни ішкі митохондриялық мембранаға ажыратқыштар түскен кезде, митохондриялардан шығарылып тасталған протондар, градиент концентрациясы бойынша F_o протондық каналарқылы емес, тікелей мембрананың кез келген бөлігі арқылыматрикске қайта оралу қабілетіне ие болады. Бұндай тасымалдау протондық градиент көлемінің төмендеуін анықтайды. Осының нәтижесінде, протондық токтың энергиясы белоктардың каталитикалық бөлігінің F_1 түйісу факторында кеңістіктердің қайта құрылуларының туындауы үшін жеткіліксіз болады[113].

Табиғи ажыратқыштарға адреналин мен тироксин гормондары, май қышқылдары және т.б. жатады**.**Ал химиялық ажыратқыштардың үлгі мысалдарына 2,4-динитрофенолды, дикумаролды және карбонилцианид-р-трифтор-метоксифенилгидразонды (фтор карбонил цианид фенилгидразон немесе КЦТФФ деп те аталады) жатқызуға болады.Бұл қосылыстардың екі ортақ белгілері бар: гидрофобты табиғаты және протонды диссоциациялауы Бұл химиялық заттар, АДФ АТФ дейін фосфорлануын тежейді, бірақ митохондриялардағы электрондар тасымалдауына ешқандай да әсер тигізбейді. Олар электрондарды тасымалдау мен АТФ синтезін ажыратады, яғни осы үрдістер арасындағы қажетті байланысты жояды.Олардың қатысында электрондарды тасымалдау кезінде бөлінетін бос энергия жылуға өтеді, яғни АТФ түрінде сақталмайды. Ажыратқыш агенттер H^+ иондары үшін ішкі митохондриялық мембраналардың өткізгіштігін күрт арттырады. Бұл липофильді заттар, олардың мембрананың бір жағында H^+ иондарын байланыстыратын және оларды мембрана арқылы екінші жағына, яғни олардың концентрациясы төмен жағына тасымалдайтын қабілеті бар. Клеткаларға осы төмен органикалық қосылыстарды қосқан кезде митохондриялар АТФ синтезін тоқтатады, дегенмен оттегі сіңіруін жалғастыра береді. Ажыратқыш агенттердің қатысында, электрондар тасымалдауының жылдамдығы жоғары болып қала береді, бірақ протондық градиент құрылмайды**.** Сонымен, ажыратқыштар, тыныс алу тізбегі бойымен электрондардың тасымалдауына елеулі әсер тигізбейді, бірақ тотығу фосфорлану үрдісінде АТФ синтезін тежейді.

FCCP протонды диссоциациялау қабілеті бар және өте гидрофобты болып табылады. Олар ішкі митохондриялық мембрана арқылы протондарды тасиды, сөйтіп протондық градиентті басады.

Кейбір ионофорлар да тотығу фосфорлануды тежей алады. Ионофорлар (яғни «иондарды тасымалдаушылар») деп, белгілі бір иондарды байланыстыруға және оларды мембрана арқылы тасымалдауға қабілетті майда еритін заттарды айтады. Олар ажыратқыш агенттерден мембрана арқылы

H^+иондарын емес, қандай да болмасын басқа катиондарды тасымалдайтындығымен ерекшеленеді. Мысалы, токсинді антибиотик валиномицин митохондрияның ішкі мембранасы арқылы оңай өтетін K^+иондарымен майда еритін кешенді құрайды, ал валиномицин болмаған жағдайда K^+иондары осы мембрана арқылы өте қиындықпен енеді. Грамицидин ионофоры мембрана арқылы K^+иондарының енуін ғана емес, сонымен бірге Na^+және басқа да бір валентті катиондардың енуін де жеңілдетеді. Қорыта келгенде, ажыратқыш агенттер мен ионофорлар H^+, K^+немесе Na^+иондары үшін мембрананың өткізгіштігін арттырып, тотығу фосфорлануды басады[114].

*Тыныс алу бақылауы.*Клеткаларға ажыратқыш агентті, мысалы динитрофенолды қосқан кезде, митохондриялармен оттегінің сіңірілуі едәуір өседі, өйткені электрондардың тасымалдану жылдамдығы артады. Мұндай үдету тыныс алу бақылауының болуына байланысты. Бұл бақылау электрондарды тасымалдауға электрохимиялық протондық градиентінің тікелей тежеуші әсеріне негізделген деп саналады. Егер ажыратқыштардың қатысында электрохимиялық градиент жоғалатын болса, онда одан әрі бақыланбайтын электрондардың тасымалдануы максималды жылдамдыққа жетеді. Градиенттің өсуі тыныс алу тізбегін тежейді, және электрондардың тасымалдануын баяулатады.Сонымен қатар, егер экспериментте жасанды түрде ішкі мембранада ерекше жоғары электрохимиялық градиентті түзетін болсақ, онда қалыпты электрондар тасымалдауы тіпті толығымен тоқталады, ал тыныс алу тізбегінің кейбір аудандарында электрондардың кері ағынын байқауға болады. Бұл тыныс алу бақылауы электрондардың тасымалдауы кезінде электрондар тасымалдауымен немесе бос энергияның өзгеруімен түйіскен протондардың жылжуы кезіндегі бос энергияның өзгеруі арасындағы қалыпты балансын көрсететінін болжауға мүмкіндік береді. Электрохимиялық градиенттің көлемі электрондар тасымалдауының жылдамдығына және бағытына әсер етеді[115].

Оқшауланған митохондриялар НАДН, O_2 және Пи қажетті мөлшерін қамтамасыз ету, бірақ АДФ молекулалар қамтамасыз етпеді, онда НАДН және O_2 қалпына тотығу тез АДФ қоры АТФ синтезіне таусылып болады тез тоқтатады. Егер оқшауланған митохондрияларды НАДН, O_2 және Фб қажетті мөлшерімен қамтамасыз етіп, бірақ АДФ молекулаларымен қамтамасыз етпесек, онда НАДН тотығуы мен O_2 тотықсыздану үрдістері жылдам тоқталады, яғни бұл АТФ синтезінің нәтижесінде АДФ қорларының тез сарқылуына байланысты болады.Егер содан соң, жүйеге АДФ қоссақ, онда НАДН тотығуы қайта басталады. Демек, митохондриялар $ФАДН_2$пен НАДН тек АТФ синтезі үшін АДФ пен Фб қорларынтолықтыру көзі болған кезде ғана тотықтыра алады.

Тыныс алу бақылауы митохондриялардың қызмет ету үрдісінде маңызды рөл атқарады. Осыған байланысты АТФ төмендеуімен және қатарлас АДФ концентрациясының жоғарылауымен жүретін энергияға тәуелді үрдістер қарқындылығының өсу жағдайында, тыныс алу қарқындылығы артады. Бұл ауысым тотығу фосфорлану үрдісінде АТФ түзілу жылдамдығының ұлғаюына

әкеледі және осылайша, АТФ жоғалуының орнын толтырады.Тыныштық күйеде, яғни клеткаларда АТФ өте жоғары деңгейі мен керісінше АДФ төмен концентрациясы болған кезде, тыныс алу жиілігі төмендейді, ал бұл тотығу фосфорлану үрдісінде АТФ синтезінің төмендеуіне әкеп соқтырады.

Тыныс алу бақылауы-бұл гликолиздің, май қышқылы ыдырауының, лимон қышқылы циклі реакцияларының және электрондар тасымалдауының үйлестіруші жылдамдықтарының қайтымды байланыстарымен реттеуші механизмдер арасында өзара байланысқан күрделі жүйесінің тек бір бөлігі ғана болып табылады. Бұл барлық үрдістердің жылдамдықтары АТФ:АДФ қатынастарына байланысты, яғни бұл жылдамдықтар АТФ қарқынды пайдалану нәтижесінде осы қатынас төмендеуіне байланысты өседі. Мысалы, ішкі митохондриялық мембрананың АТФ-синтетазасы тезірек жұмыс істейді, егер оның субстраттарының, яғни АДФ пен Фб концентрациялары арттырылатын болса. Осы реакцияның жылдамдығы неғұрлым жоғары болса, соғұрлым протондар көп мөлшерде матрикске өтеді, және осылайша электрохимиялық градиентті тез басады, ал өз кезегінде градиенттің төмендеуі электрондар тасымалдауының жылдамдауына әкеледі.

Митохондрияларда оттегінің және азоттың белсенді түрлерінің түзілу механизмдері. Митохондриялар тотығу фосфорлану арқылы эндогендік клеткалық ОБТ көп мөлшерін түзеді. Қалыпты физиологиялық жағдайларда, ОБТ өндірісі I кешеннің белгілі бір бөлігімен жоғары деңгейде реттеледі. Алайда, егер электрон тасымалдау тізбегі (ЭТТ) тотығу фосфорланудың гендік мутациясыментежелсе немесе жүзеге асыру деңгейімен салыстырғанда, шамадан тыс калорийді тұтынудан кейінайтарлықтайазайса, ондаЭТТ электрон тасымалдаушылары супероксид анионды($O_2^{\bullet-}$) түзу үшін O_2 тікелей беріле алатын, шамадан тыс электрондарды жинақтайды.I кешенмен өндірілген $O_2^{\bullet-}$ митохондриялықматрикске босап шығады және онда олар MnSOD (Sod2 гені) арқылы H_2O_2айналады.III кешенмен өндірілген $O_2^{\bullet-}$ митохондриялықмембранааралық кеңістікке босап шығады және мембранааралық кеңістік пен цитоплазмада орналасқан мыс/мырыш супероксиддисмутаза (Cu/ZnSOD; Sod1) арқылы H_2O_2айналады. Митохондриялық H_2O_2, содан кейін ядро цитозолына енуі мүмкін. Егер H_2O_2 төмендетілген өтпелі металлмен кезіксе немесе $O_2^{\bullet-}$араласып кетсе, онда H_2O_2 бұдан әрі, АФК ең күшті тотықтырғыш агентіне, яғни гидроксил радикалына($OH^{\bullet}$) айналуы мүмкін. ОБТклеткалық белоктарды, липидтерді және нуклеин қышқылдарды зақымдауы мүмкін.Демек, митохондриялықОБТ шамадан тыс өндірісі клетканың антиоксидантты қорғанысын асыруы мүмкін, және кумулятивтік зақымдану, сайып келгенде, клетканы некроз немесе апоптоз арқылы бұзуы мүмкін.

Азоттың белсенді түрлері (АБТ) митохондриялар арқылы өндірілуімүмкін. Жоғары оттегі қысымы кезінде, IV кешен O_2 өзінің терминалды электрон акцепторы ретінде пайдаланады.Алайда, төмен оттегі қысымы кезінде, IV кешен нитритті азот оксидіне (NO) дейін азайтуы мүмкін.Ашытқыда, митохондриялық тұрғыдаөндірілген NO COX5b баламалы ядролық IV кешен

суббірлігін индукциялайды, ал ол өз кезегінде IV кешендегіNO өндірісін арттырады. NO, сондай-ақ азот оксиді ситазасының үш түрінің(нейронды, индуцибелді және эндотелиалды) көмегімен аргининненжәнеO_2өндіріледі.

NO қан жолдарын кеңейтуші болып табылады.Демек, IV кешеніменNO өндірісі оттегіге негізделген кері байланыс топтамасыменқамтамасыз етеді.Оттегі қысымы төмен болған кезде, IV кешен NO синтезіне қосылады. NO митохондриялар мен клеткалардан диффузияланып, қан тамырлардыңтегіс бұлшықетті клеткаларының босаңсуын тудырады,содан қан тамырлардыңкеңейюіне әкеп соғады. Бұл өз кезегінде ұлпаның оксигенациясын (оттегімен қанықтыру) арттырады. Алайда, бұл жүйе қан жолдарын кеңейтетінқұрал ретінде белсенді емес болып табылатын пероксинитрит түзу үшін, митохондриялық$O_2^{\cdot-}$NO байланысуынескерсек, ЭТТ тежейтін және ОБТ өндірісін арттыратын генетикалық ақаулармен бұзылуы мүмкін. Пероксинитрит Fe-S орталықтары мен сульфгидрил топтарын тотықтыратынпотенциалдыреагент болып табылады.Сондай-ақ, пероксинитрит белоктардыңқұрылымы мен қызметіне әсер етеалатын нитротирозиндерді(нитросиляция) түзетінбелоктардағытирозиндермен әрекеттеседі[116].

1.5Энергетикалық алмасудың реттелуіндегі гормондардың рөлі

Ағзақызметін жүйкелі-гуморальді реттеу ішкі секреция бездерінен қан мен лимфаға бөлінетін гормондар арқылы жүреді. Гормондар жасушаның генетикалық аппаратына, өсуге, зат алмасудың барлық түріне, дене сапалары мен ақыл-ойдың дамуына әсерін тигізеді. Ішкі секреция бездеріне: гипофиз, эпифиз, қалқанша, қалқанша маңындағы (серік), тимус, бүйрек үсті, ұйқы безі, жыныс бездері жатады Олар бөлетін 40-тан астам гормондар белгілі[117,118].

Баланың эмбриондық дамуы кезінде ішкі секреция бездерінің кейбірі қызмет атқара бастайды. Бала туғаннан кейін ол бездердің қызметі әртүрлі безде әртүрлі дамиды.Ішкі секреция бездерінің дамуында гетерехрондылық заңы айқын көрінеді. Мысалы, ең ерте дифференцияланып, қызмет атқара бас тайтын бездер-эпифиз,ұйқы безіндегі Лангерганс аралшықтары (инсулин,глюкагон) және бүйрек үсті бездерінің кейбір жерлері.

Ішкі секреция бездерінің ішіндегі ең кеш дамитыны-жыныс бездері.

Ішкі секреция бездерінің гормондары өте белсенді заттар, олардың физиологиялық қасиеттері:

1) Гормондар қашықтан-дистантты әсер етеді.Мысалы,гипофиз гормондары жыныс бездерінің қызметін реттеуге қатысады.
2) Ағза қызметін гуморальді реттеуде аралық зат.
3) Ағзаға ерекше және арнайы әсерін тигізеді,мысалы инсулин қандағы қант мөлшерін реттеуге қатысады,оның мөлшері жетіспегенде екінші бездің гормоны немесе басқа белсенді зат оның қызметін атқара алмайды.Сондықтан ол жағдайда «қант диабетіне» ұшырайды.
4) Гормондар өте аз мөлшерде, өте тез, қысқа мерзімде әсер етеді.

5) Гормондар ферменттер арқылы химиялық реакциялардың жылдамдығын өзгерте алады.

Ішкі секреция бездерінің гормондар өндіруі нашарлағанда гипосекреция (грек. Гипо-аз, төмен), күшейгенде гиперсекреция (грек. Гипер- артық, жоғары, шегінен тыс) деп аталады.

Жыныс бездері-гонадалар аралас бездер: сыртқы жыныс жасушаларын және гормондарын жасап шығарады.

Жыныс гормондары ерлерде-тестостерон, андростерон, питестостерон; әйелдерде экстрогендер, эстрон, эстриол. Физиологиялық әсері: денеде зат алмасуы, анаболизмді күшейтеді (белок түзілуін, ферменттердің жасалуын), оң азот балансын қамтамасыз етеді; екінші жыныс белгілерінің дамуына көмектеседі; жүйке жүйесі мен жоғары жүйке қызметіне әсер етеді[119].

Жыныстық жетілу ер балаларда 10-11 жаста, қыз балаларда 9-10 жаста басталады.

Ер баланың денесінде жыныстық жетілу кезінде төмендегідей өзгерістер байқалады: 10-11 жаста-жыныс мүшесі мен аталық бездері үлкейеді; 12 жаста-көмекейінің өсуі байқалады; 13 жаста-жыныс мүшелерінің түктенуі; 14 жастадауысы өзгереді; 15 жаста-ұмасы пигменттеліп, қолтық асты түктенеді, сақал-мұрты шыға бастайды;

Қыз баланың жыныстық жетілу кезіндегі өзгерістер: 8 жаста – жамбас сүйектерінің ені артады; 9-10 жаста – бет терісіндегі май бездерінің қызметі күшейеді; сүт бездерінің түйнегі дами бастайды; 12 жаста – жыныс мүшелерінің маңайында түк пайда бола бастайды, ішкі және сыртқы жыныс мүшелері үлкейеді; 13 жаста – қынаптың ішіндегі сілтілік реакция кенет қышқыл реакцияға ауысады; 14 жаста – алғаш кезде тұрақсыз, кейіннен тұрақты түрде ай сайын етеккірі келеді; қолтығында түктер өседі; 15 жаста – денесінің төменгі жақ бөлігі әйелдер денесіне ұқсап өзгереді; 17-18 жаста – етеккірінің циклы толық қалыптасады, аналық жасушасы аналық безден бөлініп шыға бастайды[120].

Гуморальді реттелуді іске асыратын басты затты гормондар деп атайды. Ол гормондарды жасап шығаратын-ішкі секреция немесе эндокринді бездер деп атайды. Ішкі секреция бездерінің арнаулы жасушалары сыртқа шығатын өзектері жоқ, өзінің гормонын бірден қанға өткізеді де, қан арқылы тиісті нысана клеткаға жеткізеді.

Гормондық реттеудің өзіне тән ерекшелік қасиеттері болады. Гормондар биологиялық белсенді заттар (катализаторлар)олардың белсенділігі өте жоғары.

Өте аздаған концентрациясының өзі әжептәуір әсер етеді. Гормондардың шығу тегі пептидтер деп те атауға болады. Әрбір гормон белгілі бір мүшеге ғана әсер етіп, сол мүшенің қызметін реттейді. Гормондар медиаторларға қарағанда қашықтан әсер етеді. Тағы да бір айта кететін жәйт гормондар да ферменттіе қасиет болмайды, олар тек жасуша ішіне және жасуша органдарына ғана әсер ете алады.

Бұл бездер ерлер мен әйелдерде бірнеше қызмет атқарады. Бұл жерде аталық жасуша сперматазоидтар мен аналық жасуша жұмыртқа жасушасы пісіп

жетіледі. Бұл бездерде жыныс гормондары андроген мен эстрогендерде өндіріледі.

Ерлер гормоны тестостерон тұқым түзуші түтікшенің эпителии жасушасында түзіледі. Ал эстрогендер (эстрон, эсриол, эстрадиол) жұмыртқаның бүршікті қабатында фолликулада және Граафов көпіршігінде түзіледі. Жұмыртқаның сары денесінде Граафов көпіршігі жарылған жерінде, прогестерон гормонын өндіреді. Соның нәтижесінде жатырға ұрықтың имплатанцияланууы жүріп, құрсақ көтеру қалыпты жағдайда өтеді.

Гипофиз гормонының рефлекторлық өзгерісіне қарай жыныс бездеріне күшті әсер етеді. Әсіресе гипофиздің алдыңғы бөлігіндегі ганадотропты гормондар жыныс бездерінің қызметін реттеуші. Олардың ішіндегі маңыздылары-фолликул стимулдаушы, лютеиндеуші және пролактин. Осы айтылғанды қорытындылап келе жоғарыда көрсетілген ағзаның қызметін гормонды реттеу, өте күрделі жанжақты, ол үрдіс жасуша деңгейінде, мембрандық деңгейде, жеке-жеке мүшелер мен мүшелер жүйесі деңгейлерінде болады. Бірақта гормонды деңгейдегі реттеу механизмдер көп түрлі, жан-жақты болғанменде жүйке жүйесінен бөліп қарауға болмайды. Бұл екі реттеу механизмі бір-бірімен тығыз байланысты. Сондықтан да бұл біртұтас нейроэндокринді реттеуші жүйелер деп қарастырған жөн[121].

Гипоталамо-гипофизарлы жүйенің қызметі орталық жүйке жүйесінің жоғарғы бөліктерімен реттеледі. Гипофиздің алдыңғы бөлігінде немесе аденогипофизде аналық бездің қызметін күшейтетін гонадотропты гормонның синтезі және оның қанға бөлінуі жүзеге асады. Ол гипоталамус ядросынан бөлінетін, оны шешетін фактор физиологиялық терминмен айтар болсақ, рилизинг-факторлар немесе либериндер деп те аталады. Эндокринді бездердің бірі болып табылатын гипофиз үш гонадотропты гормондарды: фолликул жетілуін күшейтетін гормондар (ФСГ), лютеин жетілуін күшейтетін (ЛГ) және лютеотропты (ЛТГ) немесе пролактин бөліп шығарады.

Гонадотропты гормонның түзілуі тікелей гипофизбен етеккір циклының сатысына сәйкес циклды өзгертіп отырады. Етеккір циклының бірінші жартысында фоликулла түзуін ретеуші гормон түзілуі күшейеді, ол циклдың жеті және сегізінші күндерінде жоғарғы дәрежесіне жетеді. Одан кейінгі күндері оның түзілуі төмендеп, керісінше ЛГ бөлінуі жоғарылайды, ол циклдың ортасында жоғары деңгейге жететін болады.

Аналық без циклы. Гонадотропты гормондардың әсерінен аналық безде қайталанатын өзгерістер болып тұрады, олар үш сатыдан өтеді. Оларды:фолликулдың жетілуі – фолликулинді сатысы; жетілген фолликулдың жарылуы - овуляция сатысы; сары дененің дамуы – лютеинді сатысы деп бөліп қарастырамыз. Фолликулалардыңдың жетілуі. Біріншілік мордиалды фолликул эпителиалды жасушалардың жалғыз қабатымен қоршалған жетілмеген аналық безден тұрады. Оның сыртынан фолликул дәнекер тінімен қапталған, мордиалды фолликулдар жатыршілік кезеңде және қыз баланың ерте балалық шағында түзіледі. Жыныстық жетілу шағы келгенде 400000-500000 біріншілік фолликулалардан 35000-40000 шамасы ғана қалады, ал қалғандары кері дамуға

ұшырайды. Қалған біріншілік фолликулалардан 450-600 ғана толығымен жетіліп, қалғандары физиологиялық атрезияланады.Фолликулалардың жетілу процесі еттекір циклының бірінші жартысын болады, яғни, жиырма сегіз күндік цикл кезінде он төрт күнді, жиырма бір күндік циклда – он-он бір күнді құрайды.

Фолликулдың даму процесі кезінде аналық безі, дәнді қабығы, дәнекертінді қабығы барлық негізгі бөліктері өзгеріске ұшырайды.Жұмыртқа жасушасының көлемі бес-алты рет ұлғайып, оның бетінде жылтыр қабықша немесе zona pellucida пайда болады және цитоплазмада күрделі өзгерістер байқалады. Жұмыртқа жасушасы екі рет бөлінгеннен кейін ғана толық пісіп-жетіліп, ұрықтануға дайын болатыны анық.

Фолликулдың эпителийі пролиферациялық өзгерістерге ұшырап, көп қабатты membrana qranuloza folliculi құрайды.

Бұл қабаттың жасушалары бір жағынан жұмыртқа жасушасына, екінші жағынан фолликула қабырғасына жылжиды. Жұмыртқа жасушасын қоршаған қабат сәулелі қабат немесе corona radiata деп аталады, ол фолликуларлық сұйықтықта болады. Бұл сұйықтықта эстроген гормондары түзіледі, эстрогендер әйел ағзасына әр түрлі әсерін тигізеді. Жыныстық жетілудің алғашқы кезеңдеріінде эстрогендер жатырдың, қынаптың, сыртқы жыныс мүшелерінің өсуі мен дамуын, екіншілік жыныс белгілерінің пайда болуын қамтамасыз етеді. Эстрогендер жыныстық жетілу кезеңінде жатыр кілегей қабатының көбеюін немесе ғылыми тілмен айтар болсақ пролиферациясын тудыртады.

Эстрогендер жатыр бұлшық еттер тонусын, жатырдың жиырылтатын заттарға оның қозғыштығын және сезімталдығын жоғарылататын қасиетке ие. Бұл гормондар сүт бездерінің қызметінің жоғарылауына әсер етеді, сонымен қатар олар жыныстық сезімін күшеюіне әсер етеді. Фолликул өсіп-дамыған сайын, оның клеткалық қабықшалары да өседі. Өсіп-жетілген фолликуланың көлемі ұлғайып, оның бір бөлігі аналық бездерінің бетіне бұлтиып шығады, орналасқан жері жұқара бастайды.

Стероидты гормондар адам ағзасындағы жалпы тіршілік әрекетіндегі көптеген маңызды үдерстерді ретейтін белсенді физиологиялық заттардың бірі болып есептелінеді[122]. Строидты гормондардың анатомиялық құрылымы мен орналасуы, физиологиялық қызметі, әсері зерттелген, анықталған, сонымен қатар эндокринді маңызы да әлі күнге дейін қарастырылып, зерттеу әдістері жан-жақты жүргізіліп келеді. Дегенмен де строидты гормондардың оның ішінде прогестерон гормондарының рецепторлық қызметі, клеткалық деңгейдегі әсер ету механизмдері, ағзаның негізгі алмасу түрлерінің бірі энергетикалық алмасу тұрғысынан толыққанды зерттеуді, салыстырмалы қарастыруды талап етеді.

Стероидты гормондар грек тілінде: stereos-қатты жәneeidos-түр; hormao-қозғалысқа келтіремін-адам және жануарлар ағзасындағы тіршілік әрекетінің үдерістерін реттейтін физиологиялық белсенді заттар тобы (жыныс гормондары, кортикостероидтар, Д дәруменінің гормональды түрі). Омыртқалылыларда стероидты гормондар бүйрек үсті бездерінің қыртысынан

холестериннен,аталық жыныс бездерінің Лейдиг клеткаларынан, аналық жыныс жасушаларының сары денесі мен фолликулаларында сонымен қатар плацентада синтезделеді[123]. Стероидты гормондар цитоплазмада бос күйінде липидті тамшылар құрамында болады. Осыған орай жоғары липофильді қасиеттеріне сәйкес стероидты гормондар плазматикалық мембранадан қанға оңай өтеді, содан кейін нысана клеткаларға енеді.Адам ағзасында стероидты гормондардың6 түрі кездеседі.Олар:прогестерон, кортизол,альдостерон, тестостерон, эстрадиол және кальцитриол (кальцирферолдың бұрынғы атауы). Бұл қосылыстар екі көмірсу атомдарынан тұратын бүйірлік қысқа байланыстары бар немесе кейде ондай байланыстарсыз да кезедеседі. Стероидты гормондар сигналды функция атқаратын қызметіне байланысты өсімдіктерде де кездеседі[124].

Стероидты гормондар-барлық омыртқалылар мен кейбір омыртқасыздар ағзасындағы гормональды қосылыстардың негізгі класы болып табыла отырып,көп клеткалы ағзалардың тіршілік әрекетіндегі негізгі реттеуші қызмет атқарады. Мысалы: өсу, бөліну, көбею,адаптация, мінез-құлық т.б.

Стероидты гормондардың нысана клеткалардағы әсері гендердің транскрипциясын реттеуге тікелей байланысты. Мұның негізі гендердегі ДНҚ-ның белгілі бөліктерін сезетін рецептор деп аталатын арнайы реттеуші гормон кешенінің түзілуімен жүреді. Сондықтан да барлық стероидты гормондардың рецепторлары-ген транскрипциясының-лиганд тәуелділері болып есептеледі.Сонымен қатар жекелей доменді құрылым және соған сәйкес механизм оларға тән ерекшеліктердің бірі болып саналады [125]. Олар өздеріне жақын жатқан тиреоидты гормондар рецепторларымен байланысып стероидты-тироидты рецеторлар бірлігі болып бірігеді де реттеуші белоктар-ядролық рецепторлар болып табылады. Стероидты гормодар бүйрекүсті бездерінде, тестикулада, жыныс бездерінде және плацентада холестериннен синтезделеді. Бірақта стероидты өндіруші әрбір ұлпаның өзіндік өндіру сипаттық ерекшеліктері болады.

Бүйрекүсті бездеріне ұқсас жыныс бездерінен көптеген стероидтар бөлінгенімен олардың көпшілігінің гормоналды қабілеті бола бермейді. Бұл гормондардың түзілуі гипофиз бен гипоталамус арқылы кері байланыс ілмегі көмегімен қатаң бақыланады. Жыныс бездері ядролық механизмдер арқылы кортикостероидтар көмегімен әсер етеді[126].

Стероидты байланыстар суда нашар ерігенімен, органикалық ерітінділер мен өсімдіктектес майларда жақсы ериді. Барлық стероидты гормондар липофильді қасиетіне орай плазматикалық липо протеидті мембранадан жақсы өтеді және соған орай стеридогенді эндокринді бездермен еркін байланыса отырып, әсер ететін клеткалар ішіне емін - еркін кіре береді.

Стероидты гормон рецепторлары, әсер ету механизмдері.Прогестерон рецепторы промоутерінің өзара әрекеттесуінің термодинамикалық талдауы функция изоформасын анықтаудағы молекулалық моделін көрсетеді.

Адам ағзасының прогестрон рецепторлары құрылымы жағынан әртүрлі изоформада PR-A и PR- B түрінде болатыны туралы және де осыған

байланысты біраз мәселелер жоғарыда қарастырылып, жазылған болатын. PR-B ұштарындағы протеиндері 164 қалдықтарын қоспағанда бірдей болып келеді екен.Олардың изоформаларының құрылымдық ерекшеліктерін анықтайтын арнайы механизмдерді анықтау үшін, прогестерон рецепторларының өзара әрекеттесуінің термодинамикалық кесіндісі жүргізілген. Бұл талдаманың негізінде биохимиялық, дәстүрлі тағы да басқа нәтижелер негізінде қарама-қайшы пікірлер тудырып, рецептор құрылымының моделі құрастырылды[127].

Статикалық модель тұрғысынан жаңадан түзілген PR-A димерлері жан-жақты белсенді бола тұрып, ішкі энергетика жиілігі жоғары екенін көрсетті. Сонымен бірге PR-A -ның көп ретті PREs -мен байланысы көп сәйкес келмейді. PR-B рецепторларымен басқа да салыстырмалы жұмыстар барысында байқалғандай,екі изоформада ДНҚ-ға ұқсас сәйкестік танытқанымен PR-B түрі ішкі жақындық пен тұрақтылықты қамтамасыз ете отырып, PR-A қарағанда әлдеқайда байланыстырушылық қабілетке ие екенін көрсетеді.Бұл айтылған айырмашылықтар құрылымдық көзқарас тұрғысынан салыстырғанда микроскопиялық түрі жағынан ұқсастықтары әртүрлі изоформалардың транскрипциялық түзетушілік белсенділіктерінің әртүрлілігін анықтайды.

*PR (прогестерон рецепторлары) рөлі***.**Прогестерон рецепторы басқа да стреоидты гормондар рецепторларына ұқсас болып келеді. Прогестеронның холорецепторфы бір молекулалы верорецептордан және екі молекула құрылымнан тұрады. Әдеби деректерге сәйкес прогестрон рецепторларының изоэлектрлік нүктелері 4.8 ден 5.2 болып келеді. Гормон рецепторлық әрекеттесуі 7-8.5 pH көрсеткішіне тең[128].

Прогестерон рецепторының екі түрлі формасы анықталған. Олар: Ажәне В түрлері. А түрі-130амин қышқылдарының қысқарған N -ұшының В түрінің қалдық варианты болып есептеледі. Кейбір әдебиеттерде екі түрдің синтезделуі екі промотормен бақыланатын жалғыз геннің транскрипциясы альтернативтілігіне негізделген деп көрсетіледі .

Дисталды промотор В түрінің транскрипті түзілуін, ал проксимальды бөлігі қысқа А бөлімінің түзілуін реттейді. Жекелей қасиеттерімен ерекшеленгенімен де әртүрлі нысана гендерді белсендіруде екі түрлі қызмет атқарады. Сонымен бірге А формасы белгілі бір жағдайларда В формасының белсенділігін арттыруға қатысады.

Прогестерон рецепторларының екі промотор гендерінің функциональды айырмашылығы А және В формаларының экспрессиясын дифференцациясын туырып, соған байланысты клетканың прогестинге сезімталдылығын тудыруы әбден мүмкін. Эстроген рецепторлары жоғары стереоспецификалығымен ерекшеленеді және тек эстроген және антиэстрогендермен өзара байланысқа түседі. Ал прогестерон рецепторалының бір ерекшелігі глюкокортикоидтарды, синералокортикоидтарды және аз да болса андоргендерді де байланыстыра алатын қасиетке ие болуы [129].

*Митохондриальды прогестерон рецепторының лейкомиомотозды түзілістердегі көрінісі мен митохондрия мембрана потенциалының ұлғаюымен байланысы***.** Жалпы прогестиндердің лейкомотозды түзілістердің өсуі

(фиброзды ісіктер) кезіндегі рөлінің маңыздылығы клиникада толығымен расталады. Бұл механизмдер барысында гендер реттелуі арқылы прогестеронның ядролық рецепторлары қосылады деп есептейді. Аз уақыт бұрын прогестеронның митохондриялық рецепторының ұлғаюы арқылы клетка тыныс алуына қатысатыны анықталды. Бұл зерттеу қорытындылары нәтижесінде прогестерон/прогестин фиброзды ісіктер туындауы механизміне тікелей әсері бар болуы мүмкін деп шешім шығаруға болады[130].

Мұндағы зерттеулер мақсаты болып, PR-M көрінісін қалыпты миометрияда сол жатырдағы пайда болған фиброзды ісік бөлігімен салыстыра отырып митохондрияның мембараналық потенциалының ұлғаюы прогестинге тәуелді екенін анықтау үшін адамның миометриялық клетка линиясы мен сол вируспен зақымдалған клетканы салыстыра отырып зерттеулер жүргізілген.

Жұмыс барысында PR-M, PR-B, PR-A белоктарының құрамы, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа миометрияда фиброзды ісіктен алынған ыдыста қатерсіз ісіктерді зерттеуге арналған гистерэктомия түрінде қолданылды.

Аталған жұмыстың нәтижесінде PR-M митохондриальды потенциалының жоғары деңгейлері миометрияның фиброзды ісік шалынған бөліктерінде жоғары деңгей көрсетті. HTERT-ГМ клеткаларында прогестин әсерінен митохондрияның мембраналық потенциалының жоғарылағаны көрінеді.

Осыған орай зерттеу жұмыстары нәтижесінде прогестерон-прогестин әсерінен фиброзды ісіктердің өсу механизмі барысында митохондриальды белсенділіктің жоғарылау белсенділігі байқалатыны қорытындыланды.Прогестерон рецепторларының әртүрлі механизмдерін анықтау барысында көптеген жан-жақты зерттеулер жүргізілгенін көптеген жұмыстардан көруге болады. Клеткалық деңгейдегі зерттеулердің де жан-жақтылығы, зерттеу жұмыстарының күрделілігі әлі де толыққанды зерттеуді талап ететінінін анықтай түскендей. Зерттеу жұмыстарының көпшілігі клетканың әртүрлі линиялары мен жануарлар мен адам ағзасының клеткалық, сонымен бірге қатерлі және қатерсіз өсінділерге жүргізілген.

Солардың бірі прогестеронның прогестерон рецепторлары арқылы шошқалар спермотозоиды метаболизмі мен өміршеңдігіне де әсер ететіні туралы мақала.Бұл мақалада прогестерон рецепторларын өзге де прогестеронның лигандаларымен әрекеттестірген жағдайда репродуктивті жүйенің орталық жұмысының өзгерісіне әкелетіні сипатталған. Осы мақсатта жүргізілген жұмыс нысаны болып алынған шошқа спермотозоидына вестерн-блоттинг әдісі арқылы тәжірибе жүргізілген. Иммунофлюоресценция әдістерінің нәтижесі бойынша прогестерон спермотозоид акросомасы аймағында болып, ұрықтану процесі барысында негізгі роль атқаруы мүмкін дейді. Сонымен бірге, бұл зерттеулер барысында прогестерон гормонының физиологиялық реттеудегі қосымша рөлін анықтауды қажет ететіні туралы қорытынды жасайды.

Прогестерон секрециясының молекулалық бақылануы.Холестерин-жоғары немесе төмен тығыздықтағы липопротеин, сонымен бірге прогестерон

биосинтезінің қосымша бөлігі болып табылады. Холестерин клеткада стероидогенез немесе ұзын тізбекті май қышқылдарымен байланыста болып, май тамшылары түрінде күрделі эфир секілді кездесуі де мүмкін.Стероидогенез үрдісі барысында қажет кезінде бос холестерин белок тасымалдаушы стерин және цитоскелетті элемент түрінде митохондрияға тасымалданады[131].

P_{450} цитохромдағы ферменттер комплексінің холестерин тізбегінің бүйірлік бөлімінің ыдырауы холестеринді прегнолонға айналдырады. Сол уақытта өзгерген прогестерон агранулярлы эндоплазмалық торда изомеразаға айналады. Холестериннің цитоплазмадан митохондриальды мембаранаға дейін тасымалдануы олардың қосымшаларының қадамын және прогестерон биосинтезі жылдамдығын шектейтін фактор болып табылады.

Стероидогенді реттеуші протеин (StAR) және бензодиазепинді рецепторлардың перифериялық түрлері (PBR) осы тасымалдауға тікелей қатысты.

StAR холестеринді цитозольда байлап, ал PBR сырттан митохондриялық мембрананың ішіне тасымалдауға тікелей қатысты. StAR A (PKA) протеинокиназа фосфориляциясы холестерин транспортын қамтамсыз етсе, PKC фосфориляциясы бұл процесті ингибирлейді. Эндозепин PBR-дің табиғи лигандасы болып табылады және сонымен бірге митохондрия мембаранасының ішінде холестерин тасымалдануы деңгейінің реттелуіне және стероидогенез процесі кезіндегі PKA стимулдаушы эффектісі ретінде басты рөл атқарады.

Эндозепин жоғары концентрациясы luteal клеткаларда көптеп кездеседі және клетка түріне байланысты прогестерон секрециясының ұлғаю себептерін анықтауға мүмкіндік беріп отырады[132]. Флуоресценция әдістерінің энергетикалық тасымалдануы жолдары StAR PBR -мен миохондриялық мембраналарда байланысатынын көрсетеді.

Бұл әдістер StAR, PBR және эндозепин холестериннің митохондриялды мембрана сыртынан ішіне тасымалдануына байланысты жүргізіледі [133].

Бұл жұмыста стероидты гормондар құрылымы, маңызы, әсер ету механизімі сонымен қатар адам ағзасындағы көптеген маңызды физиолгиялық процестерге қатысатыны туралы қарастырылды[134]. Аталған гормондардың бірі прогестерон рецепторларының рөлі мен маңызы клеткалық механизмдерінің адам мен жануарлар ағзасында және әртүрлі типтегі клетка линияларына жүргізілген зерттелулері қарастырылып клетканың энергетикалық механизміне қатысты маңыздылығы әртүрлі ғылыми зерттеулерге нысан бола отырып зерттелгені мақалалар мен әдеби деректерге шолу жасалына отырып қарастырылды.

Яғни, стероидты гормондар-барлық омыртқалылар мен кейбір омыртқасыздар ағзасындағы гормональды қосылыстардың негізгі классы болып табыла отырып,көп клеткалы ағзалар тіршілік әрекетіндегі негізгі реттеуші қызмет атқарады[135]. Атап айтар болсақ, өсу, бөліну, көбею,адаптация, мінез құлық қалыптасуы тағы да басқа процестер. Сонымен қатар стероидты гормондардың нысана клеткалардағы әсері гендердің транскрипциясын реттеуге тікелей байланыстылығы, мұның негізі гендердегі

ДНҚ-ның белгілі бөліктерін сезетін рецептор деп аталатын арнайы реттеуші гормон кешенінің түзілуімен жүретіні де қарастырылған. Осыған орай, стреоидты гормондар ішіндегі прогестерон рецепторларының рөлі мен маңыздығы кеңінен қарастырылды. Адам ағзасының прогестрон рецепторлары құрылымы жағынан әртүрлі изоформада PR-A және PR-B түрінде болатыны туралы және де осыған байланысты біраз мәселелер жоғарыда қарастырылған.

Митохондриальды прогестерон рецепторының лейкомиомотозды түзілістердегі көрінісі мен митохондрия мембрана потенциалының ұлғаюымен байланысы және прогестерон секрециясының молекулалық бақылануы туралы тың деректерге сілтеме жасалынып прогестерон рецепторларының митохондриялық мембранадағы механизмдері деқарастырылды[136].

Сонымен, аталған бөлімде стероидты гормондардың адам ағзасындағы мүшелер мен жүйелердің жүйелі қызметі кезіндегі маңыздылығымен қатар энергетикалық алмасудағы аталған гормондардың рецепторларының қызметі мен рөлінің ерекшеліктерімен таныстық.Сол сияқты, стероидты гормондар құрылымы, маңызы, әсер ету механизімі адам ағзасындағы көптеген маңызды физиологиялық процестерге қатысатыны туралы қарастырылады.

2ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу материалдары

2.1.1 Химиялық реагенттер

F12 DMEM/Хэма (Cellgro, Mediatech, VA, USA) қоректік ортасы, 5% FBS, эпидермальды өсіру факторы (EGF epidermal growth factor) (100 мкг/мл),гидрокортизон (1 мг/ мл),инсулин (10 мг/ мл), холера токсин (1 мг/мл). Тритон Х-100,РНКаза, DMSO және басқа химиялық реагенттер пайдаланылды.

F12 DMEM/Хэма қоректік ортасына сипаттама:

– DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)-модифицирленген өсіру ортасы;
– өнімді сертификаттаушы - Biowest компаниясы;
– өнімнің коды: L0090-500;
– стерильділік деңгейі - стерильді;
– сақтау темпераратурасы - +2/+8°C;
– сақтау мерзімі - 24 ай;
– L-глютамин ұнтағының қоспадағы мөлшері- 0,365 г/л;
– түсі- қызғылт ерітінді;

Химиялық реагенттер қатаң талаптарға сай қоспалары мөлшерімен алынып, зерттеу жұмыстары жүргізілуі барысында әрбір ыдыстың сыртқы жағында ерітіндінің дайындалған мерзімі мен қоспалары құрамы зерттеулер үшін мұздатқышта немесе тоңазытқыштаарнайы температураға сәйкес сақталды.

2.1.2 Даназол препаратының дайындалуы

Даназол препаратының фармакологиялық релеванттылығын қамтамсыз үшін арнайы ерітінді дайындалды. Ерітінді құрамына: ПЭГ 400 (полиэиленгликоль) , 15%2 пиролидон (лактам класына жататын қосынды, суда және спиртте жақсы ериді), 5% глицерин және пропиленглюколь, этанол (50%) және 10% су қосылды.

Сонымен, тәжірибелік мақсатта алынған даназол препараты (АҚШ,Пенсильвания) арнайы 0,25нМ,1мкМ,3мкМ,10мкМ және 30мкМ концентрацияларда тәжірибеге дайындалды. 30 мкМ концентрациядан жоғары қоспалары кристалл түзуге бейім болғандықтан осы концентрациялар алынды.

Біздің зерттеу жұмыстарымызда даназолдың әртүрлі концентрацияларын дайындау, арнайы рұқсат етілген хаттамаға сәйкес қоспалардың концентрациясы алынып, жұмыс жүргізілді.

2.1.3 Клетка культуралары

Mcf10A сүт безініңэпителий клеткалары Американдық типті культуралар жинағының (American Culture Collection-ATCC,Манассас, АҚШ), фиброзды-

кистозды мастопатиямен ауыратын сырқат әйелдерден алынып(Дрексель университеті, Митохондриялар патофизиологиясы лабораториясы, Пенсильвания шт, АҚШ) клетка культуралары қорынан қатаң санитарлы-гигиеналық талаптарға сай сақталған лаборатория қорынан алынып, жұмыс жүргізуге қолданылды. Mcf10A клеткалары 50-60 пассаж аралығында, 5% FBS (фетальды бұзау сарысуы) қосылған, L-глютамин ұнтағының қопасы бар F12 DMEM/Хэма (Cellgro, Mediatech, VA, USA), эпидермальды өсіру факторы (EGF epidermal growth factor) (100 мкг/мл), гидрокортизон (1 мг/ мл), инсулин (10 мг/ мл), холера токсин (1 мг/мл) қоректік ортасында өсірілді.

Клеткалар даназолдың концентрацияларымен тәжірибе жасалмас бұрын жоғарыда аталған қоректік орталарда температурасы 37°C және 5% CO_2 атмосфералық жағдайларда өсірілді.

Клетка культуралары өте сезімтал болғандықтан қатаң асептикалық талаптармен орындалды.Әрбір клетканы бөліп отырғызу жұмыстары аяқталған соң әр фласк сыртына клетка культурасының аты, бөлінген күні,қолданылған реагенттер жөніндегі ақпаратты мәліметтер толыққанды жазылуы тиіс(кесте 2).

Кесте 2- Клетка өсіруге арналған арнайы лабораториялық ыдыс немес фласк көлемі

Фласк немесе ыдыс мөлшері	Орташа көлемі
12.5 $см^2$ (Т-12.5)	3 мл-ден 6 мл-ге дейін
25 $см^2$ (Т-25)	5мл-ден 13 мл-ге дейін
75 $см^2$ (Т-75)	10мл-ден 38 мл-ге дейін
150 $см^2$ (Т-150)	30мл-ден 75 мл-ге дейін
175 $см^2$ (Т-175)	35мл-ден 88 мл-ге дейін
225 $см^2$	45мл-ден 113 мл-ге дейін

Сонымен, Mcf10A сүт безінің клеткалары лабораториялық жағдайда, стандартты санитарлы талаптарға сай хаттама ретіне сәйкес, арнайы клетка орта құрамымен, белгіленген температурада өсіріліп, тәжірибелік жұмыстарымызға қолданылды.

2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1Mcf10A сүт безі клеткаларын культивирлеу, мұздату және еріту әдістері

Клеткалық линияларды келесі зерттеулер мен тәжірибелерге сақтап қалу үшін, олар-86°C DFU зертханалық төмен температуралық мұздатқышта стандартты әдіспен қатырылды.Клеткаларды мұздату кезінде алдымен оларды 1-2 мл 0,05% трипсин ерітіндісімен дезагрегацияға ұшыратады және термостатта 37°C мен 5% CO_2кезінде5 мин бойы инкубациялайды. Алынған клеткасуспензияны 5минут 7500g жылдамдықта центрифугада

айналдырады.Центрифугалаудан кейін, супернатант алынып тасталынып,тұнба ретінде қалған Mcf10A сүт безі клеткаларына құрамында 5 % ДМСО (диметилсульфоксид), 10 % FBS, 75 % қоректік ортасы бар қоспасымен ресуспензиялайды.ДМСО клеткалық мембрана арқылы оңай өтеді және клеткаішілік, сондай-ақ клеткасыртылық қорғауды қамтамасыз етеді [137].Кейін, алынған қоспаны 0,5 миллилитрден (кемінде 10^6 клетка/мл) криопробиркаларға тез құяды да, құрғақ мұзы бар боксқа 30 мин салады. Содан соң, клеткалары бар криопробиркаларды -86°C DFU төмен температуралық мұздатқышқа ауыстырады. Бұл мұздатқыш клеткалық дақылдарды ұзақ уақыт бойы мұздатылған жағдайда сақтап тұруға көмектеседі.

Клеткалардыжылдам еріту үшін клетка бар криопробиркаларды 37°C температурада су моншасында жібітеді немесе толық ерігенге дейін қолда қыздырады.Еріткеннен кейін, криопробиркаларды бірден су моншасынан алады да, 70 % этанолмен залалсыздандырады. Содан соң, клеткалық суспензияны ДМСО әсерінен бейтараптандыру үшін 5 мл ортасы бар центрифугалық пробиркаға ауыстырады. Ары қарай, клеткаларды 5минут 7500g жылдамдықта центрифугада айналдырады. Кейін,алынған супернатант алынып тасталынады да, клеткаларды жаңа өсу ортасымен қайта суспензиялайды және жаңа культураны Т-75 фласкілерге отырғызады. Клеткаларды мұздату, еріту, жұмыстары қатаң санитарлық талаптарға сәйкесінше клеткаларды өсіруге арналған арнайы бокста орындалады.

2.2.2Mcf10A сүт безі клеткаларыныңморфологиясын бағалау

Зерттеу жұмыстарымызға алынған Mcf10A сүт безі клеткалары Америка Құрама Штаттарының, Пенсильвания штатында орналасқан, Дрексель Университеті, Митохондриялар патофизиологиясы лабораториясы қорында сақталған, сүт безінің патологияларының бірі фиброзды-кистозды мастопатиядан алынған Michigan Cancer Foundationнемесе қысқартылған түрдеMcf10A сүт безі патологиясының қатерсіз түрімен сырқаттанған әйелдерденалынған қатерсіз ісік клеткаларының жиынтығынан алынды. Зерттеулерімізде сұйық азотта сақталған, клеткалар жиынтығын қатаң санитарлы-гигиеналық талаптарға сай және қауіпсіздік ережелерін сақтай отырып, лабораториялық жағдайда клетка өсіруге арналған арнайы жұмыс үстелінде орындалды.

Жұмыстың орындалу тәртібі бойынша, алғашқы алынған нұсқалары спирттің 75 % ерітіндісімен әбден сыртын жуылып алып, ерітілген 1мл клеткаларды алдын ала дайындалған клетка өсуіне арналған өсу ортасында (F12 DMEM/Хэма (Cellgro, Mediatech, VA, USA), 10мл шыны ыдыстарға бөліп құйылып 37°C, CO_2 ауа атмосферасында өсірілді.

Клеткалардың саны мен морфологиялық құрылымын анықтау анализдері тринокулярлық микроскоп (Motic AE2000, АҚШ) арқылы жүргізілді. Mcf10A сүт безі клеткаларының саны мен морфологиялық құрылымында клеткалардың өсу уақыты мен санына қарай салыстырмалы ерекшеліктері 24,48 және 72 сағаттан кейін бағаланды.

Сонымен қатар, 30мм Петри табақшасына 0,3 х 10^6 тығыздықта отырғызылған клеткалар *Mito Tracker Orange* (25нм) флуоресцентті зонды бар 1 мл PBS буферінде 37°C,5 % CO_2 жағдайында 15 мин бойы инкубацияланды. *Mito Tracker Orange* –тірі клеткалардың митохондрияларына бірегей жоғары мембраналық потенциалын қолдану арқылы енетінфлуоресцентті зонд. Инкубациядан соң клеткалар 2 рет PBS-пен шайылып, оған даназол концентрациялары қосылып, 1 немесе 10 минут бойы митохондриялардың потенциалы мен морфологиялық құрылымының өзгеруі *Olympus FluoViewTM FV1000 (B&B* Microscopes Limited, Питсбург,АҚШ) конфокальды лазерлі микроскопты қолдану арқылы бақыланды.

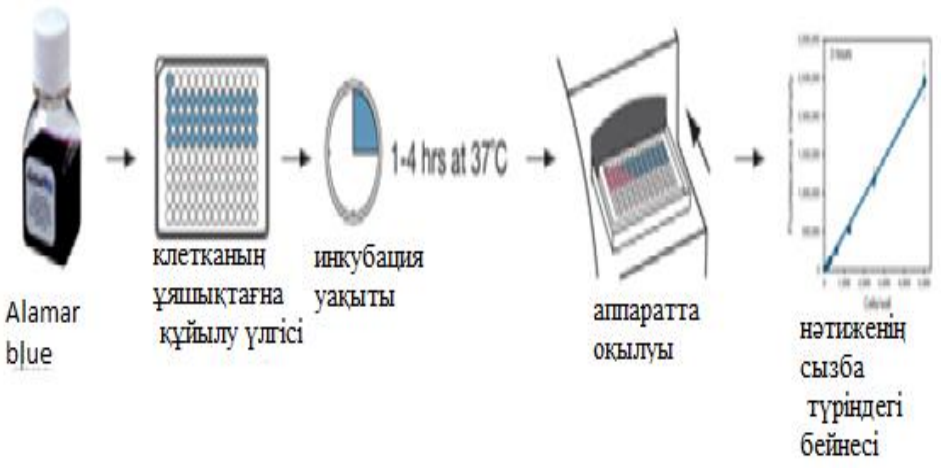
2.2.3Mcf10A сүт безі клеткаларына даназолдың цитотоксикалық әсерін*Alamar blue* талдамасы арқылыанықтау

Даназол препаратының цитотоксикалық әсерін анықтау үшін клетканың тіршілік әрекетін анықтайтын резазурин(*resazurin*) деп аталатын ароматты қосылыс пайдаланылды.

Ол үшін Даназолдың 0,025 мкМ, 1 мкМ, 3 мкМ, 10 мкМ және 30 мкМ концентрациялары қосылған Mcf10A сүт безі клеткаларын 96 планшетті ұяшықта alamar blue бояуының 3% ерітіндісінде, 100 мкл сұйықтықта, 37°C инкубаторға 2 сағатқа қойылды. Флуоресценция сигналын (пик 585nm эмиссия) Plate reader BioTek Synergy (BD Biosciences, San Jose, CA) 4 миркопланшетті аппараттында анықталды. Клетка саны өлі және тірі клеткаларды анықтайтын трипан көгін пайдалану арқылы есептелді.

Бұл тотығу-тотықсыздану индикаторы болып табылатын көк түсті бояу, реакция барысында күлгін флуоресцирлеуші резоруфинге айналады. 1929 жылы бұл бояуды Перш және Симмерт әдістерінде сүттің бактериалық ластануын бақылауда қолданған,сонымен қатар жануарлар клеткаларының да тіршілік әрекетін зерттеуде кеңінен қолданысқа ие болған.

Alamar blue-индикаторы флуоресценттік әрі спектрометриялық әдіс арқылы нақты мәлімет алуға мүмкіндік береді [138]. *Alamar blue (*Cell Viability Reagent,Life Technologies Corporation, 2011, АҚШ*)*бояуының-тәжірибелік анықталуы. Флуориметрия: 530-560 нМ және 590 нМ эмиссияда қоздыру жолымен, ал спектрофотометриялық толқын ұзындықтары 570 нМ және 600 нМ оптикалық тығыздықта өлшеу жолымен анықталады. Бояудың жекелей ерекшеліктеріне тоқталсақ, бояудың түсі қою көк түсті береді (сурет6).



Сурет 6- Alamar blue бояуының клетка тіршілік әрекетін анықтау барысындағы қолданысының сызбалық үлгісі [137,p. 207]

Осы бояу арқылы анынған мәліметтер микропланшетті Риддер (құрылғы) спектрофотометрдегі 96- ұяшықты, 384- ұяшықты форматты планшетте арнайы кюветте өлшенді. Боялуы: Resazurin. Өнімнің мөлшері: 25 мл, инкубациялық мерзімі: 1ден 4 сағат (аз клетка болған жағдайда 24 сағатқа дейін) уақытты қамтиды. Зерттелінетін клеткалар сәйкестілігі саңырауқұлақ клеткалары, бактериялар, эукариот клеткаларды алуға болады. Аталған материалдарды анықтау әдісі арнайы талаптарға сәйкес, күндізгі уақытта, колориметриялық әдіспен жүргізіледі. Сол сияқты бірге мұны нартрий тұзы немесе сауда маркасында alamar blue деп қолданады.

Platereader BioTek Synergy (BD Biosciences, San Jose, CA) құрылғысына қысқаша сипаттама беретін болсақ, микротитрлеу тәсілдері арқылы биологиялық, химиялық немесе физикалық қоспадағы сұйықтық үлгілерін зерттеу лабораториялары мен клиникалық жағдайда зерттейтін құрал болып табылады.Жалпы зерттеу бағыты немесе зерттеу аймағы флуоресценция, люминесценция жұтылу жиілігі негізінде қамтылады. Аталған құрылғы белоктар мен нуклеин қышқылдарының сандық және ферменттік белсенділіктерін, сонымен қатар клетка тіршілік әрекетін зерттеу барысындағы мүмкіндіктері зерттелуде қолданылады. Жұмыс барысы, арнайы алынған үлгіні белгілі бір толқын ұзындығында жарықтың жұтылу үдерісі негізінде жүргізіледі.

Жоғары өткізгіштік мүмкіндігі наномоляр мөлшерінде 530-560⁄590 Сақталу жағдайы: 2-8°C температурада мұздатқышта ылғалды мұзда жарамдылық мерзіміне сәйкес.

2.2.4 Mcf10A клеткаларындағы апоптоз процессін анықтау

Апоптоздың маңызды реттегіштерінің біріне клеткалардың өлу индукторлары жатады, соның ішінде, апоптозды тежейтін Fas (CD95, APO-1) беттік рецепторы және BCl-2 туысының белоктары[139].

Соңғы кездері, аннексиндер туысына жататын белоктардың биологиялық белсенділігіне үлкен назар аударылуда. Аннексин А5, басқа аннексиндер сияқты, қалыпты клеткалардан бөлінбейді; клеткасыртылық аннексин А5 көзі апоптотикалық және зақымдалған клеткалар болып табылады. Басқа аннексиндер сияқты, аннексин А5 әсер ету механизмінде олардың теріс зарядталған фосфолипидтермен, соның ішінде фосфотидилсеринмен байланысу қасиетінің зор мәнісі бар, және олардың клеткалық мембранадағы экспозициясы яғни,өңдеу уақыты апоптоздың ерте белгілерінің бірі болып табылады. Рекомбинантты аннексин А5бұл қасиеті апоптозға ұшыраған клеткаларды анықтау және санау үшін қолданылады[140,141].

Mcf10A клеткаларындағы апоптоз процессін анықтау үшін6-ұяшықты планшетке шамамен 15 сағатқа, $0{,}15\times10^{6}$(150 мың клетка) тығыздықта 37°Стемпературада және 5% CO_2 жағдайында отырғызылған Mcf10A сүт безі клеткаларының ескі қоректік ортасы төгіліп, PBS-пен шайып алынды, даназолдың 0,025нМ, 3 мкМ, 10мкМ және 30 мкМ концентрациялары қосылып 24 және 48 сағ инкубацияға қойылды. Инкубациядан соң, клеткалар трипсинизация арқылы жиналды және апоптозды анықтауға арналған жиынтықтың арнайы берілген нұсқауымен жүргізілді.

Клеткалардың апоптоз индукциясыBD Accuri С6ағынды цитометрде (BDBiosciences, Сан-Хосе, АҚШ) «Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell ApoptosisKit»жиынтығын(флюоресцеинизотиоционат (FITC) флюорохромымен коньюгацияланған Annexin V (Annexin V-FITC- апоптозды анықтауға арналған), пропидий иодиді (PI - некрозды анықтауға арналған)және бояуға арналған буфер) (Life Technologies, Гранд-Айленд, АҚШ) қолдану арқылы анықталды.BD Accuri C6 ағынды цитометрия құрылғысысының компьютерге бекітілген бөлімі жұмыс барысының нәтижелілігіне зор мүмкіндік тудырады.

Әрбір үлгіден 10000 клетканың флуоресценциясытіркелді(толқын ұзындықтары қозу/эмиссия сәйкесінше,488/525 нМ аннексин V үшін және 488/675 нМPI үшін). Квадраттағы шекараны орнату үшін келесідей бақылау үлгілері қолданылды: боялмаған клеткалар, Annexin V-FITC боялған клеткалар, PI боялған клеткалар. Үлгілерде клеткалардағы Annexin V-FITC (FL1) және PI (FL3) флуоресценциясының қарқындылығы шашыраңқы жарықтың тура (FSC) және жанама (SSC) көрсеткіштері негізінде бағаланды. Annexin+ және PI+ клеткаларының саны қос өлшемді гистограмма (DotPlot) бойынша анықталды. Апоптотикалық клеткалардың ерте апоптоздағы (Annexin+) саны гистограмманың төменгі бірінші квадрантында және кеш апоптоздағы клеткалардың (Annexin+PI+) саны гистограмманың жоғарғы бірінші квадрантында анықталды.

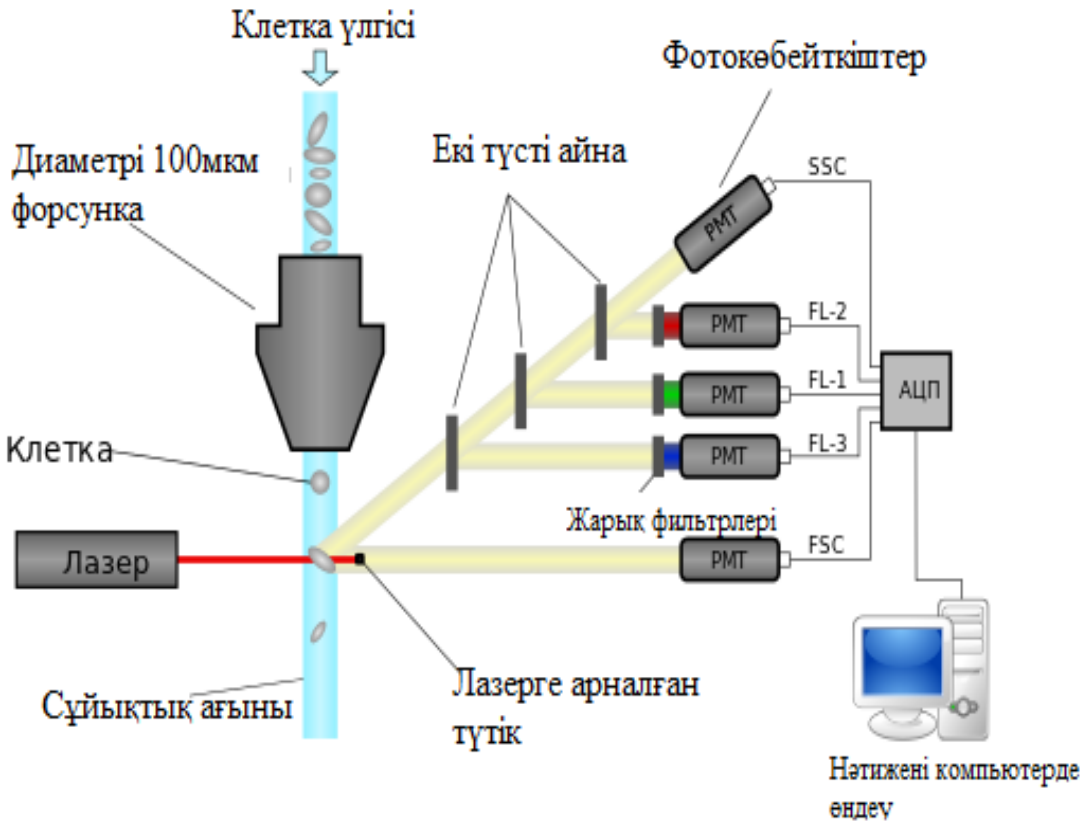
Зерттеу жұмыстарымызды жүргізуге ағынды цитометрия сипаттамасына келсек, салмағы 30 кг -ды құрайтын жоғары мүмкіндікті құрылғы иммунология,

цитология, қатерлі ісік биологиясы, өсімдіктер мен микробиология саласында жоғары нәтиже көрсететін бірден бір заманауи құрылғы.Зерттеу жұмыстарымызда аталған құрылығымен жұмыс барысында митохондрияның мембраналық потенциалын, клетка циклының талдамалары бойынша нәтижелер алынды (кестеЗ).

Кесте 3- BD Accuri C6 ағынды цитометрия құрылғысысының сипаттамалары (http://bioline.ru/catalog/18/234/)

Цитометрия	Зерттеу мүмкіндігі
Лазерлік сезімталдығы	488 нМ
Лазер көрсеткіші	640 нМ
Лазер қуаты	10 х 75 мкМ
Жарықтың таралуы	14,7 МВт 640 нМ диод қызыл лазер 20 МВт 488 нМ көк лазер
Қалдықтарды анықтауы	Алдында (0 градус, +/-13) жанынан (90 градусв, +/-13)
Қалдықтарды анықтау мөлшері	Стандартты оптикалық фильтр, 4 түстер: Fl1 533/30 нМ Фл2 585/40 нМ Фл3 > 670 нМ Фл4 675/25 нМ
Оптикалық дәлдігі	Бекітілген аймақта түзу
Ағын ұяшығы	200 мкМ ID кварцты капилляр
Минимальді мөлшер	Белгіленген бөлшектерде 0,5 мкМ
Үлгінің минимальді көлемі	300 мкл (12 х 75 мм түтікте)
Шығын мен өлшемнің шамамен алғандағы мүмкіндігі	Төмен: 14 мкл/мин, 10 мкМ ядро Орташа: 35 мкл/мин, 16 мкМ ядро Жылдамдығы: 66 мкл/мин, 22 мкМ ядро

Жұмыс бастамас бұрын құрылғының электр тогына қосылғанын, компьютердің толыққанды қосылғаны қатаң ескеріледі. Содан кейін барып, экран бетіндегі алдын ала орнатылған жұмыс тәртібі бойынша арнаулы нұсқаулықпен зерттеу тәжірибелері жүргізіледі (сурет7).



Сурет7- BD Accuri C6 ағынды цитометрия құрылғысысының арқылы зерттеуге алынған клеткалар нәтижелерін бақылау сызба-суреті(BD Accuri™ C6 нұсқама кітапшасынан)http://bioline.ru/catalog/18/234

2.2.5Клетка циклын анықтау

Клетка циклын анықтау әдісі клеткалардың пролиферативті белсенділігін анықтауға негізделген әдістердің бірі. Осы әдіс арқылы клетка циклының фазаларын G_1/G_0-, S- және G_2/M- фазалары арқылы клетка құрамындағы ДНҚ мөлшеріне байланысты ДНҚ-байланыстырушы флуоресцентті бояулар PI (йодты пропидий), 7-аминоактиномицин (7-AAD), 4’6’-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Hoechst, SybrGreenжәне тағы басқа бояулар арқылы анықтайды. Аталған әдіспен негізгі шектеуші фактор болып табылатын клеткалық суспензиялардың мөлшерін ғана анықтай алады.

Әдісті қолдану барысында тірі клеткаларды бояуға арналған ДНҚ-ның арнайы бояулар және ядро мембранасы мен плазмалық мембрана арқылы өтетін бояуларды пайдаланады(кесте4).

Кесте 4- Ағынды цитометрия құралында жиі қолданылатын бояулар жіктелуінің бірқатары (*www.bio-rad-antibodies.com*)

Флуорофор	Флуоресценция түсі	Қозудың толқын ұзындығы, нМ	Түсудің толқын ұзындығы, нМ	Жарқыраудың қатынасты жарығы
DyLight 405		400	420	3
Alexa Fluor 405		401	421	3
Pacific Blue		410	455	1
Alexa Fluor 488		495	519	3
FITC		490	525	3
DyLight 550		562	576	4
PE		490; 565	578	5
APC		650	661	4
Alexa Fluor 647		650	665	4
DyLight 650		654	673	4
PerCP		490	675	2
Alexa Fluor 700	Infrared	702	723	2

Клетка циклын ағынды цитометрия әдісі арқылы анықтаудың хаттамасыннда алдымен қолданылатын реагенттер дайындалады. Олар: 70% этонол, йодты проподий (50мкл/мл), рибонуклеаза (100мг/мл) дайындалып жұмыстың жаңа кезеңге көшіріледі.

Ағынды цитометрия арқылы Mcf10A клеткалары циклын анықтау үшін клеткалар жинап алынып, PBS-пен бірнеше қайтара шайылады. Клеткаларды 70% этанолда қатыру үшін оларды центрифугада айналдырып, беткі қабаттағы ескірген, тіршілігі жойылған клеткаларды алып тастап Vortex құрылғысында ыдыстағы (сұйықтықты шайқауға арналған қозғалатын аппарат) клеткаларға этанолды қосып бірқалыпты шайқай отырып араластырып, 30 мин 4°C температураға қояды. Этанолдан алынған клеталарды PBS-пен 2 рет жуып, центрифугада айналдырады. Алынған клеткаларға рибонуклеаза I да қою үшін 50мкл алынып 100мг/мл мөлшерінде қосылады. Бұл тәсіл ДНҚны бояйтын заттармен байланысады, одан соң 200млк 100 мг/мл PI қосып, цитометрияда анықтайды.

Талдама жасау үшін, алдымен боялмаған клеткаларды оқу арқылы гистограммадағы FSC-A (жарықты тура сындыру қабілеті), SSC-A (жанынан жарықты тарату) сызықтарын түзеп алады. Одан соң SSC-H (жанынан жарық таратудың жоғарғы сигналы)мен SSC-W (жанынан жарық таратудың ені бойынша құрылғы) реттеп алады.

Сонымен, біздің зерттеулеріміздеMcf10A клеткалары 24 сағатқа инкубацияға қойылады. Инкубациялық кезең өткеннен соң клетка ортасын фетальды бұқа сарысуының қоспасынсыз қайтадан 24 сағатқа клетка циклының синхронизациясы үшін инкубаторға қойылады. Зерттеулерде BD Accuri компаниясының C6 ағынды цитометр қолданылды.

Инкубациялық кезең өткеннен кейін клеткаларға 10%-дық сарысу қосылған медиум және даназолдың тәжірибеге арналған концентрациялары қосылып қайтадан 24 сағаттық инкубацияға қойылады. 24 сағат өткенен кейін клеткалар трипсинизация және 5 минут көлемінде 7500g жылдамдықтацентрифугалау әдістерімен жинақталып алынады. Артық медиум қоспалары алынып тасталынып, үстінен тамшылату тәсілі бойынша Vortex аппаратының көмегімен 75% этанол қосылып клеткалар фикциясын жасау үшін 20°C температураға тоңазытқышқа қойылады. Әрі қарай клеткаларға PBS ерітіндісіндегі 0,1% тритон, 50мг/мл RNAsse қосылып, олар 37^0C бөлме температурасында 30 минут тұруы шарт. Одан кейін клетка суспензиясына 10 мг/мл проподиум йодид қосылып, 20 минут тұрғаннан соң BD Accuri компаниясының C6 ағынды цитометр (BD биотехнологиялары, Сан-Хосе, Калифорния) көмегімен анықталды.

2.2.6 Клетканың тотығу-фосфорлану қабілетін өлшеу

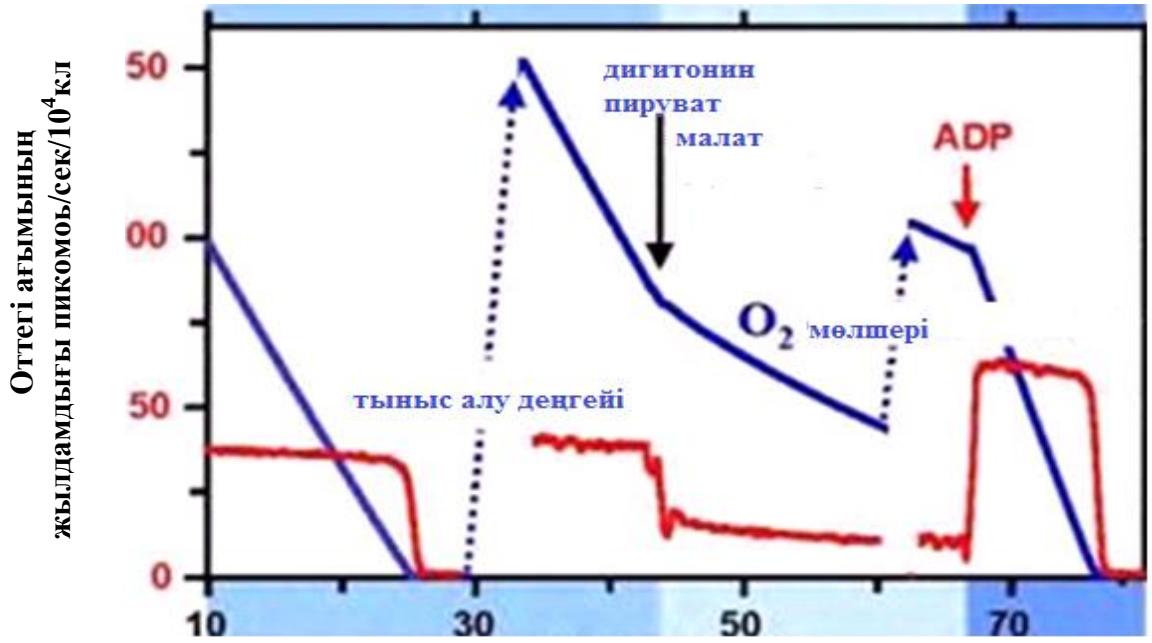
Клетканың тыныс алуын анықтау 37°C температурада O*roboros Oxygraph-2K* (Инсбрук, Австрия) аппаратында анықталды [142,143]. OROBOROS DatLab бағдарламалық қамтамасыз етілуі алынған мәліметтерді талдауға мүмкіндік береді.

Mcf10A сүт безі клетканың тотығу-фосфорлану қабілетін өлшеу үшін, трипсинизация және центрифугалау әдістермен алынған алынған mcf10A клеткалары($1x10^6$ клеткалар/мл) Кребс буфері немесе арнайы дайындалған (120mM KCl, 10mM NaCl, 20mM MOPS, pH 7,2, 2mM $MgCl_2$, 1 мм KH_2PO_2, 0.5 мм $CaCl_2$ Кребс қоспалары құрамынан тұратын ерітінділермен шайылады. Клетканың тыныс алу жиілігі 1 секундағы бір миллион клеткамен өлшенеді. Жекелей тыныс ферменттерінің тыныс әрекетін анықтау барысында пермебилизация (permeabilization) тәсілі қолданылды. Ол үшін ионды емес ерітінді дигитониннің 10мм мөлшері респирометр камераларына құйылады.Клетка ішілік сұйықтық құрамын қамтамасыз ететін қоспаға (120мМ KCl,10мМ NaCl, 20мМ MOPS, pH 7,2, 2мМ $MgCl_2$, 1 мм KH_2PO_4 0.5 мМ $CaCl_2$ және қоспаға 1 мМ ЭГТА қосылады).

Сонымен бірге жұмыс хаттамасына сәйкес бірнеше ингибитор-субстраттар(10 глутамат 1 мм, 10 мм пируват және 2мМ малат,1 мг/мл ротенон,10мМ сукцинат, 2.5мМ антимицин, 1 мМ аскорбат, 0,3 мМ TMPD (Тетра-methylphenylenediamine) қосылды.

Төмендегі 8 суретте көрсетілгендей*Oroboros Oxygraph-2K* (Инсбрук, Австрия) аппаратының арнайы бөліміне клетканы салғаннан кейін, уақыт аралығына қарай тыныс алу қабілеті бақыланады. Клетканың тыныс алуы

тұрақталған жағдайда, зерттеу жұмыстарының мақсаттарына сәйкес даназол концентрациялары қосылып, тыныс алу деңгейі анықталды.



Сурет 8- Клетканың тыныс алу қабілетін зерттеуге арналған OROBOROS Oxygraph-2K (Инсбрук, Австрия) құрылғысының нәтижелерінің үлгісі(мұнда, абцисса түзуі оттегінің концентрациясын(нМоль/мл), ал ордината сызығы уақытқа байланысты клетканың тыныс алу жылдамдығын көрсетеді)[140,p. 25]

2.2.7Митохондрияның мембраналық потенциалын анықтау

Клеткалар($0,5x10^6$) митохондриялардың мембраналық потенциалына ($\Delta\Psi m$) сезімтал 75 нМ MitoRedфлуоресцентті зондымен (толқын ұзындықтары қозу/эмиссия 622/648 нМ), (PromoCell GmbH, Гейдельберг, Германия) 20 минут бойы 37°C қараңғы жерде инкубацияланды. Шөгуден кейін клеткалық шөгінділер құрамындаCa^{2+}/Mg^{2+}жоқ таза PBS өңделген PBS араластырылды. Митохондриялардың мембраналық потенциалы BD Accuri C6 ағынды цитометрде (BD Biosciences, Сан-Хосе, АҚШ) талданды. Оң бақылау ретінде, клеткалар мембраналардың толық деполяризациясына әкелетін және митохондриялардың тотығу фосфорлануын ажырататын 2 мкМ карбонилцианид 4-(трифтометокси) фенилгидразон(FCCP) дозасымен өңделді.

Сонымен қатар,30 мм петри табақшасында 0,3 х 10^6 тығыздықта отырғызылған клеткалар *Mito Tracker Orang*e (25нМ) флуоресцентті зондыбар 1 мл PBS буферінде 37°C, 5% CO_2 жағдайында 15 мин бойы инкубацияланады.

*Mito Tracker Orang*e- тірі клеткалардың митохондрияларына бірегей жоғары мебраналық потенциалын қолдану арқылы енетін флуорецентті зонд. Инкубациядан соң клеткалар 2 рет PBS ерітіндісі қосылды және 1 немесе 10 минут бойы митохондриялардың потенциалы мен морфологиялық құрылымын өзгеруі *Olympus FluoViewTM FV1000* (B&B Microscopes Limited,

Питсбург,АҚШ) конфокалды лазерлі микроскопты қолдану арқылы бақыланды.

2.2.8Жоғары кеңейтілімдегі респирометриялықталдау

Тыныс алу ферменттерінің белсенділігі жоғары кеңейтілімдегі респирометрия арқылы 37°C екі камералы OROBOROS Oxygraph-2K респирометрінде (Инсбрук,Австрия) талданды. OROBOROS DatLab бағдарламалық қамтамасыз ету деректерді жинау және талдау үшін пайдаланылды. Центрифугалау арқылы жиналған клеткалар ($1x10^6$ клетклар/мл) түрлендірілген Кребс буферінде (137 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 20 мМ MOPS, pH 7,4 немесе 6,8, 2мМ $MgCl_2$, 1 мМ KH_2PO_4, 100 нМ $CaCl_2$ (0,5 мМ және 0,06 мМ $CaCl_2$ 1 мМ EGTA қатысында, pH 7,4 және 6,8 сәйкесінше) шайылып, қайта суспензияланды. EGTA қатысында кальций концентрациясы Maxchelator бағдарламасын қолдану арқылы есептелді (http://maxchelator.stanford.edu/CaEGT-ATS.htm).100нМ $CaCl_2$ (митохондрияларды зақымдамайтын концентрациясы) клеткаларды дигитонинмен пермебилизациялау кезінде сукцинат қатысында оттегі тұтыну қарқынының өсуін көрсету үшін қолданылды. Бұдан басқа, 0,1 мМ, 0,5 мМ және 1 мМ $CaCl_2$ бар pH 6,8, буферлері, тиісінше 1 мМ EGTA қатысында 1,1 мМ, 1,5 мМ және 2 мМ $CaCl_2$ дайындалды. Клеткалардың эндогенді энергетикалық қабілетін бағалау үшін, глюкоза да, пируват та өлшеу камерасына қосылмады. Жүйе тұрақтандырылғаннан кейін, клеткаларға мембрананың деполяризациясын тудырмайтын және оттегі тұтынуды сәл ынталандыратын 20 немесе 40 нМ мөлшері (карбонилцианид 4-(трифторметокси) фенилгидразон) (FCCP) қосылды. Әрі қарай, ең жоғары белсенділік үшінклеткалар 10 мМ сукцинатпен ынталандырылды [144,p.2044-2048; 145,p.122].Тыныс алу қарқыны секундына бір миллион клеткаларымен көрсетілді. Содан кейін, митохондрияның максималды сукцинат тотықтырғыш қабілетін бағалау үшін 10 мкМ дигитонин қосылды.

Электрондардың тасымалдану инстенсивтілігіне тыныс алуды шектеуші әсерлердің табиғатына және тасымалдағыштардың тотықсыздану деңгейіне қатысты митохондриялардың бес метаболизімдік жағдайларын бөліп қарайды.

Эндогенді тыныс алу-тотығу субстарттары мен АДФ-фосфат акцепторлары болмаған кезде байқалады[146,с. 30-31].

2.2.9 Тотығу (оксидативті) стресін өлшеу

Тотығу стресі CM-H2DCFDA және MitoSox бояуларымен, сәйкесінше, сутегі асқын тотығы және митохондриялармен түзілетін супероксид сезімтал бояғыштарының көмегімен флуориметриялық түрде бағаланды.

Mcf10A клеткалар ($0,2x10^6$ клетка) 2 мкМ CM-H2DCFDA (толқын ұзындықтары қозу/эмиссия 495/527 нМ) немесе 5 мкМ MitoSox (толқын ұзындықтары қозу/эмиссия 510/570 нМ) (Life Technologies, Гранд-Айленд,АҚШ) 15 минут бойы қарангы жерде шайқағышта 37°C температурада, 5% CO_2жағдайындаинкубацияланды. Сутегі асқын тотығы (H_2O_2) мен

супероксид ($O_2^{\bullet-}$) деңгейінің өзгеруі BD Accuri C6 ағынды цитометрде (BD Biosciences, Сан-Хосе, АҚШ) тексерілді. Оң бақылау клеткаларына I, II және III/IV тыныс алу кешендерінің ингибиторлары, сәйкесінше 1 мкг/мл ротенон, 500 мкМ малонат және 2,5 мкМ антимицин қосылды.

2.2.10Mcf10A сүт безі клеткаларының цитозолдық кальций деңгейін өлшеу

Цитозолдық кальций модуляцияларының микроскоптық эксперименттері үшін тығыздығы 200000 клетка түбі шыныдан жасалған 35 мм MatTek табақтарына (Маттек Corp., Ашленд, АҚШ) егілді. Клеткалар қоректік ортадан PBS-пен (Ca^{2+} және Mg^{2+} бар) шайылды және қараңғы жерде бөлме температурасында 15 минут бойы 2 мкМ Fluo-4 AM (қозу/эмиссия 488/560 нМ) флуоресцентті зондымен таңбаланды. Таңбалаудан кейін клеткалар екі рет жуылды және тұрақтандыру үшін қосымша 15 минут буферде ұсталды. Клеткаларға 0,5 мл PBS (Ca^{2+} және Mg^{2+} жоқ) бетін толық жабатындай етіп құйылды, ал содан кейін клеткаларға 1 мл таза PBS қосылды. Цитозолдық кальций деңгейінің тұрақтылығы 50 мкМ АУФ қосу алдында 10 минут бойы бақыланды.Клеткалық зерттеулер клеткаішілік флуоресценция ауытқуын бақылау үшін, бір уақытта бейне кескіндерін және микрофлуориметрияларды беретін *Olympus Fluo ViewTM FV1000* конфокальды лазерлік сканерлеуші инверторлы микроскопын пайдалана отырып жүргізілді.Кальцийдің (Ca^{2+}) митохондриядық матрикске жұтылуы клетка қызметінде өте маңызды болып табылады. Матрикстің Ca^{2+} деңгейінің реттегіштігі ретіндегі бұл ағын энергияныңтүзілуіне әсер етеді және клеткалық өлімін индукциялауы мүмкін[147]. Даназолдың әртүрлі концентрацияларының әсерінен митохондриялық кальцийге сезімтал - Rhod-2 AM (қозу/эмиссия 552/558 нм) флуоресценті зондын қолдану арқылы жүргізілді.

2.3 Нәтижелерді статистикалық өңдеу

Статистикалық талдау *GraphPad Prism* бағдарламасының 5.03 нұсқасын пайдаланып жүргізілді(GraphPad Software компаниясы,Сан-Диего,АҚШ).

Зерттеу тәжірибе жұмыстары кемінде үш реттен қайталанып орындалды. Өңдеулер аралығындғы статистикалық маңызды айырмашылықтар жұп емес t-тест Стьюдент көмегімен Microsoft Excell компьютерлік бағдарламасын қолдану арқылы бағаланды. Параметрлер өзгерісі $p \leq 0,05$ болған кезде дұрыс деп ұйғарылды.

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ

3.1 Даназолдың цитотоксикалық әсері

Даназол фиброзды кистозды мастопатияны емдеу барысында басқада эндокринді препараттармен бірге қолданылатын фармакологиялық қоспа болып табылады.Клиникалық қолданылуда ауырлық синдром яғни белгілерін басатын әсер ретінде ұсынылады.

Даназол 0,001мг/мл болатын жоғары гидрофобты қасиетке ие қосылыс болып табылады. Зерттеу жұмыстарымызда ерігіштік қасиетін жоғарылату және фармакологиялық құрамын жақсарту үшін ПЭГ (полиэтиленгликоль) 400, 15% 2 пиролидон, 5% глицерин және пропиленглюколь, этанол (50%) және 10% судан тұратын кешенді қоспа дайындалды. Аталған синтетикалық дәрілік заттың гормонға сәйкес стероидты табиғатына және белсенділігіне қарай цитотоксикалық қабілеті нано және микромолярлы концентрацияларында *резазурин*бояуында анықталды. Даназол препаратының цитотоксикалық әсерін анықтау үшін клетканың тіршілік әрекетін анықтайтын резазурин (resazurin) деп аталатын ароматты қосылыс пайдаланылды. Бұл тотығу-тотықсыздану индикаторы болып табылатын көк түсті бояу, реакция барысында күлгін флуоресцирлеуші резоруфинге айналады.Сонымен бірге мұны alamar blue деп те танимыз. Бастапқы сатыларда даназолдың концентрацияларын дайындап алдық та аталған препараттың цитотоксикалық қабілетін анықтау үшін клетканың тіршілік әрекетін анықтайтын alamar blue талдамасы бойынша қолданылды. Ол үшін Mcf10A сүт безі клеткаларын 96 планшетті ұяшықта alamar blue бояуының 3% ерітіндісінде, 100 мкл сұйықтықта, 37°C инкубаторға 2 сағатқа қойылды. Флуоресценция сигналын (585nm эмиссия) BioTek Synergy (BD Biosciences, San Jose, CA) 4 миркопланшетті аппараттында анықталды. Клетка саны өлі және тірі клеткаларды анықтайтын трипан көгін пайдалану арқылы есептелді.

Alamar blue - бояуы, клетканың метаболизмдік белсенділігіне байланысты колориметриялық және флуоресценттік белгілер өзгерісін береді. Бұл бояудың негізгі қасиеттерінің бірі қауіпсіздігі әрі токсикалық қасиетінің жоқтығы. Аталған бояуды клеткалардың пролиферациясы және тіршілік әрекетіне бағалау талдамаларын жасағанда цитотоксин және цитотоксикалық биопробаларға зерттеу жүргізуге тиімді болып табылады. Бояудың қолданылуына сипаттама жасайтын болсақ,токсикалық қасиеті жоқ, суда жақсы ериді, клетка пролиферациясын анықтауға тиімді, клетка тіршілік әрекетінің талдамаларын жасауға, цитотоксикалық қасиетімен бірге зақымдалған клеткалар тіршілігінің әрекетін анықтауға мүмкіндік береді. Цитокиндерді (цитокиндер дегеніміз- клетканың басқа түрлерімен және иммундық жүйе клеткаларын мен синтезделетін гормонтәріздес белоктар мен пептиндер) анықтауға, цитокин-индуцирленген пролиферацияны, клетканың қайта қалпына келу мүмкіндігін реттеу.Alamar blue-мен анықтаған кезде клеткалардың зақымдалғандары өте төмен метаболизмдік белсенділігімен айқындалады және сигналы тым әлсіз болады. Бояудың өзі усыз болғандықтан клетка тіршілігіне

қауіпсіз болып табылады. Сыртқы сипатына қарайтын болсақ, alamar blue® бояуы индиго (қоюкөк түстес) сұйықтық.

Аталған бояу түрі бактериялық,саңырауқұлақтар және жануарлар клеткаларының метаболизмдік белсенділігін анықтауға өте тиімді бояудың бірі. Бояудың токсикалық қасиетінің жоқтығы, зерттелген клеткалардың келесі тәжірибелерді де жалғастыруға де жарамды екенінен аңғаруға болады. Қасиеті жағынан, аталған бояу суда жақсы еритіндігімен ерекшеленеді, шайқауға, шаюға күрделі құрамды емес.

Даназолдың бірнеше дозалары клеткаларға улылығын бақылау үшін 0,025 мкМ, 1 мкМ, 3 мкМ, 10 мкМ және 30 мкМ концентрациялары алынды. 30 мкМ -дан жоғары концентрациялары сулы ортада кристалл түзіп кетеді. Даназолдың нақты осы концентрациясы төмен концентрациялар көрсете алмаған сигналдарға жауап беру арқылы қысқа уақыт ішіндегі емдеу барысында клеткаішілік нысаналарға тиімді әсер ететін әсерін көрсетті [148].

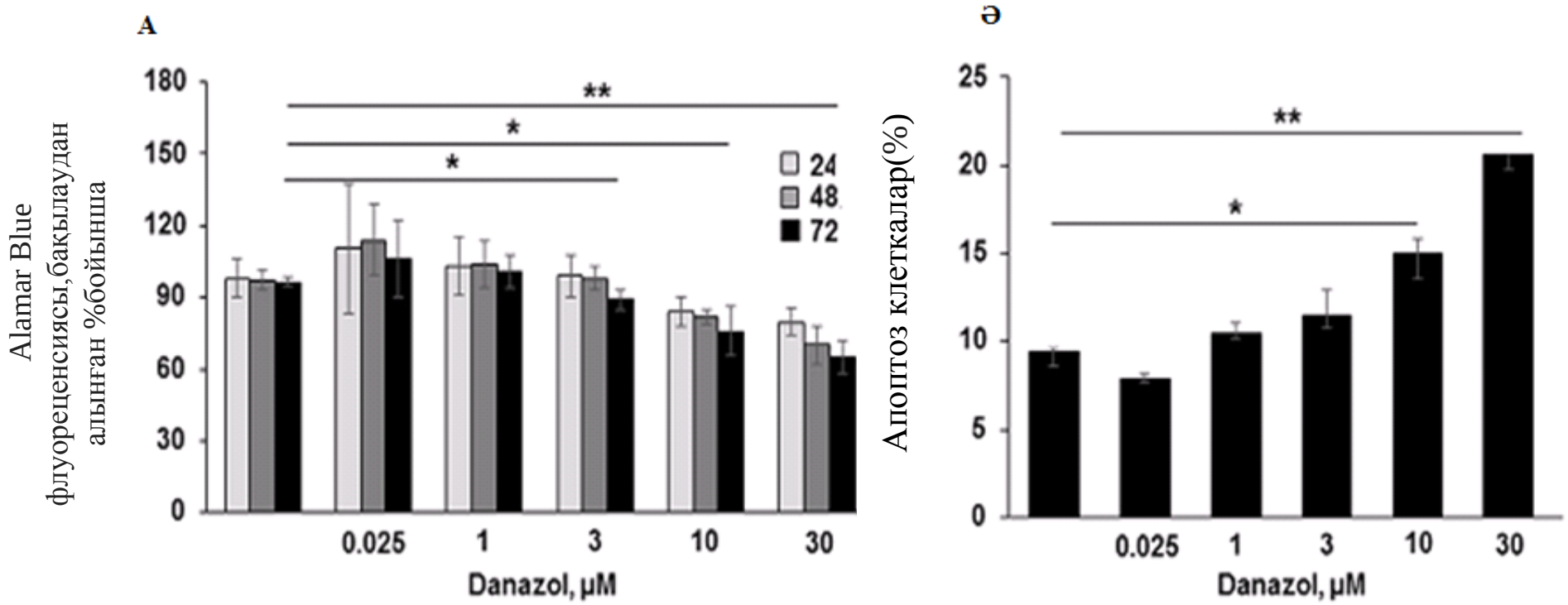
Тәжірибелік жұмыстарымыздың бастамаларын Mcf10A сүт безі клеткаларының 24,48 және 72 сағат бойы өсіріліп даназол концентрациялары қосылғаннан кейінгі нәтижелерін бақыладық.

9 А суретте көрсетілген нәтижелерден көріп отырғанымыздай, Mcf10A сүт безі клеткаларын 25 мкМ, 1 мкМ және 3 мкМ дозаларында инкубациядан соң 72 сағат бойы бақылаумен салыстырғанда 105,8 ± 16,3%, 100,8 ± 7,1% и 89 ± 4,5% көрсеткіштермен ешқандай өткір цитотоксикалық әсер байқалмады. Ал 10 және 30мМ мөлшерде тіршілік қабілеті 76,5 ± 11,4% және 65,1 ± 7,2% төмендеді (*p≤ 0,05 және ** p ≤0,005).24,48 және 72 сағаттан соң да клетканың тіршілік әрекетіне әсері болмады. Даназол өткір цитотоксикалық әсер етпегенімен, 24 сағаттан соң дозаның жоғарылауына байланысты апаптозға ұшыраған клеткалар санының көбеюіне әкелді (сурет9ә).

Даназол цитотоксикалық әсерін бақылау үшін алынған концентрациялардың уақытқа байланысты сандық мәліметтеріне жекелей талдама жасай отырып сипаттасақ:

9 А суреттен көріп отырғанымыздай 1мкМ концентрациясы 0,025 мкМ концентрациямен салыстырғанда 24 сағат өткеннен кейінгі клеткалардың өсуі қарасақ, 110% -ды, 48 сағаттан соң 109%, ал 72 сағат уақыт өткеннен кейін 110% (*p ≤ 0,05 және **p ≤0,005) көрсетіп отыр.

Сондай-ақ, 3 мкМ даназолдың мөлшері 24 сағаттан соң 109%, 48 сағат уақыт өткенде 107%, ал арада 3 тәулікке жуық уақыт өткенде 97% (*p≤ 0,05 және **p ≤0,005) көрсеткіштер береді.



Мұндағы абцисса сызығы даназолдың мкМ концентрацияларын көрсетсе,ордината сызығы Alamar blue флуоресценциясы, клетканың % көрсеткіші. Статистикалық айырмашылық (*p ≤ 0,05 және **p ≤0,005)

а - Mcf10A сүт безі клеткаларының даназолдың бірнеше концентрациясындағы цитотоксикалық қабілетінің бағалануы alamar blue талдамасы бойынша жүргізілді

ә - Даназолдың концентрацияларымен жасалынған PI талдамасы бақылаудан соң апоптозға ұшыраған клеткалардың кездесу мөлшері

Сурет 9- Даназолдың цитотоксикалық қасиеті (а) және апоптоз туындауына әсері (ә)

10 мкМ концентрациясы көрсеткіштері 24 сағат уақыт өткенде 87%, 48 сағаттан соң 86%, ал 72 сағаттан соң 84% нәтиже беріп отыр. Бұл дегеніміз даназолдың төменгі концентрацияларына қарағанда 10 мкМ (*p≤0,05 және **p≤0,005) концентрациясының токсикалық әсерінің барын көрсетеді.

Даназолдың цитотоксикалық әсерін 30мкМ концентрациясы уақыт аралығы бір тәулікті қамтыған кезде 85%, екі тәуліктен соң 81% ал, арада үш тәулік уақыт өткеннен кейінгі нәтиже бойынша клетка тіршілік әрекеті барысына әсері 77% болды. Бұл нәтижелерден бақылағанымыз даназолдың 30мкМ концентрациясының цитотоксикалық әсері бар, ол айқын көрінеді.

Апоптоз ұлпалар мен мүшелердің түзілуі, гомеостаз және диференцация деңгейлері реттелуіндегі маңызды болып табылатын клетканың бағдарланған өлімі. Апоптоз барысында ядро ДНҚ ұсақ ферменттерге ерітетін лизосомды емес эндогенді эндонуклеаз белсенділігімен сипатталады. Апоптоз кезеңдерінің үш түрін ажыратамыз.Олар: сигналды немесе индукторлы, эффекторлы және деградация немесе деструктивті деп бөлінеді .

Клетка апоптозын анықтау барысындағы зерттеулеріз Annexin-PI талдамасымен тексерілді. 9 ә суреттен көріп отырғанымыздай бақылаумен салыстырғанда 24 сағаттан кейінгі даназолдың ең төмен концентрациясы 25 мкМ мөлшерінде 7-8% болса, 1 мкМ және 3 мкМ дозаларында 10-13% көрсетеді. Даназол концентрацияларының ең жоғары мөлшері 30 мкМ 23% мөлшерді көрсетіп отыр (*p ≤ 0,05 және ** p ≤0,005).

Келесі 9Ә суреттегі нәтижелер клетка апоптозына әсерін бақылау бейнеленген. Клеткалардағы апоптоз процесінің индукциясы ағынды цитометр BD Accuri C6 мен Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit жиынтығын қолдану арқылы даназолдың әртүрлі концентрацияларымен өңдеуден кейін 24 сағат өткеннен соң анықталды. Даназолдың 0,025 мкМ концентрациясы нәтижесі 7% (*p≤ 0,05 және **p≤0,005), 1мкМ концентрациясы 12%, 3 мкМ 13,5% 10 мкМ даназолдың мөлшері 15% (*p ≤ 0,05 және **p ≤0,005), ал даназолдың тәжірибе барысында алынған ең жоғарғы концентрациясы 21% (*p ≤ 0,05 және **p ≤0,005) дейін клетканы апаптозға ұшырататын көреміз. Дегенмен де даназол концентрацияларының уақытқа байланысты әсерінен көргеніміздей клеткаға цитотоксикалық әсері, клетканың апаптозы үдерісіне әсері бар болғанымен аз уақыттан кейін клетка тіршілігін жалғастартынын көреміз. Бұл даназолдың клетканың тіршілігіне токсикалық әсерінің жоғары емес екенін көрсетеді[148, p. 55].

Сонымен даназолдың цитотоксикалық әсерін білу мақсатында жүргізілген тәжірибелеріміздің нәтижесі көрсетілген мәліметтердеданазол препаратының 0,025мкМ, 1мкМ және 3мкМ концентрацияларының клетка тіршілігіне улы емес екенін байқаймыз.Аталған препараттың жоғарғы концентрациялары, яғни 30 мкМ концентрацияда апоптозға әкелді (сурет9ә). Зерттеулеріміздің нәтижелерін толыққанды қарастыру мақсатында клеткалық процестердің басқа да механизмдеріне бақылау жүргізу үшін келесі зерттеулерге көштік.

3.2Даназолдың Mcf10A клеткаларының пролиферациясына әсері

Клетка циклы біріншілік бөліну деңгейлерінен бастап клетканың өзіндік бөлінуі немесе клетка өліміне дейінгі кезеңдерді сипаттайтынын білеміз. Осы циклдың өзі 2 кезеңді құрайды. Бірі-клетка өсуінің кезеңі, яғни интерфазалық кезеңде ДНҚ мен белоктардың синтезі жүріп клетка бөлінуге дайындалады. Мұнда да бірнеше деңгейге бөліп қарастырамыз: G_1-фазасы ағылшын тілінде *gap*-аралық деген мағынаны беретіндіктен бөлінудің бастапқы кезеңі, мРНҚ және де клетканың басқа құрылымдарының синтезі жүреді. Ал екінші фаза S-фазасы, ағылшынша түзілу деген түсінік беретіндектен, мағынасына қарап клетка ядросы ДНҚ-сы репликациясы түзілетінін және центриольдер (бар болса) екі еселенуі болатын кезеңдердің бірі. Клетка циклының соңғы кезеңі G_2-фазасы, мұнда митозға дайындық кезеңі деп қарастырамыз. Бөлінген клеткалардың тыныштық кезеңде тоқтап тұруын G_0-тыныштық фазасы деп аталады, мұнда ДНҚ саны G_1фазадағыдай болады.Ал клетканың бөліну кезеңі М фазасы, мұның өзі кариокинез(клетка ядросының бөлінуі), цитокинез(цитоплазма бөлінуі) деп ажыратамыз.

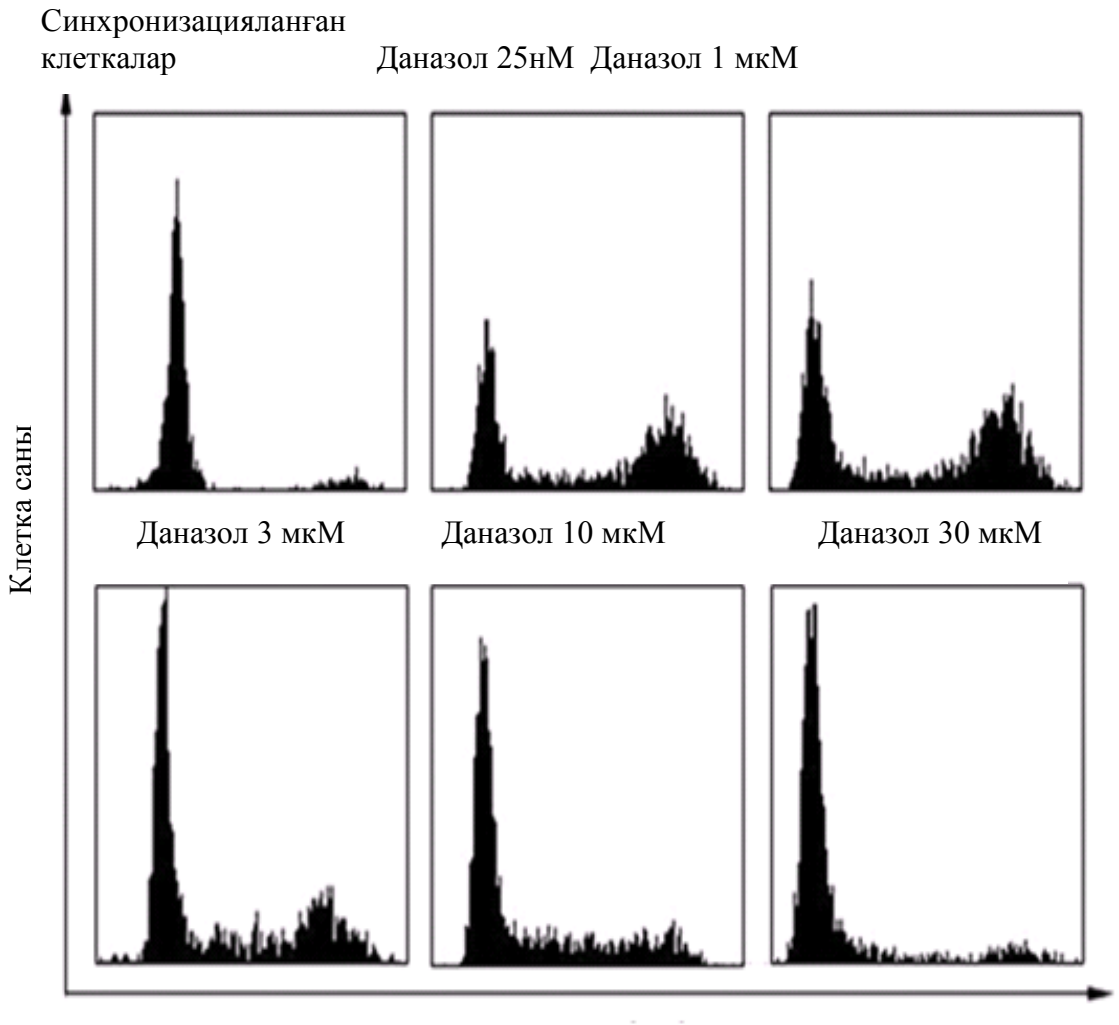
Әр фазаның аяқталуын бақылау үшін бақылау нүктелері болуы керек. Егер клетка бақылау нүктелерінен өтетін болса, клетка циклы әлі жалғасуда деп түсінуге болады.

Mcf10A клеткаларының пролиферациясына, яғни клетканың циклдық бөліну кезеңдеріне даназол препаратының қалай әсер ететінін бақылау мақсатындағы жүргізілген жұмыстарымыздың нәтижесінде 12 суреттегі мәліметтермен толықтырылды.

Төмендегі 12 суреттен көріп отырғанымыздай даназол препаратының 30мкМ концентрациясының әсерінен клеткалардың өсуінің тежелгенін көреміз. Суретте даназолдың клетка клетка пролиферациясының G_0/S фазаларына өту кезеңінде тоқталғаны байқалады.

Клетка циклын бақылаудағы даназолдың кезекті концентрацияларының бірі 25нМ концентрациясы қосылған уақыттағы нәтижені бақыласақ, клеткалық пролиферация үдерісі жалғаса береді. Ал даназолдың 1 мкМ концентарциясы бейнеленген суретте даназолдың 25нМмөлшерінен айтарлықтай айырмашылықтар байқалмайды.

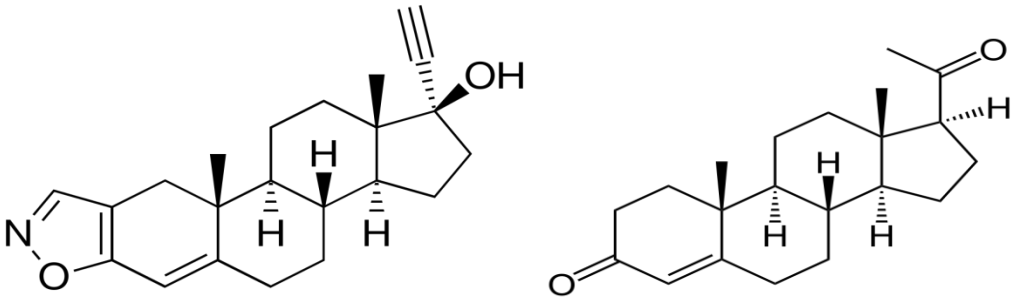
Даназолдың 3мкМ концентрациясының клетка циклына әсерін қарап, өзге концентрациялармен салыстырғанда фазаның ауысуы байқалады. Бұл өзгерістерді даназол препаратының клетка циклына әсерін зерттеу барысындағы нәтижелердің 10мкМ концентрациясынан бақыласақ, клетка пролиферациясының тежелуі айқын көрінеді.Ал 30мкМданазол концентрациясы берілген тәжірибелік зерттеулер нәтижесінде клетка өсуін айтарлықтай баяулатқанын көреміз (сурет10).



Мұндағы абцисса клеткалар санын, ордината Даназол концентрацияларының әсерін көрсетеді

Сурет 10- Даназол концентрацияларының Mcf10A клеткалары циклына әсері.Цитометриялық көрсеткіштер бойынша 72 сағаттан соң даназолдың клетка циклына әсері

Әдебиеттерге шолу барысында $C_{21}H_{30}O_2$ химиялық формуламен сипатталатын прогестеронның $C_{22}H_{27}NO_2$ химиялық құрылымдағы даназолмен ұқсастығы бізге даназолмен қатар прогестеронның әсерін салыстырмалы бақылауды байқауға ой салды (сурет11).Өйткені екеуі де стероидты табиғатқа ие болып келеді. Сонымен қатар профессор Price жетекшілігімен жүргізілген зерттеулердің негізінде Вестерн блот талдамасымен митохондрияны фракциялаудан кейін прогестерон рецепторларының митохондрияның сыртқы мембранасында орналасатынын анықтаған [148,p. 55; 149,c. 35].



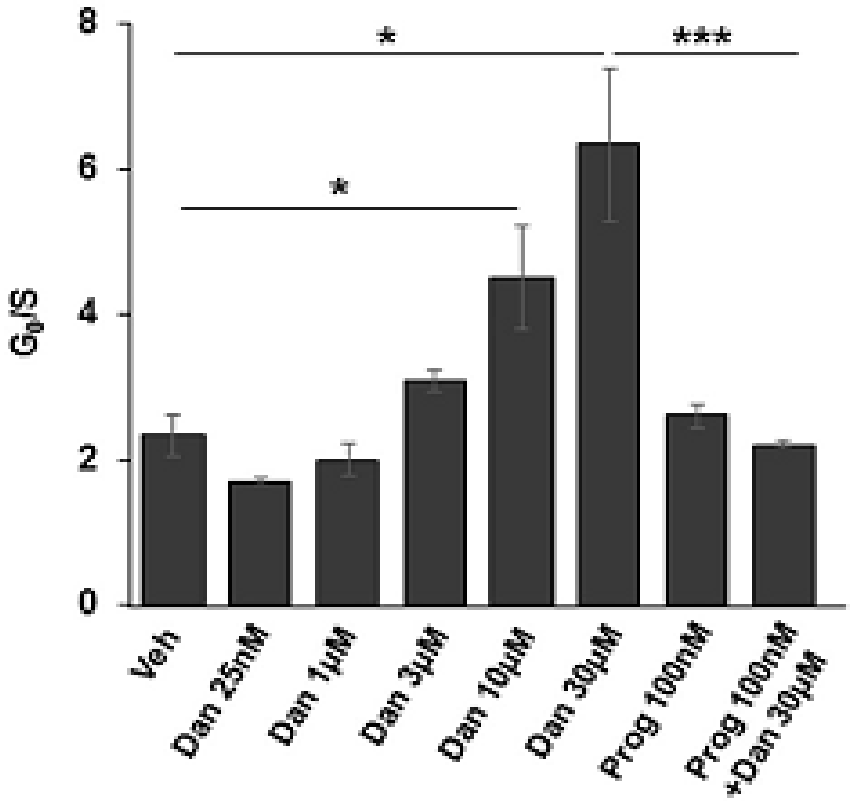
Даназол Прогестерон

Сурет 11- Даназолмен прогестеронның химиялық құрылымы

Зерттеу жұмыстарымызда даназолмен қатар прогестеронның да концентрацияларын салыстыра зерттеуіміздің өзіндік себептері бар. Мұндай салыстырмалы түрде тәжірибе жасауымызға Mcf10A клеткаларының тотығу-фосфорлану механизмін зерттеу барысында келдік. Химиялық құрылымы жағынан бензолды қос байланысы тағы да басқа химиялық құрылымына қарай прогестерон даназолмен ұқсас болып келеді. Олданазолдың стероидты препарат болғандықтан. Ал прогестерон иньекцияға арналған майлы құрамы сыртқы сипаттамасына сәйкес 1%, 2,5% ерітінді 1 мл-ден тұрады. 1 мл ерітіндінің құрамында: белсенді зат-10 мг немесе 25 мг прогестерон, қосымша заттар*:* 0,2 мл бензилбензоат, 1 мл дейін рафинадталған зәйтүн майынан тұрады. Ашық-сары түстен алтын-сары түске дейінгі мөлдір майлы сұйықтық.

Фармакотерапиялық тобына қарасақ жыныстық гормондар және жыныс жүйесі модуляторлары болып табылады. Фармакологиялық сипатына сәйкес тері астына және бұлшықет ішіне енгізуден кейін жылдам әрі толық дерлік сіңеді. Бауырда глюкурон мен күкірт қышқылдары конъюгаттарын түзу арқылы метаболизденеді. Метаболизмде сондай-ақ CYP2C19 изоферменті қатысады. Прогестерон өзгеруінде негізгі өнім биологиялық белсенді прегнандиол болып табылады. Прегнандиол глюкурон қышқылымен конъюгациядан кейін бауырдан қанға, содан соң-несепке түседі. Альдостеронның әсерін тежейді, бұл несеппен натрий және хлордың секрециясының күшеюіне әкеледі. Катаболизмдік және иммунодепрессиялық әсер етеді.Сүт бездері ацинустарының сөлінің бөлігінің өсуін белсенді етеді және лактацияны индукциялайды. Қалыпты эндометрия дамуына ықпал етеді[150].

Прогестронның 100нМ физиологиялық концентрациясы клетка циклының жалғасын тоқтата алмады. Клетка пролиферациясының тежелуіне алып келген даназолдың жоғары концентрациясы прогестеронмен қосынды түрде бақылаған кезде клетка өсуін тежей алмады (сурет12).



Мұндағы абсцисса сызығы G_0/S , ордината даназол мен прогестернның концентрациялық мөлшерін көрсетеді. Статистикалық айырмашылық (*p≤0,05 және *** p≤0,0001)

Сурет 12- Даназол концентрацияларыныңMcf10Аклеткалары циклына әсері.Даназол және прогестеронның әртүрлі концентрацияларының әсерін салыстырмалы бақылау

Зерттеулерімізде бақылау бойынша қарасақ G_0/S фазаларында даназолдың 25 нМ концентрациясы деңгейі 1,7 мөлшерін, ал даназолдың кезекті концентрациялары 1мкМ да 2,1,3 мкМ 3,8 шамасын да клетка циклын тежегенін көреміз (*p≤ 0,05 және *** p≤ 0,0001).

Даназолдың жоғары концентрацияларының бірі болып, тәжірибенің негізгі көрсеткіштік мәліметтеріне сипаттам берсек, 10мкМ концентрациясы 5, ал 30мкМ концентрацияда клетка циклының тежелу фазалары 6,9 (*p≤0,05 және *** p≤0,0001) шамасын көрсетіп отыр.Осы зерттеу тәжірибелерінде салыстырмалы үшін алынған прогестеронның 100нМ концентрациясы клетканың циклын тоқтатпады және даназолдың 30 мкМ концентрациясымен қосылып тексерілген прогестеронның 100нМ мөлшерінің де клетка циклын тоқтатпағанын көреміз.Сонымен, даназол препаратының әртүрлі концентрацияларының клетка пролиферациясына әсерін зерттеу мақсатында жүргізілген жұмыстарымыздың қорытындысында даназолдың басқа концентрациялармен және стероидты табиғатқа ие, химиялық құрылымы жағынан да ұқсас прогестеронмен салыстыра отырып бақылаудаданазолдың 30 мкМ концентрациясы клетка циклының даму кезеңдерінің G_0/S фазасында

тежеуі фиброзды-кистозды мастопатия сырқатына қарсы қолданыстағы негізгі гипотезаларды растайды.

3.3 Mcf10Aсүт безі клеткаларының тотығу-фосфорлану механизміне даназолдың әсері

3.3.1 Митохондрияның мембрана потенциалына әсерін бақылау

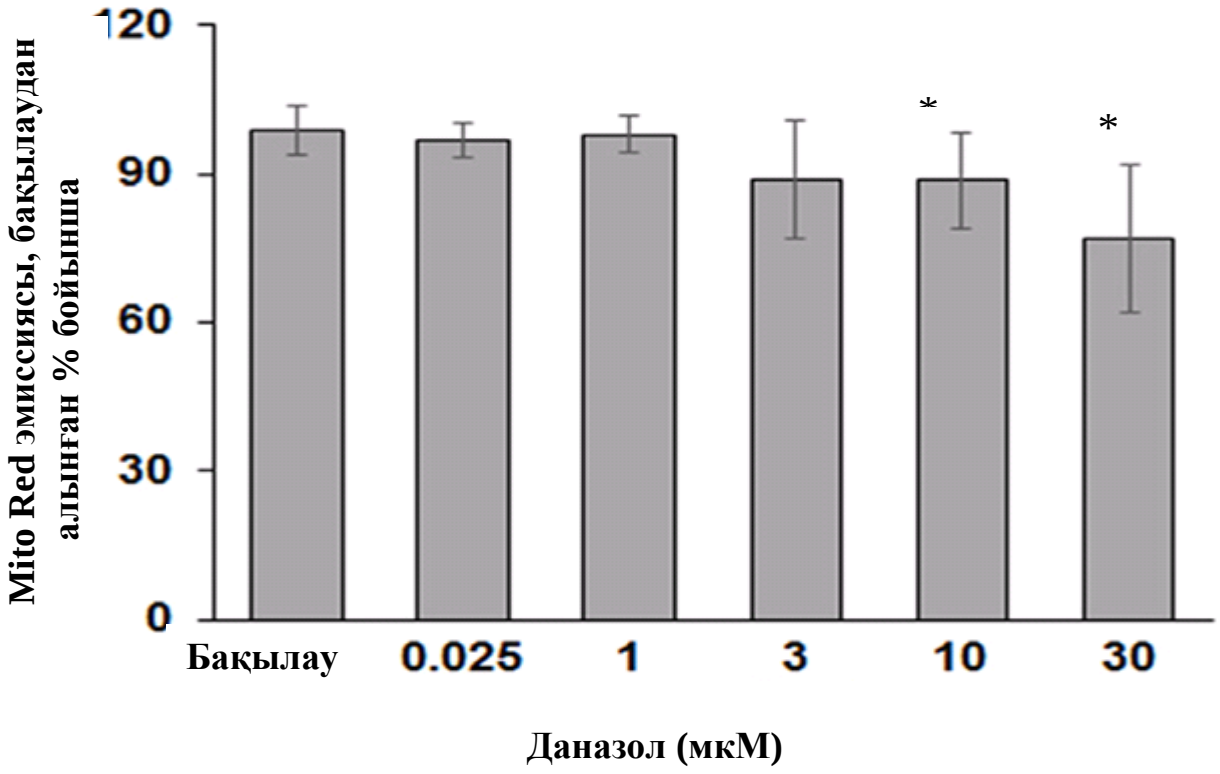
Бұл зерттеу жұмыстарында даназолдың концентрацияларының клетка гомеостазындағы өзгерістерде митохондриялардың рөлін анықтау басты мәселе ретінде қарастырылды. Ал митохондрия бұл клеткалардың энергия қажеттілігіне орай АҮФ қышқылын синтездеу, сигнал беру және стресс жағдайларына жауап ретінде оттегінің белсенді түрлерін (ОБТ) өндіретін негізгі қайнар көзі болып табылатыны белгілі.

Тотығу-фосфорлану механизмі метаболизмдік алмасу барысындағы маңызды орындалатын үдерістердің бірі. Қоректік заттардың тотығуы нәтижесінде клетка митохондриясында энергия қоры түзіледі. Барлық процестердегі АҮФ қосылысы әмбебап болып табылғанымен, фосфорлану нәтижесінде түзілген энергия арнайы метаболизмдік үдерістерге ғана қолданылады[151].

Тотығу-фосфорлану метаболизмдік жолы барысында донор байланыстардан акцептор байланыстарға электрондардың тасымалдануы жүреді. Осы реакциялар барысында энергия түзіліп АҮФ түрінде сақталатынын жақсы білеміз.Біздің зерттеу жұмыстарымыздағы негізгі мақсаттарымыздың бірі осы энергия қоры болып саналатын клетка митохондриясының энергетикалық метаболизмі барысындағы мәліметтерді қарастыру болып табылады. Өйткені, эукариот клеткаларда осы тотығу-тотықсыздану реакциялары митохондрия мембранасындағы орналасқан бірнеше белоктық комплекстермен жүзеге асады,ал прокариот клеткаларда бұл үдерістер клетканың мембранасы сыртында орналасады. Бұл белоктардың байланысқан жиынтығы электрон тасымалдаушы тізбекті құрайды. Бұл электрон тасымалдаушы тізбек құрамына кіретін бес түрлі белокты кешен негізінде прокариот клеткалардағыдай әртүрлі донор және акцептор электрондармен жұмыс жасайды. Тотығу-фосфорлану ішкі митохондриялық мембрананың тұтастығы бұзылмаған жағдайда ғана жүруі мүмкін, яғни егер бұл мембрана толық жабық түзіліс болған жағдайда орындалады.

Клеткалардағы митохондриялық мембрана потенциалы ($\Delta\Psi m$) флуоресцентті бояу Mito Red(75нМ) таңбалау арқылы анықталды.Оң бақылау ретінде клетка мембранасының толық деполяризациясына әкелетін және митохондрияның тотыға фосфорлануын ажырататын 2мкМ карбонилцианид 4-(трифторметоксин) фенилгидразонның(FCCP) дозасымен өңделген үлгі қолданылды.

13 суреттенMcf10A сүт безі клеткаларына даназолдың әртүрлі концентрацияларымен әсер еткен кездегі тотығу-фосфорлану процестерінің мәліметтерін көреміз.



Абсцисс өсі: даназол концентрациясы, мкМ; ординат өсі: Mito Red эмиссиясы, %.
Статистикалық айырмашылық (*p≤0,05)
Митохондрияның мембрана потенциалын анықтау(Статистикалық айырмашылық * p <0,05)

Сурет 13-Mcf10A клеткаларының тотығу-фосфорлану механизміне даназол концентрацияларының әсері

Жалпы клетканың тыныс алуын бақылау барысындағы талдамаларымыздаданазолдың 30 мкм концентрациясы митохондрияның мембраналық потенциалын басқа да концентрацияларға қарағанда 77% -ға дейін азайтқанын немесе төмендеткенін көріп отырмыз.

Митохондрия мембранасының электрондардың тасымалдануы барысында тыныс тізбегінің әрбір кешені тотыққан бос энергияны протондарға қарай мембрана арқылы жылжытады. Бұл өз кезегінде мембрана аралық потенциалдың айырмашылығына әкеледі[151, б. 35].

Mcf10A клеткаларының тотығу-фосфорлану механизміне әсерін бақылау нәтижелеріне қарасақ, 90% көрсеткіштермен нәтиже берсе, даназолдың 0,025 мкМ концентрациясында 93%, ал 1% (*p≤0,05) даназолдың мөлшері 90% нәтиже беріп отыр. Бақылау ретінде алынған клеткалар менданазолдың 0,025 мкМ және 1мкМ концентрациялары арасында айырмашылық 2-3%-да (*p≤0,05) ғана құрап тұр. Бұл дегеніміз даназолодың төмен концентрацияларының әсерінің бақылау клеткаларымен бірдей шамада екенін аңғартқандай. Ал, даназолдың келесі концентрациясы 3мкМ мөлшерінің нәтижелерінде 87% (*p≤0,05)деңгейін көрсетті.Даназол концентрацияларының митохондрия мембраналық потенциалына әсерін зерттеуде жүргізілген тәжірибелеріміздің қорытындыларын сипаттауды жалғасытра отырып даназолдың

10мкМконцентрациясында көрсеткіштері 90% болса, даназолдың ең жоғарғы концентрациясы 30мкМ мөлшерінің митохондрияның мембрана потенциалына әсерін зерттеген тәжірибелерімізде аталған концентрация жоғарыда айтып өткеніміздей 77% төмендетіп отыр.Сонымен, Mcf10A клеткаларының мембраналық потенциалының өзгерісіне даназолдың әртүрлі концентрацияларының әсерін бақылауға бағытталған зерттеу жұмыстарымыздың нәтижесінде мембраналық потенциалды даназолдың 30мкМ концентрациясының төмендетуі клеткаларға күшті әсер етуінің көрінісі болып табылады.

3.3.2 Mcf10A сүт безі клеткаларының тыныс алу қабілетін уақытқа байланысты зерттеу

Электрондардың тасымалдану инстенсивтілігіне тыныс алуды шектеуші әсерлердің табиғатына және тасымалдағыштардың тотықсыздану деңгейіне қатысты митохондриялардың бес метаболизімдік жағдайларын бөліп қарайды.

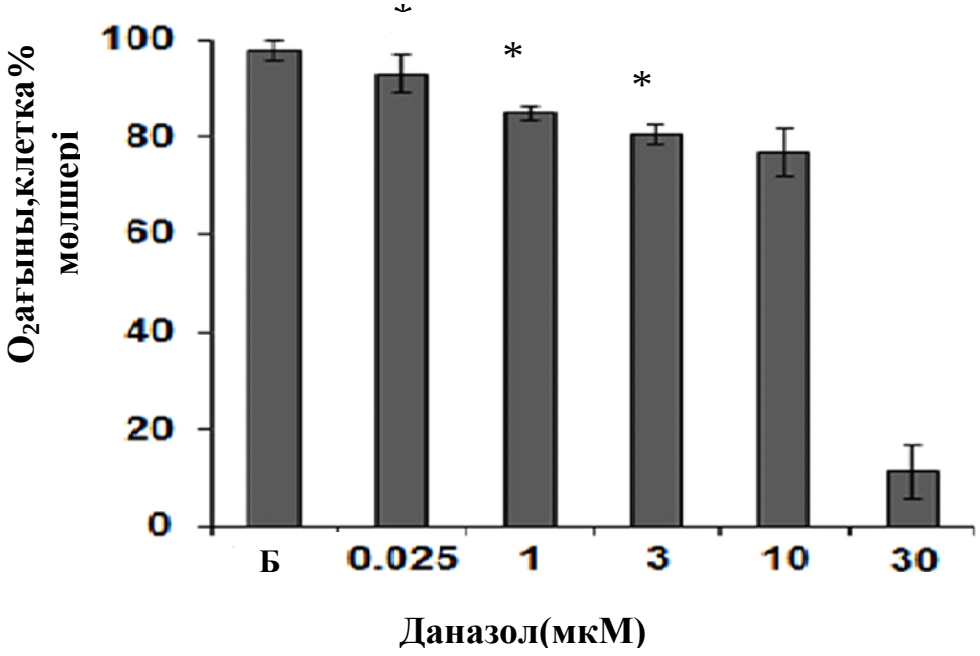
Эндогенді тыныс алу-тотығу субстарттары мен АДФ-фосфат акцепторлары болмаған кезде байқалады. Субстартты жағдайы-тотығу субстарттарының болуымен, бірақ АДФ болмауымен сипатталады. Белсенді фосфорлаушы (энергизацияланған) жағдай тотығу субстраттары мен АДФ болған жағдайда көрінеді, яғни митохондриялардың тыныс алу белсенді жағдай деп қарастырылады. Бұл жағдайда тыныс алу қарқындылығы митохондрияларға субстраттардың тотығу АДФ-тің фосфорланумен қатар жүреді. Фосфорланбайтын жағдай-қосылған АДФ таусылуымен болатын тыныс алуының бәсеңдеуімен сипатталады. Сонымен қатар бұл кезде митохондриялардың оттегіні тұтынуы ішкі мембрана арқылы протондардың ағып кетуімен және электрон тасымалдануының фосфорланбайтын жолының қызмет етуіне байланысты. Анаэробты жағдай, яғни электродтың ұяшығында оттегі қоры біткен жағдайда дамиды [146,с. 30-31].

Митохондрияның мембраналық потенциалының төмендеуі оның көптеген қызметіне, соның ішінде тотыға фосфорлануға да әсер етендігі болып табылады.Бұл процесс респирометрлік зерттеулерде көрсетілген(сурет14).

Бұл жұмыстың негізгі міндеттерінің бірі даназолдың әртүрлі концентрацияларының әсерінен клетканың зақымдану механизмдерінде оның энергетикалық механизмі мен митохондриялық оттегінің белсенді түрлерінің түзілу процесіне де мән берілді.

14 суретте клетканың оттегін тұтынуына қабілетінің көрсеткіштері бейнеленген.Бірінші бағанада бақылау клеткаларының нәтижелерін көрсетілген.Клеткаларының эндогенді тыныс алу белсенділігін бағалау барысында бақылау клеткаларының тыныс алу қарқыны 100% ($*p \leq 0,05$) көрсетіп отыр. Ал, даназолдың 0,025 мкМ концентрациялары қосылғаннан кейінгі тыныс алу белсенділігі 97% ды ($*p \leq 0,05$) құрап отыр. Даназолдың ең төменгі концентрациясының көрсеткіші мен бақылаудың айырмашылығы айтарлықтай ерекшеленбейді.Ал даназолдың келесі концентрациясы 1 мкМ мөлшерінің нәтижелерін қарасақ, Mcf10A клеткаларының тотығу-фосфорлану

механизмдерінің бірі эндогенді тыныс алу белсенділігін бағалау нәтижелері бойынша осы көрсеткіштерден 90%-ды көрсетті. Ал даназолдың 3мкМ концентрациясындағы нәтижелер 80% (*p≤0,05) болды. Тыныс белсенділігін зерттеуге арналған зерттеулеріміздің келесі нәтижелерін даназолдың 10 мкМ концентрациясын қосқаннан кейін бақылағанымызда 78% , ал 30 мкМ концентрация мөлшері тыныс алу тізбегін бірден 10% (*p ≤ 0,05) төмендетіп жіберді. Бірақ та митохондриялық мембраналық потенциалдың төмендеуі клеткалардың оттегін қабылдауын 5,9 ± 6,4 пмоль O_2 / сек/ 10^6 , ал бақылаумен салыстырғанда 26,9 ± 2,1 пмоль O_2 /сек/10^6 төмендетті.



Сурет 14-Даназолдың клеткадағы оттегі тұтынуына әсері.Статистикалық айырмашылық(*p≤0,05)

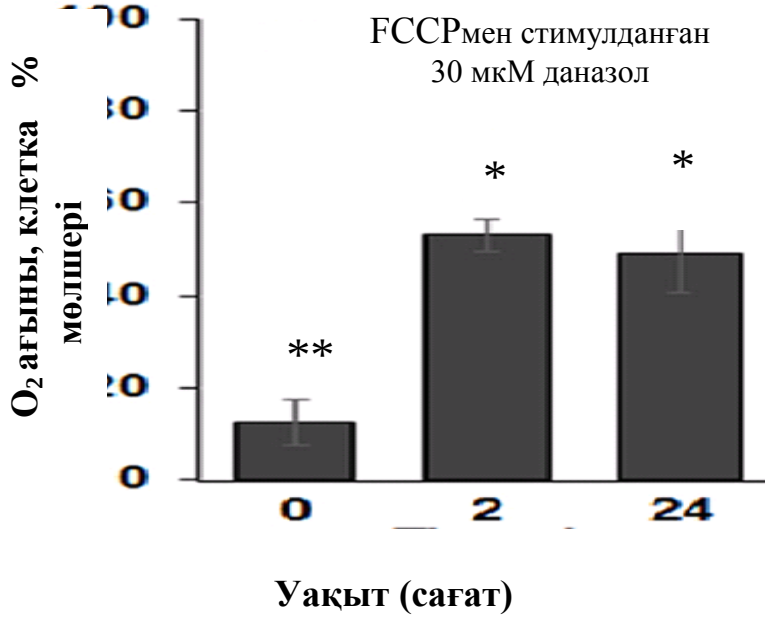
Зерттеу жұмыстарымыздаMcf10A сүт безі клеткаларының тыныс алу мүмкіндіктерін уақытқа байланысты бақыладық.Жұмыс барысында максималды тыныс алу қабілетін бағалау үшін, біріншіден клеткалар электрондардың тасымалдауын болдырмау үшін олигомицинмен тежелді, олигомицин (бөлшектеуші) болып есептеледі. Өйткені олигомицин электрохимиялық протонды градиентті қатты төмендете отырып, тежейді. Жалпы бөлшектеушілердің өзі тыныс алу тізбегі мен фосфорлану үдерісінде тотығу үдерістерінің жүйесін жояды. Ал содан кейін клеткалар ең жоғары оттегі тұтыну қарқынына жету үшін FCCP протонофор мөлшерін ұлғайту арқылы тыныс алу тежелгенге дейін титрленеді.Ионофор ретінде FCCP алынды. FCCPөз кезегінде тотығу фосфорлану үдерістерінде энергияны қамтамсыз ету үшін АҮФ синтезін бұзып, митохондрий мембраналары арқылы сутегі иондарын тасымалдаушы болып есептеледі.

Mcf10A сүт безі клеткаларының тағы бір ерекшелігі оттегінің концентрациясы төмендесе де клетка тыныс алуын жалғастыра береді. Мұны 4-комплекстегі «цитохромоксидаза» қызметімен түсіндіруге болады.

Цитохромоксидаза - электрондарды оттегіне қарай тасымалдайтын фермент. Яғни, Mcf10A сүт безі клеткаларының тыныс алуы оттегіне тәуелді ферменттерге тікелей байланысты. Даназолдың әр түрлі концентрациясын,яғни төменгі және жоғарғы мөлшерімен жасалынған тәжірибеде препараттың клетканың тыныс алуын төмендеткенін көреміз. Протонофор ретінде алынған FCCP -дің де әсерін байқай алмай отырмыз. Бұл дегеніміз даназолдың клетка тыныс алуы тізбегінің белгілі бір комплексіне әсер етіп тұрғанын көрсетеді.

Жалпы FCCPмен стимуляция жасау клетка ішілік Ca_2^+ концентрациясының жоғарылауын тудырып, белоктар синтезделуінің жылдамдығын арттыратын күшті ингибитор болып табылады[152]. Сонымен бірге КЦТФФ ингибиторы әсерінен клеткадағы тотығу-фосфорлану қабілетін арттырады және оттегінің белсенді түрлері мен АУФ деңгейін айтарлықтай төмендетеді.Зерттеулерімізде 2 және 24 сағат уақыт өткеннен кейінгі Mcf10A клеткаларының тыныс алу қабілетінің даназол концентрацияларына әсерін бақыладық.Зерттеулеріміздегі нәтижелер бойынша даназолдың 30мкМ концентрациясын бірден қосқан кездегі нәтижеде тыныс алу мөлшері 17%-ды көрсетті. Даназолдың осы концентрациясының клеткаларға енгізілгеннен кейінгі 2 сағаттан өткен уақыттағы бақылаған нәтижелерінде FCCP мен ингибирлегеннен соң тыныс алу қабілетінің 53%-ға жоғарылағанын бақыладық.

Даназолдың 30мкМ концентрациясына жүргізілген тыныс алу қабілетін ионофор FCCP-мен ингибирлей отырып жүргізген зерттеулерімізде 24 сағаттан соң тыныс алу қабілетінің 49% мөлшерде тұрғанын көреміз(сурет15).



Сурет 15- Mcf10A клеткаларының тотығу-фосфорлану механизміне даназол концентрацияларының әсері.Даназолды уақытқа байланысты қосқандағы клетканың тыныс алуының максималды мүмкіндіктері. Статистикалық айырмашылық (*p≤ 0,05)

Зерттеу нәтижелерінен анықтағанымыз тыныс алу жиілігінің төмендеуіне даназолдың тікелей митохондрияға әсері барын көрсетеді.

Сонымен,осы зерттеулерде даназолдың әртүрлі концентрацияларына және уақытқа байланысты клетканың тыныс алу мүмкіндіктерін бағалау қызықты болды.Мысалы 0,0025мкМ мөлшерлі даназолдың бақылаумен салыстырғандағы айырмашылықтары айтарлықтай айқын болмағанымен, ең жоғарғы мөлшердегі (30мкМ) концентрацияда тыныс алудың бірден төмендеп кетуі, ал ионофор ретінде алынған 2мкМ КЦТФФ қосқанда 24 сағат өткенде клетка тыныс алуының қалпына келе бастауы митохрндрияның кальций секрециялық белсенділігін мембраналық потенциал арқылы белсендіретін цитозольдық кальций мөлшерінің жаппай жоғарылауы сияқты бірнеше процестерге байланысты болуы мүмкін және даназолдың клеткаішілік нысандарының бірі тыныс алу тізбегінің I кешені болып табылады деп қорытындылаймыз.

3.3.3Даназолдың 30мкМ концентрациясын Mcf10A клеткаларына пермеабилизацияәдістерімен зерттеу

Клетка ішілік белоктарды және нуклеин қышқылдарына талдама жасауда клетка мембранасының өткізгіштігінің қабілетін жақсарту үшін,арнайы заттармен пермебилизация әдісін жасайды. Пермеабилизация-дегеніміз клеткаларды клетканың мембараналарының өткізгіштігін жақсарту мақсатында олардың тіршілік әрекеті мен метаболизмдік белсенділігін төмендетпей-ақ химиялық реагенттермен өңдеу. Пермебилизацияға арналған реагенттер екі түрге бөлінеді.Органикалық еріткіштер (метанол, этанол, ацетон). Олар мембарананы майларды еріте отырып және белоктарды каогуляциялық қабілетке келтіре отырып пермебизилизация жасайды[153].Ал екіншісі детергенттер яғни, клетка мембранасын-*сапонин* (*saponin*), Trition-X-100, Tween-20 тағы басқалар арқылы тесіктер жасау арқылы қолданылады.

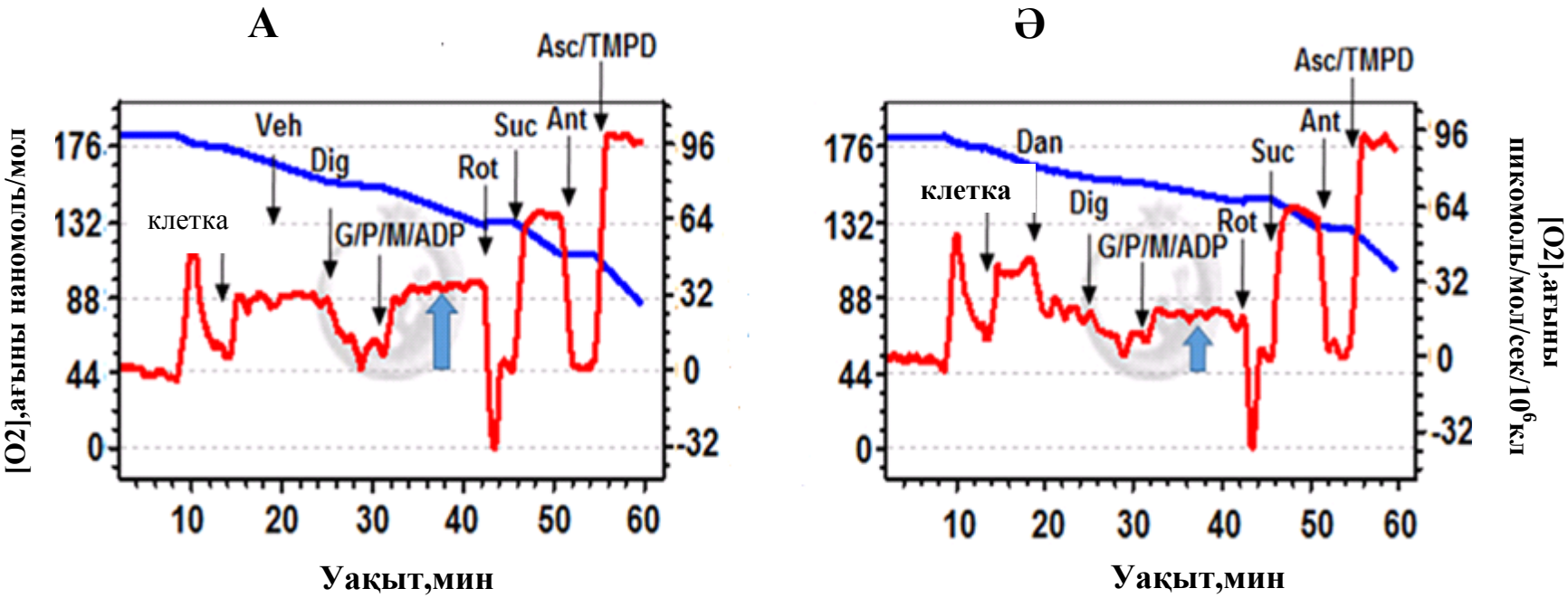
Зерттеу жұмыстарымызда Mcf10A сүт безі клеткаларының тыныс алу деңгейін OROBOROS Oxygraph-2K (Инсбрук, Австрия) құрылғысында 37°C температурада бақылау және даназол концентрацияларын қолдана отырып зерттедік. Зерттеулер барысында тәжірибе үшін өсірілген клеткаларды трипсинизация және центрифугалау тәсілдері арқылы ерітіп, тұндырып, жинап алғаннан соң даназолдың 25 нМ, 1 мкМ, 3мкМ, 10мкМ және 30мкМ концентрацияларын қолдана отырып жүргізілді. Тыныс алу жиілігі секундына миллион клетка деңгейінде алынды. Тыныс алу ферменттерінің жекелей белсенділігінің тізбектегі көрсеткіштерін бақылау мақсатында пермебилизация тәсілдері қолданылды. Тәжірибе жұмысындағы орындалған пермеабилизация тәсілдері жұмыс хаттамасында көрсетілген нормада орындалды. Тыныс ферменттерінің белсенділігін анықтауға 10 мМ глутамат, 10 мМ пируват және 2 мМ малат, 1 мг/мл ротенон, 10 мМ сукцинат, 2,5 мМ антимицинжәне 1 мМ аскорбат/0,3 мМ TMPD (тетраметилфенилендиамин) қолданылды.

Зерттеу жұмыстарында тәжірибе жасаған клетка линиясы бойынша зерттеу нәтижелерінің негізгі кезеңдерінің бірі клетканың тыныс алу деңгейін

анықтауға арналған болатын. Тыныс ферменттерінің белсенділігін бақылау мақсатында қолданылған дигитонин органикалық зат глюкозид болып табылады. Оның агликоны болып спиростан туындылары агликон жатады. Зерттеу жұмыстарымызда дигитонинді детергент ретінде қолдандық(сурет16).

Дигитонин, сукцинат,глутамат, малат және ротенонмен ынталандырылған тыныс алу арасындағы айырмашылықтар митохондрияның мөлшеріне, тыныс алу ферменттерінің санына және олардыңтөменгі тотығу белсенділігі айқын көрінетін респирометриялық талдамаларда айқын көрінді.

Қарастырылған тәжірибелерде II кешенге тәуелді тыныс алудың максималды белсенділігін бағалау үшін сукцинатпен титрленген болатын.

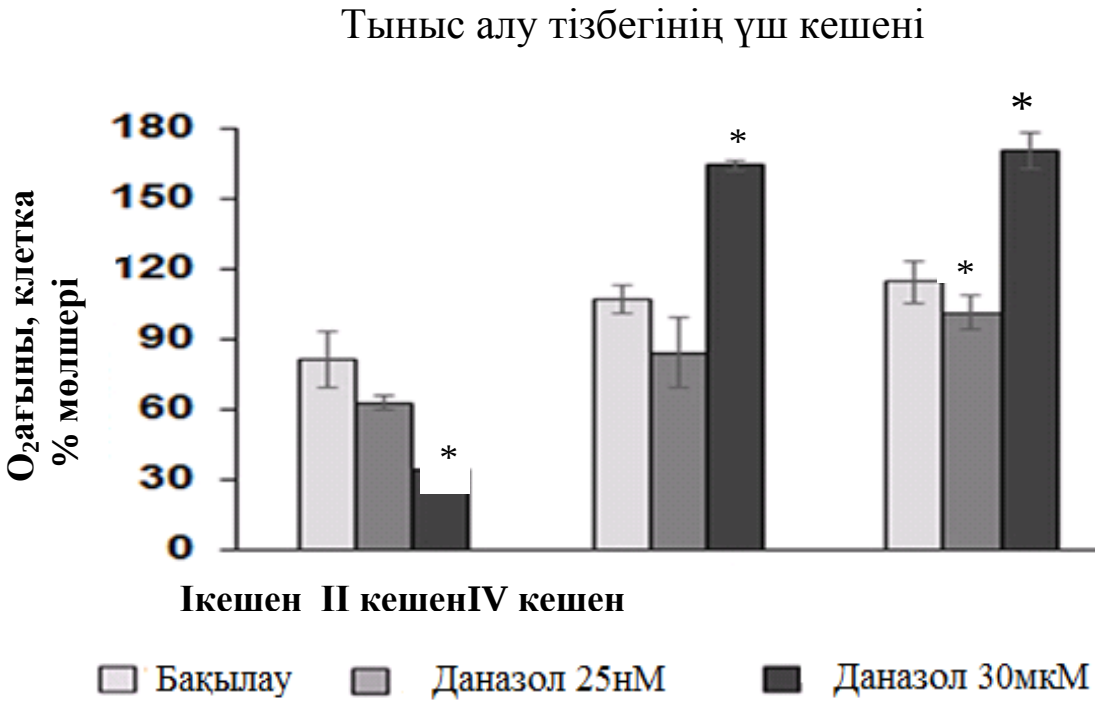


Мұндағы, абцисса сызығы оттегінің нМоль/мл концентрациясын көрсетсе, ордината сызығы уақыт айырмашылығын білдіреді. Қысқартылған мәліметтер тыныс кешенінің субстарттар. (Com I, NADH dehydrogenase) 10 mM Glutamate, 10 mMPyruvate and 2 mM Malate (G/P/M), inhibitor of Complex I 1 mg/ml Rotenone (Rot), substrate of Complex II (Com II, succinate dehydrogenase) 10 mM Succinate (Suc), inhibitor ofComplex II 2.5 mM Antimycin A (Ant), and substrate of Complex IV (Com IV, cytochrome c oxidase) 1 mM Ascorbate with 0.3 mM TMPD (Asc/TMPD).Жуан сызықтар 1 кешеннің тыныс алу белсенділігінің айырмашылығын көрсетеді

Сурет 16-Даназолдың 30мкМ концентрациясының Mcf10A клеткаларының тотығу-фосфорлану механизміне әсері. Дигитонин иен пермеабилизация жасағаннан кейінгі оксиграфиялық жазбалар(а). Даназолдың 30мкМ концентрациясын қосқаннан кейінгі оксиграфиялық жазбалар(ә)

Дигитонин көмегімен клетка мембранасының өткізгіштігін өзгерткеннен кейін глутамат(глутамин қышқылы),пируват және малат(алма қышқылы) қатысында клеткалардың тыныс алу қарқынында айтарлықтай айырмашылықтр байқалмады. Дегенмен де зақымдалған митохондриялық мембрана дигитонинмен тесілген клеткалар шегінде сақталады. Өйткеніэкзогенді сукцинат қатысында клеткалар ұзақ уақыт бойы жоғары жылдамдықпен тыныс алуын жалғастырады. Бірақ көп ұзамай тыныс алу қарқыны клеткаішілік ортаның бұзылуының нәтижесінде төмендеді. 16 суреттегі көрініске орай, I кешен ингибиторы ротеномен (1мг/мл) және сукцинат арқылы өңделді.Жоғарыдағы суреттегі нәтижелерге сәйкес даназолдың 30мкМ концентрациясының Mcf10A клеткаларының тотығу-фосфорлану механизміне әсерін бақылауда дигитонинмен пермеабилизация жасағаннан кейінгі оксиграфиялық жазбаларға қарасақ (а), бақылаумен салыстырғанда даназолдың 30мкМ концентрацияларын қосқаннан кейін 10 минут аралығынада 120%мөлшерде жоғарылағанын байқаймыз. Уақыт аралығына сәйкес 10 минут өткеннен кейінгі нәтижелерде дигитонин қосқаннан кейін тыныс алу деңгейінің 45%-ға (*p≤ 0,05) дейін төмендегенін көреміз.

Нәтижелерді тыныс алу тізбегі кешенінің әрқайсысына сай субстраттарын қосқан кезде тыныс алу деңгейінің жоғарылауы 2,5мМ антимицин қосқаннан кейін 130%-ға (*p≤ 0,05), 0,3мМ аскорбат қосқаннан кейін 176% (*p ≤ 0,05) жоғарылағанын көреміз(сурет17).



Сурет 17 - Даназолдың 30мкМ концентрациясының Mcf10A клеткаларының тотығу-фосфорлану механизміне әсері. Клетканың тыныс алу тізбегіне тыныс ферменттерінің электрондарды максималды тасымалдау мүмкіндігі. Статистикалық айырмашылық(*p≤ 0,05)

Тыныс алу тізбегінің әр кешенінің даназолдың концентрацияларына қарай электрондарды тасымалдау ерекшелігі көрсетілген суретте бақылау нәтижелеріне қарасақ, тыныс тізбегінің бірінші кешенінде 80%(*p ≤ 0,05 және), екінші кешендегі көрсеткіштері 110% (*p≤0,05) болса, төртінші кешенде 170%-ды көрсетеді.

Зерттеулеріміздегі тыныс алу тізбегінің әр кешеніндегі қорытындыларына сәйкес нәтижелерде даназолдың 25нМ концентрациясында бірінші кешенде 70%(* p≤ 0,05) болса, екінші кешенде даназолдың 25нМ концентрациясы 90% (*p≤0,05), ал төртінші кешен қорытындысы бойынша 110%-ды (*p≤0,05) нәтижені көрсетіп отыр.

Даназолдың ең жоғарғы концентрациясы болып табылатын 30 мкМ концентрациясының нәтижелері тыныс алу тізбегінің кешендері нәтижесінде бірінші кешендегі әсері төмен нәтижелер беріп отыр. Яғни, тыныс алу 45%(*p≤0,05), тыныс алу тізбегінің екінші кешені бойынша жоғары көрсеткіш170%, дәл сол сияқты тыныс алу тізбегінің төртінші кешенінің нәтижелері де 178%(*p ≤ 0,05) көрсетіп отыр.

Зерттеу нәтижелеріне қарап отырсақ, даназолдың клетка митохондриясына тікелей әсерін бақылаймыз. Даназолдың 30мкМ концентрациясы өте жоғары мөлшері ингибитор екенін зерттеулерімізде көз жеткіздік. Даназол концентрацияларының мөлшерінің азаюы немесе көбеюі кезіндегі клетканың тыныс алу деңгейінде айтарлықтай өзгерістер байқалады. Дегенмен, бұл әсерлер уақытша ғана құбылыс болып табылады. Өйткені, 2 сағат уақыт өткеннен кейін клеткалардың тыныс алу мөлшері 53%-ды көрсетсе, 24 сағаттан кейін бақылаумен салыстырғанда 49% (*p ≤ 0,05) көрсетіп отыр.

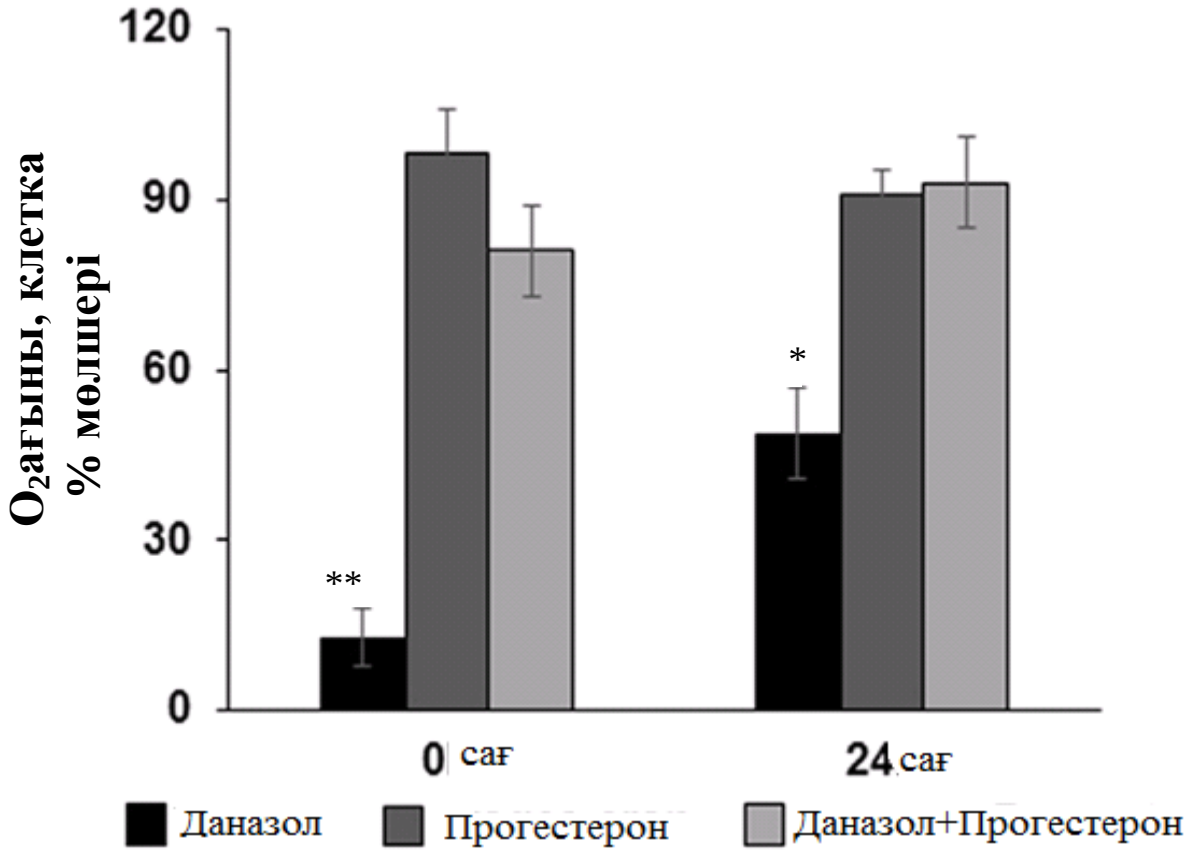
Сонымен, бұл мәліметтерден қорытындылағанымыз, даназолдың клетка құрылымындағы тікелей әсер ететін нысанасы митохондрияның тыныс алу тізбегінің II,III және IV тізбектеріндегі оттегі қабылдауы жоғарылаған сайын төмендеп отырған I кешені болуы мүмкін деп тұжырымдаймыз.

3.3.4Mcf10A клеткаларының тыныс алу мүмкіндіктерін уақытқа байланысты прогестерон қосындысымен зерттеу

Mcf10A клеткаларының тыныс алу мүмкіндіктерін уақытқа байланысты зерттеу барысында даназолдың 30мМ концентрациясы, прогестеронның 100нМ және даназолдың 30мМ мен прогестеронның 100 нМ концентрациясының қосындысымен уақытқа қарай бақылағанымызда төмендегідей нәтижелерге қол жеткіздік.

Зерттеулерімізде даназолдың 30 мкМ концентрациясын бірден қосқан кезде клетканың тыныс алу деңгейі 10%-ды құрайды(*p≤ 0,05 және **p ≤0,005).Ал прогестеронның 100нМ концентрациясын беріден қосқаннан кейінгі клетканың тыныс алу деңгейінің 99%-ға жеткенін көреміз. Тура сондай, даназолдың 30мкМ және прогестеронның 100нМ концентрациясын бірден енгізгеннен кейінгі нәтижені қарасақ, 80% (*p ≤ 0,05 және **p ≤0,005) болғанын байқалады.

Ал дәл осы концентрацияларды 24 сағат өткеннен кейін мынандай нәтижелер алдық(сурет18).



Сурет 18-Mcf10A клеткаларының тыныс алу қабілетіне 30мкМданазол мен 100нМпрогестеронның және даназолмен прогестеронның қосындысымен 24 сағаттан өткен соң,FCCP мен стимулдағаннан кейінгі қосынды әсері
Статистикалық айырмашылық(* $p \leq 0,05$ және *** $p \leq 0,005$)

Mcf10A клеткаларының тыныс алу мүмкіндіктерін уақытқа байланысты прогестерон қосындысымен зерттеу барысында даназолдың 30мкМ концентрациясы бір тәуліктен кейін 48%-ға, прогестеронның 100нМ концентрациясының бір тәуліктен кейінгі нәтижесі 90%, ал даназол мен прогестеронның қосындыларының 24 сағаттан кейінгі нәтижесі 92%(* $p \leq 0,05$ және*** $p \leq 0,005$) болды.

Сонымен, Mcf10A клеткаларының тыныс алу қабілетіне 30мкМ даназол мен 100нМ прогестеронның және даназолмен прогестеронның қосындысымен 24 сағаттан өткен соң, FCCP мен стимулдағаннан кейінгі қосынды әсерін бақылаған зерттеулерімізде прогестеронның 100 нМ концентрациясы бірден қосылғаннан кейіннен және 24 сағат өткеннен кейінгі нәтижені салыстырсақ, айтарлықтай айырмашылық көрмейміз. Ал даназолдың 30 мкМ концентрациясынан кейінгі нәтижесімен салыстырғанымызда клеткалардың тыныс алу деңгейі прогестеронның қосындысынан кейін жоғары деңгейді көрсетеді.

Ал прогестеронның 100нМ концентрациясы мен даназолдың 30 мкМ концентрациясы (*p≤0,05 және ***p ≤0,005)қосындыларынның нәтижелерінде шамамен біркелкілік мөлшерді көрсетеді.

Басқа да ғалымдардың зерттеулерінде келтірілгендей, даназолдың сүт безінің фиброзды-кистозды мастопатия сықатындағы әсер етуінің бір жолдары гормональды тұрғыдан болуы әбден мүмкін. Сондықтан да сүт безінің қатерсіз патологияларының бірі фиброзды кистозды мастопатия кезінде сырқаттардың препараттарды қабылдауы барысында пайда болған жанама әсерлер гормональды тұрғыдан болғандықтан гормональды реттелуге тікелей қатысы бар. Бұл дегеніміз даназол эстроген емес прогестерон рецепторларымен байланысқа түседі деген болжам береді[154].

Өйткені, ғылыми жұмысты жазу барысында әдеби-ғылыми деректерге шолу жасалынғанда даназолды тәжірибе ретінде ұрғашы егеуқұйрықтарға қолданған кезде даназолдың прогестерон әсерін төмедеткеніні айтылған, ал бір әдебиеттерде фиброзды-кистозды мастопатиямен ауырған сырқаттардан алынған биопсия мәліметтерінде прогестеронның жоғары мөлшері анықталған. Жүргізілген ғылыми тәжірибелердегі айтарлықтай айырмашылықтар даназолдың берілген уақыты мен мөлшеріне де байланысты болуы мүмкін деп қорытынылайды.

Ал, профессор Price-тың ғылыми зерттеулерінде Mcf10A сүт безі клеткаларында прогестрон рецепторларының орналасқаны туралы көрсетілген [123,p. 154].

Біздің зерттеулерімізде прогестерон рецепторларының экспресциясын дәлелдей алмадық, дегенменде даназолмен прогестеронның қосынды әсерінде клетка пролиферациясында және митохондрияның тотығу-фосфорлану процессінде даназол прогестерондық клетка нысандарына кедергі жасай алатынын дәлелдедік.

3.3.5Даназол концентрацияларыныңMcf10A сүт безі клеткаларының тотығу стресіне әсері

Зерттеулерімізде даназолдың концентрацияларының тотығу стресіне әсерін Mcf10A сүт безі клеткаларында даназолдың концентрацияларының тотығу стрессін тудыруы мүмкін бе деген мақсаттағы жүргізген тәжірибе жұмыстарымызда бос радикалдар туындауы мүмкіндігі супероксид және цитозольдық сутегінің асқын тотығының бояуларымен бақылап көрдік. Ол үшін, митохондриялық арнайы супероксидіне сезімтал болып табылатын MitoSox және цитозольды H_2O_2 сезімтал CM-H_2DCFDA екі флуоресценті зондтар пайдаланылды.Бұл бояулар оттегінің белсенді түрлерінің түзілуінің механизмдерін зерттеу үшін митохондриялық тыныс алу ингибиторларының қатысуымен бағаланды(сурет19).

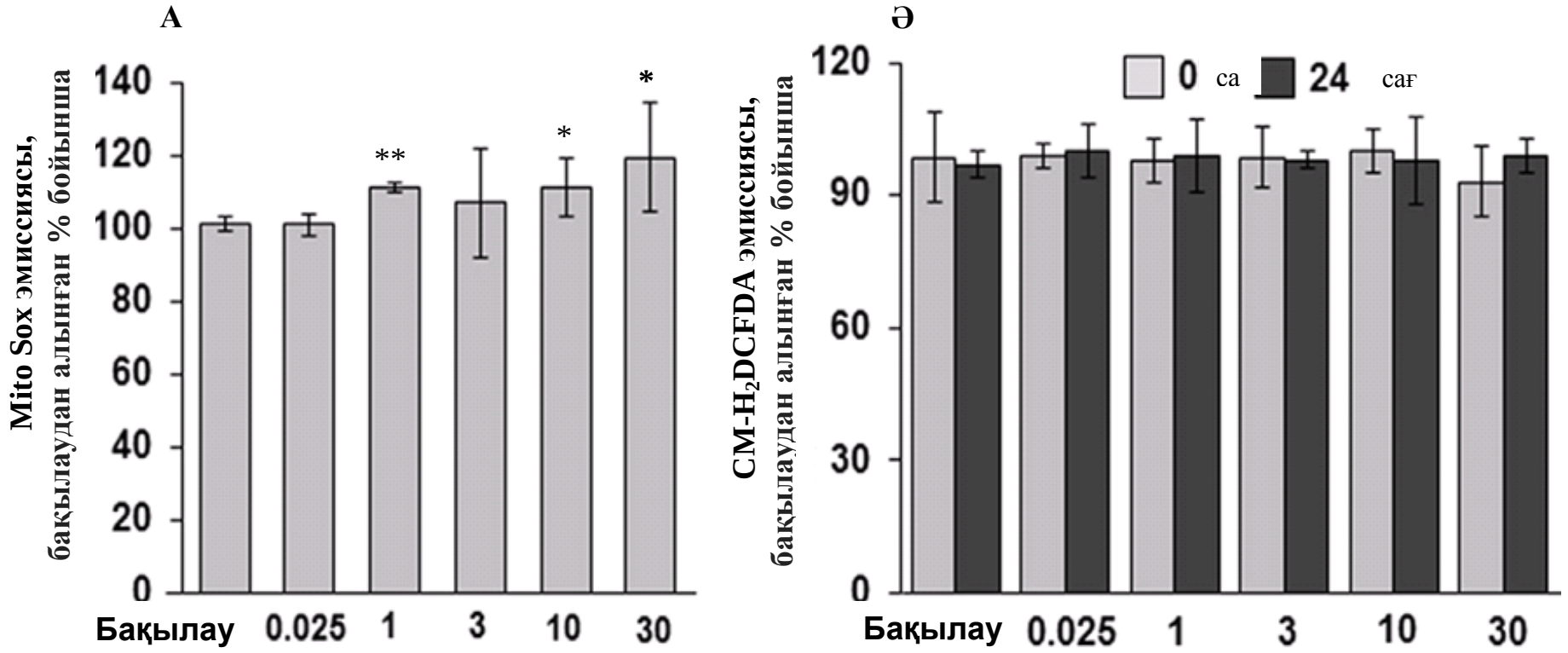
19 суреттен көріп отырғанымыздай бақылау барысында MitoSox бояуы эмиссиясына шаққандағы клеткалардың пайыздық көрсеткіші 100% 6 ал даназолдың 0,025мкМ концентрациясы да тура осындай. Ал даназолдың 1 мкМ концентрациясындағы көрсеткіш бақылау мен даназолдың 0,025мкМ

мөлшерімен салыстырғанда 107 % көрсеітп, жоғары болып отыр.Даназолдың 3 және 10мкМ концентрацияларының мөлшері 103 % және 108%-ға дейін көтерілген.Даназолдың концентрацияларының тотығу стресіне әсерін зерттеудегі тәжірибелерімізде аталған препараттың 30 мкМ концентрациясы 120 %(* $p \leq 0,05$ және ** $p \leq 0,005$) көрсетіп отыр. Бұдан байқағанымыз, электрондардың тасымалдануынан митохондриядағы сутегінің асқын тотығының босап шығуына әкеледі.

Бұл жұмыста митохондрияның метаболикалық жағдайы, осы органеллалар арқылы оттегінің белсенді түрлерінің регенерациясы жылдамдығының белсенділігі анықталды.Клетканың энергетикалық орталығы болып табылатын митохондриядан туындаған оттегінің белсенді түрлернінің даназол концентрацияларынан туындауы қарастырылып отырған мәселелердің бірі болып табылады.

Клетка ішілік механизмдерді, митохондрия гомеостазының өзгерістерінен туындайтын процестерді толыққанды зерттеу, түсіну мақсатындағы кезекті тәжірибелік жұмыстарымызда тотығу стресін бақыладық.

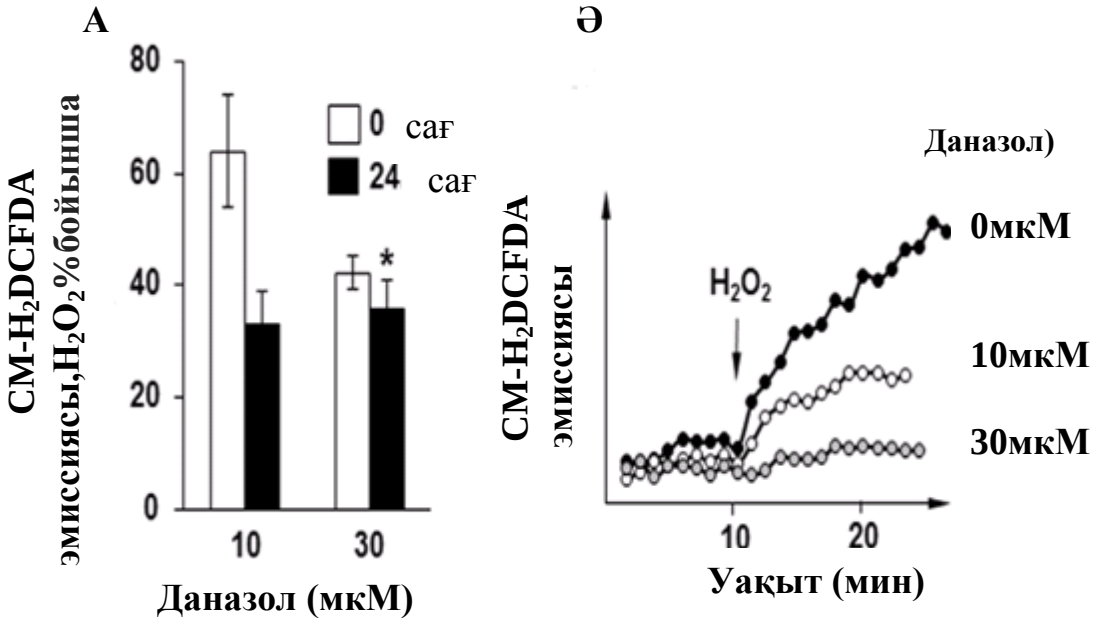
Митохондрия отегінің белсенді түрлерінің қайнар көзі болып табылады. Оттегінің белсенді түрлері - оттегі иондарынан, бос радикалдардан, сутегінің органикалық және бей органикалық құрамынан тұрады[155].Оттегінің белсенді түрлері оның қалыпты метаболизмінде үнемі тірі клеткада түзіледі, клеткаішілік сигналды жолдардың медиаторы болып табылады. Ал аталған өнімнің шамадан тыс көп болуы тотығу стресін тудырады.



Мұндағы абцисса сызығы даназолдың концентрациялары мөлшерін, ордината сызығы MitoSox (А), CM-H_2DCFDA сутегі асқын тотығы және митохондриялармен түзілетін супероксид сезімтал бояғыштарының көмегімен флуориметриялық түрде бағаланды

Сурет 19 -Даназол концентрацияларының тотығу стресіне әсері.
даназолдың сутегінің асқын тотығының жылжуын(А) және цитозольдағы бос радикалдарға(Ә) әсері.
Статистикалық айырмашылық (* $p \leq 0,05$ және ** $p \leq 0,005$)

Содан кейін цитозольдің H_2O_2 сезімтал CM-H_2DCFDA сигналдық мөлшерін өңдеу негізінде тотығу стресі дәрежесіне митохондриялардың әсері анықталды.Сол сияқты, цитозольдің H_2O_2 сезімтал зондын пайдалан отырып, даназолдың әсерін байқадық(суреттер 20а,ә). Мұнда H_2O_2 зарядталмаған молекулалары клеткалық мембранаға оңай енеді де, сутегінің асқын тотығының эндогендік қорынбайытады және оттегінің асқын тотығының түзілуін тудырады.



Сурет 20-Даназолдың тотығу үдерісіне әсері

20-суреттегі графикті бейнелеуде даназолмен 24 сағаттан соң инкубация жасағаннан кейін де аталған процестің тұрақты болатынын көрсетеді. Тотығу стрессін тудыру мақсатында 100мМ сутегінің асқын тотығын және одан соң даназолды қосқанда сутегінің асқын тотығын әсерінен күрт көтеріліп кеткен оттегінің белсенді түрлері 10мкМ және 30мкМ концентрацияларды қосу кезінде төмендей түсті. Бұл дегеніміз даназол мөлшерлерінің оттегінің белсенді формаларына басымдылық танытатынын көрсетеді.

Сонымен, біздің зерттеулерімізде даназолдың 1,3,10 және 30мкМ концентрациялары митохондриядағы супероксид мөлшерін сәл ғана жоғарылатады. Митохондриялық және цитозольдық тотығу ферменттерінің белсенділігінен тотығу стресінің туындауына әсер етпейді. Даназолдың өзге концентрацияларында да сутегінің асқын тотығының туындауына әкелмеді. Бұл өз кезегінде супероксиддисмутаза радикалдарының әсерінен болуы мүмкін.

3.3.6Даназолдың цитозольдық кальций гомеостазына әсері

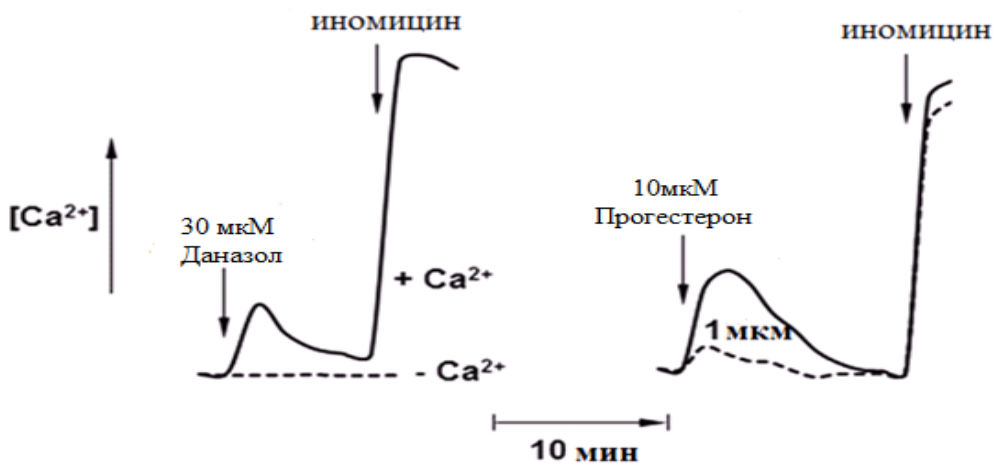
Әртүрлі стресс факторларына клетканың жауабы ретінде цитозольдық кальций ауытқуының деңгейін мысалға келтіруге болады. Дегенменде клетка митохондриялары кальций гомеостазының негізгі реттегіштері болып

табылатынын білеміз. Яғни, клеткаларды артық кальций мөлшерінен қорғау үшін осы ионның көп мөлшерін жұтып алуға қабілетті болып табылады.

Бұл жұмыста Mcf10A клеткалары түбі жұқа шыныдан жасалынған диаметрі 35мм болатын MatTek табақшаларында 200000 клетка тығыздығында отырғызылды. Клеткалар қоректік ортадан құрамында Ca^{2+} және Mg^{2+} жоқ PBS ерітіндісімен шайылды және қараңғы бөлме температурасында 15 минут бойы концентрациясы 2мкМ Fluo-4 AM флуоресцентті бояуымен таңбаланды. Содан кейін клеткалар 2 рет PBS ерітіндісімен шайылды және тұрақтандыру үшін қосымша буферде 15 минут ұсталды. Содан соң,цитозольдық кальций тербелістері конфокальды лазерлік микроскоп арқылы 570 нм жарық эмиссиясы негізінде анықталды.

Клетка митохондриясы Ca^{2+} гомеостазы тұрақтылығын реттеудегі негізгі рөл атқара отырып, аталған элементтің шамадан тыс мөлшерде бөлініп буферизациялық үдерістер тудырмауын қамтамасыз етеді. Ал митохондриядағы Ca^{2+} иондарының шамадан тыс көп болуы органелланың энергетикалық күйзеліске ұшырауына алып келеді[156].

21 суретте даназолдың концентрацияларының цитозольдық кальций деңгейіне әсерін бақыладық. Бұл зерттеулерден көргеніміз, даназолдың 30 мкМ концентарциясының әсері цитозольдық кальций шығуына әсер етпейді. даназолдың аталған жоғары концентрациясын енгізгеннен кейін кальций мөлшері аздап жоғарылағанымен қайта төмендей бастады, ингибитор ретінде иномицинмен ингибирлегеннің өзінде уақытқа байланысты төмендегенін көреміз. Ал дәл осы тәжірибені прогесетронмен жасаған кезде даназолдың 1 мкМ концентрациясымен салыстырмалы қараған кезде прогестеронның 10мкМ (*p≤0,05) концентрациясының өзі цитозольдық кальцийдің туындауын тудырмады.

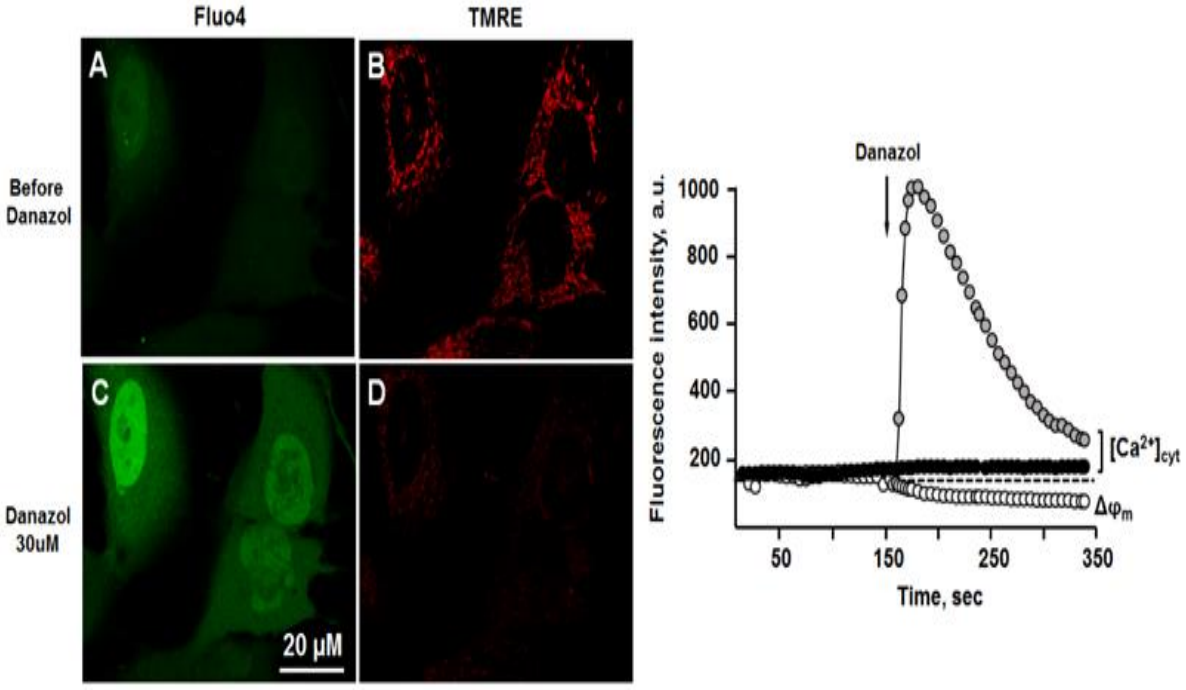


Сурет 21-Mcf10A сүт безі клеткаларының жүйесіне даназолдың кальций деңгейіне әсері

Энергетикалық және де тағы басқа көптеген клеткалық процестердің тиімділігі цитозольдық кальций арқылы реттелетіндіктен, митохондриялық

тотыға -фосфорланумен қатынаста болатын цитозольдық кальцийдің өзгеруіне даназолдың 30 мкМ және прогестеронның 10мкМ концентрациясы алынды.

Цитозольдық кальцийдің өзгерісін бақылау клеткадағы болып жатқан негізгі процестерді бақылап, анықтауға мол мүмкіндік береді. Сондықтан цитозольдық кальцийдің өзгерісі барысында даназол мен прогестеронның концентрацияларының эффектісі кальцийге сезімтал флуоресцентті-4AM бояуымен анықталды. Даназол 30мкМ концентрациясы кальцийдің туындауын тудырады (сурет22).



Сурет 22 - Даназолдың цитозольдік және митохондрия мембранасының потенциалына әсерін конфокольды микроскоп арқылы зерттеу

Бұл тәжірибелерде даназолдың 30мкМ концентрациясының кальций көтерілуі арқылы жауап бермейтіні анықталды.

Сонымен, клеткалардағы тұрақты түрде цитозольдық кальций мөлшерінің артуы, митохондрия қызметінің бұзылуына, сонымен қатар клеткаішілік процестердің өзерерістерге ұшырауына әкеледі. Мұндағы ерекше көңіл аударатын жағдай, Mcf10A сүт безі клеткаларының цитозольдық кальций деңгейі даназолдың ең жоғарғы концентрациясымен әсер еткенде ешқандай өзгерістің байқалмайтындығы. Алайда, кальций мен кернеуге сезімтал клеткалық белоктар мен мембраналық компоненттерді қамтитын клеткалық кальций бастапқы кезде сезімталдық танытқанымен клетканың күрделі процестерінің бұзылысына алып келетін өзгерістер тудырмады.

ҚОРЫТЫНДЫ

Алынған нәтижелер негізінде келесідей қорытындылар жасалынды:

1. Mcf10A сүт безі клеткаларына даназолдың әртүрлі концентрацияларының цитотоксикалық әсері анықталды. Даназол препаратының жоғарғы мөлшерлі 30 мкМ концентрациясының уақыт айырмашылығына қарай клетка тіршілігін 77%- ға дейін төмендеткені дәлелденді.

2. Даназол препаратының Mcf10A сүт безі клеткаларында апоптоз процесін тудыратыны анықталды.Даназолдың 30 мкМ концентрациясының әсерінен уақытқа байланысты апоптозға ұшыраған клеткалар санының көбейгені анықталды.

3. Даназолдың 10мкМ және 30 мкМ концентрацияларының Mcf10A клеткаларының клетка циклына сай пролиферативтік процессін G_0/S кезеңдерінде тоқтататыны айқындалды.

4. Даназолдың 30 мкМ концентрациясы Mcf10A клеткаларының мембраналық потенциалын 77%-ға дейін төмендеуін тудырды.

5. Даназол концентрацияларының мембраналық потенциалды төмендетумен қатар клетканың уақытқа байланысты оттегін қабылдауын да 10 % -ға дейін төмендеткені анықталды.

6. Mcf10A сүт безі клеткаларында даназолдың концентрациялары тотығу стресін тудырмайды.

7. Даназол митохондрияның метаболизміне прогестерон рецепторлары арқылы әсер ететіні анықталды.

8. Даназолдың 30мкМ және прогестеронның 10мкМ концентрацияларынан кальций иондарының тербелісі пайда болғаныменданазолдың 30мкМ концентрациясы цитозольдық кальций деңгейінің өзгерісіне әкелмейтіні анықталды.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1 Нұрғазиев Қ.Ш., Сейтқазина Ғ.Ж., Әжмағамбетова Ә.Е., Сейсенбаева Г.Т. Қазақстан Республикасы онкологиялық қызметінің 2011 жылдық көрсеткіштері (статистикалық мәліметтер). – Алматы, 2012. –108б.

2 Бухарин Д.Г.,ВеличкоС.А., Фролова И.Г.Особенности диагностики рака молочной железы на фоне фиброзно-кистозной мастопатии // Сибирский онкологический журнал. – 2011.– №2. – С. 14–15.

3 Макаренко Н. П. Фиброзно-кистозная болезнь // Рус.мед. журнал. - 2005. - №13.- С. 875-878.

4 Parking D.M., Bray F., Pisani F., Pisani P. Global cancer statistics: 2005 // CA Cancer J. Clin. – 2009. – Vol. 59, №2. – P. 74-108.

5 Lauersen N.H., Wilson K.H., Birnbaum S. Danazol: an antigonadotropic agent inthe treatment of pelvic endometriosis // Am J Obstet Gynecol. – 1975. - Vol. 123, №7. –P. 742-747.

6 Milwidsky A., Besch N.F., Besch P.K., Kaufman R.H. Evidence of a possible directaction of Danazol on the human ovary // Acta Obstet Gynecol Scand. – 1983. - Vol. 62, №2. – P. 187-190.

7 Lancia A., Colella F., Nicolella U., Grandioso P., Di Virgilio D. Hepatic damage afterdanazol treatment // Ital J Gastroenterol. – 1991. - Vol. 23, №1. – P. 15-16.

8 Hsieh C.Y., Chen C.H. Rhabdomyolysis and pancreatitis associated with coadministration of danazol 600 mg/d and lovastatin 40 mg/d // Clin Ther. –2008. - Vol. 30, №7. – P. 1330-1335.

9 ПрилепскаяВ.Н.,ШвецоваО.Б.Доброкачественныезаболеваниямолочных желез: принципытерапии // Маммолог. - 2005. - №4. -С. 19-25.

10 Бухарин Д.Г. Особенности маммографической визуализации «малых» форм рака молочной железы, развившегося на фоне фиброзно-кистозной болезни// Вопросы онкологии. – 2011. – Т. 57, №5. – С. 664–667.

11 Hsieh C.Y., Chen C.H. Rhabdomyolysis and pancreatitis associated with coadministration of danazol 600 mg/d and lovastatin 40 mg/d // Clin Ther. –2008. - Vol. 30, №7. – P. 1330-1335.

12 Zawar V., Sankalecha C. Facial hirsutism following danazol therapy // Cutis. –2004. - Vol. 74, №5. – P.301-303.

13 Dhont M., Delbeke L., van Eyck J., Voorhoof L. Danazol treatment of chroniccystic mastopathy: a clinical and hormonal evaluation // Postgrad Med J. - 1979. - Vol. 55, supple 5. – P. 66-70.

14 Barbieri R.L., Lee H., Ryan K.J. Danazol binding to rat androgen, glucocorticoid,progesterone, and estrogen receptors: correlation with biologic activity // FertilSteril. – 1979. - Vol. 31, №2. – P. 182-186.

15 Jenkin G., Cookson C.I., Thorburn G.D. The interaction of human endometrial andmyometrial steroid receptors with danazol // Clin Endocrinol (Oxf). – 1983. - Vol. 19, №3. –P. 377-388.

16 Cervantes F., Isola I.M., Alvarez-Larran A., Hernandez-Boluda J.C., Correa J.G.,Pereira A. Danazol therapy for the anemia of myelofibrosis: assessment ofefficacy with current criteria of response and long-term results // Ann Hematol. - 2015. -Vol. 94, №11. – P. 1791-1796.

17 Beaumont H., Augood C., Duckitt K., Lethaby A. Danazol for heavy menstrualbleeding // Cochrane Database Syst Rev. – 2007. - №3.– P. 1017.

18 Rocha R., Horstman L., Ahn Y.S., Mylvaganam R., Harrington W.J. Danazol therapyfor cyclic thrombocytopenia // Am J Hematol. – 1991. -Vol. 36, №2. – P. 140-143.

19 Ahn Y.S. Efficacy of danazol in hematologic disorders //Acta Haematol. – 1990. - Vol. 84, №3. – P. 122-129.

20 Есентаева С.Е. Терапевтический эффект еженедельного режима "Паклитаксел+карбоплатин" у больных с "тройным негативным" метастатическим раком молочной железы // Медицина. - 2010. - №2. - С. 41-43.

21 ЧичуаН.А., ЕсентаеваС.Е.,Смагулова К.К.Метрономная химиотерапия при резистентных формах рака молочной железы//Фармация Казахстана. - 2007. - №11. - С.44-46.

22 Greenblatt R.B., Nezhat C., Ben-Nun I. The treatment of benign breast diseasewith danazol // Fertil Steril. – 1980. -Vol. 34, №3. –P. 242-245.

23 Baker H.W., Snedecor P.A. Clinical trial of danazol for benign breast disease //AmSurg. – 1979. - Vol. 45, №11. –P. 727-729.

24 Vigano P., Di Blasio A.M., Busacca M., Sabbadini M.G., Vignali M. Danazol suppresses both spontaneous and activated human lymphocyte-mediated cytotoxicity //Am J Reprod Immunol. – 1992. - Vol. 28, №1. –P. 38-42.

25 Hayashi T., Takahashi T., Minami T., Akaike J., Kasahara K., Adachi M. et al. Fatalacute hepatic failure induced by danazol in a patient with endometriosis andaplastic anemia // J Gastroenterol. – 2001. -Vol. 36, №11. – P. 783-786.

26 Robert J. Kurman Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract // Springer Science & Business Media.–2013, april1 - 7. - P.390.

27 GriffinJ.P., D'Arcy P.F. A Manual of Adverse Drug Interactions // Elsevier. - 1997, november - 17. - P. 194.

28 Zawar V., Sankalecha C. Facial hirsutism following danazol therapy //Cutis. –2004. - Vol. 74, №5. – P. 301-303.

29 ThomasEric J., John Rock.Modern Approaches to Endometriosis // Springer Science & Business Media. - 2012, december 6. - P. 239-256.

30 Gelfand A., Sherins R.J., Alling D.W., Frank M.M. Treatment of hereditaryangioedema with danazol. Reversal of clinical and biochemical abnormalities //N Engl J Med. – 1976. - Vol. 295, №26. – P. 1444-1448.

31 Rocha R., Horstman L., Ahn Y.S., Mylvaganam R., Harrington W.J. Danazol therapy for cyclic thrombocytopenia //Am J Hematol. –1991. - Vol. 36, №2. – P. 140-143.

32 Ahn Y.S. Efficacy of danazol in hematologic disorders //Acta Haematol. – 1990. - Vol. 84, №3. – P. 122-129.

33 Gorins A., Perret F., Tournant B., Rogier C., Lipszyc J. A French double-blindcrossover study (danazol versus placebo) in the treatment of severefibrocystic breast disease //Eur J Gynaecol Oncol. – 1984.- Vol. 5, №2. –P. 85-89.

34 Sangha G.K., Chopra N. Danazol-induced biochemical changes in the rat ovary // Indian J Physiol Pharmacol. – 1998. - Vol. 42, №2. –P. 252-258.

35 Packard C.J., Shepherd J. Action of danazol on plasma lipids and lipoproteinetabolism // Acta Obstet Gynecol Scand Suppl. – 1994. - №159. – P. 35-40

36 Taguchi M., Kubota T., Aso T. Direct effect of danazol on the DNA synthesis andultrastructure of human cultured endometrial stromal cells //Gynecol ObstetInvestig. – 1995. - Vol. 39, №3. – P. 192-196.

37 Tanaka T. Danazol regulates the functions of normal human endometrialstromal cell subpopulations by modifying endometrial cytokine networks // IntJ Mol Med. – 2009. -Vol. 23, №3. – P. 421-428.

38 Tanaka T., Umesaki N. Danazol enhances Fas-mediated apoptosis in humanendometrial epithelial cells within normal physiology // Int J Mol Med. -2009. - Vol. 23, №2. – P. 237-243.

39 Есжан Б.Ғ., Орынбаева З.С., Төлеуханов С.Т. Сүт безінің әртүрлі патологияларында даназол препаратының қолданылуының салыстырмалы сипаттамалары. // ҚР ҰҒА-ның баяндамалары. Биология және медицина сериясы.-Алматы, 2017. – №5.– Б. 100-106.

40 Tamaya T., Wada K., Fujimoto J., Yamada T., Okada H. Danazol binding to steroidreceptors in human uterine endometrium // Fertil Steril. –1984. - Vol. 41, №5. – P. 732-735.

41 Danazol: MedlinePlus Drug Information //http:medlineplus.gov. (retrieved:2018.11.07).

42 МаксимоваД.А., ГубановаН.В., КорчагинаК.В., Шестопалова Л.В. Подготовка клеточных культур к электронно-микроскопическому исследованию: методическое пособие. –Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2012. - 49 с.

43 Методыобщейбактериологии. - М.: Мир, 1983. - Т. 1, ч. 2. - С. 163−512.

44 Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж.Молекулярная биология клетки // В 3 т. / пер. с англ.- 2-е изд., перераб. и доп. -М.: Мир, 1994.-Т. 1. - 517 с.

45 Pat. 5026637 US. Immportalhumanmammaryepithelialcelllines / H. Soule; C.M. McGrath;dated:25.06.1991.

46 Pat. 5206165 US. Immortal human mammary epithelial cell sublines / R.J. Pauley; dated: 27.04.1993.

47 Soule H.D., McGrath C.M. A simplified method for passage and long-term growth of human mammary epithelial cells //In Vitro Cell. Dev. Biol. - 1986. - №22. – P. 6-12.

48 БаснакьянИ.А.Культивированиемикроорганизмовсзаданнымисвой-ствами. - М.: Медицина, 1992. - 192 с.

49 Методыкультивированияклеток. - Л.: Наука, 1988. - 315 с.

50 Есжан Б.Г. Влияние даназола на окислительный процесс клеточной линий mcf10a // Тенденции и перспективы развития науки и образования в условиях глобализации Международная научная конференция. – Украина; Киев, 2019. - С.670-672.

51 ACC.AmericantypeculturecollectionMCF10A-JSB,Breastepithelium.NCI-PBCF-1000. – 2012, september 1. -Version 1.0.

52 DebnathJ., Muthuswamy S.K., Brugge J.S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures //Methods. –2003. –Vol. 30, №3. –P.256-268.

53 Есжан Б.Ғ., Орынбаева З.С., Төлеуханов С.Т. Сүт безінің қатерлі ісігі мен фиброзды кистозды мастопатияның салыстырмалы ерекшеліктері // ҚР ҰҒА-ның хабарлары. Биология және медицина сериясы.-Алматы, 2017. - №1(319). – Б. 103-111.

54 Tait L. et al. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10 // Cancer Res. - 1990. - №50. –P. 6087-6094.

55 Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney. - 6th edition. - N.Y:Wiley-Liss, 2010.- 550p.

56 Chen J.Q., Delannoy M., Cooke C., Yager J.D. Mitochondrial localization of ERalphaand ERbeta in human MCF7 cells //Am J Physiol Endocrinol Metab. – 2004. – Vol. 286, №6. –P.1011-1022.

57 Caputo J.L. Biosafety procedures in cell culture // J. Tissue Culture Methods. –ATCC, 1988. - Vol.11. – P. 223-227.

58 Ли И.Н., Талаева Ш.Ж., КайбуллаевБ.А.Современные подходы к лечению рака молочной железы // Онкология и радиология Казахстана. -2010. - №15. – С. 50-53.

59 Козлов В.В., Войцицкий В.Е., Зонова И.А., Боярских У.А., Гуляева Л.Ф. Молекулярная характеристика злокачественных опухолей молочной железы после неоадъювантной терапии // Вестник НГУ. - 2012. – Т.10, вып. 2. - С.145-150.

60 Есжан Б.Ғ., Төлеуханов С.Т. Фиброзды-кистозды мастопатияның сипаттамалық ерекшеліктері // Студенттер мен жас ғлымдардың «Фараби әлемі» атты халықаралық ғылыми конференциясы. – Алматы, 2017, сәуір 10-11.- Б.34-35.

61 VenturiS. Is there a role for iodine in breast diseases? //The Breast. - 2010. - Vol. 10, №5. – P. 379–382.

62 Тажединов И., Аманкулов Ж.М., Сейсенбаева Г.Т., Хан О.Г.Радионуклидная терапия – важнейшее направление в развитии ядерной медицины в Казахстане // Медицина. – 2017. - №7 (181). – С. 25-26.

63 Yessentayeva Suriya,Chichua Nino,Khamidullina Galina. Molecular biological peculiarities of “triple negative”breastcancer //MedicalandHealthScienceJournal.– 2010. - №1. -P.26-30.

64 Летягин В.П., Высоцкая И.В., Ким Е.А. Факторы риска развития рака молочной железы // Маммология. - 2006. - № 4. - С. 10-12.

65 Есжан Б.Ғ., Төлеуханов С.Т. Mcf10A сүт безі клеткаларының кумулятивтік ерекшелігін зерттеу және сипаттау // Новости науки Казахстана. Серия биологическая.-Алматы, 2019. -№1. –Б. 45-57.

66 Бухарин Д.Г. Особенности рентгенологической семиотики непальпируемых форм рака молочной железы на фоне мастопатии// Достижения, перспективы и основные направления развития лучевой диагностики в Сибири: первый съезд врачей лучевой диагностики Сибирского федерального округа. – Новосибирск, 2010. – С. 36–37.

67 Бухарин Д.Г.,СлонимскаяЕ.М., ВеличкоС.А., ФроловаИ.Г., ЛуневаС.В., ГарбуковЕ.Ю., Дорошенко А.В. Роль маммографии в диагностике «малых» форм рака молочной железы, развившегося на фоне фиброзно-кистозной болезни // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – №6. – С. 10–13.

68 Бухарин Д.Г.,ВеличкоС.А., ФроловаИ.Г., Лунева С.В. Ультрасонография и рентгеновская маммография в диагностике рака молочной железы, развившегося на фоне мастопатии // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – №1. – С. 99–102.

69 MarshallL.M., Hunter D.J., Connolly J.L., Schnitt S.J., Byrne C., London S.J., Colditz G.A. Risk of breast cancer associated with atypical hyperplasia of lobular and ductal types //Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. – 1997. - №6 (5). – P. 297-301.

70 Santen R.J., Mansel R.Benign breast disorders // The New England Journal of Medicine. - 2005. - Vol. 353, №3. – P. 275-285.

71 Hartmann L.C ., Sellers T., Frost M.H., Lingle W.L., Degnim A.C., Ghosh K., Vierkant R.A. et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer // New England Journal of Medicine.– 2005. - Vol. 353, №3. – P. 229-237.

72 Balducci L., Phillips D.M. Breast cancer in older women //Am Fam Physician. –1998. - Vol. 58, №5. – P. 1163-1172.

73 Aceves C., Anguiano B., Delgado G. Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? // Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.–2005. - Vol. 10, №2. –P. 189-196.

74 Vaidyanathan L., Barnard K., Elnicki D.M. Benign Breast Disease: When To Treat, When To Reassure, When To Refer //Cleveland Clinic Journal of Medicine. - 2002. - Vol. 69, №5. – P. 424-439.

75 Kumar S., Shah J.P., Bryant C.S., Imudia A.N., Morris R.T., Malone J.M. A comparison of younger vs older women with vulvar cancer in the United States //Am J Obstet Gynecol. –2009. - Vol. 200, №5. –P. 52-55.

76 Vetter M., Huang D.J., Bosshard G., Güth U. Breast cancer in women 80 years of age and older: a comprehensive analysis of an underreported entity //Acta Oncol. –2013. - Vol. 52, №1. – P. 57-65.

77 Vorherr H. Fibrocystic breast disease: pathophysiology, pathomorphology,clinical picture, and management // Am J Obstet Gynecol. - 1986. - Vol. 154, №1. – P. 161-179.

78 Chatzidaki P., Mellos C., Briese V., Mylonas I. Does primary breast cancer in older women (≥ 80 years) have unfavorable histological characteristics? //Arch Gynecol Obstet. –2011. - Vol. 284, №3. –P. 705-712.

79 Vidi P.A., Bissell M.J,. Lelievre S.A. Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why //Methods Mol Biol.– 2013. - Vol. 945. – P. 193-219.

80 Greenblatt R.B., Samaras C., Vasquez J.M., Nezhat C.Fibrocystic disease of thebreast //Clin Obstet Gynecol. – 1982. -Vol. 25, №2. – P. 365-371.

81 Venturi S. Is there a role for iodine in breast diseases? // The Breast. –2001. - Vol. 10, №5. – P. 379-382.

82 Breast Masses (Breast Lumps). Merck Manuals Professional Edition. - 2018,november - 3.

83 Gadducci A., Guerrieri M.E., Genazzani A.R. Benign breast diseases, contraception and hormone replacement therapy //Minerva Ginecologica.– 2012. - Vol. 64, №1. – P. 67-74.

84 Kessler J.H. The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia // The Breast Journal (Randomized Controlled Trial). - 2004.- Vol. 10, №4. – P. 328-336.

85 Susan L. Norwoord.Fibrocystic Breast Disease An Update and Review //JOGNN - Journal of Obstetric Gynecologic& Neonatal Nursing. - 1990. - Vol. 19,№2. – P. 116-121.

86 Atlantic Women's Specialists //Fibrocystic Breast Changes.– 2012,june21.

87 Gokhale, Sudheer.Ultrasound Characterization of Breast Masses //Indian Journal of Radiology and Imaging. - 2009. - Vol. 19, №3. – P. 242-247.

88 Litvak D.A., Arora R. Treatment of elderly breast cancer patients in a community hospital setting //Arch Surg. –2006. - Vol. 141, №10.–P. 985-990.

89 Cyr A., Gillanders W.E., Aft R.L., Eberlein T.J., Margenthaler J.A. Breast cancer in elderly women (≥ 80 years): variation in standard of care? //J Surg Oncol. - 2011. - Vol. 103, №3. –P.201-206.

90 Diab S.G., Elledge R.M., Clark G.M. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer //J Natl Cancer Inst.–2000. - Vol. 92, №7. – P. 550-556.

91 Laki F., Kirova Y.M., Savignoni A., Campana F., Levu B., Estève M. et al. Management of operable invasive breast cancer in women over the age of 70: long-term results of a large-scale single-institution experience //Ann Surg Oncol. – 2010. - Vol. 17, №6. – P. 1530-1538.

92 Brunello A., Basso U., Pogliani C., Jirillo A., Ghiotto C., Koussis H. et al. Adjuvant chemotherapy for elderly patients (≥ 70 years) with early high-risk breast cancer: a retrospective analysis of 260 patients //Ann Oncol. –2005. - Vol. 16, №8. – P. 1276-1282.

93 Gorins A., Perret F., Tournant B., Rogier C., Lipszyc J. A French double-blind crossover study (danazol versus placebo) in the treatment of severe fibrocystic breast disease // Eur J Gynaecol Oncol. – 1984. - №5(2). – P. 85-89.

94 Есжан Б.Ғ., Төлеуханов С.Т. Энергетикалық алмасудың реттелуіндегі стероидты гормондардың ролі//Новости науки Казахстана. Серия биологическая.-Алматы, 2018. - №3. –Б. 45-58.

95 Заитова Х.М.,Биржанова А.Н.,Туфуминов Е.Н.,Махпиршаев И.Н.,Зиябеков Д.М.,Сактаганов М.И.,Умутбаева Г.Б. Факторы риска, влияющие на развитие рака молочной железы // Медицина. – 2014. -№4. - С. 31-33.

96 Турманов Н.А., Кайдарова Д.Р.,Югай Т.А., Танжарыков Д.Х., Абдукаримова Е.С., Сактаганов М.И., Уркембаева К.Ш., Егембердиев И.Ж. Анализ мутаций в генах NBN и CHEK 2 у пациенток с раком молочной железы, жительниц Республики Казахстан // Онкология и радиология Казахстана. - 2011.- №4 (21). - С. 44-47.

97 СактагановМ.И.Депрессивные расстройства в маммологической практике // Вестник КазНМУ. – 2012. - №3. – С.45-52.

98 Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж.Молекулярная биология клетки // В 3 т. / пер. с англ.- 2-е изд., перераб. и доп. -М.: Мир, 1994.-Т. 1. - 517 с.

99 Корженевская М.А., Анисимова Л.Е., Болонина В.П., Розенфелъд С.В., Степанов Н.Н., Того Е.Ф. Молекулярная биология и патология клетки: курс лекций для студентов медицинских вузов // В 4 ч. - СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2011. - Ч. 1. - 55 с.

100 Огурцов А.Н. Биохимия для студентов. Биоэнергетика и фотосинтез. - 2015. - Ч. 5. - 40 с.

101 Alberts B. etal. Molecular biology of the cell. - sixth edition. – Garland Science, 2015. – 1464 p.

102 Скулачев В.П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. - М.: Высш. шк., 1989. - 271 с.

103 Тихонов А.Н. Молекулярные преобразователи энергии в живой клетке // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – №7. – С. 10-17.

104 Тихонов А.Н. Молекулярные моторы. Вращающиеся моторы живой клетки // Соросовский образовательный журнал. – 1999.– №6,ч.1.– С.8-16.

105 Ленинджер А. Основы биохимии // В 3 т. / пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – Т. 2.– 368 с.

106 Мазунин И.О., Володько Н.В., Стариковская Е.Б., Сукерник Р.И. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека // Молекулярная биология.–2010. - №44 (5). –С. 755–772.

107 Давыдов В.В., Клещев Н.Ф.Основы общей биохимии: учеб. пособие. – Харьков: НТУ “ХПИ”, 2007. - 380 с.

108 Starkov A.A., Fiskum G., Chinopoulos C., Lorenzo B.J., Browne S.E., Patel M.S., et al. Mitochondrial alphaketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. –2004.– Vol. 24, №36.–P. 7779–7788.

109 Hoffman D.L., Brookes P.S. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions // The Journal of biological chemistry. –2009.– Vol. 284, №24.–P. 16236–16245.

110 Kumar B., Koul S., Khandrika L., Meacham R.B., Koul H.K. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype // Cancer research. –2008.– Vol. 68, №6.–P. 1777–1785.

111 Drose S. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning // Biochimica et biophysica acta. –2013.– Vol. 1827, №5.–P. 578–587.

112 Ralph S.J., Moreno-Sanchez R., Neuzil J., Rodriguez-Enriquez S. Inhibitors of succinate: quinone reductase.Complex II regulate production of mitochondrial reactive oxygen species and protect normal cells from ischemic damage but induce specific cancer cell death // Pharmaceutical research. –2011.– Vol. 28, №11.–P. 2695–2730.

113 Quinlan C.L., Orr A.L., Perevoshchikova I.V., Treberg J.R., Ackrell B.A., Brand M.D. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions // The Journal of biological chemistry. –2012.– Vol. 287, №32.–P. 27255–27264.

114 Lambert A.J., Brand M.D. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) // The Journal of biological chemistry. –2004.– Vol. 279, №38.–P. 39414–39420.

115 Bruce A. et al.Molecular Biology of the Cell. - 4th ed. - New York: Garland Publishing, 2017.-1616 p.

116 Zhunussova A., Sen B., Friedman L., Tuleukhanov S., Brooks A.D., Sensenig R. et al. Tumor microenvironment promotes dicarboxylic acid carrier-mediated transport of succinate to fuel prostate cancer mitochondria // American journal of cancer research. –2015.– Vol. 5, №5. –P. 1665–1679.

117 Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.Биологическая химия. - 2-е изд. - М.:Медицина, 1990. - 528 с.

118 Розен В. Б. Основы эндокринологии. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 1994. - 384 с.

119 SmithB.D., GrossC.P., Smith G.L., Galusha D.H., Bekelman J.E., Haffty B.G. Effectiveness of radiation therapy for older women with early breast cancer //J Natl Cancer Inst. –2006. - Vol. 98, №10. – P. 681-690.

120 Jenkin G., Cookson C.I., Thorburn G.D. The interaction of human endometrial andmyometrial steroid receptors with danazol // Clin Endocrinol (Oxf). – 1983. - Vol. 19, №3. – P. 377-388.

121 Dai Q., Shah A.A., Garde R.V., Yonish B.A., Zhang L., Medvitz N.A. et al. A truncated progesterone receptor (PR-M) localizes to the mitochondrion and controls cellular respiration // Mol Endocrinol. – 2013. -Vol. 27, №5. – P. 741-753.

122 Panahy C., Puddefoot J.R., Anderson E., Vinson G.P., Berry C.L., Turner M.J. et al.Effects of danazol on incidence of progesterone and estrogen receptors

inbenign breast disease // Br Med J (Clin Res Ed). – 1987. - Vol. 295, №6596. – P. 464-466.

123 Gavrilova-Jordan L.P., Price T.M. Actions of steroids in mitochondria //SeminReprod Med. – 2007. - Vol. 25, №3. –P. 154-164.

124 Barbieri R.L., Ryan K.J. Danazol: endocrine pharmacology and therapeutic applications // Am J Obstet Gynecol. – 1981. - Vol. 141, №4. – P. 453-463.

125 Stanczyk F.Z., Hapgood J.P., Winer S., Mishell Jr D.R. Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects // Endocr Rev. – 2013. - Vol. 34, №2. – P. 171-208.

126 Gledhill J.M., Barker S., Wanless C., Hinson J.P., Puddefoot J.R., Panahy C. et al.Progesterone receptor induction by danazol in cultured cancer cells and therat uterus // J Steroid Biochem Mol Biol. – 1992. - Vol. 43, №4. – P. 289-296.

127 Selcer K.W., Leavitt W.W. Progesterone down-regulation of nuclear estrogenreceptor: a fundamental mechanism in birds and mammals // Gen CompEndocrinol. – 1988. - Vol. 72, №3.–P. 443-452.

128 Ikegami H., Terakawa N., Shimizu I., Kano H., Tanaka Y., Aono T. et al. Danazolbinds to progesterone receptors and inhibits the growth of human endometrial cancer cells in vitro // Am J Obstet Gynecol. – 1986. - Vol. 155, №4. – P. 857-861.

129 Shields-BotellaJ., Chetrite G., Meschi S., Pasqualini J.R. Effect of nomegestrol acetate on estrogen biosynthesis and transformation in MCF-7 and T47-D breast cancer cells // The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. –2005. - Vol. 93, №1. – P. 1-13.

130 Kazmi S.M. et all. Differential regulation of human progesterone receptor A and B form-mediated trans-activation by phosphorylation //Endocrinology. - 1993. - Vol.133. – P. 1230-1238.

131 Elkin E.B., Hurria A., Mitra N., Schrag D., Panageas K.S. Adjuvant chemotherapy and survival in older women with hormone receptor-negative breast cancer: assessing outcome in a population-based, observational cohort //J Clin Oncol. –2006. - Vol. 24, №18. – P. 2757-2764.

132 Scheller K., Sekeris C.E. The effects of steroid hormones on the transcription ofgenes encoding enzymes of oxidative phosphorylation // Exp Physiol. – 2003. - Vol. 88, №1. – P. 129-140.

133 Chen J.Q., Delannoy M., Cooke C., Yager J.D. Mitochondrial localization of Er alpha and ER beta in human MCF 7 cells // Am J Physiol Endocrinol Metab. – 2004. - Vol. 286, №6. – P. 1011-1022.

134 Stoddard I.I., Frederick R. Iodine Alters Gene Expression in the MCF7 Breast Cancer Cell Line: Evidence for an Anti-Estrogen Effect of Iodine // International Journal of Medical Sciences. –2008. - Vol. 5. – P. 189-196.

135 Jenkin G. Review: the mechanism of action of danazol, a novel steroid derivative // Aust N Z J Obstet Gynaecol. – 1980. - Vol. 20, №2. – P. 113-118.

136 Psarra A.M., Sekeris C.E. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria // IUBMB Life. – 2008. - Vol. 60, №4. – P. 210-223.

137 Rodriguez-Corrales J.A., Josan J.S. Resazurin live cell assay: setup and fine-tuning for reliable cytotoxicity results // Methods Mol Biol. –2017. - Vol. 1647. – P. 207-219.

138 Rampersad S.N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator ofmetabolic function and cellular health in cell viability bioassays // Sensors(Basel). – 2012. - Vol. 12, №9. – P.12347-12360.

139 Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. - 2-е изд., перераб.и доп.-М.,2003.-288с.

140 Pesta D., Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle // Methods Mol Biol. –2012.– Vol. 810.–P. 25–58.

141 Reutelingsperger C.P., van Heerde W.L. Annexin V6 the regulator of phosphatidyleserincatalyzed inflammation and coagulation during apoptosis // Cell.Mol7Lafe Sci.-1997.-Vol.53, №6.-P.527-532.

142 Vanags D.M., coppola S., Burgess D.H. Protease involment in fodin cleavage and phosphatidyserin exposure in apoptosis // Biol.Chem.-1996.-Vol.271,№49. –P.31075-31085.

143 Gnaiger E. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function // In Mitochondrial dysfunction in drug-induced toxicity. – Wiley, 2008. – P. 27–352.

144 Williamson J.R. Control of energy metabolism in hamster brown adipose tissue // J Biol Chem.– 1970.–Vol. 245, №8.–P. 2043-2050.

145 Spencer T.L. The transport and oxidation of succinate by Ehrlich ascites-tumour cells // Biochem J.– 1976.–Vol. 160, №1.–P. 121-123.

146 Побежимова Т.П., Колесниченко А.В, Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез/ отв.ред.Р.К. Саляев.-М.,2004.-98с.

147 Есжан Б.Ғ., Төлеуханов С.Т. MCF10A клеткалары линиясында Даназол препаратының цитотоксикалық қасиетін анықтау // «Экологиялық генетика мен эксперименталды биологияның өзекті проблемалары» Халықаралық ғылыми-практикалық конференция. - Алматы,2018. -Б.18-19.

148 Irgebay Zh., Yeszhan B., Sen B., TuleukhanovS., Ari D. Brooks., SensenigR., OrynbayevaZ.Danazol alters mitochondria metabolism of fibrocystic breast Mcf10A cell//The Breast. – 2017. - Vol.35.- P.55-62.

149 Есжан Б.Г.,Тулеуханов С.Т. Влияние препарата даназола на клеточный механизм молочной железы при патологии кистознных образований.«Актуальные вопросы медицины» //VIIМеждународная научно-практическая конференция.-Баку,2018.-С.35-36.

150 Rabe T., Kiesel L., RuAhlem C., Kennedy M., Page T., Bell D., Delorme E., Villegas S., Reading C., White S., Stickney D., Frincke J.17α-alkynyl 3α, 17β-androstanediol non-clinical and clinical pharmacology, pharmacokinetics and metabolism //Invest New Drugs. - 2012. - Vol. 30, №1. – P. 59-78.

151 Есжан Б.Ғ., Төлеуханов С.Т. Сүт безінің әртүрлі патологияларында Даназол препаратының әсері мен емдік ерекшеліктері // Студенттер мен жас

ғлымдардың «Фараби әлемі» атты халықаралық ғылыми конференциясы. – Алматы, 2017, сәуір 10-11.- Б.35-36.

152 Тажединов И., Аманкулов Ж.М., Сейсенбаева Г.Т., Хан О.Г. Радионуклидная терапия – важнейшее направление в развитии ядерной медицины в Казахстане // Медицина. -Алматы, 2017. - №7 (181). – С. 45-56.

153 Forbes L.J., Forster A.S., Dodd R.H., Tucker L., Laming R., Sellars S., Patnick J., Ramirez A.J. Promoting early presentation of breast cancer in older women: implementing an evidence-based intervention in routine clinical practice //J Cancer Epidemiol.–2012. - №1.–P. 835-167.

154 Gnaiger E. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-resolutionrespirometry to assess mitochondrial function // In: D.J.a.W. Y, editor. Mitochondrial dysfunction in drug-induced toxicity. – Wiley, 2008. -P. 27-352.

155 Pesta D., Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilizedfibers from small biopsies of human muscle //Methods Mol Biol. –2012. - №810. – P. 25-58.

156 Есжан Б.Г. Влияние даназола на гомеостаз цитозольного (внутриклеточного) кальция // «Advances in Science and Technology» XVIII Международная научно-практическая конференция. –М., 2019. - С. 12-13.

ҚОСЫМША А

АКТ

внедрения новой методики с использованием препарата «Даназола» на механизм действия клеточной линии молочной железы Mcf10A

в Казахском НИИ онкологии и радиологии МЗ РК

Наименование предложения: Рекомендация к применению препарата «Даназола» при лечении фиброзно-кистозной мастопатии молочной железы (методика и методы исследования применялись в работе докторанта Есжан Б.Г. на тему: «Исследование молекулярных и физиологических механизмов действия «Даназола» на энергетический метаболизм клеток молочной железы Mcf10A»).

Форма внедрения: Проведение презентации методики, используемой в диссертационной работе в Маммологическом центре при АО Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии МЗ РК, где Есжан Б.Г. представила методику определения цитотоксичности и эффективности различных концентраций препарата Даназола in vitro.

Ответственные за внедрение: докторант кафедры биофизики и биомедицины, факультета биологии и биотехнологи КазНУ им. аль-Фараби-Есжан Б.Г., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биофизики и биомедицины КазНУ им. аль-Фараби - Тулеуханов С.Т., д.м.н., заведующий маммологического центра Абдрахманова А.Ж., д.б.н., ученый секретарь КазНИИ онкологии и радиологии МЗ РК –Гончарова Т.Г.

Эффективность внедрения: Использование цитотоксических методов с применением флуоресцентного красителя (Аламар синий), при проведении экспериментальных исследований, даст возможность определять метаболические выжившие клетки при воздействии различных концентрации препарата «Даназола».

Срок внедрения: 08.11.2018 г.

Ответственные за внедрение: Есжан Б.Г.

Тулеуханов С.Т.

Абдрахманова А.Ж

Гончарова Т.Г.

"ҚАЗАҚ ОНКОЛОГИЯ ЖӘНЕ РАДИОЛОГИЯ ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ" АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ

ҚОСЫМША Ә

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

СОГЛАСОВАНО
Проректор по научно-
инновационной деятельности
_____ Рамазанов Т.С.
«__» _____ 2018 г.

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе,
председатель комиссии
_____ Хикметов А.К.
«24» сентября 2018 г.

АКТ
о внедрении завершенной научно-исследовательской работы (этапа) в учебный процесс

Комиссия Казахского национального университета имени аль-Фараби в составе: председатель: Хикметов А.К. - проректор по учебной работе, члены: директор департамента по академическим вопросам Мухитдинова Т.М., директор департамента по науке и инновационной деятельности Мухамбетжанов С.К., упраление методической работы и образавательных технологии Саксенбаева Ж.С., декан факультета биологии и биотехнологии Заядан Б.К., председатель методбюро факультета биологии и биотехнологии Кулбаева М.С., заведующий кафедрой биофизики и биомедицины Тулеуханов С.Т. составили настоящий акт о том, что в 2018/2019 учебном году на кафедре биофизики и биомедицины внедрены результаты научно-исследовательской работы докторанта Есжан Б.Г. на тему: «Механизм действия препарата «Даназол» на метоболизм клеточной линии Mcf10A», выполненной по теме PhD «Исследование молекулярных и физиологических механизмов действия препарата"Даназол" на энергетический метаболизм клеток молочной железы Mcf10A» (2015-2018 гг.), научный руководитель д.б.н., профессор: Тулеуханов С.Т.

№ п/п	Форма внедрения (наименование нового курса, спецкурса, раздела лекции, лаб.работы, установки, учебные пособия и т.п.); курс, специальность	Объем внедрения (количество работ, лекционных часов)	Краткое содержание внедренной работы
1	Результаты НИР ««Механизм действия препарата «Даназол» на метоболизм клеточной линии Mcf10A», внедрены в курс «Основы физиологии животных», 3 кредита, 2 курс бакалавриат по специальности - Биология.	Лекция – 2 часа ««Механизм действия препарата «Даназол» на метоболизм клеточной линии Mcf10A»	Установлены метаболические особенности митохондрий клеточной линии Mcf10A при воздействии разной концентрации препарата даназол.

Материалы к настоящему акту рассмотрены на заседании методического бюро факультета биологии и биотехнологии (протокол № 3 от 24.10 2018 г.)

Члены комиссии:

Директор департамента по академическим вопросам _____ Мухитдинова Т.М.

Директор департамента по науке и инновационной деятельности работе _____ Мухамбетжанов С.К.

Управление методической работы и образавательных технологии _____ Саксенбаева Ж.С.

Декан факультета биологии и биотехнологии _____ Заядан Б.К.

Председатель методбюро факультета биологии и биотехнологии _____ Кулбаева М.С.

Заведующий кафедры биофизики и биомедицины _____ Тулеуханов С.Т.