

Фізіологічний журнал

ТОМ 56 № 4 2010

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

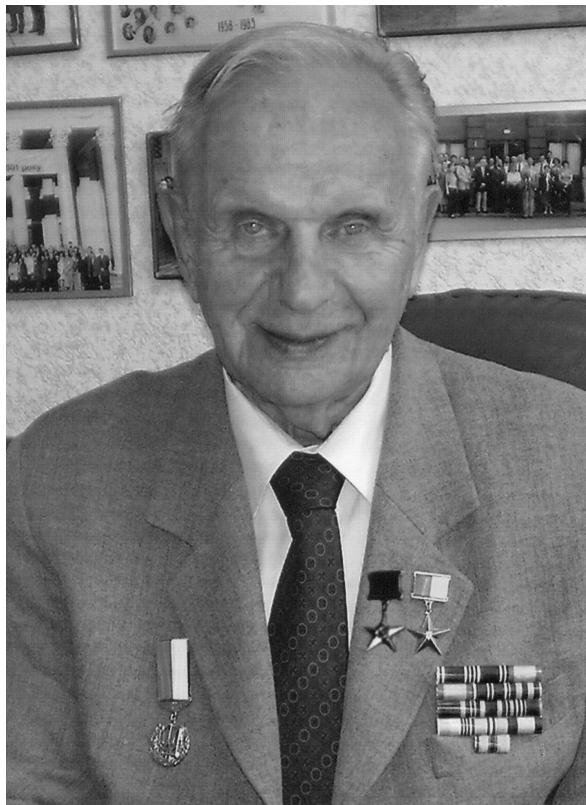
Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Кришталюк О.О., Сагач В.Ф., Шевко А.М.</i> Всесвітня слава науки і гордість українського народу – Платон Григорович КОСТЮК	3
<i>Костюк П.Г.</i> Іони кальцію в клітинному ядрі	10
<i>Savrasova A.V., Lushnikova I.V., Isaeva E.V., Skibo G.G., Isaev D.S., Kostyuk P.G.</i> The effect of neuraminidase blocker on gabazine-induced seizures in rat hippocampus	14
<i>Чорна С.В., Досенко В.Є., Струтинська Н.А., Вавілова Г.Л., Сагач В.Ф.</i> Підвищена експресія потенціалзалежного аніонного каналу й аденіннуклеотидтрансферази та чутливість кальційіндукованої мітохондріальної пори в серці старих щурів	19
<i>Шипшина М.С., Веселовський М.С.</i> Особливості сенсорної нейротрансмісії в культурі нейронів спінальних гангліїв і дорсальних рогів спинного мозку щурів	26
<i>Кириченко В.О., Нагібін В.С., Тумановська Л.В., Досенко В.Є., Рибальченко В.К., Мойбенко О.О.</i> Ефекти заглушення гена убіквітину при анексії–реоксигенації в культурі кардіоміоцитів	37
<i>Ткаченко М.М., Коцюруба А.В., Базілюк О.В., Гороть І.В., Сагач В.Ф.</i> Зміни судинної реактивності та реактивних форм кисню за умов постійного перебування мишей у зоні відчуження	47
<i>Струтинський Р.Б.</i> Вазодилаторні ефекти флокаліну – фторвмісного активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів	59
<i>Лебідь Ю.В., Досенко В.Є., Скибо Г.Г.</i> Експресія мРНК субодиниць протеасоми (PSMB5 та PSMB9) у нейронах гіпокампа при експериментальному цукровому діабеті: зв'язок із процесами апоптозу та некрозу	66
<i>Акопова О.В., Коцюруба А.В., Харламова О.М., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф.</i> Роль мітохондрій у NO-залежній регуляції активності Na ⁺ , K ⁺ -АТФази аорти щурів	76
<i>Власенко О.В., Довгань О.В., Майський В.О., Пілявський О.І., Мазниченко А.В.</i> Ламінарний розподіл активних нейронів у спинному мозку при реалізації харчодобувних стереотипних рухів у щурів	86

<i>Вознесенська Т.Ю., Бризгіна Т.М., Сухіна В.С., Макогон Н.В., Алексєєва І.М.</i> Вплив інгібітора активації NF-kB куркуміну на оогенез і загибель фолікулярних клітин при імунному ушкодженні яєчників мишей	96 102
<i>Фалалєєва Т.М., Кухарський В.М., Берегова Т.В.</i> Вплив тривалого введення глутамату натрію на структурно-функціональний стан шлунка та масу тіла щурів	111
<i>Грінченко О.А., Янчук П.І.</i> Шляхи впливу таурину на шлункову секрецію	
<i>Кірошка В.В., Тищенко Ю.О.</i> Вплив вихідного гормонального статусу тварини-реципієнта на морфологічний стан та ендокринну функцію алотрансплантата оваріальної тканини	121
ОГЛЯДИ	
<i>Костюк О.П., Король Т.Ю., Король С.В., Романенко С.В., Пінченко В.О., Костюк П.Г.</i> Зміна кальцієвої сигналізації як один з механізмів патогенезу хвороби Альцгеймера та діабетичної полінейропатії	130 139
ПАМ'ЯТНІ ДАТИ	
<i>Лук'янець О.О.</i> Пам'яті академіка П.Г. Костюка	

Всесвітня слава науки і гордість українського народу – Платон Григорович Костюк



10 травня 2010 року обірвався життєвий шлях видатного нашого сучасника, все-світньо відомого українського вченого – фізіолога і біофізика, одного з фундаторів клітинної і молекулярної фізіології, талановитого організатора науки, прекрасного педагога, державного діяча, академіка НАН і АМН України, Російської АН, Європейської академії, члена Німецької академії природознавства «Леопольдіна», АН Чехословаччини, Угорської АН, заслуженого діяча науки і техніки України, лауреата Державних премій СРСР, УРСР і України в галузі науки і техніки, престижних вітчизняних, міжнародних і іменних премій,

© О.О. Кришталь, В.Ф. Сагач, А.М. Шевко

*Все моє життя присвячено Науці,
пізнанню таємниць живої природи,
в ім'я збереження повноцінної
життєдіяльності людини.*

почесного члена багатьох закордонних наукових товариств, директора Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, керівника Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України, завідувача кафедри молекулярної фізіології та біофізики Фізико-технічного центру НАН України, кафедри ЮНЕСКО молекулярної і клітинної фізіології, Героя Соціалістичної Праці, Героя України Платона Григоровича КОСТЮКА.

П.Г.Костюк народився 20 серпня 1924 р. у Києві в родині видатного психолога та педагога, засновника Інституту психології у Києві, заслуженого діяча науки і техніки УРСР, академіка АПН СРСР Григорія Силовича Костюка та ученого-хіміка за освітою і родом професії Мотрони Федорівни Лященко. Платон Григорович згадував: «... у дитинстві я часто заходив у лабораторію, де працювала мати і з величезним інтересом роздивлявся прилади, а особливу увагу привертала різної форми посудини з яскравими кольоровими розчинами. Вдома у кабінеті батька була велика бібліотека і стояв рояль «Стэнвей». Я звик проводити час в оточенні музики, книг і знань і це, можливо, визначило мій шлях у науку». Школу він закінчив у червні 1941 р., у день, коли почалася війна. Згодом, коли окупація Києва стала вже реальністю, тоді у свої 16 років він разом з батьком їде до Сталінграда, де вступає до медичного інституту на клінічне відділення та в педагогічний – на відділення іноземних мов.

Добре знання німецької мови ще з дитинства, згодом опанування англійської та французької мов мали велике значення для його вільного спілкування зі світовою науковою елітою. Ще у школі він читав Гете, Шиллера, Гейне в оригіналі. Платон Григорович розповідав, яке враження справив його виступ німецькою мовою і відразу зроблений ним переклад на англійську мову під час відкриття міжнародного симпозіуму з біофізики іонних каналів, організаторами якого були майбутні лауреати Нобелівської премії Берт Сакман та Ервін Негер. Знаком виявлення глибокої поваги до оратора були бурхливі оплески учасників наукового форуму.

У 1942 р. Платон Костюк з батьком дивним чином вибралися з палаючого Сталінграда та згодом приїхали в Кзил-Орду, де він продовжив навчання на біологічному факультеті Об'єднаного медичного університету. У 1943 р. П.Г. Костюка призвали до лав Червоної армії, де він служив у запасному стрілковому полку командиром відділення, потім став курсантом Харківського військово-медичного училища, яке знаходилося в Ашхабаді, а згодом працював фельдшером резервного медичного батальйону. Після демобілізації у 1945 р. повернувся до рідного Києва. В 1946 р. закінчив біолого-грунтознавчий факультет Київського державного університету ім. Т.Г. Шевченка, а у 1949 р. – лікувальний факультет Київського медичного інституту ім. О.О. Богомольця.

Вже в студентські роки П.Г. Костюк почав займатися науковою роботою в лабораторії загальної фізіології при Київському державному університеті ім. Т.Г. Шевченка, яку очолював один із засновників сучасної електрофізіології професор, а згодом академік АН УРСР Данило Семенович Воронцов. З великою зацікавленістю Платон Григорович брав участь у дослідженні механізмів функціонування нервової системи. Цей науковий напрям став голов-

ним в усій подальшій його науковій долі. У 25 років Платон Григорович захистив кандидатську дисертацію на тему «Адаптація нерва к поступенно наростающему электрическому току» і з 1950 р. розпочав викладацьку діяльність на кафедрі фізіології тварин і людини КДУ ім. Т.Г.Шевченка.

У 1956 р. П.Г. Костюк захистив докторську дисертацію «Центральное торможение в простейшей рефлекторной дуге». При виконанні експериментальної роботи він уперше в СРСР у Києві почав застосовувати скляні мікроелектроди для внутрішньоклітинної реєстрації потенціалів нервових клітин й отримав точні дані відносно тривалості синаптичної затримки, а також перебігу поодинокого збуджувального та гальмівного впливу. Результати досліджень були узагальнені у монографії «Двухнейронная рефлекторная дуга». Ця монографія, а також його друга монографія «Микроэлектродная техника» у 1960 р. були відзначені премією ім. І.П. Павлова АН СРСР. З 1956 р. П.Г. Костюк – професор кафедри фізіології тварин та людини КДУ ім. Т.Г. Шевченка і очолює лабораторію загальної фізіології Інституту фізіології цього університету. В 1958 р. він перейшов на роботу до Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР. Заснований Платоном Григоровичем відділ загальної фізіології центральної нервової системи під його керівництвом став одним із відомих осередків світової науки, де було започатковано новий напрям фізіології – клітинна і молекулярна нейрофізіологія, біофізика клітини. У 1959 р. відбулася знаменна зустріч П.Г. Костюка на міжнародному фізіологічному конгресі у Буенос-Айресі з лауреатом Нобелівської премії професором Джоном Керью Екклсом – одним із засновників сучасної фундаментальної нейрофізіології, про яку тепло згадував Платон Григорович: «Я зробив доповідь англійською мовою про дослідження окремих нейронів з допомогою мікроелектродів.

Після виступу до мене раптом підійшов Екклс, наукове світило, і запитав, де я всього цього навчився. Моєю відповіддю про те, що все зроблено самостійно, він був неймовірно здивований і тут же запросив мене до своєї лабораторії в Канберрі в Австралії...». У 1960–1961 рр. в університеті у Канберрі ним були проведені спільні з Дж. Екклсом дослідження з визначення природи гальмування та його значення у рефлекторній діяльності мозку та опубліковано п'ять статей у провідних міжнародних журналах. Спільні наукові роботи з Екклсом, Шмідтом (Німеччина), Іто й Ошимою (Японія) та іншими дали високий індекс цитування у світовій науковій літературі. П.Г. Костюк став добре знайомим ученим в усьому світі

Завдяки розвитку ним сучасного напрямку клітинної і молекулярної нейрофізіології новими гранями засяяв та одержав міжнародне наукове визнання очолюваний Платоном Григоровичем з 1966 р. до останнього дня життя, Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР, а згодом НАН України.

П.Г. Костюк був одним із засновників актуальних наукових напрямів у галузі нейрофізіології (синаптичні процеси в спинному мозку), молекулярної біології та клітинної біофізики (структура та функції іонних каналів, мембранні рецептори).

Використовуючи мікроелектродну техніку для дослідження структурно-функціональної організації нервових центрів, біофізичних і молекулярних механізмів збудження та гальмування в нервових клітинах, П.Г. Костюк ефективно працював над удосконаленням наукових досліджень за допомогою модернізації старої апаратурної бази і поповнення її новими приладами, які він разом зі своїми співробітниками розробляв і впроваджував в експериментальну роботу. Винахідницька діяльність була успішною. П.Г. Костюк – автор 7 патентів на винаходи приладів для

електрофізіологічних досліджень. За розробку та створення унікальних приладів для клітинних електрофізіологічних досліджень Платону Григоровичу разом зі співробітниками його відділу та дослідно-конструкторського виробництва Інституту фізіології у 1976 р. присуджено Державну премію в галузі науки і техніки УРСР.

П.Г. Костюк створив великий творчий колектив, який під його керівництвом успішно вивчав нейронну організацію різних відділів спинного мозку та виявив низку особливостей супраспінальних впливів на передачу аферентної імпульсації через спинний мозок. У монографії «Структура і функція нисходящих систем спинного мозга» узагальнюються результати власних досліджень структурної організації і функціональних особливостей цереброспінальних взаємовідношень, роль надсегментарного гальмування. Цю працю у 1977 р. було відзначено премією ім. І.М. Сеченова АН СРСР.

Платоном Григоровичем розроблено оригінальні методики, за допомогою яких плідно вивчалися закономірності діяльності клітинної мембрани. Поряд із фармакологічними впливами на окремі типи іонних каналів, з'явилася можливість розділяти та реєструвати електричні струми і вивчати властивості та кінетику натрієвих, кальцієвих і калієвих іонних струмів. Проведено також дослідження активності транспорту іонів крізь плазматичну мембрану. На підставі цих досліджень були висунуті принципово нові положення щодо механізмів діяльності іонних каналів, які забезпечують збуджувальність соматичної мембрани. За цикл досліджень «Исследования ионных механизмов возбудимости сомы нервной клетки» П.Г. Костюку, О.О. Кришталю, І.С. Магурі та В.І. Підоплічко присуджено Державну премію СРСР (1983).

Велике значення мають дослідження властивостей потенціалкерованих кальціє-

вих каналів. Завдяки застосуванню математичної моделі, з'явилась можливість кількісно оцінювати діяльність їх ворітних механізмів. Уперше був зареєстрований «ворітний струм» кальцієвих каналів. За допомогою особливої модифікації методу внутрішньоклітинного діалізу вдалося зареєструвати флуктуації струмів, зумовлених активністю окремих кальцієвих каналів, та виміряти функціональні характеристики останніх. У 1983 р. у Державному комітеті СРСР у справах винаходів та відкриттів за № 276 було зареєстровано відкриття «Явление избирательной саморегулируемой кальциевой проводимости мембраны сомы нервной клетки» (П.Г. Костюк, О.О. Кришталь, В.І.Підоплічко). Ця робота також була відзначена міжнародною премією імені Луїджі Гальвані (1992 р., США).

Зважаючи на те, що іонам кальцію належить винятково важлива роль регуляції внутрішньоклітинних процесів у нормі та патології, з 1983 р. основні дослідження Платона Григоровича та його співробітників спрямовані на вивчення механізмів гомеостазу іонів кальцію у нервових клітинах і його порушень при мозковій патології. На основі фундаментальних досліджень структури та функції іонних каналів, мембранних рецепторів нервових клітин П.Г.Костюк відкрив нові факти стосовно їх молекулярних, кінетичних, фармакологічних властивостей. Ці дослідження показали наявність родини потенціалкероаних мембранних каналів, здатних з високою селективністю створювати вхідний струм кальцію при деполяризації нейрональної мембрани. Уперше ці канали були поділені на дві основні функціональні групи: низько- та високопорогові.

За монографію «Кальций и клеточная возбудимость» П.Г. Костюку присуджено премію ім. О.О.Богомольця АН України (1987). У результаті досліджень властивостей синаптичної передачі та молекулярних механізмів, що її забезпечують у

нейронах центральної, периферичної та вегетативної нервових систем, створена теоретична основа для пошуку селективно діючих фармакологічних і біологічно активних препаратів та ефективної цілеспрямованої корекції патологічних станів. За цикл наукових праць «Синаптична передача сигналів у нервовій системі: клітинні і молекулярні механізми та шляхи корекції їх порушень» П.Г. Костюку та співавторам було присуджено (2003) Державну премію у галузі науки і техніки України.

П.Г. Костюк створив вітчизняну школу дослідників у галузях нейрофізіології, клітинної та молекулярної фізіології, біофізики клітини, яка здобула всесвітнє визнання. Створене Платоном Григоровичем оригінальне наукове направлення сприяє розкриттю найскладніших і тонких механізмів життєдіяльності нервової клітини, є теоретичним фундаментом для розуміння діяльності мозку, стало сприятливим ґрунтом для масштабних досліджень природи збудження і гальмування на молекулярному рівні, дало змогу зробити відкриття в галузі синаптичних процесів у нервовій системі, було зроблено неоціненний внесок у розуміння механізмів гомеостазу іонів кальцію в нервових клітинах у нормі та при прояві патологічних станів (цукровий діабет, фенілкетонурія, епілепсія, гіпоксія).

П.Г. Костюк підготував 28 докторів і 97 кандидатів наук. Багато десятиріч вів велику педагогічну діяльність: читав лекції для студентів Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Національного технічного університету України, Національного університету «Києво-Могилянська академія». Як засновник вивчення біофізики нервової клітини він був ініціатором створення базової кафедри молекулярної фізіології та біофізики Київського відділення Московського фізико-технічного інституту, яку очолював з 1983 р.

Платон Григорович з великою увагою і батьківською опікою відносився до молоді, яка прагнула одержати знання, майстерно прищеплював їй любов до справи свого життя – до науки. Його лекції з фізіології, нейрофізіології, біофізики клітини студенти слухали із великою зацікавленістю. Це було зумовлено тим, що Платон Григорович мав великий лекторський дар, мабуть, генетично успадкований від батька, вмів дуже майстерно викласти у доступній формі складний матеріал, захоплено розкриваючи наукові обрії. Назавжди у пам'яті співробітників його відділу залишаться платонівські наукові семінари, які проходили протягом 50 років кожної п'ятниці. На них обговорювали щойно отримані результати наукових досліджень і давали корисні поради. Серед 16 монографій П.Г. Костюка – 4 підручники. Великою популярністю користується його підручник «Физиология центральной нервной системы». За підручник «Биофизика», який вже перевидано українською мовою, П.Г.Костюку зі співавторами присуджено у 1992 р. Державну премію в галузі науки і техніки України. Платон Григорович має майже 1200 наукових праць. Основні його праці: Двухнейронная рефлекторная дуга. М.: Медгиз, 1959; Микроэлектродная техника. Киев: Изд-во АН УССР, 1960; Структура и функция нисходящих систем спинного мозга. М., Наука, 1973; Кальций и клеточная возбудимость. М., Наука, 1986; Calcium ions in nerve cell function, Oxford University Press, 1992; Calcium signalling in the nervous system (P.G. Kostyuk, A.N. Verkhratsky) – Chichester; Wiley, 1955; Plasticity in Nerve Cell Function, Clarendon Press Oxford, 1998; Біофізика (П.Г. Костюк, В.Л. Зима, І.С. Магура, М.С. Мірошніченко, М.Ф. Шуба), Київ: Обереги, 2001; Биофизика одиночного синапса (М.С. Веселовський, С.А. Федулова, П.Г. Костюк), Киев: Наук. думка, 2004; Іони кальцію у функції мозку. Від фізіології до патології (П.Г. Костюк, О.П. Кос-

тюк, О.О. Лук'янець), Київ: Наук. думка, 2005; Над океаном времени (П.Г. Костюк, Ю.Г. Виленский, А.Н. Шевко) Київ: Наук. думка, 2005.

Очолювані П.Г.Костюком відділ загальної фізіології нервової системи і створений ним Міжнародний центр молекулярної фізіології – провідні у світовій науці заклади з вивчення молекулярних механізмів функціонування нервових клітин. Свідченням міжнародного визнання рівня наукових досліджень в Інституті під керівництвом П.Г. Костюка є створення у 2000 р. за рішенням ЮНЕСКО міжнародної кафедри молекулярної і клітинної фізіології під керівництвом Платона Григоровича і лауреата Нобелівської премії Ервіна Негера.

Інтенсивну та плідну наукову роботу П.Г.Костюк успішно поєднував з науково-організаційною, науково-педагогічною працею та громадською діяльністю. З 1976 р. він входив до складу Президії АН СРСР, а у 1976–1988 рр. був академіком-секретарем Відділення фізіології АН СРСР. Президентом АН СРСР у той час був всесвітньо відомий фізик академік А.П. Александров, віце-президентами – академіки В.О. Котельніков, Ю.А. Овчинніков, Г.І.Марчук (1986–1991 – президент АН СРСР), Є.П. Веліхов. До складу президії входили видатні вчені лауреати Нобелівської премії академіки О.М. Прохоров, М.М.Семенов, М.Г.Басов, П.Л.Капіца, академіки М.В. Келдиш (1961–1974 – президент АН СРСР), О.О.Баєв, М.М.Боголюбов, В.А. Амбарцумян, М.О.Лавренєв, Б.Є. Патон, М.М. Емануель, Г.К. Скрябін та ін. Співпраця та спілкування з провідними вченими мали великий вплив на формування Платона Григоровича як організатора науки та відомого громадського діяча. З 1993 по 1998 рр. П.Г. Костюк був віце-президентом НАН України, з 1988 по 2004 рр. – член Президії НАН України. До останніх днів був радником Президії НАН України та членом Президії АМН України, головою Державного

фонду фундаментальних досліджень в Україні. П.Г. Костюк обирався депутатом Верховної Ради УРСР (1975–1990) 9, 10, та 11 скликань. На сесії 11 скликання П.Г. Костюка було обрано Головою Верховної Ради України. Саме під час його головування Верховна Рада прийняла закон про українську мову як державну. Платон Григорович входив до складу керівних органів багатьох міжнародних наукових товариств, обирався віце-президентом Міжнародної організації з вивчення мозку IBRO (1974–1979), головою Радянського комітету IBRO (1974–1990), віце-президентом Міжнародного союзу теоретичної та прикладної біофізики (1975–1980), членом центральної ради Всесоюзного товариства ім. І.П. Павлова (1965–1991), членом центральної ради та віце-президентом Міжнародної спілки фізіологічних наук (1980–1994), віце-президентом Федерації Європейських спілок фізіологічних наук (1991–1995), з 1968 р. очолював Українське фізіологічне товариство, а з 2005 р. – президент Спілки фізіологічних товариств СНД.

П.Г. Костюк був засновником і головним редактором (1969–1988) та співредактором з 1993 р. наукового журналу «Нейрофізіологія/ Neurophysiology», який перекладається англійською мовою видавничою фірмою «Пленум Паблішінг-корпорейшн» (США, Велика Британія); один із засновників і співредактор (1976–1999) міжнародного журналу «Neuroscience» (Оксфорд, Велика Британія), головним редактором (з 1993 р.) журналу «Доповіді НАН України», членом багатьох російських та українських редакційних колегій. Платон Григорович був постійним учасником та організатором багатьох міжнародних наукових форумів.

Його доповіді вражали науковців новизною результатів, оригінальністю методичних розробок, новаторськими ідеями, яскравим ілюстративним матеріалом,

точністю та емоційністю мови.

Наукові праці та доповіді Платона Григоровича – золотий фонд світової науки.

За видатні досягнення у розвитку фізіологічної науки, вагомий внесок у підготовку висококваліфікованих кадрів, активну педагогічну та громадську діяльність Платона Григоровича було відзначено багатьма нагородами: Президента України, Почесними грамотами Верховної Ради та Кабінету Міністрів України, почесними званнями та медалями. П.Г. Костюк – Герой Соціалістичної Праці (1984) і Герой України (2007). Його нагороджено Дипломом Президента України за значний особистий внесок у розвиток нейрофізіологічної науки та створення національної школи нейрофізіології (1993), нагороджений двома орденами Леніна (1981, 1984), двома орденами Трудового Червоного Прапора (1967, 1974), орденом Ярослава Мудрого V ступеня (1998), орденом «За заслуги» III ступеня (1993), орденом Держави (2007). У 2005 р. П.Г. Костюку було вручено найвищу нагороду НАН України – золоту медаль ім. В.І. Вернадського під № 2. За видатні досягнення у розвитку інтернаціональної науки наукова спільнота відзначила українського вченого світовою медаллю Свободи (2006), у 2007 р. – золотою медаллю (США) для України і медаллю ім. Леонарда Ейлера Європейської академії природничих наук (Гоновер, 2009 р.). П.Г. Костюк має звання «Почесний доктор Київського національного університету ім. Тараса Шевченка» (2009). За цикл робіт “Кальциевая сигнализация в нервной клетке” його нагороджено золотою медаллю ім. І.М. Сеченова РАН (2009).

П.Г. Костюк – це багатогранна обдарована яскрава постать. Платон Григорович розповідав, що в Австралії у дворі університету був чудовий корт, де він уперше взяв у руки ракетку та з того часу до останніх років з нею не розлучався. Пізніше, вже на Ельбрусі, де наш Інститут мав високогірну

наукову базу, він захопився гірськими лижами. Оволодівши цією непростою справою майже у 50-річному віці, він згодом багато ходив на лижах у Карпатах, де часто проводили наукові школи, на гірських лижних трасах в Австрії, Швейцарії. Він добре розбирався у живопису, часто відвідував театр і філармонію. З великим задоволенням слухав українські пісні, сам чудово співав, дуже любив класичну музику у виконанні симфонічного оркестру, а вдома у нього була зібрана величезна колекція музичних записів. У молоді роки він навіть вчився на вечірньому відділенні в консерваторії по класу фортепіано, але згодом зрозумів, що музика – це не його життєвий шлях.

Неоціненний особистий науковий внесок видатного українського вченого Платона Григоровича Костюка має величезний вплив на розвиток магістральних напрямків нейрофізіології, клітинної та молекулярної фізіології, біофізики, патофізіології, фармакології, медицини ХХ та ХІ століть. Його життя є яскравим прикладом безмежної відданості обраній справі – біологічній науці, прогрес якої Платон Григорович здійснював в інтересах України та всього людства.

Неймовірно важко говорити про Платона Григоровича у минулому часі, серце стискається від болю. Благородну місію Платона Григоровича Костюка – феноменального дослідника в біологічній науці достойно продовжують його численні талановиті учні, яким випала щаслива доля працювати з ним і вчитися у нього, колеги,

послідовники в Україні, а також у різних наукових центрах світу.

Вітчизняна і світова наукова спільнота вжахнулася від страшної звістки про те, що неблаганна смерть вирвала з життя безмежно талановиту, мудру, високопорядну, надзвичайно чуйну та добру людину, яка зігрівала душевним теплом усіх, хто його оточував. Зупинилося серце люблячого і любимого чоловіка, батька, дідуся, друга, колеги, вчителя і наставника. Вчені Національної академії наук України, Верховна Рада України ушанували пам'ять академіка Платона Григоровича Костюка хвилиною мовчання. Родині вченого, колективам співробітників Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, яким він успішно керував 45 років, Міжнародного центру Молекулярної фізіології НАН України, створеного і очолюваного ним, висловили свої щирі співчуття Президент, Прем'єр-міністр, Голова Верховної Ради України, Президент Національної академії наук України, відомі вітчизняні вчені, керівники провідних наукових центрів різних країн світу, однодумці у наукових пошуках – лауреати Нобелівської премії, численна когорта талановитих його вихованців-учнів, колеги і друзі. Всі, хто знав Платона Григоровича, у глибокій скорботі низько схилили голови перед величчю, шляхетністю та добротою цієї неординарної людини, перед світлою пам'яттю про нього. У безмежному небі людської шани і пам'яті яскраво засяяла неповторна зірка корифея фізіологічної науки – Платона Григоровича Костюка.

Іони кальцію в клітинному ядрі

Структура ядерної оболонки. Клітинні ядра мають складну за структурою оболонку, що відгороджує генетичний апарат від решти цитоплазми. Вона складається з двох мембран – зовнішньої та внутрішньої – між якими знаходиться порожнина – перинуклеарний простір. Важливо, що останній сполучений з луменом ендоплазматичного ретикулума (ЕР) у зв'язку з тим, що мембрана ЕР морфологічно сполучена з зовнішньою мембраною ядра; тому перинуклеарний простір можна розглянути як специфічну частину ЕР.

Тому значний інтерес має з'ясування можливості наявності в ядрі власного кальцієвого депо, яке могло б функціонувати як посередник у передачі цитозольних кальцієвих сигналів у нуклеоплазму. Дійсно, за допомогою конфокальної мікроскопії була підтверджена наявність таких депо [5]. Вони утворюються між внутрішньою ядерною мембраною та прилеглою мембраною ЕР і можуть ефективно накопичувати Ca^{2+} за рахунок активності відповідної SERCA-помпи.

Відповідно повинні існувати молекулярні механізми, що передають сигнали в нуклеоплазму через внутрішню мембрану ядерної оболонки. Технічний інтерес має створення можливостей визначення наявності іонних каналів і рецепторів саме на цій мембрані. Це стало можливим завдяки розробленню техніки отримання ізольованих клітинних ядер з наступним усуненням зовнішньої ядерної мембрани через утримання їх в 1%-му розчині цитрату натрію з додаванням 5 ммоль/л діетилтритола. Така процедура призводить до усунення зовнішньої

ядерної оболонки без пошкодження внутрішньої [7]. Після цього можлива реєстрація поодиноких іонних каналів методом patch-clamp (“nucleus attached patch-clamp”).

Іонні канали ядерної оболонки. Найбільш помітними каналами ядерної оболонки є «канали великої провідності», які реєструються як у зовнішній, так і внутрішній мембранах. Їх провідність в мембранах ядер нейронів Пуркінє мозочка практично ідентична (198 ± 27 та 199 пк См ± 17 пк См). Вони є мало селективними для моновалентних катіонів та практично непроникними для двовалентних [1]. Аналогічні канали були також зареєстровані в нейронах гіпокампа. Їх активність залежала від потенціалу, який підтримувався на мембрані. В зовнішній мембрані вони були практично відкритими при негативних потенціалах, а при позитивних їх активність різко зменшувалась. І навпаки, на внутрішній мембрані потенціалзалежність відкритого стану була протилежною. На рис. 1 представлені записи активності таких каналів та їх вольт-амперні характеристики, а на рис. 2 – залежність відкритого стану від потенціалу мембрани (чорні кола позначають активність каналів зовнішньої, а білі кола – активність каналів внутрішньої мембрани).

Наявність зазначених каналів великої провідності характерна і для ядерних оболонок інших типів центральних нейронів. Очевидно, що такі канали забезпечують прямий зв'язок між нуклеоплазмою або цитоплазмою та перинуклеарним простором і забезпечують транспорт одновалентних катіонів між цими структурами. Тобто

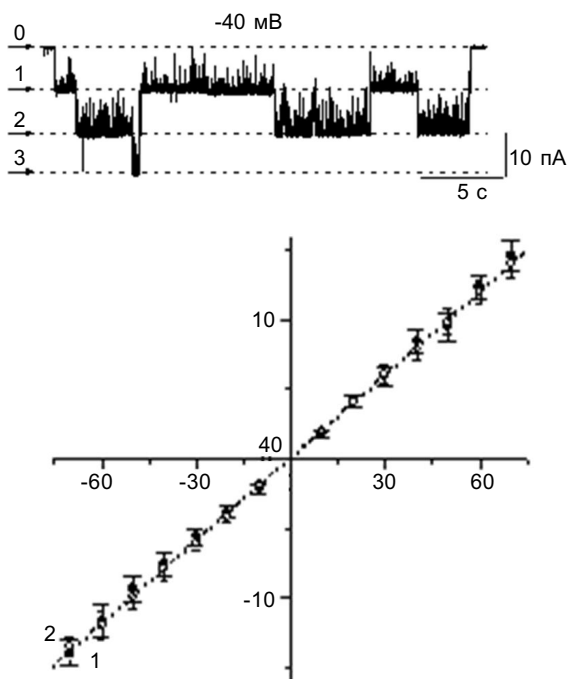


Рис. 1. Характеристики катіонних каналів великої провідності мембран ядерної оболонки нейронів Пуркінє мозочка. Записи активності каналів (цифри зліва вказують на кількість відкритих каналів) та їх вольт-амперні характеристики для зовнішньої (1) та внутрішньої (2) мембрани в симетричному розчині 150 ммоль/л KCl

вони відповідають характеристикам, що властиві ядерним порам і, можливо, формують такі пори.

Актуальним є питання про те, чи можуть і яким механізмом можуть передаватися в клітинне ядро ті розглянуті вище внутрішньоклітинні сигнали, що виникають при життєдіяльності клітини. В цьому відношенні дуже важливим фактом є зазначена вище наявність в ядерній оболонці кальцієвого депо, яке споріднене з відповідним депо ER і створює можливість генерації ним кальцієвих сигналів у нуклеоплазму.

У цьому відношенні істотним є відкриття в ядерній мембрані IP_3 -рецепторних структур; ріанодинових рецепторів у ній не було виявлено [4]. При цьому дуже важливою виявилась експресія IP_3 -активованих кальцієвих каналів саме на внутрішній мембрані ядерної оболонки; відповідно при

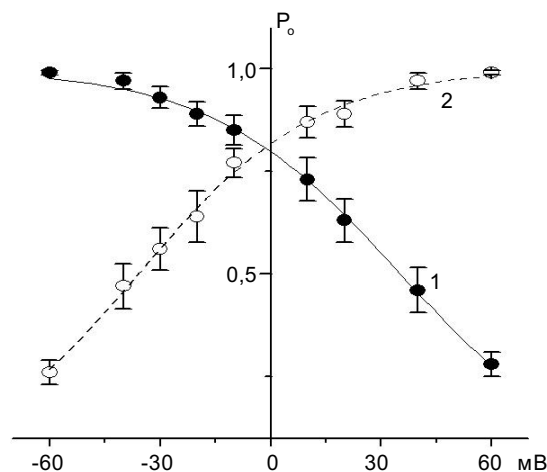


Рис. 2. Залежності відкритого стану катіонних каналів зовнішніх (1) та внутрішніх (2) ядерних мембран від трансмембранного потенціалу

їх активації буде виникати відтік Ca^{2+} безпосередньо в нуклеоплазму. Така активація можлива під впливом як IP_3 , так і Ca^{2+} .

Запропонована певна модель термінації відповідних кальцієвих каналів. Вивільнення Ca^{2+} з перинуклеарного депо спряжене з перенесенням великого електричного заряду і буде призводити до появи негативного потенціалу в перинуклеарному просторі. При цьому активація катіонних каналів великої провідності буде зменшуватися. Можливо, що вони необхідні для тривалої регуляції активності IP_3 -рецепторів. При досягненні значних негативних значень цього потенціалу може наступити певне блокування IP_3 -рецепторів і припинення виділення Ca^{2+} з депо в нуклеоплазму [4].

На рис. 3 представлена залежність вірогідності відкритого стану IP_3 -каналів ядерної оболонки нейронів Пуркінє та пірамідальних нейронів від мембранного потенціалу.

Цікаво, що кальцієві сигнали в нуклеоплазмі можуть виникати з більш швидкою кінетикою, ніж аналогічні сигнали в цитоплазмі. Причиною цього є дуже тісні просторові зв'язки між перинуклеарним простором та нуклеоплазмою. Певно це має істотне значення для своєчасної та ефективної активації експресій генів та

інших ядерних процесів. Особливе значення такі характеристики відповідних процесів мають в ембріональних клітинах, коли відбувається процеси їх диференціювання.

Функції внутрішньоядерної сигналізації. Функціональна роль сигналів, що передаються в нуклеоплазму, складна і не повністю з'ясована. Вона проявляється вже на самих ранніх стадіях транскрипції генів родини C-fos і C-jun [8], залежність транскрипції C-fos-генів від вмісту Ca^{2+} в ядрі має дзвоноподібну характеристику з максимум близько 250 нмоль/л [10]. Навіть коротке (приблизно хвилина) підвищення цього рівня було достатнім для максимального впливу на швидкість транскрипції в гліальних і лейкоцитних клітинах.

Цікаво, що ефективність таких змін у транскрипції залежала також від того, яким шляхом Ca^{2+} надходили в клітину з позаклітинного середовища. Так, у нейронах гіпокампа їх деполяризація гіперкалієвим розчином значно ефективніше стимулювала таку транскрипцію підвищенням $[\text{Ca}^{2+}]_i$ активацією NMDA-рецепторів [2]. Очевидно, просторові та часові характеристики кальцієвої хвилі істотні для визначення ефективності й очевидності внутрішньоядерної сигналізації.

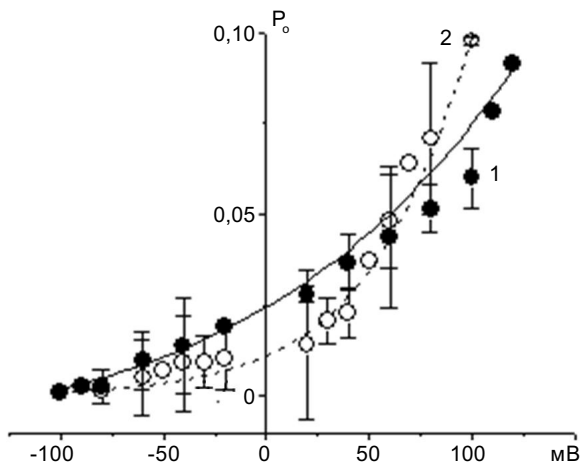


Рис. 3. Залежність сил вірогідності відкритого стану IP_3 -каналів внутрішньої ядерної мембрани нейронів Пуркінє (1) та пірамідальних нейронів (2) від мембранного потенціалу

У нервових клітинах також продемонстрована залежність їх диференціації від надходження кальцієвих сигналів у нуклеоплазму, залежної від генетичної транскрипції. Так, у нейронах задньокорінцевих гангліїв відмічено зв'язок між ростом і розгалуженням їх нейритів і величиною внутрішньоядерних Ca^{2+} -транз'єнтів [3]. Такі сигнали значної амплітуди були зареєстровані саме в ембріональних нейронах цього типу; в постнатальних клітинах їх амплітуда істотно зменшувалася [9].

З іншого боку, пригнічення можливості такої сигналізації спричиняє протилежні ефекти. Як пригнічення витоку іонів кальцію, так спустошення відповідних депо призводить до пригнічення клітинної диференціації в період максимального її розвитку, спричиненого відповідними процесами генетичної транскрипції [6]. Під час визрівання клітин послаблюється виникнення осциляцій; відповідно припиняється можливість їх реплікації та диференціації.

Разом з тим питання про роль внутрішньоядерної кальцієвої сигналізації залишається певною мірою дискусійним, оскільки в багатьох дослідженнях не вдалося зареєструвати наявності істотної різниці у вмісті вільних іонів кальцію між цитоплазмою та нуклеоплазмою, яке могло б сприяти такій сигналізації. Ймовірно, що іони кальцію вільно проходять через внутрішньоядерну мембрану, що не підтримує можливості створення градієнта їх концентрації на цій мембрані, яка сприяла б виникненню відповідних сигналів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Федоренко О.А., Дужий Д.Є., Марченко С.М. Катіонні канали великої провідності в ядерній оболонці нейронів Пуркінє мозочка шурів // *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2007. – **39**, №3. – С. 13–18.
2. Bading H., Ginty D.D., Greenberg M.E. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways // *Science*. – 1993. – **260**. – P. 181–186.

3. Birch B.D., Eng D.L., Kocsis J.D. Intracellular Ca^{2+} transients during neurite regeneration of an adult mammalian neuron // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1993. – **89**. – P. 7978–7982.
4. Fedorenko O.A., Duzhyy D.?E?, Marchenko S.?M. Ca^{2+} channels in the nuclear membrane of hippocampal pyramidal neurons // Acta Physiol. – 2006. – P. 183–186.
5. Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Tepikin A.V., Petersen O.H. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope // Cell. – 1995. – **80**. – P. 439–444.
6. Holliday J., Adams R.J., Sejnowski T.J., Spitzer N.C. Calcium-induced release of calcium regulates differentiation of cultured spinal neurons // Neuron. – 1991. – **7**. – P. 787–796.
7. Humbert J.P., Matter N., Artault J.C., Koppler P., Malviya A.N. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**. – P. 478–485.
8. Roche E., Prentki M. Calcium regulation of immediately response genes // Cell. Calcium. – 1994. – **16**. – P. 331–338.
9. Utzschneider D.A., Rand M.N., Waxman S.G., Kocsis J.D. Nuclear and cytoplasmic Ca^{2+} signals in developing rat dorsal root ganglion neurons studied in excised tissue // Brain. Res. – 1994. – **635**. – P. 231–237.
10. Werlen G., Belin D., Conne B., Roche E., Lew D.P., Prentki M. Intracellular Ca^{2+} and the regulation of early response gene expression in HL-60 myeloid leukemia cells // J. Biol. Chem. – 1993. – **268**. – P. 16596–16601.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 29.04.2010*

A.V. Savrasova, I.V. Lushnikova, E.V. Isaeva, G.G. Skibo, D.S. Isaev, **P.G. Kostyuk**

The effect of neuraminidase blocker on gabazine-induced seizures in rat hippocampus

Concentration of neuraminidase (NEU), an enzyme which cleaves negatively charged sialic acids from carbohydrate moieties of the cellular membrane, could vary depending on physiological conditions. Multiple evidences suggest that fluctuations of NEU extracellular concentrations can influence neuronal activity. In the present study we examined the effect of down regulation of endogenous NEU activity on seizure-like activity (SLA) induced by gabazine (specific blocker of inhibitory synaptic transmission) in the hippocampal CA1 pyramidal region of cultured slices. We show that in slices pretreated with the blocker of endogenous NEU, N-acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid (NADNA), duration of synchronous oscillations induced by gabazine was considerably increased comparatively to control untreated slices. This study adds further information that changes in the level of NEU activity is an important factor, which can affect neuronal network excitability.

Keywords: polysialic acid, neuraminidase blocker, seizure, gabazine, hippocampus.

INTRODUCTION

Polysialic acid, a large cell-surface negatively charged carbohydrate, regulates manifold physiological functions including cell migration, axon outgrowth, neurogenesis, synaptogenesis and neuronal excitability [7,10,16]. A key enzyme, which regulates the level of sialic acid in the cell outer membrane, is endogenous NEU [14, 15]. Concentration of NEU in the brain could vary in dependence on physiological conditions [2] and many studies suggest that increasing in the level of the extracellular concentrations of NEU can affect cell-to-cell interactions, synaptogenesis and influence neuronal activity [7,13,17]. However, there is a lack of studies devoted to investigation of the effect of endogenous NEU deficiency on the cellular and neuronal network activity. In our recent study we showed that seizures induced by infusion of the high-potassium/low magnesium (High-K⁺/low Mg²⁺) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) into hippocampus were significantly longer and seizure threshold was decreased in rats pretreat-

ed by the NEU blocker [7]. A major goal of the present study was to determine how oversialylation following blockade of endogenous NEU affected the hippocampal seizures evoked by gabazine, a specific GABA_A receptor inhibitor. The mechanism of seizure induction in gabazine model of seizures is based on the blockage of synaptic inhibition. The etiology of temporal lobe epilepsy is closely associated with hippocampal changes in GABA_A receptor expression and function [3,11,18,20]. In the present study we showed that in hippocampal slices pretreated with specific NEU blocker epileptiform activity induced by blockade GABAergic transmission was considerably exacerbated.

METHODS

All procedures used in this study were approved by the Animal Care Committee of Bogomoletz Institute of Physiology.

Slice cultures were prepared using the method of Stoppini et al. [12,19]. Briefly, Wistar rat pups were anesthetized and decapi-

tated at postnatal day 7. The brains were removed and hippocampi were cut into 350 μm transverse sections using a McIlwain tissue chopper. Slices were then transferred to sterile porous membrane inserts (Millicell, Bedford, MA, USA), which were placed in a 6-well plate containing 1 ml culture medium/well (50% of MEM, 25% horse serum (HS), 25% HBSS, 5 mM Tris, 2 mM NaHCO_3 , 12.5 mM HEPES, 15 mM glucose, 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, pH 7.2) and cultivated at $+35^\circ\text{C}$ at air atmosphere with 5% CO_2 . The culture medium was changed the next day after preparation of the slices and then twice a week. All experiments with organotypic hippocampal slice cultures were performed at 14-21 days in vitro. For recordings, slices were transferred to a submersion-type chamber mounted to the microscope (Olympus BX50WI, Japan) and superfused with the oxygenated ACSF of the following composition (mM): NaCl 126, KCl 3.5, CaCl_2 2.0, MgCl_2 1.3, NaHCO_3 25, NaH_2PO_4 1.2 and glucose 11. Extracellular field potentials were recorded from hippocampal CA1 pyramidal layer using borosilicate glass pipettes filled with ACSF. Pipette resistance was 1-3 M Ω . Recordings were performed using AC differential amplifier (A-M

Systems, Carlsborg, WA, USA) (bandpass 0.1 Hz-1 kHz; 100) and digitized at 10 kHz online with an analogue-to-digital converter (NI PCI-6221, National Instruments, Austin, TX, USA) and stored on a computer using WinWCP program (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Glasgow, UK). Off-line analysis of the recordings was performed using Clampfit (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA) and Origin 7.0 (Microcal Software, Northampton, MA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Field potential recordings were performed from hippocampal CA1 pyramidal layer in organotypic slice culture. Bath application of 10 μM of gabazine led to the increase of neuronal activity following spontaneous interictal-like discharges in all control slices (Fig 1). To examine the effect of downregulation of the endogenous NEU activity cultured hippocampal slices were incubated with NADNA (2mM) during 2 hours. SLA was induced in all 10 slices pretreated with NADNA (Fig 1). This activity persisted as long as gabazine was kept in extracellular solution in control as well as in NADNA pretreated slices. The fre-

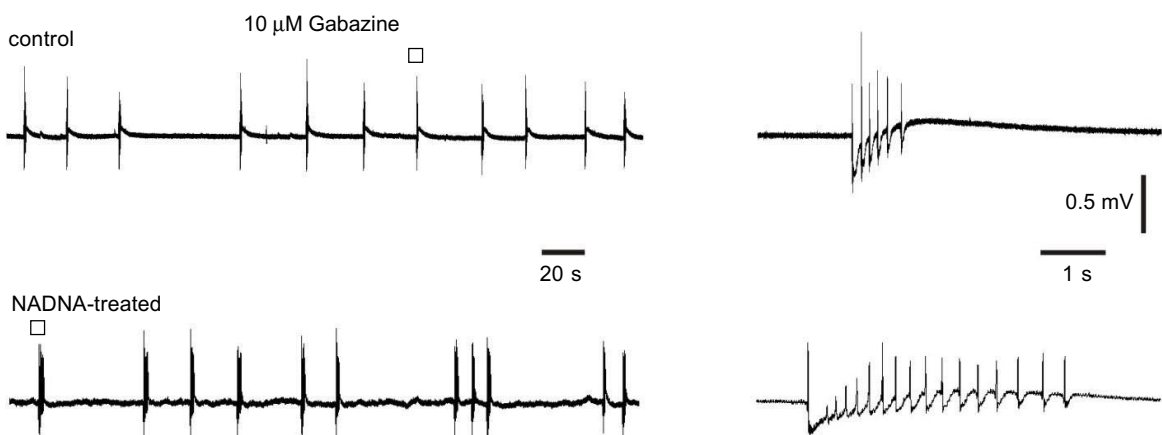


Fig.1. Effect of NEU activity suppression on gabazine-induced SLA in cultured hippocampal slices. Extracellular field potential recordings from CA1 pyramidal cell layer in the presence of 10 μM gabazine in control (upper panel) and NADNA pretreated (lower panel) slices. Spontaneous discharges marked with squares shown in expanded scales in the right panel

quency of synchronous discharges during SLA for both control and NADNA-pretreated slices was $0,03 \pm 0,01$ Hz (Fig 2a). However the duration of synchronous oscillations was significantly increased in NADNA pretreated slices comparatively to controls ($2,1 \pm 0,3$ s in control vs $3,8 \pm 0,7$ s in NADNA pretreated slices; $p < 0,05$, Fig 2b). These data are in agreement with our previous report when blockade of endogenous NEU significantly reduced seizure threshold and aggravated hippocampal seizures induced by infusion of High- K^+ /low Mg^{2+} solution in vivo [7]. Previous studies have shown that pretreatment of slice with NEU significantly altered kinetic properties of the voltage-gated sodium channels [1,7,15]. The authors connected this phenomenon with a presence of the negatively charged sialic acid residues on the extracellular surface region of the channel [6,9]. The charge created by these carbohydrates constantly influences the gating apparatus of the channel. Pretreatment with NEU removes sialic acid residues from the extracellular membrane and as a result shifts channel activation curve to the depolarized direction [7,15]. Further support of the idea that sialic acids contribute to the voltage dependence of sodium channel gating was obtained using recombinant deletion of likely glycosylation sites

from the sodium channel sequence [1]. The deletion of the channels glycosylation sites resulted in mutant channels that gated at voltages up to 10 mV more positive than wild-type channels. In our previous study pretreatment with NEU led to increase in the action potential threshold following decreasing of neuronal activity [7]. The blockade of the endogenous NEU in our present study has an opposite effect on the neuronal network activity. It was demonstrated that seizure intensity in a kindling model of epilepsy were not altered when NADNA was administered concurrently with NEU. So there is no direct proconvulsant effect of NADNA on SLA [7]. We proposed that NEU deficiency lead to accumulation of sialic acid in extracellular region and as a result increases open probability of the sodium channels which leads to enhancement of the neuronal excitability. Recent studies strongly support this assumption. It was shown that NEU inhibitors induced paired-pulse facilitation in population spikes without changes in excitatory postsynaptic potentials in the CA1 region of hippocampal slices and enhanced synchronization in rat hippocampal CA3 networks [8,21]. Also the fact that inherited diseases (sialidosis, galactosialidosis, Salla disease etc.) concerned with defective or deficient metabolism of endogenous NEU

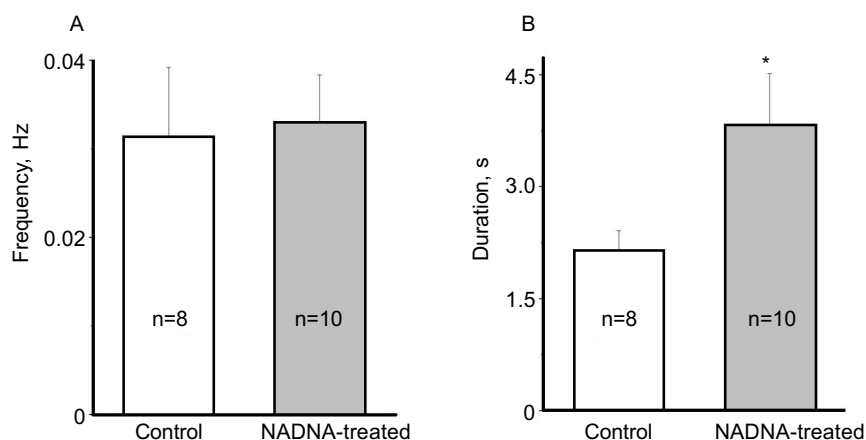


Fig.2. Effects of NADNA pretreatment on different characteristics of gabazine-induced SLA in CA1 pyramidal layer. Summary plots show the PS frequency (A) and duration (B) during the epileptiform discharges in control (white) and NADNA pretreated (grey) slices. All values are mean \pm SEM, * $P < 0,05$ versus control. N designates the total number of slices in each experimental group

and sialic acid are often accompanied with epilepsy, exemplifies a substantial role of the level of sialylation in regulation of neuronal activity [4,5,22]. Present study adds further evidence that modulation of NEU activity renders a substantial influence on neuronal network excitability.

ACKNOWLEDGEMENTS Supported by Christopher Donalnty and Kyle Coggins Memorial grant.

**А.В. Саврасова, І.В. Лушнікова, О.В. Ісаєва,
Г.Г.Скибо, Д.С. Ісаєв, П.Г. Костюк**

ЭФФЕКТ БЛОКАТОРА НЕЙРАМИНИДАЗИ НА ВЫКЛИКАНИ ГАБАЗИНОМ НАПАДИ В ГИПО- КАМПИ ЩУРИВ

Концентрація нейрамінідази – ферменту, який відокремлює негативно заряджені сіалові кислоти від вуглеводів клітинної мембрани, може змінюватися залежно від фізіологічних умов. Численні відомості свідчать про те, що флуктуації позаклітинної концентрації нейрамінідази можуть впливати на нервову активність. Ми досліджували ефект зменшення активності ендогенної нейрамінідази на епілептичну активність, викликану габазином (специфічним блокаторм синаптичного гальмування) у пірамідальному шарі зони СА1 гіпокампа культивованих зрізів. Ми показали, що у зрізах, оброблених блокаторм ендогенної нейрамінідази N-ацетил-2,3-дегідро-2-деоксинеіраміновою кислотою, тривалість синхронних осциляцій, викликаних габазином, була значно збільшена порівняно з контрольними необробленими зрізами. Наше дослідження доповнює та розширює дані про те, що зміна активності нейрамінідази є важливим фактором, який може впливати на нервову збудливість.

Ключові слова: полісіалова кислота, блокаторм нейрамінідази, габазін, гіпокамп.

**А.В. Саврасова, І.В. Лушнікова, Е.В. Ісаєва,
Г.Г.Скибо, Д.С. Ісаєв, П.Г. Костюк**

ЭФФЕКТ БЛОКАТОРА НЕЙРАМИНИДАЗЫ НА ВЫЗВАННЫЕ ГАБАЗИНОМ ПРИПАДКИ В ГИПОКАМПИ КРЫС

Концентрация нейраминидазы – фермента, который отделяет негативно заряженные сиаловые кислоты от углеводов клеточной мембраны, может изменяться в зависимости от физиологических условий. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что флуктуации внеклеточной концентрации нейраминидазы могут влиять на нервную активность. В этой работе мы исследовали эффект уменьшения активности эндогенной нейраминидазы на эпилептическую активность, вызванную габазином

(специфическим блокаторм синаптического торможения) в пирамидном слое зоны СА1 гиппокампа культивированных срезов. Мы показали, что в срезах, обработанных блокаторм эндогенной нейраминидазы N-Ацетил-2,3-дегідро-2-деоксинеіраміновою кислотою, длительность синхронных осцилляций, вызванных габазином, значительно увеличивалась по сравнению с контрольными необработанными срезами. Настоящая работа дополняет и расширяет сведения о том, что изменение активности нейраминидазы является важным фактором, который может влиять на нервную возбудимость.

Ключевые слова: полисиаловая кислота, блокаторм нейраминидазы, габазін, гиппокамп.

REFERENCES

1. Bennett E., Urcan M.S., Tinkle S.S., Koszowski A.G., Levinson S.R. Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. A possible electrostatic mechanism // *J. Gen. Physiol.* – 1997. – **109**. – P.327–343.
2. Boyzo A., Ayala J., Gutierrez R., Hernandez R. J. Neuraminidase activity in different regions of the seizing epileptic and non-epileptic brain // *Brain Res.* – 2003. – **964**. – P.211–217.
3. Brooks-Kayal A.R., Shumate M.D., Jin H., Rikhter T.Y., Coulter D.A. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy // *Nat. Med.* – 1998. – **4**. – P.1166–1172.
4. Buchhalter J.R. Inherited epilepsies of childhood // *J. Child. Neurol.* – 1994. – **1**. – P.12–19.
5. de Geest N., Bonten E., Mann L., de Sousa-Hitzler J., Hahn C., d’Azzo A. Systemic and neurologic abnormalities distinguish the lysosomal disorders sialidosis and galactosialidosis in mice // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – **11**. – P.1455–1464.
6. Fozzard H.A., Hanck D.A. Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms // *Physiol. Rev.* – 1996. – **76**. – P.887–926.
7. Isaev D., Isaeva E., Shatskih T., Zhao Q., Smits N.C., Shworak N.W., Khazipov R., Holmes G.L. Role of extracellular sialic acid in regulation of neuronal and network excitability in the rat hippocampus // *J. Neurosci.* – 2007. – **27**. – P.11587–11594.
8. Izumi Y., Tokuda K., O’dell K.A., Zorumski C.F., Narahashi T. Neuroexcitatory actions of Tamiflu and its carboxylate metabolite // *Neurosci. Lett.* – 2007. – **426**. – P.54–58.
9. James W.M., Agnew W.S. Multiple oligosaccharide chains in the voltage-sensitive Na channel from *electrophorus electricus*: evidence for alpha-2,8-linked polysialic acid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1987. – **148**. – P.817–826.
10. Kiss J.Z., Rougon G. Cell biology of polysialic acid // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 1997. – **7**. – P.640–646.
11. Loup F., Wieser H.G., Yonekawa Y., Aguzzi A., Fritschy

- J.M.* Selective alterations in GABA_A receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy // *J. Neurosci.* – 2000. – **20**. – P.5401–5419.
12. Lushnikova I.V., Voronin K.Y., Malyarevskyy P.Y., Skibo G.G. Morphological and functional changes in rat hippocampal slice cultures after short-term oxygen-glucose deprivation // *J. Cell Mol. Med.* – 2004. – **8**(2). – P.241–248.
13. Muller D., Wang C., Skibo G., Toni N., Cremer H., Calaora V., Rougon G., Kiss J.Z. PSA–NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity // *Neuron.* – 1996. – **17**. –P.413–422.
14. Rafelson M.E. Jr. The neuraminidases and their action on glycoproteins and other sialic acid-containing compounds // *Expos. Ann. Biochim. Med.* – 1963. – **24**. – P.121–132.
15. Recio-Pinto E., Thornhill W., Duch D.S., Levinson S.R., Urban B.W. Neuraminidase treatment modifies the function of electroplax sodium channels in planar lipid bilayers // *Neuron.* – 1990. – **5**. – P.675–684.
16. Schauer R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man // *Zoology.* – 2004. – **107**. – P.49–64.
17. Seki T., Rutishauser U. Removal of polysialic acid–neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus // *J. Neurosci.* – 1998. – **18**. – P.3757–3766.
18. Sperk G., Furtinger S., Schwarzer C., Pirker S. GABA and its receptors in epilepsy // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2004. – **548**. – P.92–103.
19. Stoppini L., Buchs P.A., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue // *J. Neurosci. Meth.* – 1991. – **37**. – P.173–182.
20. Tsunashima K., Schwarzer C., Kirchmair E., Sieghart W., Sperk G. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus III: altered messenger RNA expression in kainic acid-induced epilepsy // *Neuroscience.* – 1997. – **80**. – P.1019–1032.
21. Usami A., Sasaki T., Satoh N., Akiba T., Yokoshima S., Fukuyama T., Yamatsugu K., Kanai M., Shibasaki M., Matsuki N., Ikegaya Y. Oseltamivir enhances hippocampal network synchronization // *Pharmacol. Sci.* – 2008. – **106**. – P.659–662.
22. Wreden C.C., Wlizla M., Reimer R.J. Varied mechanisms underlie the free sialic acid storage disorders // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**. – P.1408–1416.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: savrasova10@gmail.com

Received 14.05.2010

С.В.Чорна, В.Є. Досенко, Н.А. Струтинська, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

Підвищена експресія потенціалзалежного аніонного каналу й аденіннуклеотидтранслокази та чутливість кальційіндукованої мітохондріальної пори в серці старих щурів

Досліджували експресії мРНК і білка потенціалзалежного аніонного каналу (ПЗАК), мРНК аденіннуклеотидтранслокази (АНТ), а також чутливість мітохондріальної пори (МП) до дії кальцію в серці дорослих і старих щурів. Показано, що в серці старих щурів рівень експресії мРНК ПЗАК підвищений в 1,7 раза ($P < 0,05$), а мРНК АНТ – в 1,8 раза ($P < 0,05$) порівняно з дорослими тваринами. За допомогою Western-blott-аналізу показано, що рівень експресії білка ПЗАК в серці старих щурів також значно підвищений порівняно з дорослими тваринами. При дослідженні дозозалежного від кальцію (10^{-7} – 10^{-4} моль/л) набухання мітохондрій нами було встановлено підвищену чутливість МП до індуктора її відкриття в серці старих щурів порівняно з дорослими тваринами. Таким чином, підвищення рівнів експресії ПЗАК і АНТ як основних структурно-функціональних компонентів МП і підвищена чутливість МП до дії Ca^{2+} , спричинена збільшенням проникності мітохондріальних мембран при старінні, можуть бути одними із шляхів порушення їх бар'єрних властивостей, що може призводити до дисфункції мітохондрій.

Ключові слова: потенціалзалежний аніонний канал, аденіннуклеотидтранслоказа, експресія мРНК, мітохондріальна пора, серце, старіння.

ВСТУП

Старіння – складний генералізований процес, який супроводжується оксидативним стресом, що спричиняє в організмі розвиток таких патологічних процесів, як атеросклероз, діабет, нейродегенеративні захворювання, ішемічно-реперфузійні пошкодження серця та старіння, пов'язаних із дисфункцією мітохондрій [14]. Мітохондрії – найважливіші органели клітини, відповідальні за окисне фосфорилування, клітинну сигналізацію та підтримку гомеостазу внутрішньоклітинного кальцію [4]. Одним із проявів функціональних порушень у мітохондріях є зміна бар'єрних властивостей мембран цих органел, зокрема, внаслідок формування неселективної

кальційзалежної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП) між зовнішньою і внутрішньою мітохондріальними мембранами, що є ключовим механізмом у розвитку апоптозу клітин [7].

Необхідний обмін метаболітами між мітохондріями та цитоплазмою відбувається через зовнішню та внутрішню мембрани мітохондрій і має важливе значення для нормального функціонування клітини. У мітохондріях ссавців через зовнішню мембрану метаболіти транспортуються за участю потенціалзалежного аніонного каналу (ПЗАК) [6, 23], в той час як через внутрішню мембрану органел здійснюється близько 50 процесів транспорту метаболітів 30 транспортерами, серед яких найважливішим є аденін-

нуклеотидтранслоказа (АНТ) [21]. ПЗАК і АНТ є ключовими компонентами МП і виконують притаманні їм функції [8, 13]. Доведено, що ПЗАК – це пороутворювальний білок порин з молекулярною масою 30–35 кДа [25]. Очищений білок ПЗАК може формувати канали з діаметром пори 2–3 нм та електрофізіологічними властивостями, притаманними МП. ПЗАК становлять близько 0,3 % від загальної кількості білків мітохондрій, що еквівалентно 100 пмоль білка ПЗАК на 1 мг білків мітохондрій [7]. Так, зміна проникності зовнішньої мембрани мітохондрій регулюється різними лігандами, а саме Ca^{2+} , АТФ, глутаматом натрію тощо, безпосередньо за участі ПЗАК [23]. Зокрема, ПЗАК забезпечує транспорт через зовнішню мембрану мітохондрій аденінових нуклеотидів [22], Ca^{2+} [10], цитрату, сукцинату та фосфату [15]. Нині виявлено три ізоформи ПЗАК у ссавців – ПЗАК1, ПЗАК2 і ПЗАК3, кожна з яких може виконувати різні фізіологічні функції [16]. ПЗАК взаємодіє з АНТ на внутрішній мембрані мітохондрій та октамером креатинкінази в міжмембранному просторі [3]. АНТ є лігандом для формування МП на внутрішній мембрані мітохондрій. Відомо, що за фізіологічних умов АНТ транспортує високоенергетичні молекули АТФ і АДФ через мембрану мітохондрій [17]. Виявлено дві ізоформи АНТ (АНТ1 і АНТ2) у мишей, тоді як у людей – три (АНТ1, АНТ2 й АНТ3), які експресуються в різних тканинах по-різному. Показано, що ген ізоформи АНТ1 експресується переважно у скелетному м'язі, серці та головному мозку, ген ізоформи АНТ2 – у легенях, нирках, селезінці та печінці, а ген ізоформи АНТ3 – у всіх видах тканин [9, 11]. Існує зв'язок між зміною проникності мітохондріальних мембран і чутливістю МП до індукторів її відкриття, зокрема при старінні. Зміни рівнів експресії ключових компонентів МП – ПЗАК і АНТ – можуть зумовлювати зміни проникності мітохондріальних мембран.

Метою нашої роботи було дослідити рівні експресії мРНК і білка ПЗАК, мРНК АНТ, а також чутливість МП до дії кальцію в серці дорослих і старих щурів.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на самцях-щурах лінії Вістар віком 6 (n=6) та 24 міс (n=6), яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Виділення РНК. Зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція. РНК виділяли з тканини серця, використовуючи набір “Trizol RNA-rep” (“Isogen”, Росія). Зворотну транскрипцію проводили за допомогою набору реагентів “First Strand cDNA Synthesis Kit” (“Fermentas”, Литва), використовуючи 2–2,5 мкг загальної РНК і випадковий Random гексамерного праймера. Отриману внаслідок зворотної транскрипції комплементарну ДНК (кДНК) використовували для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для ампліфікації фрагмента гена ПЗАК і АНТ і гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (ГАДФГ) як ендогенний контроль. Для кількісної оцінки експресії генів використовували праймери з такою нуклеотидною послідовністю: прямиий – 5'-САТАТСААССТGG GCTGTG-3', зворотний –5'-ТТGGCTG СТАТТССААAGC-3' для ПЗАК; прямиий – 5'-ТТССССАССААГСТСТСААСТ-3', зворотний –5'-CGGCTGTСАСАСТСТGGG СААТСА-3' для АНТ; прямиий –5'-GGGTG TGAАССАСGAGААААТАТGA-3', зворотний –5'-AGCАССАГТGGАТGСAGGG GАТGАТ-3' для ГАДФГ. Ампліфікаційна суміш для ПЛР об'ємом 25 мкл містила 5 мкл розчину кДНК, 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 0,2 ммоль/л розчину суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, 0,5 од.

Тақ-полімерази (“АмпліСенс”, Росія), 30 пмоль кожного з праймерів (“Metabion”, Німеччина) і деіонізовану воду. Ампліфікація фрагментів гена складалася з 37 циклів: денатурація при 94°C (50 с), гібридизація праймерів при 58°C (1 хв) та елонгація при 72°C (1 хв). ПЛР проводили в термоциклері “GeneAMPSystem 2700” (“Applied Biosystems”, США). Отримані ампліфікати розділяли в 1,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Візуалізацію та оцінку яскравості ампліфікатів після горизонтального електрофорезу (170 В протягом 30 хв) проводили за допомогою трансільюмінатора та програмного забезпечення ViTran (“Біоком”, Росія).

Визначення рівня експресії білка ПЗАК. Рівень експресії білка ПЗАК визначали за допомогою Western-blott-аналізу. Гель-електрофорез білків суспензії мітохондрій серця проводили в 12%-му розчині поліакриламідного гелю за наявності додецилсульфату Na за Лемлі [18] в камері Hoefer miniVE (“Amersham”, Англія). Для розподілення білків використовували електродний буфер такого складу (ммоль/л): тріс-НСІ – 25, гліцин – 192; розчин додецилсульфату Na – 0,1%; рН 8,3. Попередньо проби кип’ятили протягом 3 хв у буфері з β-меркаптоетанолом. Вміст загального білка визначали за методом Лоурі [19]. Білок у кількості 100 мкг вносили в лунку для електрофорезу. Після електрофоретичного розподілення білки переносили на PVDF-мембрану (“Sigma”, США) за допомогою системи напівсухого електроперенесення Hoefer miniVE Blot Module (“Amersham”, Англія). Для цього використовували буфер такого складу (ммоль/л): тріс-НСІ – 25, гліцин – 192; розчин додецилсульфату Na – 0,1%, розчин метанолу – 20%; рН 8,3. Після перенесення білків мембрану блокували 5%-м розчином сухого знежиреного молока протягом 18–20 год при 4°C та обробляли первинними моноклональними антитілами до ПЗАК (“Sigma”, США) у розведенні 1:1000 протягом 2 год при 20°C. Після цього

мембрану відмивали в твін-фосфатному буфері (PBS-T) та інкубували зі вторинними антикролячими імуноглобулінами G, кон’югованими з пероксидазою хрому (“Sigma”, США) у розведенні 1:2000 у PBS-T буфері протягом 1 год при 20°C. Для візуального оцінювання за допомогою фарбування перенесених із гелю на мембрану білків використовували субстрат-фарбник для пероксидази 3-аміно-9-етилкарбазол. Кількісний розрахунок отриманих імуноблотів проводили за допомогою їх сканування та обробкою за допомогою комп’ютерної програми GelPro.

Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [1]. Дослідження відкривання МП проводили за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій серця щурів за наявності індуктора Ca²⁺ в інкубаційному середовищі [1].

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excel (MS Office XP) та Origin 6.0 (“Microcall Inc”, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зміни експресії мРНК ПЗАК і АНТ у серці дорослих і старих щурів представлені на рис. 1. Показано, що в серці старих щурів рівень експресії мРНК ПЗАК підвищений в 1,7 раза, а мРНК АНТ – в 1,8 раза порівняно з дорослими тваринами (див. рис. 1,а,б).

Таким чином, згідно з отриманими результатами, старіння супроводжується достовірним підвищенням експресії мРНК ПЗАК і АНТ в серці щурів. За допомогою методу Western-blott-аналізу показано, що рівень експресії білка ПЗАК у серці старих щурів також значно підвищений порівняно з дорослими тваринами (рис. 2).

Відомо, що існує зв’язок між ПЗАК і білками сімейства Bcl-2. Раніше в наших дослідженнях за допомогою методу ПЛР було показано підвищення експресії мРНК

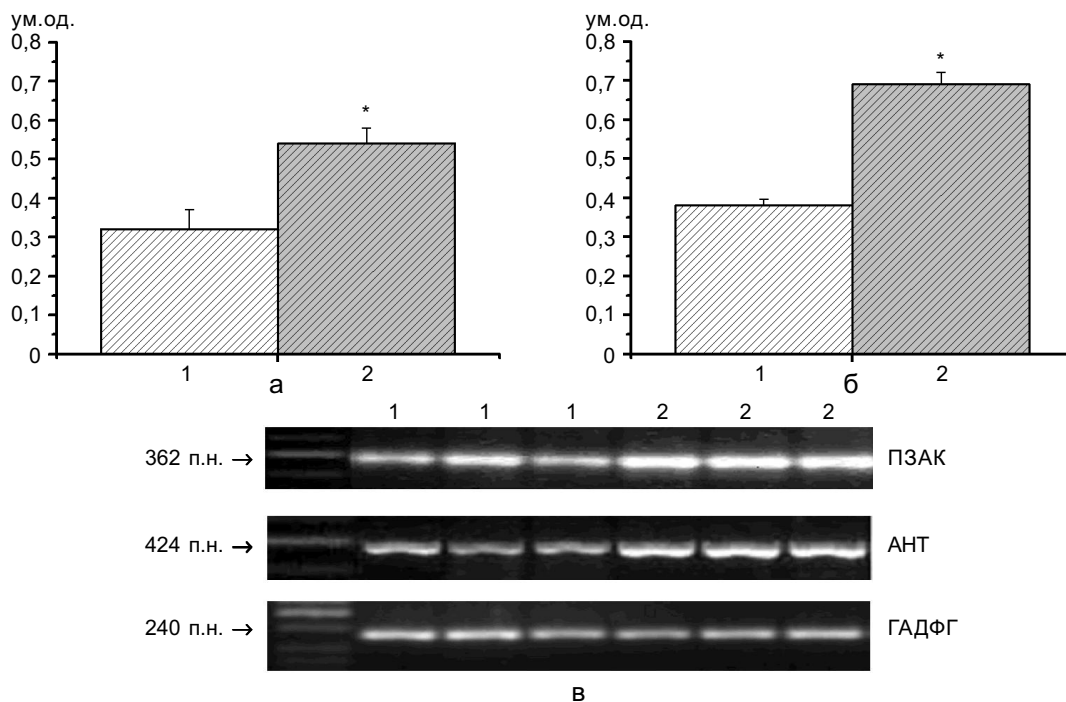


Рис. 1. Експресія гена потенціалзалежного аніонного каналу (ПЗАК) (а) та аденіннуклеотидтранслокази (АНТ) (б) в тканинах серця дорослих (1) та старих (2) шурів. (n = 6). * P<0,05 відносно дорослих шурів; гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (ГАДФГ) як ендogenous контролю; в – приклад фотографії електрограми, отриманої в результаті полімеразно-ланцюгової реакції; п.н. – пара нуклеотидів

проапоптотичного Вах у серці старих шурів порівняно з молодими [2]. За допомогою інших методів (Western-blott-аналізу та імуногістохії) також показано підвищення рівнів експресії білка Вах при старінні [5]. Встановлене нами підвищення рівня експресії мРНК білка ПЗАК, який взаємодіє з Вах, узгоджується з результатами визначення підвищеного вихідного рівня експресії мРНК Вах у серці старих шурів [2]. При дослідженні лінії клітин, що мутовані за мітохондріальною ДНК, також визначені підвищені рівні експресії мітохондріального ПЗАК. Останні, а також встановлена за допомогою конфокальної мікроскопії колокалізація ПЗАК/Вах підвищували проник-

ність мітохондріальних мембран, що призводило до апоптозу цих клітин [27]. Крім того, у трансформованих пухлинних клітинах рівні експресії ПЗАК значно вищі порівняно з нормальними клітинами. Автори заключають, що мітохондріальні ПЗАК можуть відігравати роль фармакологічних мішеней відносно дії антиканцерогенних речовин [24].

При дослідженні концентраційного дозозалежного від кальцію (10^{-7} – 10^{-4} моль/л) набухання мітохондрій нами було встановлено підвищену чутливість МП до індуктора її відкриття в серці старих шурів порівняно з дорослими тваринами (рис.3) на підставі того, що Ca^{2+} в наймен-

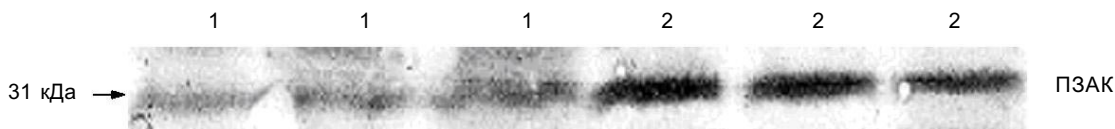


Рис. 2. Експресія білка потенціалзалежного аніонного каналу (ПЗАК) у тканинах серця дорослих (1) та старих шурів (2); n = 6

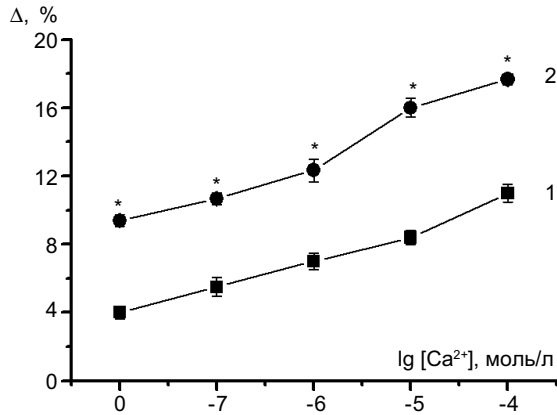


Рис. 3. Концентраційна залежність різниці величини набухання за наявності іонів кальцію мітохондрій серця дорослих (1) і старих (2) щурів (n=5); (Δ% – різниця між показником набухання мітохондрій на 15-й хвилині їх набухання і показником вихідного значення оптичної густини цієї суспензії на 1-й хвилині); *P<0,05 порівняно з дорослими щурами

шій концентрації (10^{-7} моль/л) спричиняє більш значне набухання мітохондрій серця старих щурів порівняно з дорослими, і ця різниця становить 5 %. Необхідно відмітити, що за відсутності Ca^{2+} спостерігалось незначне набухання мітохондрій серця старих щурів порівняно з дорослими тваринами. Цей факт може свідчити про підвищення проникності мембран мітохондрій з віком.

Однією із ключових мішеней у розвитку апоптозу, до якого залучені проапоптотичні Вах і ВАК, є ПЗАК, що взаємодіє з цими білками, внаслідок чого збільшується проникність мітохондріальних мембран при старінні. Ca^{2+} також спричинює збільшення проникності мітохондріальних мембран, але незалежно від участі Вах і ВАК. Попередження зміни проникності мітохондріальних мембран, викликане як Вах/ВАК, так і Ca^{2+} регулюється антиапоптотичними білками сімейства Bcl-2. Ці білки проявляють широкий спектр дії від інгібування апоптозу до його індукції. Так, Вах – один із представників цього сімейства – може змінювати фізичні властивості ПЗАК таким чином, що робить його «відкритим»

для вивільнення із мітохондрій у цитоплазму цитохрому c, а білок Bcl-2 може підтримувати ПЗАК у «закритому стані».

Активація механізмів тієї чи іншої форми загибелі клітини може визначатися кількістю відкритих МП. Так, в умовах формування МП у декількох мітохондріях, в клітині активується аутофагія, при відкриванні МП у більшій кількості мітохондрій ініціюється апоптоз, що, ймовірно, є наслідком збільшення в цитоплазмі кількості цитохрому c та апоптозіндукуючого фактора [12]. Таким чином, при більшій кількості відкритих МП можливе ініціювання апоптозу на відміну від того, що мінімальна кількість відкритих МП принципово не впливає на процес клітинної загибелі [26].

Отримані нами результати дають можливість припустити, що підвищені рівні експресії ПЗАК і АНТ пов'язані зі збільшенням кількості утворених МП у мембранах органел у серці старих щурів, що в свою чергу може призводити до збільшення проникності мітохондріальних мембран і

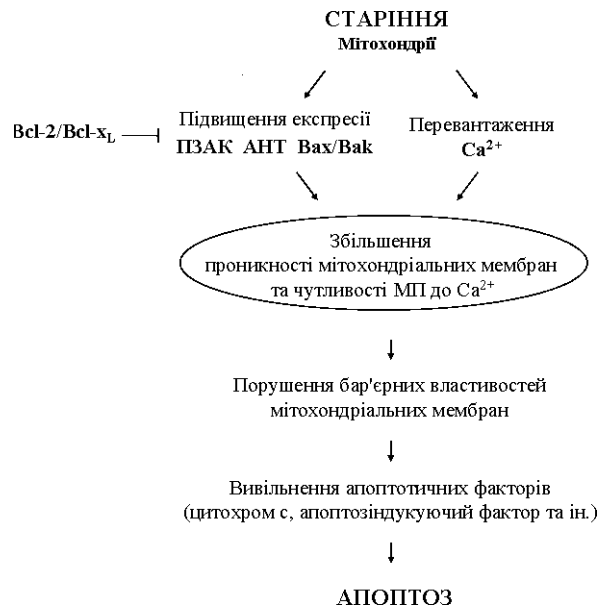


Рис. 4. Схематичне зображення процесів, що спричиняють підвищену чутливість мітохондріальної пори (МП) до кальцію та апоптоз при старінні: ПЗАК – потенціалзалежний аніонний канал; АНТ – аденін-нуклеотидтрансфераза

підвищення чутливості МП до індуктора Ca^{2+} , який спричиняє набухання мітохондрій, і як результат – вивільнення апоптотичних факторів і розвиток апоптозу (рис. 4). Існує припущення ймовірної залежності кількості утворених МП від концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі, що має суттєве значення в регуляції проникності мітохондріальних мембран [20].

Отже, підвищення рівнів експресії ПЗАК і АНТ як основних структурно-функціональних компонентів МП і підвищена чутливість МП до дії Ca^{2+} , спричинена збільшенням проникності мітохондріальних мембран у серці старих щурів, можуть бути одними із шляхів порушення їх бар'єрних властивостей та індукувати загибель клітин внаслідок дисфункції мітохондрій.

С.В. Черная, В.Е. Досенко, Н.А. Струтинская, Г.Л. Вавилова, В.Ф. Сагач

ПОВЫШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМОГО АНИОННОГО КАНАЛА И АДЕНИННУКЛЕОТИДТРАНСЛОКАЗЫ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КАЛЬЦИЙ-ИНДУЦИРОВАННОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ В СЕРДЦЕ СТАРЫХ КРЫС

Исследовали экспрессии мРНК и белка потенциалзависимого анионного канала (ПЗАК), мРНК адениннуклеотидтранслоказы (АНТ), а также чувствительность митохондриальной поры (МП) к действию кальция в сердце взрослых и старых крыс. Показано, что в сердце старых крыс уровень экспрессии мРНК ПЗАК повышался в 1,7 раза ($P < 0,05$), а мРНК АНТ – в 1,8 раза ($P < 0,05$) по сравнению со взрослыми животными. С помощью метода Western-blott-анализа показано, что уровень экспрессии белка ПЗАК в сердце старых крыс также значительно повышался по сравнению со взрослыми животными. При исследовании дозозависимого от кальция (10^{-7} – 10^{-4} моль/л) набухания митохондрий нами была установлена повышенная чувствительность МП к индуктору ее открытия в сердце старых крыс по сравнению со взрослыми животными. Таким образом, повышение уровней экспрессии ПЗАК и АНТ как основных структурно-функциональных компонентов МП и повышенная чувствительность МП к действию Ca^{2+} , вызванная увеличением проницаемости митохондриальных мембран при старении, могут быть одними из путей нарушения их барьерных свойств, что может приводить к дисфункции митохондрий.

Ключевые слова: потенциалзависимый анионный канал, адениннуклеотидтранслоказа, экспрессия мРНК, митохондриальная пора, сердце, старение.

S.V. Chorna, V.E. Dosenko, N.A. Strutynska, G.L. Vavilova, V.F. Sagach

INCREASED EXPRESSION OF VOLTAGE-DEPENDENT ANION CHANNEL AND ADENINE NUCLEOTIDE TRANSLOCASE AND THE SENSITIVITY OF Ca^{2+} -INDUCED MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION OPENING PORE IN OLD RAT HEART

We investigated mRNA and protein expression of voltage-dependent anion channel (VDAC), mRNA adenine nucleotide translocase (ANT) as well as the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening (MPTP) to Ca^{2+} in the adult and old rat heart. It was shown that in the old rats hearts VDAC mRNA expression increased by 1,7 ($p < 0,05$) times and mRNA ANT expression increased by 1,8 ($p < 0,05$) times in comparison with adult animals. The Western Blot analysis showed that the level of VDAC protein expression in the old rat hearts also significantly increased compared with adult animals. In the hearts of old rats, the sensitivity of MPTP opening to calcium (10^{-7} – 10^{-4} mol/l) determined by mitochondria swelling, increased two-fold ($p < 0,05$). Therefore, an increased VDAC and ANT expression, as the main structural functional components of the MPTP, and an increased sensitivity of MPTP opening to Ca^{2+} caused an increase in the permeability of mitochondrial membranes in aging. Each of these factors may contribute to alterations in mitochondrial barrier properties and lead to mitochondrial dysfunction.

Key words: voltage-dependent anion channel expression, adenine nucleotide translocase, expression mRNA, mitochondrial permeability transition pore, heart, aging.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів митохондріальної пори в серці щурів // *Фізіол. журн.* – 2004. – **50**, № 2. – С. 49–63.
2. Сагач В.Ф., Рудик О.В., Вавілова Г.Л., Коцюруб А.В., Ткаченко Ю.П. Мелатонін відновлює ішемічну толерантність і зменшує чутливість відкриття митохондріальної пори в серці щурів // *Там само.* – 2006. – **52**, № 3. – С. 3–15.
3. Brdiczka D., Kaldis P., Wallimann T. In vitro complex formation between the octamer of mitochondrial creatine kinase and porin // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**, №44. – P. 27640–27644.
4. Brown G.C. Control of respiration and ATP synthesis

- in mammalian mitochondria and cells // *J. Biochem.* – 1992. – **284**, Pt 1. – P.1–13.
5. Centurione L., Antonucci A., Miscia S., Grilli A., Rapino M., Grifone G., Di Giacomo V., Di Giulio C., Falconi M., Cataldi A. Age-related death-survival balance in myocardium: an immunohistochemical and biochemical study // *Mech. Ageing Dev.* – 2002. – **23**, №4. – P.341–350.
 6. Colombini M. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol // *Mol. Cell. Biochem.* – 2004. – **256–257**. – P.107–115.
 7. Crompton M., Barksby E., Johnson N., Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death // *J. Biochem.* – 2002. – **84**. – P.143–152.
 8. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *J. Biochem.* – 1999. – **341**. – P. 233–249.
 9. Doerner A., Pauschinger A., Bador A. Noutsias M., Giessen S., Schulze K., Bilger J., Rauch U., Schultheiss H.P. Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans // *FEBS Lett.* – 2004. – **414**, № 2. – P. 258–262.
 10. Gincel D., Zaid H., Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function // *J. Biochem.* – 2001. – **358**, Pt 1. – P. 147–155.
 11. Grado A., Manchado C., Iglesias R., Giralt M., Villarroya F., Mampel T., Vinas O. Muscle/heart isoform of mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT1) is transiently expressed during perinatal development in rat liver // *FEBS Lett.* – 1998. – **421**. – P. 213–216.
 12. Guimaraes C.A., Linden R. Programmed cell death: apoptosis and alternative death styles // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – **217**. – P. 1638–1650.
 13. Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection // *Cardiovas. Res.* – 2004. – **61**. – P. 372–385.
 14. Harman D. The free radical theory of aging // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2003. – **5**, №5. – P.557–561.
 15. Hodge T., Colombini M. Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels // *J. Membr. Biol.* – 1997. – **157**, №3. – P. 271–279.
 16. Juhaszova M., Wang S., Zorov D.B., Nuss H.B., Gleichmann M., Mattson M.P., Sollott S.J. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – **1123**. – P. 197–212.
 17. Klingenberg M. The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport // *J. Membr. Biol.* – 1980. – **56**. – P. 97–105.
 18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**. – P. 680–685.
 19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, №1. – P.265–275.
 20. Mayer B., Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis // *News Physiol. Sci.* – 2003. – **18**. – P. 89–94.
 21. Passarella S., Atlante A., Valenti D., Bari L. The role of mitochondrial transport in energy metabolism // *Mitochondrion.* – 2003. – **2**. – P. 319–343.
 22. Rostovtseva T., Colombini M. ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane // *J. Biochem. Chem.* – 1996. – **271**. – P. 28006–28008.
 23. Shoshan-Barmatz V., Gincel D. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death // *Cell Biochem Biophys.* – 2003. – **39**, №3. – P. 279–292.
 24. Simamura E., Shimada H., Hatta T., Hirai K. Mitochondrial voltage-dependent anion channels (VDACs) as novel pharmacological targets for anti-cancer agents // *J. Bioner. Biomembr.* – 2008. – **40**, №3. – P. 213–217.
 25. Sorgato M., Moran O. Channels in mitochondrial membranes: knowns, unknowns, and prospects for the future // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 1993. – **28**. – P. 127–171.
 26. Weiss J.N., Korge P., Honda H.M., Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease // *Circulat. Res.* – 2003. – **93**. – P. 292–301.
 27. Yuqi L., Lei G., Yang L., Zongbin L., Hua X, Lin W, Rui C, Mohan L, Yi W, Minxin G., Shiwen W. Voltage-dependent anion channel (VDAC) is involved in apoptosis of cell lines carrying the mitochondrial DNA mutation // *BMC Med. Genet.* – 2009. – **10**. – P. 114.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: snizhana-chorna@inbox.ru

Матеріал надійшов до редакції 22.03.2010

М.С. Шипшина, М. С. Веселовський

Особливості сенсорної нейротрансмісії в ко-культурі нейронів спінальних гангліїв і дорсальних рогів спинного мозку щурів

Досліджували властивості хімічної нейропередачі на рівні первинних аферентних входів у спинний мозок на розробленій нами простій і зручній in vitro моделі суміжно-культивованих дисоційованих нейронів спінальних гангліїв (СГ) і нейронів дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ) новонароджених щурів. Результати наших досліджень показали наявність збуджувальних і гальмівних синапсів нейронів СГ на клітинах ДРСМ. Збуджувальна нейротрансмісія в таких синапсах була опосередкована пресинаптичним викидом глутамату та подальшою активацією рецепторів NMDA- і не-NMDA-субкласів. При цьому активація не-NMDA-рецепторів робить основний внесок у реалізацію збуджувальних постсинаптичних ефектів. У передачу гальмівних сигналів були залучені як гліцин-, так і ГАМК-ергічні нейрони СГ. Однак в більшості досліджених пар нейронів гальмівна синаптична трансмісія була опосередкована пресинаптичним вивільненням гліцину. Запропонована нами in vitro модель ко-культури нейронів СГ/ДРСМ, на відміну від раніше розроблених подібних методів, дає змогу найбільш повно використовувати сучасні методичні підходи у вивченні особливостей трансмісії соматосенсорної інформації з периферії в ЦНС, а також глибоко досліджувати специфічні властивості синапсів аферентних нейронів.

Ключові слова: спінальні ганглії, дорсальні роги спинного мозку, ко-культура, синаптична передача, NMDA-рецептори, не-NMDA-рецептори, γ -аміномасляна кислота, гліцин, викликані постсинаптичні струми.

ВСТУП

Первинні аферентні нейрони та нейрони дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ) відіграють фундаментальну роль у трансмісії та модуляції різних видів соматичної та вісцеральної сигналізації [1, 17]. На рівні ДРСМ відбувається первинна інтеграція сенсорних сигналів і реалізується первинний контроль ростральних центрів над аферентною інформацією за допомогою спадних провідних шляхів. Сенсорна інформація про стимули різних модальностей сприймається периферичними рецепторами і передається клітинам ДРСМ волокнами нейронів спінальних гангліїв (СГ), що проходять у складі задніх корінців спинного

мозку (СМ). Мієлінізовані та немієлінізовані волокна нейронів СГ закінчуються в різних пластинах (за Рекседом) дорсального рогу. Так, тонкі С-волокна мають закінчення переважно в пластинах I і II [3]; терміналі ноцицепторів A_{δ} знаходяться переважно в пластинах I і V та частково – в пластині X; аферентні волокна від внутрішніх органів закінчуються в основному на клітинах пластин I та V, а крупні мієлінізовані A_{β} -волокна – на дендритах нейронів III і IV пластин [1]. У ДРСМ містяться клітини трьох класів: 1) проєкційні нейрони, що передають інформацію ростральним центрам [6], більшою частиною формують пластини I, II і V; 2) збуджувальні проміжні нейрони, що передають сигнал у межах

© М.С. Шипшина, М. С. Веселовський

відповідних сегментів СМ; 3) гальмівні інтернейрони, що модулюють сенсорну трансмісію. Загалом, ДРСМ являють собою складну чітко організовану частину ЦНС з різноманітним виконуваним нею функцій.

Більшість досліджень особливостей трансмісії на рівні аферентних синаптичних входів в СМ проводилися *in vivo* [2] або *in vitro* на зрізах СМ із збереженням дорсальних корінців [24, 25, 26]. При цьому постсинаптичні відповіді викликалися стимуляцією цілого корінця, а вибір постсинаптичної клітини відбувався «наосліп». Однак необхідність у більш точних дослідженнях нейротрансмісії на цьому рівні стала передумовою для розробки більш зручних об'єктів. У зв'язку з широким використанням первинних нейрональних культур для вивчення функціональних властивостей синапсів і синаптичних ефектів фармакологічних агентів, протеїнів тощо, деякими авторами була запропонована низка засобів сумісного культивування нейронів СГ і клітин СМ чи ДРСМ [10, 13, 17, 19, 22]. Використання таких змішаних і розділених культур дає змогу полегшити рішення деяких експериментальних задач, однак відтворення більшості з таких об'єктів є достатньо складним у методичному плані.

Як модель для вивчення синаптичної передачі в первинних аферентних синапсах нами був розроблений більш простий метод суміжного культивування дисоційованих нейронів СГ і ДРСМ. Це модифікований і спрощений варіант мульти-компаратментної техніки [4], що не був описаний раніше. В нашій моделі клітини двох різних популяцій були просторово роз'єднані, будучи розміщеними в суміжних компартментах. При цьому аксони нейронів СГ утворювали синапси на клітинах-мішенях ДРСМ, вільно долаючи межу розподілу культур двох популяцій нейронів. У такій системі значно полегшується ідентифікація клітин СГ чи ДРСМ, оскільки їх розміщення задане

умовами посадки культур. Крім того, при відповідному збільшенні стає можливим візуально простежити проєкції аферентних нейронів на клітини ДРСМ, що додає зручності при виборі пари синаптично зв'язаних клітин. Запропонована нами тут модель ко-культури нейронів СГ/ДРСМ дає змогу культивувати клітини протягом декількох тижнів та є зручною для вивчення властивостей синаптичної передачі на рівні первинних аферентних входів у спинний мозок. У цій роботі ми спробували охарактеризувати типи такої хімічної нейропередачі та з'ясувати роль субпопуляцій постсинаптичних рецепторів в їх реалізації.

МЕТОДИКА

Виготовлення камер для суміжного культивування нейронів СГ/ДРСМ. Для наших експериментів в пластикові чашки для культивування діаметром 35 мм були поміщені покриті полі-L-орнітином (Poly-L-ornitine, «Sigma», США) круглі покривні скельця. Камери для суміжного культивування нейронів СГ/ДРСМ являють собою окремі секції прямокутних силіконових камер flexiPERM slide («greiner bio-one», Німеччина), посередині котрих, перпендикулярно контактній площині камери із покривним склом, покритим полі-L-орнітином, були вмонтовані прямокутні покривні скельця. Лінійні розміри останніх коректувалися відповідно до внутрішніх розмірів силіконових камер. Готові камери при розміщенні на скельцях формували щільні контакти в місцях стикання їх з підкладкою. Таким чином, формувалися два компартменти, в кожному з яких висівалися нейрони відповідного типу. В таких умовах виключалося змішування суспензій клітин на межі розподілу двох відсіків, що дало можливість отримати суміжні культури клітин СГ і ДРСМ.

Суміжне ко-культивування дисоційованих нейронів СГ і ДРСМ. Для приго-

тування ко-культур дисоційованих СГ/ДРСМ нейронів використовували новонароджених шурів лінії Вістар. Люмбальний відділ спинного мозку і пов'язані з ним СГ брали від тієї самої тварин та занурювали в охолоджений розчин мінімального середовища Ігла (MEM, «Sigma», США), що містив NEPES – 20 ммоль/л, натрієву сіль бензилпеніциліну 25 – од/мл, сульфат стрептоміцину – 25 мкг/мл. Після видалення спинномозкових оболонок від ділянки СМ відокремлювали ДРСМ, для чого СМ за допомогою скальпеля по дорсальній комісурі був розділений на дві половини та зони, що відповідають дорсальним третинам, висікалися з кожної половини. Ділянки тканини СМ, що містили ДРСМ, попередньо розрізані скальпелем на сегменти, інкубували в 0,2%-му розчині трипсину (тип XI, «Sigma», США) протягом 8 хв при 37°C. СГ очищували від передніх, задніх корінців і спинномозкового нерва, після чого інкубували в 0,2%-му розчині пронази (Pronase E, «Serva», Німеччина) протягом 7–8 хв при 37°C. Після ферментації тканину сегментів ДРСМ і СГ декілька разів промивали в розчині MEM, що містив 10% кінської сироватки (Horse serum, «Gibco», США), для інактивації протеолітичних ферментів. Механічну дисоціацію клітин ДРСМ і СГ проводили за допомогою опалвлених пастерівських піпеток, діаметри кінчиків яких поступово зменшуються в розчині для культивування, що містив MEM, 10 % кінської сироватки, 2,2 г/л NaHCO_3 , 6 мкг/мл інсуліну (Insulin, «Sigma», США), 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну, 25 мкг/мл сульфату стрептоміцину. Отримані суспензії клітин розбавлялися розчином для культивування таким чином, щоб кінцева щільність їх при підрахунку в гемоцитометрі становила приблизно 50 000 клітин/см². Далі клітини двох популяцій висівали у відповідні компартменти камер для культивування на скельця, попередньо вкриті полі-L-орні-

тином, та інкубували при 37°C, концентрації CO_2 5 % та абсолютній вологості протягом 1 год. За цей час нейрони ДРСМ і СГ добре осідали та прикріплялися до скла у проєкціях займаних відсіків. Потім камери акуратно знімали, даючи можливість нейронам СГ вільно формувати аксони в напрямку до клітин-мішеней ДРСМ. У чашки з ко-культурою додавали по 2 мл розчину для культивування та інкубували при вищезазначених умовах протягом декількох тижнів. На 2-гу – 3-тю добу культивування в середовище до ко-культури додавали 5 мкмоль/л цитозин-А-D-арабінофуранозиду («Sigma», США) для пригнічення проліферації гліальних клітин, а через 36–48 год після цього розчин міняли на свіжий. В таких умовах нейрони добре росли та морфологічно диференціювалися, після 14-ї доби культивування культуру брали в експеримент.

Електрофізіологічні методи. Реєстрація іонних струмів в парах «нейрон СГ – нейрон ДРСМ» відбувалася за допомогою методу фіксації потенціалів у конфігураціях «ціла клітина» одночасно на пре- та постсинаптичній клітинах. Аналізували постсинаптичні струми (вПСС) на мембранах нейронів ДРСМ, викликані внутрішньоклітинною стимуляцією клітин СГ у кожній парі. Стимуляцію СГ нейронів здійснювали прикладанням деполяризувальних імпульсів амплітудою 60–120 пА та тривалістю 0,5–1 мс з інтервалом 1–2 с. Експериментальна установка була зібрана на базі інвертованого мікроскопа Axiovert S100 («Carl Zeiss», Німеччина). Використання фазово-контрастного об'єктива (Plan-Neofluar 100Ч NA 1.30) з масляною імерсією дозволяло отримати в системі 1000-кратне оптичне збільшення, щоб візуально ідентифікувати потенціально зв'язані пари нейронів. Сигнали, відповідні вПСС, реєстрували та фільтрували з частотою 5 кГц за допомогою двох підсилювачів ЕРС-8 («НЕКА», Німеччина), оцифровували та

записували з застосуванням аналого-цифрового перетворювача DigiData 1322A та програмного пакета WinWCP V3.9.6. (University of Strathclyde, Шотландія); частота оцифровки становила 10 кГц. Усі експерименти проводили при 20°C. На мембранах нейронів ДРСМ потенціал підтримували на рівні -70 мВ. Значення мембранного потенціалу клітин були відкоректовані з урахуванням рідинного контактного потенціалу (16 мВ), розрахованого за допомогою калькулятора контактних потенціалів програмного пакета PClamp 9.0 («Axon Instruments», США).

Patch-піпетки із внутрішнім діаметром кінчика 1–1,5 мкм були витягнуті з боросилікатних скляних капілярів («World Precision Instruments», США). Внутрішньоклітинний розчин у петч-піпетках в усіх випадках містив (ммоль/л): калію глюконату – 155; натрію глюконату – 10; EGTA – 10; MgCl₂ – 1; HEPES – 20 (рН доводили до 7,4 додаванням КОН). Заповнені таким розчином піпетки мали опір 5–7 МОм. Базовий зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140; KCl – 3; CaCl₂ – 2; MgCl₂ – 2; глюкози – 30; HEPES – 20 (рН доводили до 7,4 додаванням NaOH). При дослідженні властивостей збуджувальних вПСС використовували зовнішньоклітинний розчин, що номінально не мав у складі Mg²⁺. У наших експериментах градієнт для Cl⁻ створювався таким чином, що під час реєстрації вПСС мали вихідний напрям, а вЗПСС – вхідний. Це давало змогу візуально розрізнити два типи постсинаптичних відповідей під час реєстрації.

Аплікація та зміна розчинів, що містили блокатори збуджувальної (DNQX, D_L-AP5) та гальмівної (бікукулін, стрихнін) нейропередачі відбувалася безупинно (швидкість зміни розчинів 1мл/30 с). Всі реактиви для електрофізіологічних експериментів були отримані від фірми «Sigma» (США).

Аналіз кінетичних показників вПСС (амплітуда, час наростання, постійна часу

спаду) виконували за допомогою програмного пакета Clampfit 9.0 («Axon Instruments», США) та Excel2002 («Microsoft Corporation», США), побудова графіків – за допомогою програми OriginPro 8 («OriginLab Corporation», США).

РЕЗУЛЬТАТИ

Морфологічні характеристики нейронів СГ та ДРСМ у ко-культурі. В умовах суміжного культивування нейрони СГ і ДРСМ розвивалися відповідно до своїх фенотипічних властивостей та вільно формували синаптичні контакти як з клітинами власної популяції, так і з нейронами іншої генерації. При цьому нейрони СГ і ДРСМ добре розрізнялися морфологічно (рис. 1). Нейрони СГ у ко-культурі були представлені псевдоуніполярними та біполярними клітинами еліпсоїдної або круглої форми, що відрізнялися фазово-яскравими сомами різного розміру (від 20 до 50 мкм). Нейрони ДРСМ були більш фазово-темними і нараховували бі- або мультиполярні клітини, що характеризувалися дуже вираженою арборизацією нейритів. Клітинні тіла останніх відрізнялися розмаїттям форм і розмірів, що, напевно, пов'язано із належністю їх до окремих функціональних типів нейронів ДРСМ.

Нами були протестовані 25 пар синаптично зв'язаних пар клітин СГ/ДРСМ. Серед них в 12 парах внутрішньоклітинна стимуляція нейрона СГ викликала збуджувальні вПСС (вЗПСС), а в 13 парах – гальмівні вПСС у клітинах ДРСМ. Невелика та постійна синаптична затримка 5,14 мс ± 0,31 мс (n = 18) і відсутність пропусків синаптичних відповідей в обох випадках дають змогу визначити зареєстровані ПСТ як моносинаптичні [9].

Властивості вЗПСС на мембранах клітин ДРСМ, викликаних стимуляцією СГ нейронів у парі. Моносинаптичні вЗПСС, зареєстровані на нейронах ДРСМ при

підтримуваному потенціалі -70 мВ і фізіологічній позаклітинній концентрації Mg^{2+} (2 ммоль/л), характеризувалися швидкою активаційною та інактиваційною кінетикою. Час до піку вЗПСС, розрахований за висхідною частиною кривої струму від 10 до 90 % пікової амплітуди, становило $2,82$ мс $\pm 0,37$ мс ($n = 5$). Спад вЗПСС у найкращий спосіб апроксимувався однією експонентою із середньою постійною часу $\tau = 3,91$ мс $\pm 0,31$ мс ($n = 5$). При цьому часовий хід вЗПСС практично не змінювався при різних значеннях підтримуваного потенціалу (рис. 2, в). Значення амплітуд вЗПСС практично лінійно залежали від підтримуваних потенціалів на мембранах

ДРСМ клітин, і потенціал реверсії постсинаптичних струмів становив $-1,43$ мВ $\pm 2,46$ мВ ($n = 5$; рис. 2, а, б). Таким чином, кінетичні властивості вЗПСС відповідали таким, раніше описаним для глутаматергічних ПСС, що були досліджені на інших препаратах [8, 16, 18]. Аплікація селективного блокатора NMDA-рецепторів D_L -AP5 у концентрації 10 мкмоль/л не викликала зниження амплітуд вЗПСС і не впливала на кінетику їхнього спаду. Тоді як прикладання блокатора не-NMDA-рецепторів DNQX у концентрації 10 мкмоль/л призводила до повного блокування вЗПСС (рис. 3, а). Такий ефект у наших експериментах міг бути пов'язаний з блокадою

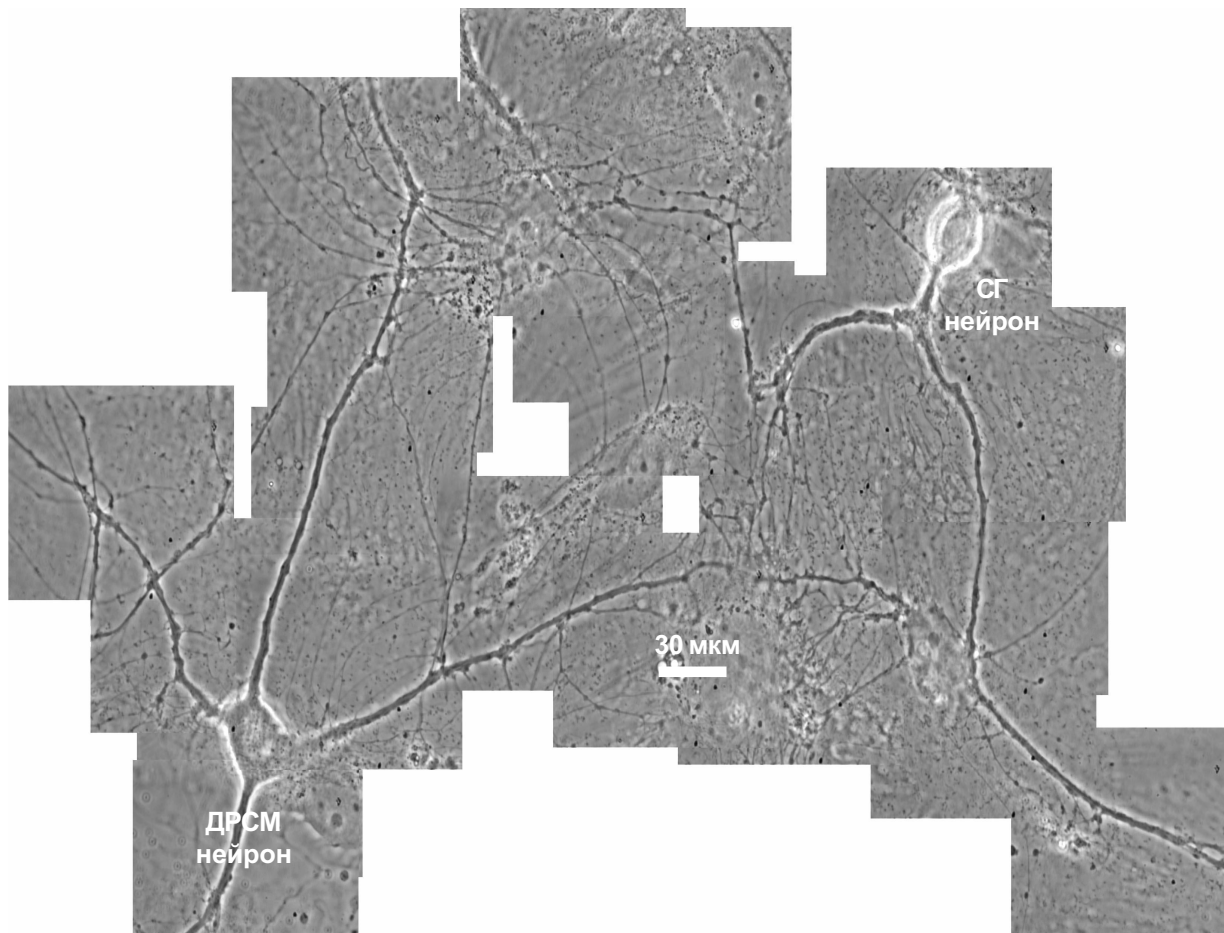


Рис. 1. Реконструйоване мікрофотографічне зображення нейронів спінальних гангліїв та клітин дорсальних рогів спинного мозку в умовах суміжного ко-культивування на 14-ту добу *in vitro* (об'єктив Plun-Neofluar 100г, NA 1.3, масляна імерсія, «Zeiss»)

NMDA-рецепторів Mg^{2+} [12], коли їх позаклітинна концентрація була 2 ммоль/л.

В експериментах з використанням зовнішньоклітинного розчину, що не містить Mg^{2+} , часовий хід моносинаптичних вЗПСС, реєстрованих при підтримуваному потенціалі -70 мВ, характеризувався більш повільним двох експоненціальним спадом ($\tau_1 = 2,68 \pm 0,31$ мс, $\tau_2 = 58,85 \pm 10,32$ мс ($n = 7$)), а час до піку становив $3,05 \pm 0,58$ мс ($n = 7$). Активаційна та інактивна кінетика таких вЗПСС також не виявляла суттєвих змін залежно від підтримуваних потенціалів.

Прикладання DNQX у концентрації 10 мкмоль/л дало змогу виділити NMDA-компонент вЗПСС, зареєстрованих при підтримуваному потенціалі -70 мВ у безмагнієвому позаклітинному розчині. Цей залишковий струм повністю блокувався аплікацією D_L -AP5 у концентрації 10 мкмоль/л (див. рис. 3, б). Амплітуда ізольованого NMDA-компонента становила в середньому $18,06\% \pm 2,19\%$ від інтегра-

льного вЗПСС. При цьому в порівнянні з інтегральними струми, опосередковані активацією NMDA-рецепторів, відрізнялися повільнішою кінетикою. Час до піку таких струмів був $6,29 \text{ мс} \pm 1,21 \text{ мс}$ ($n = 6$), а спад добре описувався однією експонентою з $\tau = 45,01 \text{ мс} \pm 10,40 \text{ мс}$ ($n = 6$).

В більшості досліджених клітинних пар у безмагнієвому середовищі вЗПСС містили як NMDA-, так і не- NMDA-компоненти. Однак в 2 парах нейронів СГ/ДРСМ за тих самих умов реалізація вЗПСС була опосередкована внеском тільки не- NMDA-компонента. Такі струми повністю блокувалися DNQX (10 мкмоль/л) при підтримуваному потенціалі -70 мВ (не зображено).

Характеристики вГПСС на мембранах клітин ДРСМ, викликаних стимуляцією СГ нейронів у парі. У 13 з 25 пар клітин стимуляцію первинних аферентних нейронів викликала ГПСС у нейронах ДРСМ. Амплітуди усереднених вГПСС мали лінійну залежність від підтримуваного потенціалу

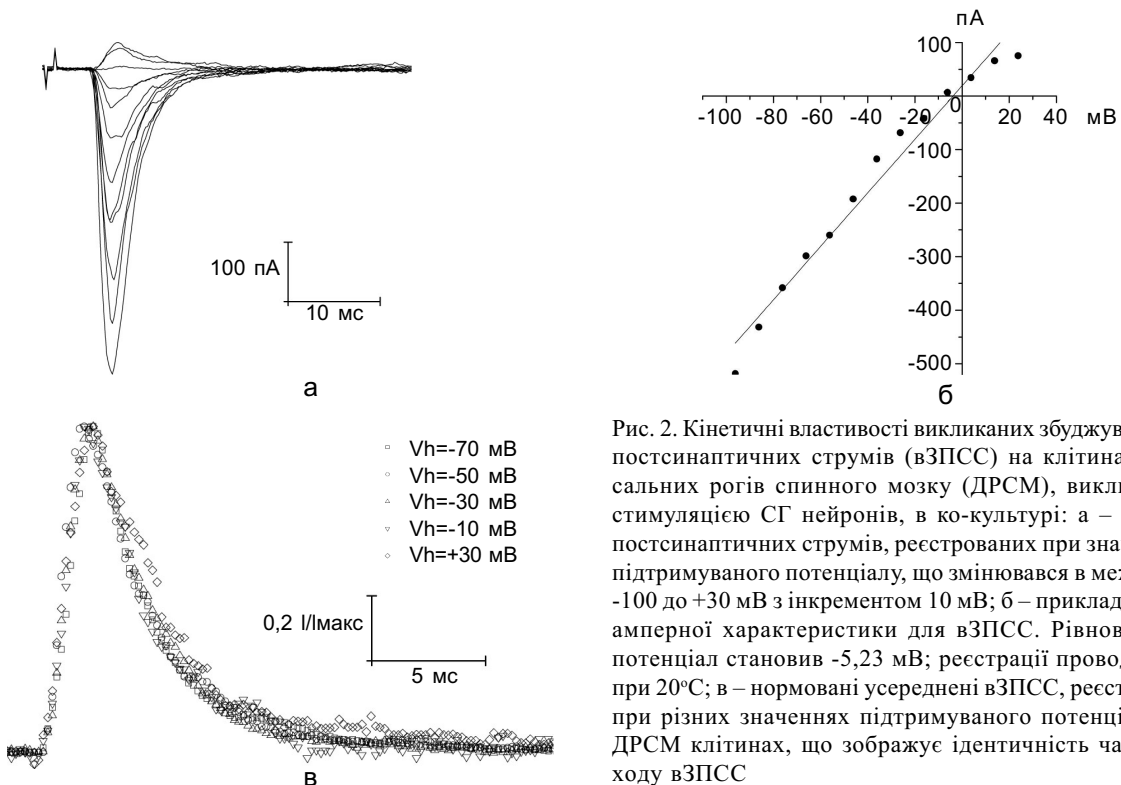


Рис. 2. Кінетичні властивості викликаних збуджувальних постсинаптичних струмів (вЗПСС) на клітинах дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ), викликаних стимуляцією СГ нейронів, в ко-культури: а – записи постсинаптичних струмів, реєстрованих при значеннях підтримуваного потенціалу, що змінювався в межах від -100 до +30 мВ з інкриментом 10 мВ; б – приклад вольтамперної характеристики для вЗПСС. Рівноважний потенціал становив -5,23 мВ; реєстрації проводилися при 20°C; в – нормовані усереднені вЗПСС, реєстровані при різних значеннях підтримуваного потенціалу на ДРСМ клітинах, що зображує ідентичність часового ходу вЗПСС

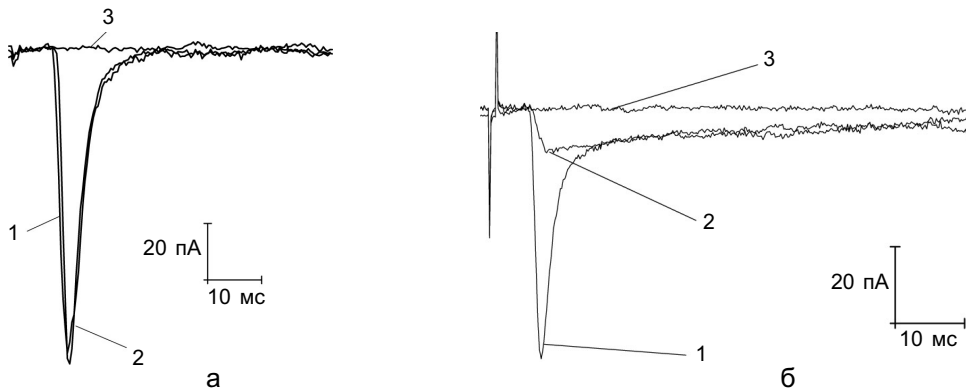


Рис. 3. Фармакологічні властивості викликаних збуджувальних постсинаптичних струмів (вЗПСС). а – дія блокувальних глутаматергічної нейротрансмісії на вЗПСС, реєстровані при зовнішньоклітинній концентрації Mg^{2+} 2 ммоль/л: 1 – вЗПСС у контролі; 2 – при аплікації D_L -AP5 (10 мкмоль/л); 3 – при аплікації DNQX (10 мкмоль/л). б – дія блокувальних НМДА- та не-НМДА-рецепторів на вЗПСС, реєстровані в безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині: 1 – вЗПСС в умовах контролю; 2 – після аплікації DNQX (10 мкмоль/л); 3 – при аплікації D_L -AP5 (10 мкмоль/л)

на мембранах постсинаптичних клітин. Розрахований за вольт-амперними характеристиками потенціал реверсії для цих струмів становив $-101 \pm 2,68$ мВ ($n = 6$) і відповідав рівноважному потенціалу для Cl^- , розрахованому за рівнянням Нернста для використовуваних розчинів (-109 мВ; рис. 4). Часовий хід більшості моносинаптичних вГПСС, зареєстрованих при підтримуваному потенціалі -70 мВ, характеризувався достатньо швидким зростанням та повільним спадом. Час до піку для вГПСС різних амплітуд був однаковим і становив $2,62$ мс $\pm 0,37$ мс ($n = 7$). Спад

добре апроксимувався однією експонентою з $\tau = 19,58$ мс $\pm 4,50$ мс ($n = 7$).

Викликані ГПСС в 8 з 13 пар були обстежені на чутливість до блокувальних гальмівної нейротрансмісії. Для 7 пар нейронів СГ/ДРСМ незалежно від позаклітинної концентрації Mg^{2+} аплікація специфічного блокувальника ГАМК_A-рецепторів бікукуліну метіодиду в концентрації 10 мкмоль/л не викликала суттєвих змін амплітуд і кінетичних показників вГПСС. Тоді як подальше прикладання стрихніну в концентрації 0,5–1 мкмоль/л призводило до повного блокування залишкового вГПСС

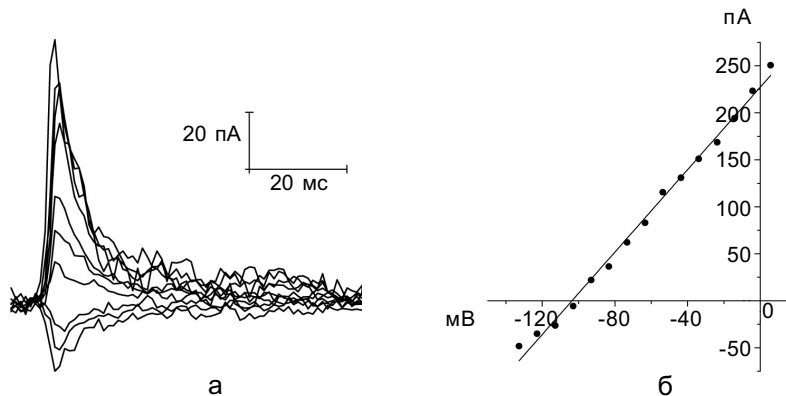


Рис. 4. Кінетичні характеристики викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС), відведених від клітин дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ) при стимуляції нейронів спінальних гангліїв (СГ) у парах: а – записи постсинаптичних струмів, реєстрованих при значеннях підтримуваного потенціалу, що змінювався від -130 до $+10$ мВ з інкрементом 10 мВ; б – вольт-амперна характеристика вГПСС, зареєстрованих при $20^\circ C$; рівноважний потенціал становив $-106,52$ мВ

(рис. 5, а). Такі фармакологічні ефекти та вищеописані кінетичні властивості дають підставу визначати зареєстровані нами вГПСС як гліциніндуковані Cl^- струми [9, 14, 26].

Однак у 1 парі нейронів СГ/ДРСМ вГПСС виявилися чутливими до блокатора GABA_A -рецепторів (див. рис. 5, б). У цьому разі аплікація бікукуліну метіодиду повністю пригнічувала вГПСС. Крім того, інактиваційна кінетика цих струмів була повільнішою за таку гліцинактивованих (τ спаду, усереднене за 40 записами, становило $44,43 \text{ мс} \pm 0,49 \text{ мс}$), що дало змогу ідентифікувати їх як GABA -індуковані Cl^- струми [11, 14, 26].

ОБГОВОРЕННЯ

Ми досліджували властивості хімічної нейротрансмісії на рівні первинних аферентних входів у спинний мозок на розробленій нами *in vitro* моделі суміжно-культивованих дисоційованих нейронів СГ і ДРСМ щура. У такій системі добре ідентифіковані морфологічні відмінності двох популяцій клітин і можливість візуально відстежити проєкції аферентних нейронів на клітини ДРСМ забезпечували зручність проведення та достатньо високу продук-

тивність запланованих електрофізіологічних досліджень з визначення постсинаптичних ефектів.

Отримані нами експериментальні результати узгоджуються з даними попередніх електрофізіологічних та імунохімічних досліджень про наявність і вивільнення низки медіаторів у терміналях волокон первинних аферентів, що закінчуються на різних структурах ДРСМ [24]. У деяких попередніх працях були описані збуджувальні та гальмівні синаптичні відповіді в спинномозкових клітинах, викликані активацією нейронів СГ [25]. При цьому відзначалося, що збуджувальні постсинаптичні сигнали можуть бути опосередковані глутаматом чи спорідненими амінокислотами, що взаємодіють переважно з рецепторами не- NMDA субкласу [7, 24, 26]. Також як медіатор була описана функція субстанції Р у передачі ноцицептивної інформації нейронам ДРСМ, експресуючим NK1-рецептори [15]. Наші результати свідчать про вивільнення глутамату як збуджувального нейромедіатора в синаптичних терміналях нейронів СГ і про участь NMDA- и не-NMDA-рецепторів у реалізації вГПСС у нейронах ДРСМ. Однак при нормальній фізіологічній концентрації Mg^{2+} 2 ммоль/л

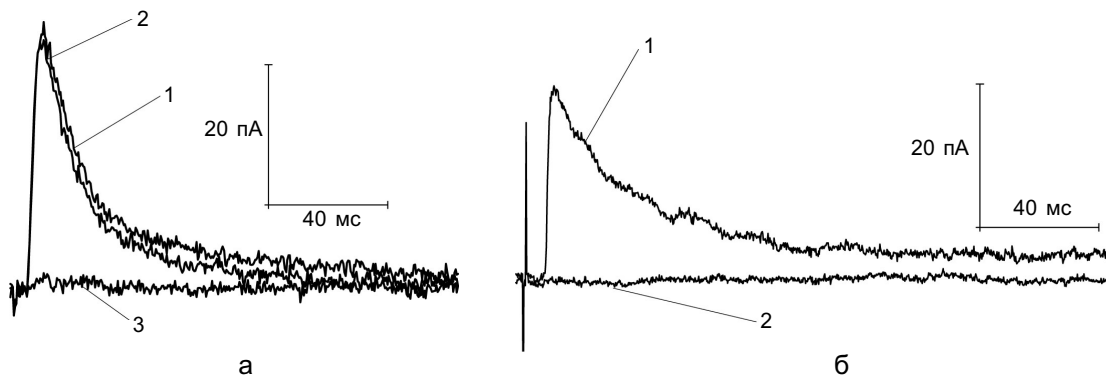


Рис 5. Ефекти блокаторів гальмівної синаптичної передачі на викликані гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС) нейронів дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ), реєстрованих в ко-культурі: а – фармакологічні властивості вГПСС зі швидкою інактивацією: 1 – вГПСС в контролі; 2 – при аплікації метіодиду бікукуліну (10 мкмоль/л); 3 – після аплікації стрихніну в концентрації 0,5 мкмоль/л. б – блокувальна дія метіодиду бікукуліну (10 мкмоль/л) на вГПСС клітин ДРСМ, зареєстровані в одній з пар СГ/ДРСМ нейронів: 1 – вГПСС у контролі; 2 – після аплікації метіодиду бікукуліну (10 мкмоль/л)

виділити NMDA-компонент вЗПСС виявилося неможливим, що могло бути пов'язано з потенціалзалежним блокуванням Mg^{2+} вхідного струму через NMDA-рецептор-керовані канали при підтримуваному потенціалі -70 мВ [12]. Хоча в наших умовах зміна підтримуваного потенціала на мембранах ДРСМ нейронів у бік деполаризувальних значень не виявляла суттєвих змін у лінійності ходу вольт-амперних характеристик та кінетичних властивостях вЗПСС. Напевно внесок NMDA-рецепторів у реалізацію інтегрального вЗПСС виявився незначним, бо скасування Mg^{2+} -блоку деполаризацією не вплинуло на постсинаптичну відповідь та її часові характеристики. Можливість оцінити NMDA-компонент вЗПСС стала доступною тільки при виключенні позаклітинного Mg^{2+} . При цьому розмір NMDA-опосередкованого струму становив $18,06 \pm 2,19$ % від інтегрального вЗПСС (див. рис. 3, б). Таким чином, можна припустити, що в дослідженій нами групі клітин ДРСМ на постсинаптичних мембранах у синапсах нейронів СГ щільність NMDA-рецепторів є нижчою порівняно з не-NMDA-рецепторами. Це підтверджує домінуючий внесок останніх у реалізацію вЗПСС.

Питання про ідентифікацію медіаторів, які опосередковують гальмівну трансмісію в синапсах нейронів СГ на клітини ДРСМ, нині залишається відкритим. Деякими дослідниками було висловлено припущення, що ГАМК і гліцин як медіатори, ймовірно, відіграють важну роль у модуляції ноцицептивної трансмісії в ДРСМ [25, 26]. Імунногістохімічні дослідження з використанням методів імунного забарвлення також показали наявність нейронів і терміналей, що містять гліцин і ГАМК у високій концентрації, в ділянках ДРСМ, що приймають первинні аферентні входи [5, 20, 21, 23]. Проте роль цих медіаторів у гальмуванні сенсорного сигналу не є загально-визнаною, як і взагалі існування гальмівних

проекцій первинних аферентів на нейрони ДРСМ [7]. В наших експериментах у більшості досліджених клітин ДРСМ вГПСС, що були викликані стимуляцією нейронів СГ, виявилися чутливими до блокатора гліцинових рецепторів (рис. 5, а), що дає змогу пов'язати ресстрацію таких струмів з пресинаптичним вивільненням гліцину в терміналях клітин СГ. Крім того, кінетичні властивості цих вГПСС також узгоджуються з такими, раніш описаними для гліцинергічних ПСС [9, 14, 25, 26]. Однак нами були також виявлені вГПСС, кінетичні характеристики котрих, а також ефект антагоністу ГАМК_A-рецепторів, є показником того, що вони зумовлені викидом ГАМК у пресинаптичних терміналях первинних аферентів (див. рис. 5, б). Таким чином, результати наших експериментів показали, що як гліцин-, так і ГАМК-ергічні нейрони СГ можуть брати участь у передачі гальмівних сигналів клітинам ДРСМ.

Попередні дослідження в ідентифікації властивостей гальмівної та збуджувальної нейропередачі на рівні первинних аферентних входів спиралися на вивчення синаптичних контактів, що формуються визначеними типами аферентних волокон і пов'язані з передачею сигналів певних модальностей. У нашій роботі ми не ставили завдання з'ясувати належність аксонів пресинаптичних СГ нейронів до A_{α} , A_{β} чи С-типу волокон. Тому ми не можемо екстраполювати наші результати на особливості хімічної передачі больових або інших конкретних видів сенсорних сигналів. Однак представлена нами *in vitro* модель суміжно-культивованих дисоційованих нейронів СГ/ДРСМ дає можливість вивчення модулювальних ефектів на синаптичну передачу, а також детального дослідження особливостей функціонування специфічних синаптичних контактів, що формуються в парі клітин СГ і ДРСМ, та відображають перший рівень обробки соматосенсорних сигналів.

М.С. Шипшина, МС. Веселовский

ОСОБЕННОСТИ СЕНСОРНОЙ НЕЙРО- ТРАНСМИССИИ В КО-КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ СПИНАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ И ДОРСАЛЬНЫХ РОГОВ СПИННОГО МОЗГУ КРЫС

В данной работе мы исследовали свойства химической нейронпередачи на уровне первичных афферентных входов в спинной мозг на разработанной нами простой и удобной *in vitro* модели смежно-культивируемых диссоциированных нейронов спинальных ганглиев (СГ) и нейронов дорсальных рогов спинного мозга (ДРСМ) новорожденных крыс. Результаты наших исследований показали наличие возбуждающих и тормозных синапсов нейронов СГ на клетках ДРСМ. Возбуждающая нейротрансмиссия в таких синапсах была опосредована пресинаптическим высвобождением глутамата и последующей активацией рецепторов NMDA- и не- NMDA-субклассов. При этом активация не-NMDA-рецепторов делает основной вклад в реализацию возбуждающих постсинаптических эффектов. В передачу тормозных сигналов были вовлечены как глицин-, так и ГАМК-эргические нейроны СГ. Однако в большинстве исследованных пар нейронов тормозная синаптическая трансмиссия была опосредована пресинаптическим высвобождением глицина. Предложенная нами *in vitro* модель ко-культуры нейронов СГ/ДРСМ, в отличие от ранее разработанных подобных методов, позволяет наиболее полно использовать современные методические подходы в изучении особенностей трансмиссии соматосенсорной информации с периферии в ЦНС, а также дает возможность глубокого исследования специфических свойств синапсов афферентных нейронов.

Ключевые слова: спинальные ганглии, дорсальные рога спинного мозга, ко-культура, синаптическая передача, NMDA-рецепторы, не-NMDA-рецепторы, γ -аминонасыщенная кислота, глицин, вызванные постсинаптические токи.

M. S. Shipshina, N. S. Veselovsky

CHARACTERISTICS OF SENSORY NEUROTRANSMISSION IN CO-CULTURE OF BOTH THE RAT DORSAL ROOT GANGLION AND THE RAT DORSAL HORN SPINAL CORD NEURONS

We examined properties of chemical neurotransmission at the level of primary afferent inputs into spinal cord with the new easy-to-use *in vitro* model of contiguously-cultivated dissociated both the dorsal root ganglion neurons (DRG) and the dorsal horn spinal cord neurons (DHSC) from newborn rats. The results of our studies showed the presence of excitatory and inhibitory DRG neurons synapses on the cells of DHSC. The excitatory afferent signaling in such synapses was mediated by presynaptic release of glutamate and a following activation of both NMDA- and non-NMDA-receptor subclasses.

In these cases the activation of non-NMDA-receptors makes a main contribution to realization of excitatory postsynaptic effects. Either glycine- or GABA-ergic DRG neurons were involved in transmission of inhibitory signals to the DHSC neurons. However, in vast majority of examined neuronal pairs the inhibitory synaptic transmission was mediated by presynaptic release of glycine. As distinct from the previous similar methods, an *in vitro* model of co-culture of both the DRG and the DHSC neurons proposed here allows to use comprehensively modern technical approaches for examination of the transmission of somatosensory information from the periphery to the CNS. The described model could be acceptable for detailed investigation of specific properties of primary afferent synapses.

Key words: dorsal root ganglion, dorsal horn spinal cord, co-culture, synaptic transmission, NMDA- receptors, non-NMDA-receptors, GABA, glycine, evoked postsynaptic currents.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шеперд Г. Нейробиология. – М.: Мир, 1987. – 454 с.
2. Экклс Дж. Физиология нервных клеток. – М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1959. – 298 с.
3. Brown A. G. The dorsal horn of the spinal cord // *Q. J. Exp. Physiol.* – 1982. – **67**. – P. 193–212.
4. Campeton R. Local control of neurite development by nerve growth factor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – **74**. – P. 4516–4519.
5. Cronin J.N., Bradbury E.J., Lidierth M. Laminal distribution of GABAA- and glycine-receptor mediated tonic inhibition in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord: effects of picrotoxin and strychnine on expression of Fos-like immunoreactivity // *Pain.* – 2004. – **112**. – P. 156–163.
6. Giesler G.J., Menetrey D., Basbaum A.I. Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat // *J. Compar. Neurol.* – 1979. – **184**. – P. 107–126.
7. Gruner W., Silva L.R. w-Conotoxin Sensitivity and Presynaptic Inhibition of Glutamatergic Sensory Neurotransmission *in vitro* // *J. Neurosci.* – 1994. – **14**, №5. – P. 2800–2808.
8. Hestrin S., Nicoll R.A., Perkel D.J., Sah P. Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices // *J. Physiol.* – 1990. – **422**. – P. 203–225.
9. Jonas P., Bischofberger J., Sandkühler J. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse // *Science.* – 1998. – **281**, № 5375. – P. 419–424.
10. Lee C.J., Labrakakis C., Joseph D.J., Macdermott A.B. Functional similarities and differences of AMPA and Kainate receptors expressed by cultured rat sensory neurons // *Neuroscience.* – 2004. – **129**. – P. 35–48.
11. Maximov A., Pang Z.P., Tervo D.G., Sudhof T.C.

- Monitoring synaptic transmission in primary neuronal cultures using local extracellular stimulation // *J. Neurosci. Methods.* – 2007. – **161**. – P. 75–87.
12. Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons // *Nature.* – 1984. – **309**. – P. 261–263.
 13. Medvedeva Y.V., Veselovsky N.S., Fedulova S.A., Kostyuk P.G. Postsynaptic currents in dorsal root ganglion neurons co-cultured with spinal cord neurons // *Neurophysiology.* – 2001. – **33**. – P. 1–4.
 14. Mitchell E.A., Gentet L.J., Dempster J, Belelli D. GABAA and glycine receptor-mediated transmission in rat lamina II neurones: relevance to the analgesic actions of neuroactive steroids // *J. Physiol.* – 2007. – **583**. – P. 1021–1040.
 15. Morris R., Cheung O., Stewart A., Maxwell D. Spinal dorsal horn neurone targets for nociceptive primary afferents: do single neurone morphological characteristics suggest how nociceptive information is processed at the spinal level // *Brain Res. Rev.* – 2004. – **174**, № 46. – P. 173–190.
 16. Nelson P.G., Pun R.Y., Westbrook G.L. Synaptic excitation in cultures of mouse spinal cord neurones: receptor pharmacology and behavior of synaptic currents // *J. Physiol.* – 1986. – **372**. – P. 169–190.
 17. Ohshiro H., Ogawa S., Shinjo K. Visualizing sensory transmission between dorsal root ganglion and dorsal horn neurons in co-culture with calcium imaging // *J. Neurosci. Methods.* – 2007. – **165**. – P. 49–54.
 18. Sah P., Hestrin S., Nicoll R.A. Properties of excitatory postsynaptic currents recorded in vitro from rat hippocampal interneurons // *J. Physiol.* – 1990. – **430**. – P. 605–616.
 19. Sikand P., Premkumar L.S. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse // *Ibid.* – 2007. – **581**, № 2. – P. 631–647.
 20. Todd A.J., Spike R.C. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn // *Prog. Neurobiol.* – 1993. – **41**. – P. 609–645.
 21. Todd A. J., Watt C, Spike R.C., Sieghart W. Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord // *J. Neurosci.* – 1996. – **76**, № 3. – P. 974–982.
 22. Vikman K.S., Backström E., Kristensson K., Hill R.H. A two-compartment in vitro model for studies of modulation of nociceptive transmission // *J. Neurosci. Methods.* – 2001. – **105**. – P. 175–184.
 23. Watson N. Synaptic interactions between the terminals of slow-adapting type II mechanoreceptor afferents and neurones expressing -aminobutyric acid- and glycine-like immunoreactivity in the rat spinal cord // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – **471**. – P. 168–179.
 24. Yoshimura M., Jessell T.M. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord // *J. Physiol.* – 1990. – **430**. – P. 315–335.
 25. Yoshimura M., Nishi S. Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: Pharmacological properties of synaptic currents // *Neuroscience.* – 1993. – **53**. – P. 519–526.
 26. Yoshimura M., Nishi S. Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord in vitro // *J. Physiol.* – 1995. – **482**. – P. 29–38.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: shipshina@ya.ru

Матеріал надійшов до редакції 12.01.2010

**В.О. Кириченко, В.С. Нагібін, Л.В. Тумановська,
В.Є. Досенко, В.К. Рибальченко, О.О.Мойбенко**

Ефекти заглушення гена убіквітину при аноксії–реоксигенації в культурі кардіоміоцитів

Беручи до уваги важливу роль убіквітинзалежного протеасомного протеолізу в обміні функціональних білків кардіоміоцитів (актину, міозину, іонних каналів тощо), становить інтерес дослідження механізмів клітинної смерті при специфічному заглушенні гена убіквітину (UBB) за допомогою РНК-інтерференції та моделюванні аноксії–реоксигенації. Інтерферуючі РНК вводили шляхом електропорації в ізолювані неонатальні кардіоміоцити, після чого первинна культура клітин підлягала дії аноксії (30 хв) з наступною реоксигенацією (1 або 24 год). Відсоток живих, некротичних, апоптотичних та аутофагічних кардіоміоцитів визначали флуоресцентною мікроскопією. Кількісну оцінку експресії UBB і субодиниць протеасоми $\beta 5$ (PSMB5) та $\beta 9$ (PSMB9) проводили з використанням полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Показано, що при моделюванні аноксії–реоксигенації в режимі 30 хв – 24 год експресія мРНК UBB збільшувалася в 2,1 раза ($P < 0,05$). При введенні в культуру малих інтерферуючих РНК експресія мРНК цього білка зменшувалася в 2,4 раза ($P < 0,05$), при цьому знижувалася експресія мРНК субодиниць протеасоми $\beta 5$ і $\beta 9$ в 1,3 ($P > 0,05$) та 1,6 ($P < 0,05$) раза відповідно в порівнянні з контролем (введення індиферентних дволанцюгових РНК). При цьому зменшувалася кількість живих клітин у культурі (70,26 % \pm 1,54 %, $P < 0,05$), збільшувалася кількість некротичних (25,92 % \pm 1,52 %, $P > 0,05$), апоптотичних (4,32 % \pm 0,53 %, $P > 0,05$) і клітин з ознаками аутофагії (38,2 % \pm 3,81 %, $P < 0,05$). При цьому заглушення UBB при аноксії–реоксигенації (30 хв – 1 год) збільшувало кількість живих клітин на 3,7 % і зменшувало кількість некротичних кардіоміоцитів на 4,7 % та не впливало на популяцію апоптотичних та аутофагічних клітин. Отримані результати свідчать про те, що заглушення UBB, експресія якого збільшується при аноксії–реоксигенації, індукує некротичну та аутофагічну загибель інтактних культивованих кардіоміоцитів, однак деякою мірою збільшує резистентність цих клітин до аноксії–реоксигенації.

Ключові слова: убіквітин, РНК-інтерференція, кардіоміоцити.

ВСТУП

Оскільки серце постійно функціонує з великим навантаженням, що потребує інтенсивного синтезу нових протеїнів, то постає нагальна потреба контролю за фолдингом новосинтезованих і своєчасною утилізацією «відпрацьованих» білків. Ефективність виконання такого завдання забезпечується потужною системою контролю за якістю протеїнів, яка складається насамперед із шаперонів та убіквітинзалежного протеасомного протеолізу

(УПП). Функціонування останнього визначається двома основними процесами: убіквітинізацією (ковалентна модифікація білка-мішені за допомогою приєднання ланцюжка низькомолекулярного білка убіквітину) та гідролізом маркованих таким чином білків мультиферментним комплексом під назвою протеасома. Про важливу роль системи УПП для нормальної роботи клітин серця свідчать дані про його порушення при експериментальному відтворенні серцевої патології, зокрема ішемії,

© В.О. Кириченко, В.С. Нагібін, Л.В. Тумановська, В.Є. Досенко, В.К. Рибальченко, О.О.Мойбенко

ішемії–реперфузії та гіпертрофії серця [2, 7, 16], і при реальних захворюваннях людини (кардіоміопатіях, інфаркті міокарда, гіпертрофії) [1, 3]. Зокрема, показано, що активність протеасоми 26S при моделюванні ішемії міокарда суттєво знижується, що пояснюється високою чутливістю цього комплексу до оксидативного ушкодження [2]. При відтворенні аноксії–реоксигенації для кардіоміоцитів встановлено, що активність протеасоми зменшується при аноксії, але швидко відновлюється до контрольного значення після реоксигенації, а застосування інгібіторів протеасоми при цьому дає змогу захистити кардіоміоцити від ушкодження [2]. Введення селективних інгібіторів протеасоми в експерименті *in vivo* при моделюванні ішемії–реперфузії серця також призводило до зменшення розмірів ділянки інфаркту міокарда [16]. При цьому зрозуміло, що адекватна робота протеасоми, а саме специфічність і вибірковість протеолізу, забезпечується системою убіквітинізації, в якій убіквітин займає ключове положення. Він є внутрішньоклітинним, низькомолекулярним, висококонсервативним регуляторним протеїном, що складається з 76 амінокислотних залишків (молекулярна маса 8564,5 Да). Основна його функція полягає у маркуванні білків, що підлягають протеасомній деградації. Встановлено, що убіквітин є важливим не лише для здійснення протеасомного протеолізу, а й відіграє велику роль у правильній компартменталізації білків, внутрішньоклітинній сигналізації, сортуванні трансмембранних білків та їхньому транспорті [18, 19, 20]. В останні роки показано, що убіквітин розглядається як один із перспективних молекулярних маркерів захворювань серця, оскільки його експресія значно підвищується у пацієнтів з гострим інфарктом міокарда та стенокардією [4]. Однак експресія генів, що кодують різні субдиниці протеасоми, не вивчалася, і це не дає можливість об'ек-

тивно оцінити ефективність роботи УПП як цілісної системи деградації внутрішньоклітинних протеїнів.

Мета цієї роботи – вивчити ефекти заглушення гена убіквітину (UBB – від англ. Ubiquitin B) із застосуванням малих інтерферуючих РНК (siRNA) в культивованих кардіоміоцитах, визначити експресію генів, що кодують субдиниці протеасоми (PSMB5 і PSMB9) і дослідити резистентність таких клітин до аноксії–реоксигенації.

МЕТОДИКА

Культикування ізолюваних кардіоміоцитів та моделювання аноксії–реоксигенації. Дослідження проведені на щурах лінії Вістар віком 2 доби. Культуру кардіоміоцитів отримували за методикою Reineske [19]. Тварин знерухомлювали за допомогою цервікальної дислокації, через повздовжній розріз грудної порожнини виймали серце. Шлуночки відокремлювали від передсердь, відмивали в стерильному буферному сольовому розчині (рН 7,4) такого складу (ммоль/л): НЕPES – 20, КСl – 5,4, NaCl – 116,4, глюкоза – 5,5, Na₂HPO₄ – 0,4 та K₂HPO₄ – 0,4. Після цього їх механічно подрібнювали ножицями на шматочки, розміром приблизно 1 мм³ та переносили у “свіжу” порцію буфера, що містив 0,34 мг/мл колагенази II типу та 0,6 мг/мл панкреатину. Проводили 3–4 цикли інкубування по 10 хв при 37°C, центрифугували (400 g, 1,5 хв), а осад ресуспендували в 1 мл середовища для культивування, до якого входили середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM) та середовище 199 у співвідношенні 4:1, ембріональна теляча сироватка – 15 %, NaHCO₃ – 4,2 ммоль/л, НЕPES – 15 ммоль/л, стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл і пеніцилін – 100 ОД/мл. Кількість живих і загиблих клітин підраховували в камері Горяєва при додаванні 0,2%-го трипанового синього.

Отримані клітини висаджували з розрахунку 120 000 клітин на 1 см² поверхні в 16-лункові пластикові планшети для культур клітин на скло, вкрите 2%-м желатином. Культивування кардіоміоцитів проводили в живильному середовищі, при 37°C у газовому середовищі: 5 % CO₂ та 95 % атмосферного повітря. Через 24 год культивування змінювали живильне середовище та моделювали аноксію–реоксигенацію таким чином: подавання газової суміші, що включала 5 % CO₂ та 95 % Ar протягом 30 хв у ексікаторі з щільно притертою кришкою, куди зазначену газову суміш подавали через стерилізуючий фільтр (діаметр пор фільтра 0,22 мкм) і шар стерильної води, налитий на дно ексікатора. Для моделювання реоксигенації після аноксії замінювали живильне та газове середовища (без аргону) та культивували клітини протягом 1 або 24 год [6].

РНК-інтерференція in vitro. РНК для специфічного заглушення UBV, а також індіферентні РНК (Scr siRNA, від англ. scrambled RNA), що не впливають на експресію жодного гена, були синтезовані на замовлення фірмою «Metabion» (Німеччина) і мали таку послідовність нуклеотидів:

UBV-Sense-5`-GGCCAAGAUCAG GAUAAAUU-3`,

UBV-Antisense-5`-UUUAUCCUGGA UCUUGGCCUU-3`,

Scrambled-Sense-5`-UGUUCAGCGAA AUAUAACCUU-3`,

Scrambled-Antisense-5`-GGUUAUAUU UCGCUGAACAUU-3`.

Дволанцюгові РНК отримували безпосередньо перед введенням в клітини, згідно з протоколом виробника: розчини відповідних сенсових і антисенсових олігонуклеотидів розводили двічі за допомогою буфера для анелінгу, що містив (ммоль/л): HEPES-KOH – 30 (рН 7,4), KCl – 100, MgCl₂ – 2, NH₄Ac – 50. В окрему пробірку вносили рівні об'єми кожного з розчинів і

додавали удвічі менший об'єм буфера. Отриману суміш інкубували 1 хв при 90 °C і протягом 45 хв охолоджували до кімнатної температури у термоциклері “GeneAmp System 2700”. Введення у кардіоміоцити специфічних до мРНК убіквітину чи індіферентних дволанцюгових РНК здійснювали за допомогою набору для трансфекції кардіоміоцитів «Rat Cardiomyocytes Neo Nucleofector Kit» («Lonza», Швейцарія) та приладу Nucleofector («Lonza», Швейцарія). Кардіоміоцити у живильному середовищі переносили у пробірки та осаджували центрифугуванням при 400 g протягом 90 с. До клітинного осаду додавали 100 мкл буфера, що містив 85 мкл розчину для трансфекції кардіоміоцитів щура та 15 мкл розчину «Supplement-1» (за рекомендаціями виробника) а також 7,5 мкл розчину контрольних (індіферентних) чи UBV-специфічних дволанцюгових РНК (20 мкмоль). Вміст пробірок обережно перемішували, переносили в кювети для трансфекції, які поміщали у нуклеофектор і проводили трансфекцію за протоколом виробника. Вміст кювет переносили у нове середовище та культивували за наведеною вище схемою протягом доби. Всі операції проводилися при 37 °C.

Виділення РНК, зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі. РНК виділяли із використанням набору Trizol RNA-prep («Isogen», Росія) з культур кардіоміоцитів, що зазнавали введення специфічних до мРНК убіквітину чи індіферентних дволанцюгових РНК за допомогою електропорації. Концентрацію виділеної РНК визначали спектрофотометром NanoDrop 1000 («Thermo Scientific», США). Зворотну транскрипцію (ЗТ) проводили із використанням First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва), застосовуючи 1,2–1,5 мкг загальної РНК і гексамерний праймер. Отримана внаслідок ЗТ комплементарна ДНК (кДНК) зазнавала генспецифічної полімеразної ланцю-

гової реакції (ПЛР)-ампліфікації. Для оцінки експресії мРНК убіквітину ми використовували праймери такої послідовності: прямий: UBB-F 5'-GGCAAGACCATCASCCTG-3', зворотний: UBB-R 5'-CTGAAGAATTAATAGCCA-3'. Експресію UBB стандартизували відносно експресії гена β -актину як ендogenous контролю, для якого використовувалися праймери такої послідовності: прямий: β -actin-F 5'-CTTAGAGG GACAAGTGGCG-3' та зворотний: β -actin-R 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'. ПЛР-ампліфікація UBB проводилася у 10 мкл суміші для ПЛР у реальному часі з барвником (SYBR Green), що містив 40 пмоль кожного праймера. Об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Ампліфікацію здійснювали за допомогою термоциклера «7500 Fast Real-Time PCR System». Програму ампліфікації починали з попередньої активації AmpliTaq Gold® ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95°C і продовжували 45 циклами, кожен з яких складався з: денатурації при 95°C (19 с), приєднання праймерів та елонгації при 58°C (1 хв). Для контролю специфічності проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 58 до 95°C із реєстрацією зниження інтенсивності флуоресценції комплексів двохланцюгових ДНК з SYBR Green. Визначали відносний рівень експресії гена UBB із застосуванням загальноприйнятої методики (рівень експресії = $2^{-\Delta Ct}$, де Ct – пороговий цикл ампліфікації). Для кількісної оцінки експресії генів PSMB5 використовували набір TaqMan Gene Expression Assay 7500 Rn01488742_m1, а для оцінки експресії PSMB9 – Custom TaqMan Gene Expression Assay 7500. Проби для відповідних генів розроблені на основі послідовності мРНК щура («Applied Biosystems», США). Експресію генів PSMB5 та PSMB9 нормалізували відносно гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GADPH) як ендogenous контролю, використовуючи реактив TaqMan Rodent GADPH

Control Reagent (VIC™Probe). ПЛР-ампліфікація складалася з 50 таких циклів: початкова денатурація при 95°C упродовж 20 с, з наступною обробкою при 95°C протягом 3 с, приєднання праймерів та елонгація – 60 °C, 30 с. Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення “7500 Fast Real-time PCR Software”.

Визначення кількості живих, некротичних апоптотичних та аутофагічних клітин. Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин визначали прижиттєвим фарбуванням кардіоміоцитів бісбензидом (Hoechst 33342) та йодидом пропідіуму [6] в концентрації 8,75 мкмоль/л та оцінювали за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії (Nikon Eclipse E200, фільтр D/PI, довжина хвилі збудження 330–380 та 510–560 нм для Hoechst та йодиду пропідіуму відповідно). Для виявлення аутофагічних вакуолей у клітинах використовували специфічний барвник – монодансилкадаверин (прижиттєве забарвлення) в концентрації 100 мкмоль/л (фільтр UV-2A, довжина хвилі збудження 330–380 нм).

Статистична обробка. Отримані цифрові результати обробляли статистично з використанням програми Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, США) та Origin 7.5 (OriginLab Corporation, США). Вірогідність відмінностей середніх значень ($P < 0,05$) визначали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Експресія UBB в культурі ізольованих кардіоміоцитів при моделюванні аноксії–реоксигенації та при введенні siRNA, специфічних до UBB. За допомогою ПЛР у реальному часі було показано, що моделювання аноксії–реоксигенації (в режимі 30 хв – 24 год) призводить до підвищення експресії мРНК убіквітину в 2,1 раза ($P < 0,05$; рис. 1).

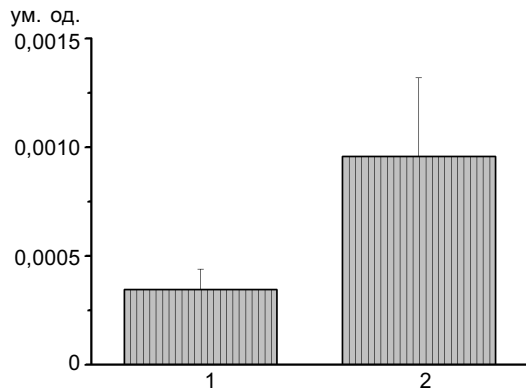


Рис. 1. Експресія мРНК убіквітину в культурі кардіоміоцитів за умов моделювання анексії-реоксигенації (n=5): 1 – контроль, 2 – культура кардіоміоцитів, що підлягали моделюванню анексії-реоксигенації

При введенні в культуру кардіоміоцитів малих інтерферуючих РНК, специфічних до мРНК убіквітину, експресія цього гена знижувалася в 2,4 раза ($P < 0,05$; рис. 2), що є підтвердженням ефективності його заглушення.

Експресія генів протеасомних субодиниць PSMB5 та PSMB9 в культурі ізольованих кардіоміоцитів при заглушенні UVB. У культурах клітин нами також було визначено рівні експресії двох протеасомних субодиниць: $\beta 5$, що відповідає за хімотрипсिनоподібну активність ферменту

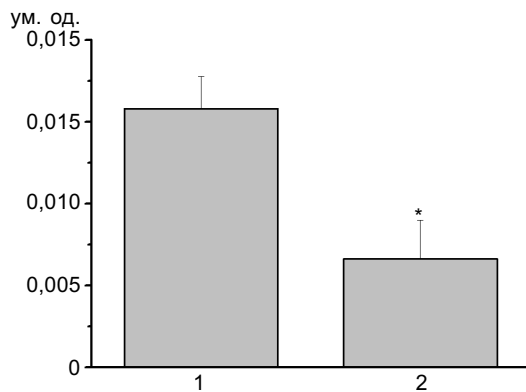


Рис. 2. Експресія мРНК убіквітину в культурі кардіоміоцитів за умов специфічного заглушення цього гена за допомогою інтерферуючих РНК (n=5): 1 – контрольна культура кардіоміоцитів, якій було введено індиферентні РНК; 2 – культура, у яку було введено специфічні інтерферуючі РНК (siRNA) до гена убіквітину. * $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

(рис. 3,а) та індукційної субодиниці $\beta 9$ (див. рис 3,б). Рівень експресії мРНК указаних субодиниць знижувався в 1,3 ($P > 0,05$) та 1,6 ($P < 0,05$) раза відповідно порівняно з контролем (введення індиферентних siRNA). Такий ефект може опосередковано вказувати на залежність експресії субодиниць протеасоми від вмісту убіквітину в клітині або певних поліубіквітинізованих білків, вміст яких знижується в разі інтерференції UVB.

Співвідношення живих, некротичних, апоптотичних та аутофагічних клітин в культурі кардіоміоцитів при введенні інтерферуючих РНК до убіквітину та при моделюванні анексії-реоксигенації. Заглу-

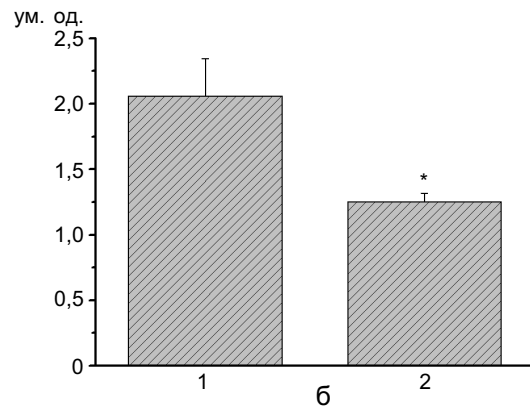
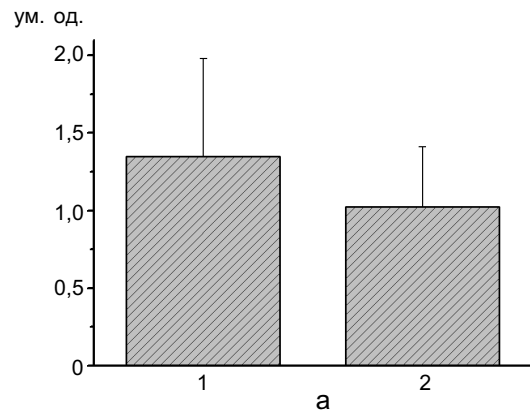


Рис. 3. Експресія генів протеасомних субодиниць PSMB5 (а) та PSMB9 (б) у культурі кардіоміоцитів за умов специфічного заглушення гена убіквітину (n=5). 1 – контрольна культура кардіоміоцитів, якій було введено індиферентні РНК; 2 – культура, у яку було введено специфічні інтерферуючі РНК (siRNA) до гена убіквітину. * $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

шення UBВ у культурі кардіоміоцитів спричиняло зміни у співвідношенні живих клітин і клітин з ознаками різних видів запрограмованої та незапрограмованої клітинної смерті. Так, через добу після введення дволанцюгових РНК, специфічних до мРНК UBВ, кількість живих клітин у культурі зменшувалася до $70,26 \% \pm 1,54 \%$ ($P < 0,05$) порівняно з контрольними культурами (введення scg siRNA), відсоток живих клітин у яких становив $75,58 \% \pm 1,54 \%$ (рис. 4,а). Однак при відтворенні аноксії з подальшою реоксигенацією кількість живих клітин у контролі зменшувалася до $66,58 \% \pm 1,52 \%$ ($P < 0,05$), тоді як попереднє заглушення UBВ у культурах клітин, навпаки, спричиняло протективний ефект – відсоток живих клітин не відрізнявся від контрольних значень – $70,3 \% \pm 3,39 \%$ ($P > 0,05$).

Негативні наслідки для культури кардіоміоцитів при введенні специфічних інтерферуючих РНК проявлялися в збільшенні кількості клітин, що гинули через некроз – до $25,92 \% \pm 1,52 \%$ ($P > 0,05$) порівняно з контрольними культурами ($23,61 \% \pm 1,56 \%$; див. рис. 4,б). Проте клітини зі зниженою експресією UBВ проявляли більшу стійкість до пошкоджувальної дії аноксії–реоксигенації та мали тенденцію до зменшення вмісту некротичних клітин до $21,51 \% \pm 2,42 \%$ ($P > 0,05$) порівняно з культурами, яким вводили індіферентні РНК ($26,22 \% \pm 1,73 \%$).

Кількість апоптотичних клітин в культурі з заглушенням UBВ мала тенденцію до збільшення до $4,32 \% \pm 0,53 \%$ ($P > 0,05$) порівняно з контролем ($3,49 \% \pm 0,3 \%$; див. рис. 4,в). При відтворенні аноксії–реоксигенації вміст апоптотичних клітин був підвищеним як у культурах, що підлягали трансфекції інтерферуючих РНК ($6,55 \% \pm 0,55 \%$; $P > 0,05$), так і в контрольних культурах ($6,44 \% \pm 0,6 \%$). Тобто кількість апоптотичних клітин суттєво не змінювалася при інтерференції UBВ.

Кількість клітин з ознаками аутофагії

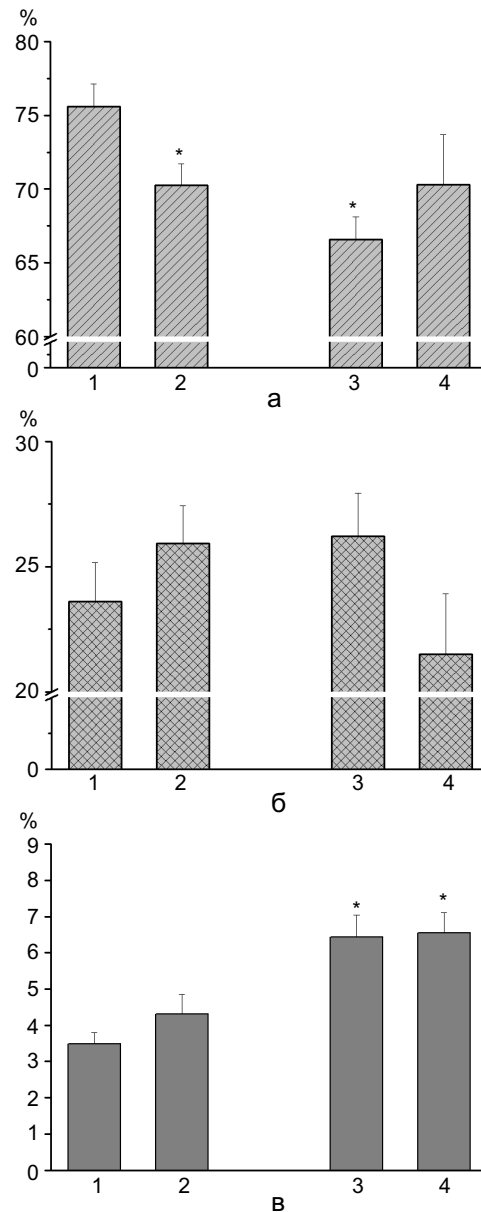


Рис. 4. Зміни кількості живих (а), некротичних (б) та апоптотичних (в) клітин у первинній культурі ізолюваних кардіоміоцитів неонатальних щурів при відтворенні аноксії–реоксигенації на тлі пригнічення експресії гена убіквітину. 1 – контрольні культури, у які було введено індіферентні РНК; 2 – культури, у які було введено специфічні до мРНК убіквітину інтерферуючі РНК; 3 – аноксія–реоксигенація на тлі введення індіферентних РНК; 4 – аноксія–реоксигенація на тлі введення інтерферуючих РНК (n=15). * $P < 0,05$ порівняно з контрольними культурами, у які було введено індіферентні РНК

після введення інтерферуючих РНК до UVB збільшувалася до $38,2\% \pm 3,81\%$ ($P < 0,05$) у порівнянні зі введенням індіферентних РНК ($23,55\% \pm 1,33\%$; рис. 5). Однак моделювання аноксії–реоксигенації в таких культурах не викликало значного збільшення клітин з ознаками аутофагії, кількість яких становила $34,08\% \pm 4,61\%$ ($P > 0,05$) порівняно з контрольними культурами при моделюванні аноксії–реоксигенації ($29,44\% \pm 3,02\%$).

Отже, заглушення UVB порушувало життєздатність кардіоміоцитів у культурі, що не дивно з огляду на величезне значення процесів убіквітинізації в клітинах. На нашу думку, можливість їх існування можна пояснити лише компенсаторним збільшенням експресії інших убіквітиноподібних протеїнів (малий убіквітиноподібний модифікатор (від англ. small ubiquitin-like modifier) – SUMO та білок, експресія якого знижується в процесі розвитку в попередниках нервових клітин – Nedd8), що також слугують міткою для розпізнавання білкових молекул протеасомою [10, 14, 22].

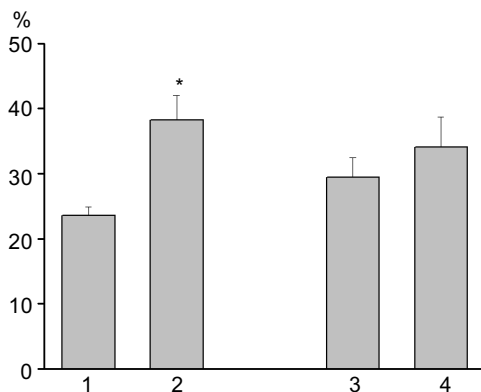


Рис. 5. Зміни кількості клітин з ознаками аутофагії у первинній культурі ізольованих кардіоміоцитів неонатальних щурів при відтворенні аноксії–реоксигенації. 1 – контрольні культури, у які було введено індіферентні РНК; 2 – культури, у які було введено специфічні до мРНК убіквітину інтерферуючі РНК; 3 – аноксія–реоксигенація на тлі введення індіферентних РНК; 4 – аноксія–реоксигенація на тлі введення інтерферуючих РНК (n=15). * $P < 0,05$ порівняно з контрольними культурами, у які було введено індіферентні РНК

Проте очевидно, що вказані протеїни не можуть повністю взяти на себе функції убіквітину.

Досить несподіваним для нас виявився той факт, що інтерференція UVB стимулювала більшою мірою незапрограмований вид клітинної смерті – тобто некроз, при тому, що нині немає літературних даних стосовно ролі убіквітину в індукції некрозу. Однак ушкоджені таким чином кардіоміоцити проявляли значно більшу стійкість до аноксії–реоксигенації, що відображалася у збільшенні кількості живих клітин і зменшенні некротичних. Вочевидь, заглушення UVB може розглядатися як особливий варіант прекодиціювання.

Відомо, що практично всі фактори прекодиціювання справляють ушкоджувальний ефект на клітини чи цілий орган, проте забезпечують стійкість до ішемічно–реперфузійного ураження. В наших попередніх роботах було показано, що інгібітори протеасоми індукують апоптотичну та аутофагічну клітинну смерть у культурі кардіоміоцитів, але визначають підвищену резистентність клітин до аноксії–реоксигенації в разі пригнічення активності протеасоми безпосередньо перед припиненням оксигенації (раннє прекодиціювання) та у віддаленому періоді (пізнє прекодиціювання), коли термін між аплікацією інгібітора протеасоми становив 24 год [6, 21]. Слід зазначити, що протективний ефект як інтерференції UVB, так і інгібіторів протеасоми досягався внаслідок зменшення кількості саме некротичних клітин. Поясненням цього феномена, на нашу думку, може бути те, що субстратами протеасомного протеолізу є, зокрема, основні антиоксидантні ферменти: супероксиданіондисмутаза та каталаза [3, 7, 8], а, отже, порушення їх убіквітинізації або зменшення деградації протеасомою буде сприяти стабілізації вмісту вказаних білків у клітині. Це внаслідок зменшення оксидативного ушкодження та запобігає руй-

нуванню мембран клітин вільними радикалами і, як наслідок, – некрозу.

Добре відомо, що ішемічне ушкодження клітин призводить до накопичення великої кількості пошкоджених, окиснених білків, що поряд з нестачею вільних амінокислот у клітині є сигналом до активації лізосомного протеолізу, який є кінцевим елементом аутофагії. Показано, що блокування УПП на різних рівнях призводить до значної активації аутофагічних процесів [5, 23]. У наших дослідах показано, що заглушення мРНК убіквітину спричинює значне підвищення вмісту клітин з ознаками аутофагії, проте кількість аутофагічних клітин не відрізняється в контрольній і дослідній групах (введення індиферентних або специфічних siRNA). Такий ефект, на нашу думку, може бути зумовлений тим, що убіквітин є селективним сигналом для аутофагічної деградації різних типів субстратів – від білкових агрегатів до мембранних органел [12]. Більше того, ідентифіковано білки p62 та NBR1 (від англ. neighbor of BRCA1 gene 1), що відіграють роль рецепторів для полубіквітинізованих протеїнів і їх скупчень та здатні здійснювати аутофагічну деградацію останніх [11, 15]. Тому зниження вмісту убіквітину в клітині та мічених ним білків може призводити до обмеження аутофагічної дегенерації.

ВИСНОВКИ

1. Заглушення експресії UBV із застосуванням малих інтерферуючих РНК викликає зменшення життєздатності кардіоміоцитів і збільшує популяцію некротичних клітин.

2. При аноксії–реоксигенації зниження вмісту мРНК убіквітину зменшує некротичну загибель кардіоміоцитів і збільшує кількість живих кардіоміоцитів.

3. Заглушення експресії UBV спричинює зниження експресії мРНК субодиниць протеасоми $\beta 5$ та $\beta 9$, що робить додатковий внесок до порушення протеасомного

протеолізу в культивованих кардіоміоцитах.

4. Установлений парадоксальний ефект (індукція некротичної та аутофагічної клітинної смерті інтактних кардіоміоцитів і збільшення їх витривалості при аноксії–реоксигенації) інтерференції UBV може бути віднесений до концепції прекодицювання як підвищеної стійкості ушкоджених клітин, зокрема кардіоміоцитів при патології серця.

**В.А.Кириченко, В.С. Нагибин,
Л.В. Тумановская, В.Е. Досенко,
В.К. Рибальченко, А.А. Мойбенко**

ЭФФЕКТЫ ЗАГЛУШЕНИЯ ГЕНА УБИКВИТИНА ПРИ АНОКСИИ-РЕОКСИГЕНАЦИИ В КУЛЬТУРЕ КАРДИОМИОЦИТОВ

Принимая во внимание важнейшую роль убиквитин-зависимого протеасомного протеолиза в обмене функциональных белков кардиомиоцитов (актина, миозина, ионных каналов и др.), представляется интересным исследование механизмов клеточной смерти при специфическом заглушении гена убиквитина (UBV) с помощью РНК-интерференции и моделировании аноксии–реоксигенации. Интерферирующие РНК вводили с помощью электропорации в изолированные неонатальные кардиомиоциты, после чего первичная культура клеток подвергалась действию аноксии (30 мин) с последующей реоксигенацией (1 или 24 ч). Процент живых, некротических, апоптотических и аутофагических кардиомиоцитов определяли с помощью флуоресцентной микроскопии. Количественная оценка экспрессии генов UBV и субъединиц протеасомы $\beta 5$ (PSMB5) и $\beta 9$ (PSMB9) проводилась с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Показано, что при моделировании аноксии–реоксигенации в режиме 30 мин – 24 ч экспрессия мРНК убиквитина увеличивалась в 2,1 раза ($P < 0,05$). При введении в культуру малых интерферирующих РНК экспрессия мРНК данного белка уменьшалась в 2,4 раза ($P < 0,05$), при этом снижалась экспрессия мРНК субъединиц протеасомы $\beta 5$ и $\beta 9$ в 1,3 ($P > 0,05$) и 1,6 ($P < 0,05$) раза соответственно по сравнению с контролем (введение индиферентных двухцепочечных РНК). При этом уменьшалось количество живых клеток в культуре ($70,26 \pm 1,54 \%$, $P < 0,05$), увеличивалось количество некротических ($25,92 \pm 1,52 \%$, $P > 0,05$), апоптотических ($4,32 \pm 0,53 \%$, $P > 0,05$) и клеток с признаками аутофагии ($38,2 \pm 3,81 \%$, $P < 0,05$). При этом заглушение гена убиквитина при аноксии–реоксигенации (30 мин – 1 ч) увеличивало количество живых клеток на 3,7 % и уменьшало количество некротических кардиомиоцитов на 4,7 % и не влияло на популяцию апоптотических и аутофагических клеток. Полученные

данные свидетельствуют о том, что заглушение гена UBB, экспрессия которого увеличивается при аноксии–реоксигенации, индуцирует некротическую и аутофагическую гибель интактных культивируемых кардиомиоцитов, однако в некоторой степени увеличивает резистентность этих клеток к аноксии–реоксигенации. Ключевые слова: убиквитин, РНК-интерференция, кардиомиоциты.

**V.O. Kyrychenko, V.S. Nagibin,
L.V. Tumanovska, V.E. Dosenko,
V.K. Rybalchenko, O.O. Moibenko**

EFFECTS OF UBIQUITIN GENE SILENCING IN ANOXIA-REXYGENATION OF NEONATAL CARDIOMYOCYTES

Ubiquitin-dependent proteasomal proteolysis is crucial in the turnover of cardiomyocytes functional proteins (actin, myosin, ion channels at al), therefore, investigation of cell death after ubiquitin (UBB) gene silencing using RNA interference and anoxia-reoxygenation (AR) modeling appears to be attractive. Cardiomyocytes were transfected by siRNA to ubiquitin gene using electroporation procedure, and then primary culture was treated by 30 min of anoxia and 60 min of reoxygenation. The number of living, necrotic and apoptotic cardiomyocytes was determined by fluorescence microscopy. The level of UBB and proteasome subunits $\beta 5$ (PSMB5) and $\beta 9$ (PSMB9) mRNA expression was estimated by real-time PCR. It was shown that UBB mRNA expression was increased by 2.1 times after AR modelling ($P < 0.05$). Small interference RNA injection in cell culture decreased ubiquitin, PSMB5 and PSMB9 expression by 2.4 ($P < 0.05$), 1.3 ($P > 0.05$) and 1.6 ($P < 0.05$) times, respectively, compared with control (scrambled siRNA introduction). At the same time, the number of living cardiomyocytes decreased to $70.26 \pm 1.54\%$, $P < 0.05$, and the level of necrotic cells, apoptotic cells and cells with signs of autophagy augmented by $25.92 \pm 1.52\%$, ($P = 0.38$), $4.32 \pm 0.53\%$ ($P = 0.15$) and $38.2 \pm 3.81\%$ ($P = 0.001$), respectively. Ubiquitin silencing after AR (30 min/1 h) increased the number of living cells by 3.7% and decreased the number of necrotic cells by 4.7% and did not alter the apoptotic and autophagic cells populations. The data obtained indicate that ubiquitin gene silencing, mRNA expression of which augmented during AR, induces necrotic and autophagic death of intact neonatal cardiomyocytes in culture, but enhances the AR resistance of these cells to some extent.

Key words: ubiquitin, RNA-interference, cardiomyocytes.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пашевін Д.О., Досенко В.С., Биць Ю.В., Мойбенко

О.О. Зміни активності протеасоми в тканинах аорти, серця та лейкоцитах крові в процесі моделювання холестеринового атеросклерозу // *Фізіол. журн.* – 2007. – **53**, №6. – С.3–10.

2. Bulteau A.L., Lundberg K.C., Humphries K.M. Sadek H.A., Szweida P.A., Friguet B., Szweida L.I. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P.30057–30063.
3. Cao C., Leng Y., Liu X., Yi Y., Li P., Kufe D. Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases // *Biochemistry.* – 2003. – **42**, №35. – P.10348–10353.
4. Chen S.M., Li Y.G., Wang D.M. Zhang G.H., Tan C.J. Expression of heme oxygenase-1, hypoxia inducible factor-1alpha, and ubiquitin in peripheral inflammatory cells from patients with coronary heart disease // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2009. – **47**, №3. – P.327–333.
5. Ding W.X., Ni H.M., Gao W. Yoshimori T., Stolz D.B., Ron D., Yin X.M. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability // *Amer. J. Pathol.* – 2007. – **171**, №2. – P.513–524.
6. Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovskaya L.V., Zagoriy V.Y., Moibenko A.A., Vaage J. Proteasomal proteolysis in anoxia-reoxygenation, preconditioning and postconditioning of isolated cardiomyocytes // *Pathophysiology.* – 2006. – **2**. – P.119–125.
7. Gross E.R., Gross G.J. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – **70**, №2 – P.212–221.
8. Hoffman E.K., Wilcox H.M., Scott R.W., Siman R. Proteasome inhibition enhances the stability of mouse Cu/Zn superoxide dismutase with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis // *J. Neurol. Sci.* – 1996. – **139**, №1. – P.15–20.
9. Ikeda F., Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals // *EMBO reports.* – 2008. – **9**, №6. – P.536–542.
10. Kim K.I., Baek S.H. Small ubiquitin-like modifiers in cellular malignancy and metastasis // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2009. – **273**. – P.265–311.
11. Kirkin V., Lamark T., Johansen T., Dikic I. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets // *Autophagy.* – 2009 – **5**, №5. – P.732–733.
12. Kirkin V., McEwan D.G., Novak I., Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy // *Mol Cell.* – 2009. – **34**, №3. – P.259–69.
13. Kostin S., Pool L., Elsdesser A., Hein S., Drexler H.C., Arnon E., Hayakawa Y., Zimmermann R., Bauer E., Klueckorn W.P., Schaper J. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts // *Circulat. Res.* – 2003. – **92**, №7. – P.715–724.
14. Kumar S., Yoshida Y., Noda M. Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1993. – **195**, №1. – P.393–399.

15. Lamark T., Kirkin V., Dikic I., Johansen T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets // *Cell Cycle*. – 2009. – **8**, №13. – P.1986–1990.
16. Luss H., Schmitz W., Neumann J. A proteasome inhibitor confers cardioprotection // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – **54**. – P.140–151.
17. Mearini G., Schlossarek S., Willis M.S., Carrier L. The ubiquitin–proteasome system in cardiac dysfunction // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 2008. – **1782**, №12. – P.749–763.
18. Piper R.C., Luzio J.P. Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2007. – **19**. – P.459–465.
19. Reinecke H., Zhang M., Bartosek T. Murry C.E. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts // *Circulation*. – 1999. – **100**. – P.193–202.
20. Staub O., Rotin D. Role of Ubiquitylation in Cellular Membrane Transport // *Physiol. Rev.* – 2006. – **86**. – P.669–707.
21. Surovaya O.V., Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovskaya L.V., Moibenko A.A. Effects of late postconditioning on gene expression and cell death in neonatal rat cardiomyocyte cultures // *Pathophysiology*. – 2009. – **16**, №1. – P.47–52.
22. Wang J. SUMO conjugation and cardiovascular development // *Front Biosci.* – 2009. – **14**. – P.1219–1229.
23. Zhu K., Dunner K.Jr., McConkey D.J. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells // *Oncogene*. – 2009. – **29**, №3. – P.451–462.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Київ. нац. у-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: victoria 30@mail.ru*

*Матеріал надійшов до
редакції 18.01.2010*

М.М. Ткаченко, А.В. Коцюрuba, О.В. Базілюк, І.В. Гороть, В.Ф. Сагач

Зміни судинної реактивності та реактивних форм кисню за умов постійного перебування мишей у зоні відчуження

На препаратах аорти мишей ліній C57BL/6 і BALB/c, які народилися і постійно перебували за умов чорнобильської зони відчуження різної тривалості (6 і 18 міс) вивчали особливості змін судинної реактивності та вмісту реактивних форм кисню і стабільних метаболітів оксиду азоту (NO). Показано, що за цих умов порушуються ендотелійзалежні реакції розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) грудної аорти на дію ацетилхоліну. Більшому пошкодженню ендотелійзалежних реакцій розслаблення ГМ грудної аорти за цих умов відповідають менший рівень синтезу NO й окисного аргіназного метаболізму аргініну. Зниження синтезу NO за умов постійної дії низьких доз радіації зумовлюється підвищенням генерації реактивних форм кисню, а саме супероксидного та гідроксильного радикалів, основним джерелом утворення яких можуть бути мітохондрії. За умов постійної дії низьких доз радіації більшому пошкодженню ендотелійзалежних реакцій відповідають менший рівень нітрозилування білків і генерації OH-радикала.

Ключові слова: аорта, ендотелій, зона відчуження, низькі дози радіації, оксид азоту, реактивні форми кисню, реактивні форми азоту, сечова кислота, судинна реактивність.

ВСТУП

Ендотелій – складний і багатофункціональний орган, який не просто утворює бар'єр між кров'ю та гладенькими м'язами (ГМ) судин, але діє і як модулятор функцій судин. Він є важливою ланкою формування та регуляції судинного тонуусу завдяки синтезу і вивільненню вазоактивних речовин. Ендотелій є найбільш радіочутливим елементом судинної стінки [2, 4, 6, 11, 15]. Одним з основних медіаторів судинної реактивності є оксид азоту (NO), який синтезується з L-аргініну трьома основними ізоформами NO-синтази (NOS) : двома конститутивними – нейрональною (nNOS), ендотеліальною (eNOS) і індукбельною (iNOS) [4, 13, 17]. Після відкриття системи NO стало зрозуміло, що не лише реактивні форми кисню (РФК: $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, стабільний H_2O_2 тощо), але і реактивні

форми азоту (РФА: $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$, ONOO^- , стабільні NO_2^- і NO_3^- тощо) можуть чинити вазоактивну (вазопротекторну, вазотоксичну, вазоконстрикторну чи вазодилаторну) дію в серцево-судинній системі [7, 8, 14, 18, 20]. Щодо ролі активних метаболітів кисню, то домінуюча концепція про виключно токсичну дію, останнім часом трансформувалася у їх токсичну дію при генерації у дозах, що перевищують фізіологічні, тоді як щодо останніх все очевидніше домінує думка, що вони виконують більш регуляторну, сигнальну функцію в серцево-судинній системі, в тому числі і щодо регуляції синтезу РФК і РФА. Ми вивчили певні біохімічні показники, що дають змогу оцінювати інтенсивність утворення як РФК, так і РФА у різних за радіочутливістю ліній мишей за умов постійного перебування у зоні відчуження

© М.М. Ткаченко, А.В. Коцюрuba, О.В. Базілюк, І.В. Гороть, В.Ф. Сагач

(за хронічної дії низьких доз внутрішнього і зовнішнього β/γ -опромінення).

Мета нашої роботи полягала у дослідженні особливостей ендотелійзалежного механізму судинної регуляції і метаболізму ендогенних рівнів реактивних форм кисню та азоту в аорті мишей ліній C57BL/6 і BALB/c залежно від різної тривалості перебування у зоні відчуження.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на мишах масою 20–22 г відносно радіочутливої лінії C57BL/6 і радіочутливої лінії BALB/c, які народилися і протягом усього свого життя перебували за умов зони відчуження (тварини знаходилися у віварії Інституту проблем безпеки атомних електростанцій НАН України, лабораторія експериментальної радіобіології і засобів радіозахисту, м. Чорнобиль). Контролем були 6- і 18-місячні тварини, що народилися і прожили своє життя за умов київського віварію за природного радіоактивного фону. Досліди проводилися у 2006–2008 р.

Миші лінії C57BL/6 характеризуються середньою чутливістю до радіації: для самців ЛД 50/30 – 6,5 Гр, для самиць – 6,7 Гр. Миші лінії BALB/c чутливі до дії радіації: для самців ЛД 50/30 < 5,7 Гр, для самиць – 5,85 Гр [1]. Тварини цих ліній використовуються практично у всіх медичних і біологічних дослідженнях, які проводяться на лінійних мишах, а також як еталон для порівняння з особливостями інших інбредних ліній у галузі екології та радіобіології [1]. Радіоактивне забруднення навколишнього середовища після аварії на Чорнобильській АЕС викликало підвищення рівня радіації на значних територіях України, особливо в зоні відчуження навколо станції. Тому проводили дослідження кормів, які використовувалися для годування тварин, на радіоактивне забруднення. Встановлено, що цей показник (за β -ак-

тивними радіонуклідами) для зерна, що постійно використовується в середньому був – 1,550 Бк/кг. Зовнішній фон у місці розташування тварин становив 23–30 мкР/год. Згідно з даними звіту ДСНПП “Екоцентр” (1998) про радіаційну ситуацію в зоні відчуження, на основі картографічної зйомки території м. Чорнобиля по розподілу ^{90}Sr , ^{137}Cs , $^{238-240}\text{Pu}$, ^{241}Am у шару ґрунту 0–5 см від поверхні виявлено три зони з аномально високими рівнями вмісту вказаних радіонуклідів. Територія віварію потрапляє до центру однієї з таких зон. На ній вміст радіонуклідів $^{238-240}\text{Pu}$ коливається від 2 до 3 кБк/м², ^{241}Am від 4 до 6,6 кБк/м², ^{90}Sr від 100 до 180 кБк/м², ^{137}Cs від 200 до 510 кБк/м². Співвідношення вказаних радіонуклідів є наступним: ^{90}Sr – 30 %, ^{137}Cs – 68 %, ^{241}Am – 0,3 %, $^{238-240}\text{Pu}$ – 0,3 % [5].

Після декапітації у мишей вилучали грудну аорту. Далі її ретельно препарували під мікроскопом і нарізали на сегменти з урахуванням циркулярної орієнтації її гладеньком’язового шару (під кутом приблизно 45°). Ширина такого кільцевого сегменту не перевищувала 1 мм, маса становила 0,5–0,7 мг. Препарати поміщали в проточну термостатовану (35–36° С) камеру, яка була заповнена буферним розчином Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 133,0; KCl – 4,7; NaHCO₃ – 16,3; NaH₂PO₄ – 1,38; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,05; глюкоза – 7,8; тріс – 10,0; рН 7,4. У камері препарат піддавали пасивному розтягненню силою 1,6–1,8 мН і витримували в такому стані 30–60 хв. Скорочувальну активність ГМ грудного відділу аорти реєстрували за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX1C у режимі, що наближався до ізометричного. Активацію ГМ здійснювали додаванням до буферного розчину норадреналіну (НА, 2·10⁻⁵ моль/л, “Sigma”, США). Сталий рівень цього скорочення (“плато”) приймали за 100 %. Від нього проводили розрахунки змін амплітуди

розслаблення ГМ (відсотки) на ендотелій-залежний (ацетилхолін йодид, 10^{-5} моль/л, "Sigma", США) і ендотелійнезалежний (нітропрурид натрію, 10^{-4} моль/л, "Sigma", США) агоністи.

У гомогенаті аорти дорослих (6 міс) і старих мишей (18 міс) ліній C57BL/6 і BALB/c визначали швидкість генерації активних метаболітів кисню: супероксидного радикала ($\cdot O_2^-$) і гідроксильного радикала (OH^\cdot), а також вміст пероксиду водню (H_2O_2), стабільних метаболітів оксиду азоту [нітрит – (NO_2^-) і нітрат – (NO_3^-)-аніонів], низькомолекулярних (НМНТ) і високомолекулярних (ВМНТ) нітрозотіолів, низькомолекулярних антиоксидантів (сечова кислота, сечовина), продуктів неферментативного (дієнові кон'югати – ДК, малоновий діальдегід – МДА) і ферментативного окиснення ліпідів (тромбоксан $B_2 - TxB_2$, лейкотриєн – LTC_4).

Визначення вмісту H_2O_2 . Проби (100–250 мкг білка) додавали в кварцеву кювету (1 см), що містила 2 мл 0,1 М розчину КJ, надлишок лактопероксидази (50 нмоль) у 0,05 М фосфатному буфері (рН 7,33). Фіксували швидкі зміни екстинції проб при 353 нм. Вміст H_2O_2 виражали в пікомолях на 1 мг білка проби, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $\epsilon = 26000$ моль $^{-1} \cdot$ см $^{-1}$.

Визначення швидкості утворення супероксидного радикала. Генерацію $\cdot O_2^-$ в пробах оцінювали за окисненням цитохрому с у 10 ммоль тріс-буфері (рН 7,4), фіксуючи зміни екстинції при 550 нм після інкубації сумішей при 37° С протягом 30 хв. Вміст $\cdot O_2^-$, генерованого пробами під час інкубації, визначали, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $\epsilon = 21000$ моль $^{-1} \cdot$ см $^{-1}$.

Визначення швидкості утворення ОН-радикала. Готували інкубаційну суміш [20 ммоль дезоксирибози, 1 ммоль H_2O_2 , 20 ммоль натрій-фосфатного буфера, рН 7,4 і проба (100–250 мкг білка)]. Інкубували суміш 30 хв при 37° С після чого добавляли

0,5 мл 1%-го розчину тіобарбітурової кислоти в 50 ммоль NaOH і 0,5 мл 2,8%-го розчину трихлороцтової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв на киплячій водяній бані, охолоджували і визначали вміст МДА визначенням величини екстинції при 532 нм. Вміст ОН-радикала, що генерувався при цьому за 30 хв інкубації, виражали в умовних одиницях: $\Delta E \cdot 10^2$ за 30 хв на 1 мг білка проби.

Визначення вмісту NO_2^- , низькомолекулярних і високомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ, ВМНТ). Спочатку досліджували за класичним методом Гріна, використовуючи реактив Гріса, сумарний вміст NO_2^- у гомогенаті аорти (вільний NO_2^- і NO_2^- , що утворюється при гідролізі НМНТ і ВМНТ). Аліквоту гомогенату гідролізували компонентом реактиву Гріна, що містить Hg^{2+} протягом 18 год, потім отримували безбілкові проби, осаджуючи білок хлорною кислотою в кінцевій концентрації 0,5 моль/л. Після центрифугування в надосадовій рідині визначали сумарний вміст NO_2^- , додаючи другий компонент реактиву Гріна. Отримували значення A_1 ($A_1 =$ вільний $NO_2^- +$ ВМНТ + НМНТ).

Визначення вмісту НМНТ. У безбілкових аліквотах гомогенатів аорти (осадження білків 0,5 моль/л $HClO_4$) визначали вміст NO_2^- , використовуючи реактив Гріна з Hg^{2+} для гідролізу НМНТ. Отримували значення A_2 ($A_2 =$ вільний $NO_2^- +$ НМНТ).

Визначення вмісту вільного NO_2^- . У безбілкових аліквотах гомогенатів аорти за допомогою реактиву Гріна без Hg^{2+} визначали значення A_3 ($A_3 =$ вільний NO_2^-). Після цього визначали вміст НМНТ і ВМНТ: вміст НМНТ = $A_2 - A_1$; вміст ВМНТ = $A_3 - A_2$.

Визначення вмісту NO_3^- . Вміст NO_3^- визначали бруциновим методом у безбілкових аліквотах гомогенату аорти спектрофотометрично [8].

Визначення вмісту сечової кислоти і сечовини. Концентрацію сечової кислоти і

сечовини визначали колориметричними реакціями у безбілкових розчинах гомогенатів аорти за допомогою відповідних стандартних наборів реактивів фірма “Філісит Діагностика” (Дніпропетровськ).

Визначення вмісту МДА. До 0,5 мл гомогенату аорти додавали 0,5 мл 1%-го розчину тіобарбітурової кислоти в 50 ммоль NaOH і 0,5 мл 2,8%-го розчину трихлороцтової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв на киплячій водяній бані, охолоджували і визначали величину екстинції при 532 нм.

Визначення вмісту ДК. Вміст ДК визначали спектрофотометрично за поглинанням при 232 нм гептанових екстрактів проб методом Гаврилова та співавт.[3].

Визначення вмісту тромбоксану B_2 (TxB_2) і лейкотриєну C_4 (LTC_4). Ейкозаноїди TxB_2 і LTC_4 визначали за допомогою RIA-методу, використовуючи стандартні добірки реактивів фірми “Amersham” (Англія).

Визначення вмісту білка. Вміст загального білка в пробах визначали загально-вживаним методом Бредфорд, використовуючи барвник Cumassi G-250 (“Ferak”, Німеччина) [5, 6, 8].

Результати обробляли методом варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення Origin 7 (“Microcal Software, Inc.”, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Агоніст мускаринових рецепторів ацетилхолін завжди викликає розслаблення ГМ судин людини і багатьох тварин за умов цілісного ендотелію [4, 13, 14, 17]. За нашими результатами на ізольованих кільцевих препаратах грудної аорти 6-місячних мишей лінії C57BL/6 контрольної групи амплітуда його становила $45,3 \% \pm 5,1 \%$, а мишей лінії BALB/c – $41,0 \% \pm 4,3 \%$ від заданого рівня активації. У 18-місячних тварин ліній C57BL/6 і BALB/c контрольної групи амплітуда розслаблення ГМ аорти становила $21,1 \pm 4,0$ і $15,5 \% \pm 4,1 \%$ відповідно від заданого рівня активації (рис. 1). Це розслаблення зумовлено дією NO, що синтезується ендотелієм. Після вилучення ендотелію воно зникає або замість нього реєструється скорочення ГМ. Різні нітросполуки також відомі як вазодилататори. Розслаблення ГМ аорти 6-місячних мишей лінії C57BL/6 на нітропрурид натрію становило $100,8 \% \pm 10,1 \%$, мишей лінії BALB/c – $109,5 \% \pm 9,3 \%$, а 18-місячні тварини – $90,8 \pm 6,3$ і $92,0 \% \pm 7,5 \%$ відповідно від заданого рівня активації і навіть після механічної деендотелізації препаратів не зазнає змін [5]. Тобто реакція ГМ аорти на дію ацетилхоліну є залежною від збереження структурної та функціональної

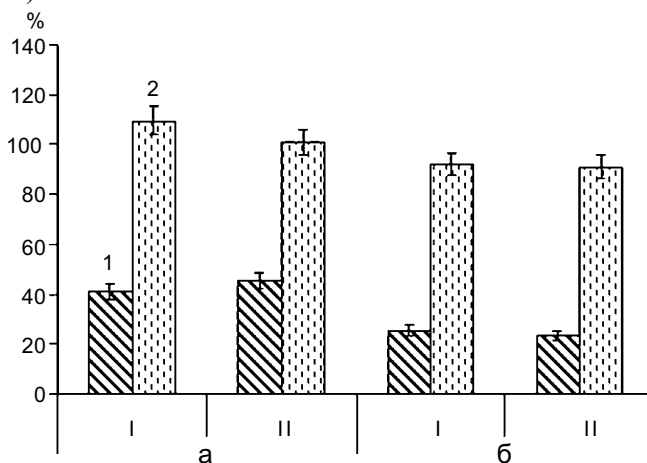


Рис. 1. Амплітуда розслаблення гладеньких м’язів грудної аорти 6- (а) та 18-місячних (б) мишей ліній BALB/c (I) і C57BL/6 (II) контрольної групи на дію йодиду ацетилхоліну (10^{-5} моль/л, 1) та нітропрусиду натрію (10^{-4} моль/л, 2) від заданого рівня активації

організації ендотелію, а на нітропрусид натрію – незалежною. Ці загальноприйняті положення були використані нами для тестування функціональної активності ендотелію і ГМ аорти мишей. Слід відзначити, що ми не спостерігали між тваринами одного віку, але різних ліній статистично

достовірних відмінностей як між фізіологічними реакціями ГМ аорти на ацетилхолін і нітропрусид натрію, так і досліджуваними біохімічними показниками (див. рис.1, табл. 1).

На ізольованих кільцевих препаратах грудної аорти 6-місячних тварин відносно

Таблиця 1. Особливості короткотривалої (6 міс) і довготривалої (18 міс) дії низьких доз радіації на визначені біохімічні показники, що характеризують окисний метаболізм в аорті мишей різних за радіочутливістю ліній (M ± m; n = 10)

Показник	Тривалість перебування у зоні відчуження	Миші лінії BALB/c	Миші лінії C57BL/6
Швидкість генерації O ₂ , ум.од.	контроль 1	1,91 ± 0,25	-
	контроль 2	2,46 ± 0,34	-
	6 міс	4,71 ± 0,61 *	18,3 ± 1,6 *.*.*
	18 міс	16,54 ± 1,43 *.*.*	16,6 ± 2,4 *
Швидкість генерації OH, ум.од.	контроль 1	0,36 ± 0,04	-
	контроль 2	0,46 ± 0,07	-
	6 міс	2,73 ± 0,52 *	1,09 ± 0,21 *.*.*
	18 міс	2,38 ± 0,39 *	5,33 ± 0,79 *.*.*.*
Вміст H ₂ O ₂ , пмоль/мг білка	контроль 1	7,82 ± 0,95	-
	контроль 2	6,23 ± 1,55	-
	6 міс	13,8 ± 1,2 *	11,9 ± 2,1
	18 міс	13,61 ± 2,01 *	13,7 ± 1,8 *
Вміст сечової кислоти, нмоль/мг білка	контроль 1	0,91 ± 0,11	-
	контроль 2	1,25 ± 0,18	-
	6 міс	5,47 ± 0,71 *	2,86 ± 0,37 *.*.*
	18 міс	2,06 ± 0,28 *.*.*	2,57 ± 0,35 *
Вміст лейкотриєну, пмоль/мг білка	контроль 1	2,58 ± 0,42	-
	контроль 2	4,05 ± 1,25	-
	6 міс	6,71 ± 1,13 *	10,1 ± 2,6 *
	18 міс	9,41 ± 1,65 *	3,12 ± 0,73 *.*.*.*
Вміст тромбоксану B ₂ , пмоль/мг білка	контроль 1	2,11 ± 0,32	-
	контроль 2	3,56 ± 0,74	-
	6 міс	5,92 ± 1,36 *	11,1 ± 2,1 *.*.*
	18 міс	13,11 ± 2,43 *.*.*	4,66 ± 0,51 *.*.*.*
Вміст ДК, нг/мг білка	контроль 1	7,63 ± 0,95	-
	контроль 2	11,80 ± 1,36	-
	6 міс	27,82 ± 3,58 *	13,6 ± 3,2 **
	18 міс	11,9 ± 0,76 **	23,5 ± 6,7 *.*.*.*
Вміст МДА, нмоль/мг білка	контроль 1	5,24 ± 0,92	-
	контроль 2	8,10 ± 1,25	-
	6 міс	25,76 ± 2,42 *	12,9 ± 1,2 *.*.*
	18 міс	33,41 ± 5,61 *	8,37 ± 1,09 *.*.*.*

У табл. 1-4: *різниця достовірна (P<0,05) відносно значення в контролі 1;

** різниця достовірна (P<0,05) відносно значення в групах 6-місячних тварин;

*** різниця достовірна (P<0,05) відносно значення у мишей лінії BALB/c.

радіочутливих мишей із зони відчуження ацетилхолін у концентрації 10^{-5} моль/л (n=10) викликав розвиток трьох типів реакцій преактивованих норадреналіном ГМ: 1) у 6

дослідах (60 %) рееструвалося стійке скорочення ГМ амплітудою від 17 до 83 % ($35,3\% \pm 3,1\%$); 2) в одному досліді (10 %) спостерігалось розслаблення ГМ, амплі-

Таблиця 2. Короткочасна (6 міс) і довготривала (18 міс) дія низьких доз радіації на розраховані біохімічні показники, що характеризують окисний метаболізм в аорті мишей різних ліній (M ± m; n = 10)

Показник	Тривалість перебування у зоні відчуження	Миші лінії BALB/c	Миші лінії C57BL/6
Відношення ТхВ ₂ /LTC ₄ , ум.од.	контроль 1	0,82 ± 0,05	-
	контроль 2	0,88 ± 0,06	-
	6 міс	0,88 ± 0,07	1,1 ± 0,09
	18 міс	1,39 ± 0,11	1,49 ± 0,13
Відношення МДА/(ТхВ ₂ і LTC ₄), од.	контроль 1	1,12 ± 0,08	-
	контроль 2	1,06 ± 0,07	-
	6 міс	2,04 ± 0,26*	0,61 ± 0,09****
	18 міс	1,48 ± 0,18	1,08 ± 0,13
Частка О ₂ в сумі (О ₂ і ОН), %	контроль 1	84,14 ± 14,28	-
	контроль 2	83,96 ± 13,89	-
	6 міс	63,31 ± 10,07	94,38 ± 19,51
	18 міс	87,4 ± 15,22	75,7 ± 18,02
Частка ОН у сумі (О ₂ і ОН), %	контроль 1	15,86 ± 2,84	-
	контроль 2	16,04 ± 1,95	-
	6 міс	36,69 ± 6,51*	5,62 ± 0,71 ****
	18 міс	12,6 ± 2,18**	24,3 ± 3,96 *****
Частка ДК у сумі (ДК і МДА), %	контроль 1	59,28 ± 8,19	-
	контроль 2	59,30 ± 8,43	-
	6 міс	51,92 ± 7,95	51,32 ± 6,02
	18 міс	26,26 ± 3,66 ***	73,74 ± 9,18 ***
Частка МДА у сумі (ДК і МДА), %	контроль 1	40,72 ± 6,14	-
	контроль 2	40,70 ± 5,68	-
	6 міс	48,08 ± 7,12	48,68 ± 9,22
	18 міс	73,74 ± 11,56*	26,26 ± 5,1**
Частка LTC ₄ у сумі (LTC ₄ і ТхВ ₂), %	контроль 1	55,01 ± 10,64	-
	контроль 2	53,22 ± 7,08	-
	6 міс	53,12 ± 8,12	47,64 ± 7,43
	18 міс	41,79 ± 6,95	40,1 ± 5,36
Частка ТхВ ₂ в сумі (LTC ₄ і ТхВ ₂), %	контроль 1	44,99 ± 6,54	-
	контроль 2	46,78 ± 5,83	-
	6 міс	46,86 ± 8,12	52,36 ± 8,82
	18 міс	58,21 ± 9,08	59,9 ± 7,95
Частка ейкозаноїдів (LTC ₄ і ТхВ ₂), пмоль/мг білка	контроль 1	4,69 ± 0,74	-
	контроль 2	7,61 ± 1,99	-
	6 міс	12,63 ± 2,49*	21,2 ± 4,7****
	18 міс	22,52 ± 4,08***	7,78 ± 1,24*****
Сума продуктів ПОЛ (ДК і МДА), ум.од.	контроль 1	12,87 ± 1,87	-
	контроль 2	19,90 ± 2,61	-
	6 міс	53,58 ± 6,0 *	26,50 ± 4,4 ***
	18 міс	45,31 ± 6,37*	31,87 ± 7,79

туда якого не перевищувала 20 % від рівня їх активації; 3) у 3 дослідах (30 %) ніяких змін тонічного напруження ГМ на цей агоніст не відбувалося (рис. 2).

На донор NO нітропрусид натрію (n=9) ГМ грудної аорти також реагували по-різному: 1) у 5 дослідах (56 %) розвивалося типове розслаблення ГМ, амплітуда якого варіювала від 26 до 105 %, а в середньому вона становила $55,9 \pm 4,2 \%$; 2) у 2 дослідах (22 %) реєструвалося скорочення амплітудою від 20 до 25 %; 3) у 2 дослідах (22 %) змін тонічного напруження ГМ на цей агоніст не виявлено (див. рис. 2).

Дослідження на 18-місячних мишах із зони відчуження показали, що ГМ ізольованих кільцевих препаратах грудної аорти на дію ацетилхоліну в концентрації 10^{-5} моль/л (n=8) реагують також неоднозначно, а саме: 1) у 2 дослідах (25 %) реєструвалося збільшення тонічного напруження

ГМ амплітудою 25-30 % і тривалістю 6 хв з наступним відновленням заданого рівня їх активації; 2) в одному досліді тонічне напруження ГМ збільшувалося майже на 40 % і змінювалося їх розслабленням амплітудою майже 30 %; 3) у 3 дослідах (38 %) ацетилхолін викликав транзиторне, що тривало 1–4 хв, розслаблення ГМ, після чого заданий рівень їх активації відновлювався; 4) у 2 дослідах (25 %) змін тонічного напруження ГМ на досліджуваній агоніст взагалі не відбувалося (див. рис.1).

На нітропрусид натрію ГМ грудної аорти у 100 % дослідів (n=8) реагували розслабленням. Амплітуда його сягала в окремих дослідах від 42 до 111 %, а в середньому становила $79,7 \pm 5,0 \%$ (див. рис. 2).

Раніше нами було показано, що у дорослих і старих мишей лінії BALB/c, які постійно перебували у зоні відчуження,

Таблиця 3. Короткочасна (6 міс) і довготривала (18 міс) дія низьких доз радіації на визначені біохімічні показники, що характеризують систему синтезу оксиду азоту в аорті мишей різних ліній (M ± m; n = 10)

Показник	Тривалість перебування у зоні відчуження	Миші лінії BALB/c	Миші лінії C57BL/6
Вміст NO ₂ , пмоль/мг білка	контроль 1	190,84 ± 22,52	-
	контроль 2	105,2 ± 18,3**	-
	6 міс	54,57 ± 5,9 *	32,94 ± 8,07 *
	18 міс	54,48 ± 4,84 *	90,3 ± 5,9*****
Вміст NO ₃ , нмоль/мг білка	контроль 1	9,73 ± 1,42	-
	контроль 2	11,51 ± 1,56	-
	6 міс	10,21 ± 2,01	11,5 ± 0,5
	18 міс	9,11 ± 1,31	14,6 ± 2,7
Вміст низькомолекулярних нітрозотіолів, пмоль/мг білка	контроль 1	114,5 ± 16,4	-
	контроль 2	82,25 ± 11,93	-
	6 міс	62,2 ± 13,8 *	30,6 ± 3,8 *****
	18 міс	74,9 ± 11,6	41,6 ± 6,2 *
Вміст високомолекулярних нітрозотіолів, пмоль/мг білка	контроль 1	1527,1 ± 179,1	-
	контроль 2	1726,4 ± 161,3	-
	6 міс	2300,2 ± 454,5	1300,6 ± 298,1
	18 міс	6129,1 ± 1462,1 ***	9527,5 ± 399,8***
Вміст сечовини, нмоль/мг білка	контроль 1	12,0 ± 1,5	-
	контроль 2	36,8 ± 4,5**	-
	6 міс	40,44 ± 1,56 *	33,24 ± 5,04 *
	18 міс	16,68 ± 1,92***	48,84 ± 9,84 *****

взагалі відсутні ендотелійзалежні реакції розслаблення ГМ грудної аорти на йодид ацетилхоліну, що свідчить про uszkodження ендотеліальної функції. Водночас ендотелійнезалежні реакції розслаблення ГМ на нітропрурид натрію у дорослих мишей цієї лінії uszkodжені частково, а у старих відтворюються у всіх дослідах [5].

Таким чином, внаслідок постійної дії низьких доз радіації ендотелійзалежне, а саме NO-залежне, розслаблення ГМ аорти порушується у мишей різних ліній неоднаково залежно від тривалості дії радіації.

У табл. 1 представлено значення досліджених біохімічних показників, що характеризують окисний метаболізм у тварин контрольної та дослідної груп, а у табл. 2 – співвідношення між цими показниками, що характеризують зміни окисного метаболізму в аорті за умов коротко- (6 міс) та довготривалої (18 міс) дії низьких доз радіації.

Результати, представлені в табл. 1 і 2 вказують на те, що за тривалої дії низьких доз радіації спостерігається значна активація генерації РФК в ендотеліальних і гладеньком'язових клітинах аорти (як O_2^- , так і ОН-радикалів). Основним джерелом РФК швидше за все можуть бути мітохондрії, позаяк підвищення генерації O_2^-

значно перевищують рівні підвищення пулів основних немітохондріальних оксидаз – ксантинооксидази (маркер – вміст сечової кислоти) і ліпідних оксидаз – ліпооксигенази (маркер – вміст $LTС_4$) і циклооксигенази (маркер – вміст TxB_2).

Швидкість генерації O_2^- (в мітохондріях) синхронно змінюється із рівнем пошкодження NO-залежного розслаблення аорти [5]. Так, у мишей лінії C57BL/6 він становив $958 \% \pm 84 \%$ відносно контрольних значень, тоді як у мишей лінії BALB/c лише $247 \% \pm 32 \%$ через 6 міс перебування у зоні відчуження, а через 18 міс рівні генерації O_2^- були однаково високими у мишей обох ліній 675 ± 97 і $671 \% \pm 58 \%$ відповідно щодо відповідного контролю (див. табл. 1).

Пули стабільного H_2O_2 були підвищеними (на 218–220 %) відносно контролю у мишей обох ліній лише протягом тривалого перебування у зоні відчуження (18 міс).

Рівні генерації ОН-радикала за дії радіаційного фактора були високими у мишей обох ліній, але вища ступінь пошкодження ендотелію аорти супроводжувалася не вищими, а, навпаки, нижчими значеннями цього показника. Так, через 6 міс швидкість генерації ОН-радикала у мишей

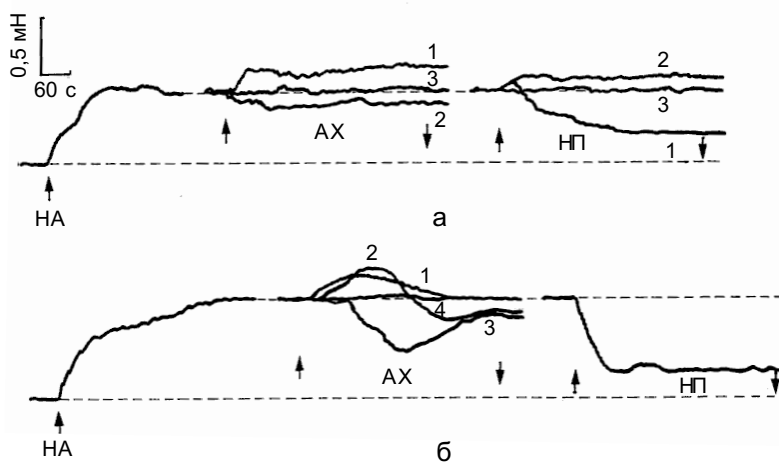


Рис. 2. Ендотелійзалежні (йодид ацетилхоліну – АХ, 10^{-5} моль/л) і ендотелійнезалежні (нітропрурид натрію – НП, 10^{-4} моль/л) скорочувальні реакції преактивованих норадреналіном ($2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) ГМ ізольованих препаратів грудної аорти 6- (а) та 18-місячних (б) мишей лінії C57BL/6 із зони відчуження. Стрілками показано початок і кінець впливу досліджуваних агоністів: 1, 2, 3 – різні типи реакцій гладеньких м'язів на них. Розрив між кривими відповідає 10 хв

лінії C57BL/6 з більшими рівнями пошкодження становили $303 \% \pm 58 \%$ відносно контролю, тоді у менш пошкоджену ендотелію аорти мишей лінії BALB/c – $758 \% \pm 144 \%$. Через 18 міс ці рівні становили відповідно 1159 ± 172 і $517 \% \pm 85 \%$, причому у мишей BALB/c з меншим рівнем генерації OH^\cdot -радикала відмічали більшу ступінь пошкодження ендотелію (див. табл. 1).

У табл. 3 представлено значення біохімічних показників, що характеризують синтез активних метаболітів оксиду азоту (РФА) в аорті мишей різного віку та за різною тривалістю дії низьких доз радіації у зоні відчуження, а в табл. 4 – показників, що характеризують вікові особливості функціонування системи синтезу NO в

контролі та за умов дії низьких доз радіації.

Окисний метаболізм L-аргініну (генерація РФА) в зоні відчуження за умов тривалої дії низьких доз радіації теж був підвищений, але меншою мірою, ніж генерація РФК. При цьому достовірно підвищувалися лише пули нітрозильованих білків (ВМНТ) – максимально ($552 \% \pm 23 \%$) через 18 міс у мишей лінії C57BL/6, тоді як у мишей радіочутливої лінії BALB/c нітрозильованих білків було дещо менше ($355 \% \pm 84 \%$ від рівня контролю), при цьому пошкодження ендотелію у них, навпаки, було вищим. Аналогічно, у мишей лінії C57BL/6 через 6 міс пули нітрозильованих білків були достовірно меншими ($85 \% \pm 19 \%$) від таких у лінії BALB/c ($151 \% \pm 30 \%$), при цьому ступінь пошкодження

Таблиця 4. Короткочасна (6 міс) і довготривала (18 міс) дія низьких доз радіації на розраховані біохімічні показники, що характеризують систему синтезу оксиду азоту в аорті мишей різних ліній (M ± m; n = 10)

Показник	Тривалість перебування у зоні відчуження	Миші лінії BALB/c	Миші лінії C57BL/6
Частка NO_2^- у сумі (NO_2^- і NO_3^-), %	контроль 1	$1,92 \pm 0,15$	-
	контроль 2	$0,91 \pm 0,11^{**}$	-
	6 міс	$0,53 \pm 0,08^*$	$0,29 \pm 0,04^{****}$
	18 міс	$0,59 \pm 0,07$	$0,61 \pm 0,09^{**}$
Частка NO_2^- у сумі (NO_2^- і НМНТ і ВМНТ), %	контроль 1	$10,41 \pm 1,13$	-
	контроль 2	$5,76 \pm 0,42^{**}$	-
	6 міс	$6,14 \pm 0,76^*$	$2,33 \pm 0,17^{****}$
	18 міс	$0,87 \pm 0,15^{***}$	$0,93 \pm 0,15^{***}$
Частка НМНТ у сумі (NO_2^- і НМНТ і ВМНТ), %	контроль 1	$6,25 \pm 0,47$	-
	контроль 2	$4,51 \pm 0,36$	-
	6 міс	$2,47 \pm 0,36^*$	$5,70 \pm 0,42^{***}$
	18 міс	$1,2 \pm 0,17^{***}$	$0,43 \pm 0,06^{*****}$
Частка ВМНТ у сумі (NO_2^- і НМНТ і ВМНТ), %	контроль 1	$83,33 \pm 7,19$	-
	контроль 2	$94,66 \pm 15,24$	-
	6 міс	$91,39 \pm 15,08$	$92,0 \pm 15,21$
	18 міс	$97,93 \pm 6,39$	$98,63 \pm 9,6$
Сума нітрозотіолів (НМНТ і ВМНТ), пмоль/мг білка	контроль 1	$1641,6 \pm 195,5$	-
	контроль 2	$1808,7 \pm 173,2$	-
	6 міс	$2362,4 \pm 468,3$	$1331,2 \pm 301,9$
	18 міс	$6204,0 \pm 1473,7^{***}$	$9569,1 \pm 405,8^{***}$
Індекс оксигенації, ум.од.	контроль 1	$8,75 \pm 1,30$	-
	контроль 2	$2,18 \pm 0,12^{**}$	-
	6 міс	$0,38 \pm 0,07^*$	$0,23 \pm 0,04^*$
	18 міс	$0,51 \pm 0,09^*$	$0,47 \pm 0,09^{***}$

ендотелію у них, навпаки, був більшим (табл. 3). Отже, більшому пошкодженню ендотелій-залежних реакцій відповідає реципрокно менше нітрозилування білків, аналогічно як і менший рівень генерації OH -радикала.

Істотніші пошкодження ендотелію за дії радіації зумовлюються також більш значним зниженням пулів NO_2^- і нітрозильованого глутатіону і цистеїну (НМНТ) [5]. Враховуючи той факт, що основним місцем синтезу NO , як і O_2^- , є мітохондрії [16, 18], можна припускати порушення цього процесу за дії радіації.

Цікаво, що спостерігається певна синхронна залежність між рівнем пошкодження ендотелію та пулами сечовини, основним джерелом синтезу якої в аорті є мітохондріальна аргіназа II, що конкурує з NO -синтазами за спільний субстрат – L-аргінін [10, 18]. В цьому разі, вочевидь, конкуренція теж може бути, але ми спостерігали синхронне зниження пулів і NO_2^- (маркер – утворення NO), і сечовини (маркер активності аргінази). Так, при більш значному пошкодженні ендотелію (через 6 міс у мишей лінії C57BL/6) спостерігали і суттєвіше пригнічення утворення NO_2^- (в основному спонтанно при окисненні NO) і менше підвищення пулів сечовини (всього на 277 ± 42 щодо $337 \% \pm 33 \%$ у мишей лінії BALB/c) з меншим пошкодженням ендотелію. Такі самі закономірності спостерігали і за тривалої дії радіаційного чинника (через 18 міс) – при більшому пошкодженні ендотелію у мишей лінії BALB/c спостерігали і менші пули NO_2^- (52 ± 5 щодо $86 \% \pm 6 \%$). Отже, можна зробити припущення, що більшому рівню пошкодження ендотелію за умов тривалої дії низьких доз радіації відповідає менший рівень генерації NO [при цьому окисний метаболізм L-аргініну спрямований на утворення не NO , а пероксинітриду (ONOO^-) за умов окисного стресу при одночасній генерації значних кількостей і NO , і O_2^-] і менший рівень неокисного аргіназного метаболізму аргініну, про що свідчать пули сечовини.

Враховуючи, що як окисний процес генерації NO/ONOO^- , так і неокисний процес утворення сечовини відбувається в основному в мітохондріях ендотеліальних і гладеньком'язових клітин аорти [9, 12, 16], можна зробити припущення, що вазотоксична дія низьких доз радіації зумовлюється саме порушенням мітохондріального гомеостазу, а тобто – підвищенням генерації в них O_2^- і OH -радикалів і, меншою мірою, утворенням ONOO^- , одночасно із пригніченням утворення в них NO і низькомолекулярних нітрозотіолів (в основному нітрозоглутатіону) [19].

Відмічено синхронну залежність між рівнями генерації OH -радикала, активністю аргіназного метаболізму L-аргініну і пошкодженням ендотелію. Позаяк відомо, що OH -радикал є одним із активаторів аргінази, меншим рівням генерації OH -радикала відповідають менші пули сечовини (а, отже, і активності аргінази), що супроводжується більш значним пошкодженням ендотелію [16]. Враховуючи цей факт, а також більш значне зниження пулів NO_2^- при вищих рівнях пошкодження ендотелію, можна зробити припущення про активацію низькими дозами радіації процесу апоптозу в ендотеліальних клітинах, причому апоптозу в його класичному мітохондрійзалежному варіанті, опосередкованому (ініційованому) відкриванням мітохондріальної пори її індукторами – РФК [18], а також зменшенням оксигенації L-аргініну за цих умов (табл. 4). Відомо, що відкриття пори пригнічується NO , але стимулюється ONOO^- , а також, що потужним інгібітором пори є γ -аміномасляна кислота (ГАМК), яка синтезується у мітохондріях із продуктів аргіназного шляху – як із глутамату, так і путресцину, що утворюються із орнітину.

Отже, отримані результати передбачають можливість проапоптичної дії низьких доз радіації (за умов тривалої їх дії), внаслідок чого спостерігається практично повне знищення ендотелію, а отже і ендотелій-залежного розслаблення. Біохімічними

причинами проапоптотичної дії низьких доз радіації може бути, з одного боку, стимуляція генерації РФК і ONOO^- в мітохондріях (індуктори відкриття пори і ініціатори апоптозу), а з іншого – пригнічення утворення NO і ГАМК (інгібітори відкриття пори).

ВИСНОВКИ

1. За короткочасного (6 міс) та тривалого (18 міс) впливу низьких доз радіації на мишей двох різних радіочутливих ліній, які постійно перебували у зоні відчуження, порушуються ендотеліозалежні реакції розслаблення ГМ грудної аорти на дію ацетилхоліну.

2. Більшому пошкодженню ендотеліозалежних реакцій розслаблення ГМ грудної аорти за цих умов відповідають менший рівень синтезу NO і окисного аргіназного метаболізму аргініну.

3. Зниження синтезу NO за умов постійної дії низьких доз радіації зумовлюється підвищенням генерації реактивних форм кисню, а саме супероксидного і гідроксильного радикалів, основним джерелом утворення яких можуть бути мітохондрії.

4. За умов постійної дії низьких доз радіації більшому пошкодженню ендотеліозалежних реакцій відповідає менше нітрозилування білків, аналогічно як і менший рівень генерації OH-радикала.

М.Н. Ткаченко, А.В. Коцюрuba, О.В. Базілюк, І.В. Гороть, В.Ф. Сагач

ИЗМЕНЕНИЯ СОСУДИСТОЙ РЕАКТИВНОСТИ И РЕАКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОГО ПРЕБЫВАНИЯ МЫШЕЙ В ЗОНЕ ОТЧУЖДЕНИЯ

На препаратах аорты мышей линий C57BL/6 и BALB/c, которые родились и постоянно находились в условиях Чернобыльской зоны отчуждения различной продолжительности (6 и 18 мес) изучали особенности изменений сосудистой реактивности и содержания реактивных форм кислорода и стабильных метаболитов оксида азота (NO). Показано, что при этих условиях нарушаются эндотелийзависимые реакции расслабления гладких мышц

грудной аорты на действия ацетилхолина. Большому повреждению эндотелийзависимых реакций расслабления гладких мышц грудной аорты в этих условиях отвечает меньше уровень синтеза NO и окислительного аргиназного метаболизма аргинина. Снижение синтеза NO в условиях постоянного действия низких доз радиации обусловлено повышением генерации реактивных форм кислорода, а именно супероксидного и гидроксильного радикалов, основным источником образования которых могут быть митохондрии. В условиях постоянного действия низких доз радиации большому повреждению эндотелийзависимых реакций отвечает меньшее нитрозилирование белков, аналогично, как и меньший уровень генерации OH-радикала.

Ключевые слова: аорта, эндотелий, зона отчуждения, низкие дозы радиации, оксид азота, реактивные формы кислорода, реактивные формы азота, мочева кислота, сосудистая реактивность.

M.N. Tkachenko, A.V. Kotsjuruba, O.V. Bazilyuk, I.V. Gorot, V.F. Sagach

CHANGES OF VASCULAR REACTIVITY AND REACTIVE FORMS OF OXYGEN IN CONDITIONS OF VARYING DURATION OF PERMANENT STAY IN THE ALIENATION ZONE

Peculiarities of changes in the vascular reactivity and in the content of reactive forms of oxygen and stable metabolites of nitric oxide (NO) were studied in the aorta preparations of C57BL/6 and BALB/c mice of the two age groups (6 and 18 mo.), which were born and permanently kept in the Chernobyl alienation zone. The results obtained showed a disturbance of acetylcholine-induced endothelium-dependent reactions of relaxation of smooth muscles of the thoracic aorta. A lower level of NO synthesis and lower level of oxidative arginase metabolism of arginine corresponded to a higher degree of damage of endothelium-dependent reactions of relaxation of the thoracic aorta smooth muscles. A decrease of NO synthesis in conditions of permanent effects of low doses of radiation was conditioned by an increase of generation of reactive forms of oxygen, namely, superoxide and hydroxyl radicals, which might be formed in mitochondria. In conditions of permanent effects of low doses of radiation a lesser level of protein nitrosothilation, same as lesser one of generation of OH-radical, corresponded to a higher level of damage of endothelium-dependent reactions.

Key words: aorta, Chernobyl alienation zone, endothelium, nitric oxide, low doses of radiation, reactive forms of oxygen, reactive forms of nitric, uric acid, vascular reactivity

*O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv;
O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
A.V. Palladin Institute of Biochemistry NAS Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: Наука, 1983. – 189 с.
2. Воробьёв Е.И., Степанов Р.П. Ионизирующие излучения и кровеносные сосуды. – М.: Энергоатомиздат, 1985. – 296 с.
3. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело. – 1988. - № 2. – С. 60–64.
4. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Коркушко О.В., Безруков В.В., Кульчицкий О.К., Стефанов О.В., Соловйов А.І., Мала Л.Т., Фролькіс В.В. Фундаментальні механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему як основи патогенетичного лікування її захворювань // Фізіол. журн. – 2004. – **50**, № 1. – С. 11–30.
5. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Коцюрuba А.В., Поперека Г.М., Степаненко Л.Г., Сенюк О.Ф. Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження // Там само. – 2005. – **51**, № 3. – С. 32–41.
6. Ткаченко М.Н., Коцюрuba А.В., Базілюк О.В., Таланов С.А., Поперека Г.М., Сенюк О.Ф., Сагач В.Ф. Сосудистая реактивность и метаболизм реактивных форм кислорода и азота при действии низких доз радиации // Рад. биология. Радиоэкология. – 2009. – **49**, № 4. – С. 462–472.
7. Фролькіс В.В., Безруков В.В., Кульчицкий О.К. Старение и экспериментальная патология сердечно-сосудистой системы. – К.: Наук. думка, 1994. – 248 с.
8. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals // Cell. Biol. – 1990. – **68**, № 5. – P. 989–998.
9. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – **87**, № 7. – P. 1620–1624.
10. Durante W., Johnson F.K., Johnson A.J. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2007. – **34**, № 9. – P. 906–911.
11. Gajdusek C.M., Onoda K., London S., Johnson M., Morrison R., Mayberg M.R. Early molecular changes in irradiated aortic endothelium // J. Cell Physiol. – 2001. – **188**, № 1. – P. 8–23.
12. Honston M., Chumley P., Radi R., Rubbo H., Freeman B.A. Xanthine oxidase reaction with nitric oxide and peroxynitrite // Arch. Biochem. Biophys. – 1998. – **355**, № 1. – P. 1–8.
13. Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1999. – **34**, № 6. – P. 879–886.
14. Kano Y., Tanabe T., Nagasawa J., Mizuta T. Effect of age on rat responses to acetylcholine and nitric oxide donor (NOC-18) // Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. – 2000. – **107**, № 3–4. – P. 331–334.
15. Kantak S.S., Diglio C.A., Onoda J.M. Low dose radiation-induced endothelial cell retraction // Int. J. Radiat. Biol. – 1993. – **64**, № 3. – P. 319–328.
16. Korge P., Ping P., Weiss J.N. Reactive oxygen species production in energized cardiac mitochondria during hypoxia/reoxygenation: Modulation by nitric oxide // Circ. Res. – 2008. – **103**. – P. 873–880.
17. Marin J., Rodrigues-Martinez M.A. Age-related changes in vascular responses // Exp. Gerontol. – 1999. – **34**. – P. 503–512.
18. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling // J. Nutr. – 2007. – **137**, June – P.1616S–1620S.
19. Singh R.J., Hogg N., Goss S.P., Antholine W.E., Kalyanaraman B. Mechanism of superoxide dismutase/H₂O₂ – mediated nitric oxide release from S-nitrosoglutathione // Arch. Biochem. Biophys. – 1999. – **372**, № 1. – P. 8–15.
20. Tarpey M.M., Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite // Circ. Res. – 2001. – **89**. – P. 224–236.

Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ;

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 16.03.2010

Р.Б. Струтинський

Вазодилататорні ефекти флокаліну – фторвмісного активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів

В експериментах in vivo на великих тваринах показано, що амплітуда та тривалість гіпотензивного ефекту нового вітчизняного фторвмісного активатора АТФ-чутливих калієвих ($K_{\text{АТФ}}$) каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран флокаліну чітко корелює з величиною введеної дози – чим більша доза, тим сильніший і триваліший ефект. Тобто флокалін викликає потужні дозозалежні вазодилататорні реакції при внутрішньовенному введенні та введенні в перфузовану кров'ю стегнову артерію, що практично не відрізняються від ефектів відомого активатора $K_{\text{АТФ}}$ -каналів пінацидилу. Проте слід зауважити, що при дослідженні флокаліну на нешкідливість з'ясувалося, що він відноситься до малотоксичних сполук і в 3,5 рази менш токсичний за пінацидил. При ресстрації системного артеріального тиску (САТ) анестезованої собаки виявилось, що порогова доза флокаліну при внутрішньовенному введенні становить 0,05 мг/кг і відповідає незначній дилататорній реакції тривалістю близько 3 хв і амплітудою на $9,52\% \pm 2,01\%$ ($n=7$, $P<0,05$) від вихідного рівня. В дозах 0,5 мг/кг та вищих флокалін досить суттєво знижував артеріальний тиск – більш ніж на 37 %. Введення 0,5; 0,75; 1,0 та 1,5 мг/кг знижувало САТ від вихідного рівня на $42,07 \pm 6,18$ ($n=5$, $P<0,05$); $44,22 \pm 4,87$ ($n=3$, $P<0,05$); $44,3 \pm 4,59$ ($n=5$, $P<0,05$) та $66,28$ мм рт.ст. $\pm 3,15$ мм рт.ст. ($n=3$, $P<0,05$) відповідно. При внутрішньовенному введенні великих доз флокаліну (0,75 - 1,5 мг/кг) досить часто цей показник знижувався до 40–50 мм рт.ст. Слід зауважити, що таке небезпечно зниження артеріального тиску в відповідь на великі дози флокаліну є не досить тривалим (близько 15 хв) та протягом години тиск звичайно відновлюється до вихідного рівня. Введення флокаліну в стегнову артерію та вимірювання перфузійного тиску в ній показало аналогічну, проте дещо сильнішу дозозалежну вазодилатацію.

Ключові слова: $K_{\text{АТФ}}$ -канали, вазодилатація, артеріальний тиск крові, флокалін

ВСТУП

Аденозинтрифосфатчутливі калієві ($K_{\text{АТФ}}$) канали клітинних мембран відносяться до тих структур, що тісно пов'язані з енергетичним станом клітини. Основним ендогенним регулятором активності цих каналів є внутрішньоклітинна концентрація АТФ, зменшення рівня якої нижче від мілімолярного, зокрема при гіпоксії та ішемії тканин, призводить до їх відкриття та розвитку компенсаторних та захисних механізмів [9, 15, 21]. Збільшення вмісту АТФ від вказаного вище рівня, навпаки,

© Р.Б. Струтинський

спричинює закриття цих каналів [9, 20, 21]. Ця закономірність відповідає $K_{\text{АТФ}}$ -каналам кардіоміоцитів, судинним і не судинним гладеньком'язовим клітинам, нейронам тощо [14, 18, 21, 22]. Виходячи з того, що при фізіологічних умовах внутрішньоклітинна концентрація АТФ відповідає мілімолярним рівням (близько 3–5 ммоль/л), $K_{\text{АТФ}}$ -канали постійно повинні бути в інгібованому стані, що і підтверджується проведеними дослідженнями [23]. Виключенням є тільки канали в-клітин підшлункової залози, що тісно пов'язано з виробленням інсуліну, а отже, нормальним функціонуванням орга-

нізму [16, 22]. Значимість $K_{AT\Phi}$ -каналів в умовах фізіологічної норми для більшості тканин залишається загадкою, крім підшлункової залози та судинної системи. В судинному руслі розрізняють декілька функцій цих каналів. У першу чергу, це метаболічна регуляція кровотоку, а також регуляція базального тонуусу судин, реактивна гіперемія, ауторегуляція судинного кровотоку та зниження кров'яного тиску при ендотоксичному шоку [19]. Метаболічну регуляцію кровотоку пов'язують з гіпоксією і його підсиленням в гіпоксичній зоні внаслідок зменшення внутрішньоклітинного вмісту АТФ, співвідношення АТФ/АДФ і наступної активації $K_{AT\Phi}$ -каналів. Активація $K_{AT\Phi}$ -каналів гладеньком'язових та ендотеліальних клітин судин спричиняє трансмембранний вихід з клітини іонів калію та гіперполяризацію клітинної мембрани для перших та звільнення молекул оксиду азоту для других. Наслідком чого є розширення кровоносних судин та посилене постачання кисню та енергоресурсів до тканин, які цього потребують, під час гіпоксії. В розвитку вазодилаторних реакцій, можливо, можуть брати участь і $K_{AT\Phi}$ -канали мітохондріальних мембран [3].

Відкривання $K_{AT\Phi}$ -каналів можливе і фармакологічним шляхом за допомогою активаторів цих каналів, використання яких спричиняє гіпотензивні та антишемічні ефекти [9, 17]. Вазодилаторні ефекти таких активаторів, зокрема фторвмісних, є досить потужними навіть при таких патологічних станах, що супроводжуються значними порушеннями системного артеріального тиску, як артеріальна гіпертензія та цукровий діабет [5, 6]. Слід зауважити, що в експериментах на ізольованих смужках аорти щурів зі спонтанною гіпертензією ефекти активаторів калієвих каналів за своєю амплітудою практично не відрізнялися від таких у тварин з нормальним тиском, тоді як при стрептозотозинвикликаному діабеті були дещо зменшеними [5, 6]. У дослідженнях власти-

востей цих відкривачів каналів особливу увагу приділяють їх кардіопротекторним, антишемічним діям. Проте вплив активаторів $K_{AT\Phi}$ -каналів на судинні реакції залишається ще повністю нез'ясованим. Зокрема, досі незрозумілим є підвищення напруження судинної смужки в експериментах *in vitro* при дії флокаліну в концентрації 0,5 ммоль/л [4].

Метою нашої роботи було дослідження вазодилаторних ефектів нового вітчизняного фторвмісного активатора $K_{AT\Phi}$ -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран флокаліну в експериментах *in vivo*.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на 7 безпородних собаках різної статі масою від 17 до 23 кг під хлоразно-уретановим наркозом (хлоралола – 70 та уретан – 200 мг/кг, внутрішньовенно) в умовах закритої грудної клітки та збереження природного дихання. Після введення гепарину (500 од/кг) крізь стегнові артерії катетеризували черевний відділ аорти для реєстрації артеріального тиску. Для оцінки вазомоторних реакцій периферичних судин виконували аутоперфузію судин задніх кінцівок за допомогою насоса при підтриманні постійного об'єму перфузії та вимірювання перфузійного тиску в стегновій артерії. Реєстрацію результатів експериментів здійснювали за допомогою полікардіографа “Mingograph-82” фірми «Siemens-Elema» (Швеція). В таких умовах, максимально наближених до фізіологічних, відкривається можливість найбільш чітко реєструвати вазомоторні ефекти нових фармакологічних вазоактивних сполук в експериментах *in vivo*.

Флокалін розчиняли в диметилацетаміді (на 5 мг флокаліну – 0,1 мл диметилацетаміду) та вводили в дозах від 0,01 до 1,5 мг/кг та від 0,05 до 0,2 мг/кг внутрішньовенно та в перфузовану кров'ю стегнову артерію відповідно. Для порівняння амплітуди вазодилаторних ефектів

флокаліну з ефектами інших активаторів K_{ATP} -каналів, як контроль використовували відомий активатор цих каналів пінацидил, який вводили в перфузовану кров'ю стегову артерію в аналогічних дозах. В стегову артерію та внутрішньовенно також вводилися фізіологічний розчин разом з диметил-ацетамідом у дозах, що відповідали введеним разом з флокаліном.

Отримані результати обробляли математично за методом варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Origin 7.0. Достовірність результатів визначали за критерієм t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ розглядали як статистично достовірні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз отриманих результатів показав, що в експериментах *in vivo* на великих тваринах флокалін, як і в експериментах *in vitro* на ізольованих препаратах аорти та ізольованому, перфузованому за Лангендорфом серці щурів і морських свинок [4, 7, 10], проявляє вазодилататорні властивості, які мають виражений дозозалежний характер (рис. 1, а, 2). При внутрішньовенному введенні флокаліну в дозах 0,01 та 0,02 мг/кг ніяких змін в системному артеріальному

тиску (САТ) не відбувалося (таблиця). При введенні 0,05 мг/кг спостерігали незначну дилататорну реакцію (тривалістю близько 3 хв) у судинному руслі (таблиця, рис. 1, б) – зниження САТ від вихідного рівня у середньому на $9,52\% \pm 2,01\%$ ($n=7$, $P < 0,05$). Таким чином, порогова доза флокаліну (внутрішньовенне введення) щодо зміни САТ анестезованої собаки становила 0,05 мг/кг. Введення флокаліну в дозах 0,5 мг/кг і вищих зменшувало САТ досить суттєво, більш ніж на $37,26\% \pm 3,53\%$ ($P < 0,05$) та на $42,07 \pm 6,18$ ($n=5$, $P < 0,05$); $44,22 \pm 4,87$ ($n=3$, $P < 0,05$); $44,3 \pm 4,59$ ($n=5$, $P < 0,05$) та $66,28$ мм рт.ст. $\pm 3,15$ мм рт.ст. ($n=3$, $P < 0,05$) відповідно при введенні 0,5; 0,75; 1,0 та 1,5 мг/кг. При цьому узагальнене значення САТ у всіх експериментах у середньому становило $121,46$ мм рт.ст. $\pm 7,81$ мм рт.ст. Ці значення прямо вказують на потужність ефектів флокаліну на судинну систему, а саме на артеріальний тиск. При внутрішньовенному введенні великих доз флокаліну (0,75–1,5 мг/кг) досить часто САТ знижувався до 40–50 мм рт.ст., що є практично гранично допустимим рівнем – подальше зниження САТ є смертельно небезпечним. Слід зауважити, що таке небезпечне зниження артеріального тиску в відповідь на великі дози флокаліну є досить

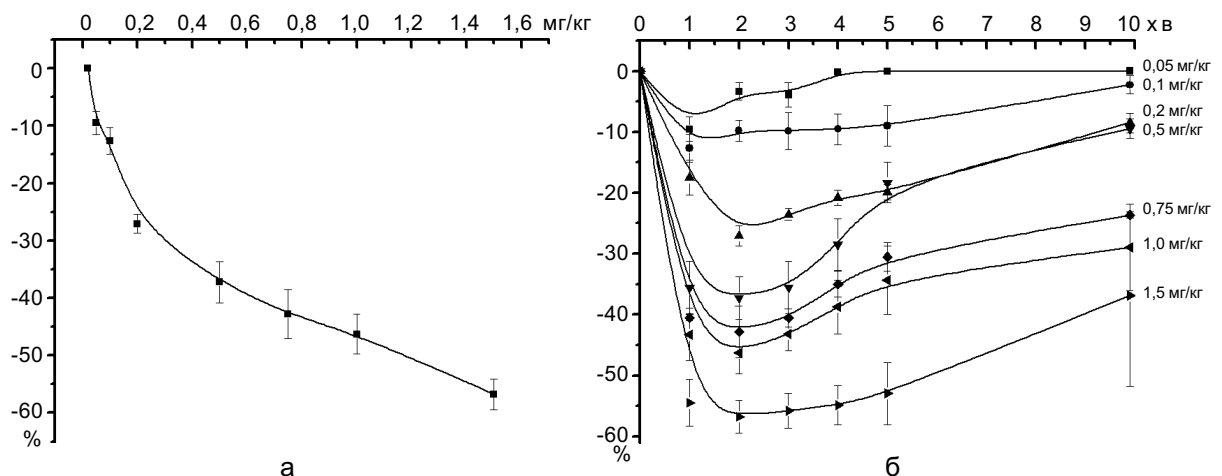


Рис. 1 Залежність системного артеріального тиску (крива доза-ефект) від введеної дози (а) та часу дії (б) флокаліну (в відсотках від вихідного рівня) в експериментах на анестезованих собаках. $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем

Зміна системного артеріального тиску при внутрішньовенному введенні різних доз флокаліну (у відсотках від вихідного рівня) в експериментах на анестезованих собаках (M±m)

Доза флокаліну, мг/кг	Час дії флокаліну, хв.											
	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30		
0,01 (n=3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,02 (n=3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05 (n=7)	-9,52±2,01*	-3,37±1,42	-3,92±2,02	-0,19±0,16	-0,06±0,06	0	0	0	0	0	0	0
0,1 (n=8)	-12,66±2,31*	-9,81±1,69*	-9,86±3,08*	-9,54±2,51*	-9,02±3,29*	-2,29±1,51	-3,06±1,75	-2,07±1,37	-1,49±1,14	-0,76±0,76		
0,2 (n=5)	-17,45±2,86*	-27,08±1,64*	-23,54±0,95*	-20,8±1,26*	-19,95±1,27*	-8,49±1,6*	-7,31±1,3*	-6,31±0,97*	-5,22±0,85*	-2,18±1,7		
0,5 (n=6)	-35,53±4,35*	-37,26±3,53*	-35,53±4,35*	-28,5±4,2*	-18,34±3,32*	-9,44±1,6*	-6,88±1,94*	-5,55±1,97	-4,42±2,71	-5,02±2,15		
0,75 (n=3)	-40,5±0,5*	-42,82±4,24*	-40,53±1,53*	-35±2,14*	-30,49±2,37*	-23,63±0,49*	-17,56±1,3*	-12,34±0,91*	-9,45±0,95*	-7,1±0,34*		
1,0 (n=5)	-43,25±4,3*	-46,28±3,44*	-43,2±2,67*	-38,73±4,43*	-34,31±5,61*	-28,97±7,09*	-24,6±7,16*	-18,69±7,28*	-11,1±6,27*	-6,45±6,45		
1,5 (n=3)	-54,48±3,85*	-56,75±2,68*	-55,77±2,84*	-54,84±3,17*	-52,94±5,06*	-36,85±14,97*	-25,36±11,6*	-19,97±11,57	-15,18±10,53	-13,28±9,58		

* P<0,05 порівняно з вихідним рівнем.

недовгим і триває близько 15 хв, по завершенні яких рівень САТ є вже зниженим від початкового рівня всього на 25 % (див. таблицю). Максимальний ефект флокаліну на артеріальний тиск взагалі відбувається в перші 3 хв після введення, після чого він повільно відновлюється до вихідного рівня (див. таблицю, рис. 1,б). Така короткочасна плінність потужності ефекту можливо пов'язана з природою та функцією цього мембранного каналу. Адже основним ендogenousним регулятором його активації є внутрішньоклітинний вміст АТФ та співвідношення АТФ/АДФ, а основним наслідком їх відкриття є антиішемічний захист органа чи тканини, який би тип K_{ATP} -каналів не активувався. Щодо судинної дилатації внаслідок активації цих каналів, то немає фізіологічного сенсу зменшувати судинний опір на досить тривалий період часу, адже при їх розширенні відразу збільшується локальний кровотік та поліпшується постачання кисню, що запобігає гіпоксії та розвитку ішемії в цій частині організму. Сила та тривалість гіпотензивного ефекту флокаліну чітко корелює з величиною введеної дози – чим більша доза, тим сильніший і триваліший ефект. Слід зауважити, що за 30 хв після введення флокаліну в відповідних до наших експериментів дозах артеріальний тиск в анестезованій собаці є зниженим практично завжди не більше ніж на 15 % та практично нормалізується протягом години.

Оптимальні з нашої точки зору кардіопротекторні дози флокаліну – 0,1 та 0,2 мг/кг, передішемічне внутрішньовенне введення яких призводить до зменшення розміру інфаркту міокарда у середньому на 37–40 % в експериментах з гострою ішемією та реперфузією міокарда [2, 8, 12], достовірно знижують САТ протягом перших 5 та 25 хв відповідно (див. таблицю). Незважаючи на те, що гіпотензивний ефект флокаліну в дозі 0,2 мг/кг удвічі потужніший (див. рис. 1,б) та майже в 5 разів триваліший (див. таблицю) ніж у дозі 0,1 мг/кг

кардіопротекторні ефекти при їх введенні за умов ішемії–реперфузії міокарда практично не відрізняються, що може вказувати на ймовірну відсутність прямого зв'язку між доішемичним зниженням артеріального тиску та захистом від ішемічних і реперфузійних пошкоджень при створенні фармакологічного прекодиціювання у анестезованих собак за допомогою флокаліну. Можливо більш значну роль в такому випадку відіграє розширення коронарних судин і попередження розвитку їх вазоконстрикції під час реперфузії ішемізованого міокарда [1, 2, 8, 11]. Отже, для мінімального впливу на гемодинаміку тварин і запуском потужних захисних антиішемічних механізмів в експериментах зі створенням ішемії–реперфузії міокарда *in vivo* флокалін, імовірно, слід використовувати в дозі, яка не перевищує 0,2 мг/кг.

В серії експериментів з введенням флокаліну та відомого активатора K_{ATP} -каналів пінацидилу в перфузовану кров'ю стегову артерію (в дозах від 0,05 до 0,2 мг/кг) показано, що вазодилаторні ефекти обох активаторів калієвих каналів у стеговій артерії достовірно не відрізняються між собою (рис. 2). Що дало нам змогу порівняльно оцінити гіпотензивні якості нового вітчизняного фторвмісного активатора K_{ATP} -каналів флокаліну за амплітудою реакції, який як і пінацидил, відноситься до групи ціаногуанідинів за класифікацією активаторів калієвих каналів та є фторвмісним аналогом останнього [13]. Проте слід зауважити, що при дослідженні флокаліну на нешкідливість виявилось, що за класифікацією речовин за токсичністю, він відноситься до малотоксичних сполук, та в 3,5 раза менш токсичний за пінацидил. Його напівлетальна доза для білих щурів становить 2150 мг/кг, що значно менше ніж у останнього – 600 мг/кг [1, 13].

Вимірювання перфузійного тиску в стеговій артерії показало дещо сильніші ефекти флокаліну на судинний тонус, ніж

при внутрішньовенному введенні та вимірюванні САТ (див. рис. 1, а, 2), що, ймовірно, пов'язано з одною зоною (стегова артерія) введення флокаліну та реєстрації змін перфузійного тиску. При цьому зміни тиску зберігалися. Введення флокаліну в дозах 0,05; 0,1 та 0,2 мг/кг призводило до зниження перфузійного тиску в стеговій артерії на $34,67 \pm 16,04$ ($n=6$), $45,25 \pm 10,33$ ($n=6$; $P<0,03$) та $53,67$ мм рт.ст. $\pm 5,49$ мм рт.ст. ($n=6$; $P<0,02$) мм рт.ст. відповідно від вихідного рівня. Аналогічні дози пінацидилу зменшували перфузійний тиск у стеговій артерії собаки на $46,75 \pm 4,99$ ($n=6$; $P<0,03$), $52,25 \pm 11,39$ ($n=6$; $P<0,02$) та $64,67$ мм рт.ст. $\pm 2,6$ мм рт.ст. ($n=6$; $P<0,02$) відповідно від вихідного рівня.

Слід зауважити, що розчинник флокаліну диметилацетамід у використаних у дослідженні концентраціях не впливав на показники гемодинаміки.

Таким чином, в експериментах *in vivo* на великих тваринах показано, що сила та тривалість гіпотензивного ефекту флокаліну чітко корелює з величиною введеної дози – чим більша доза, тим сильніший і триваліший ефект. Тобто флокалін має потужні дозозалежні вазодилаторні ефекти при внутрішньовенному введенні та

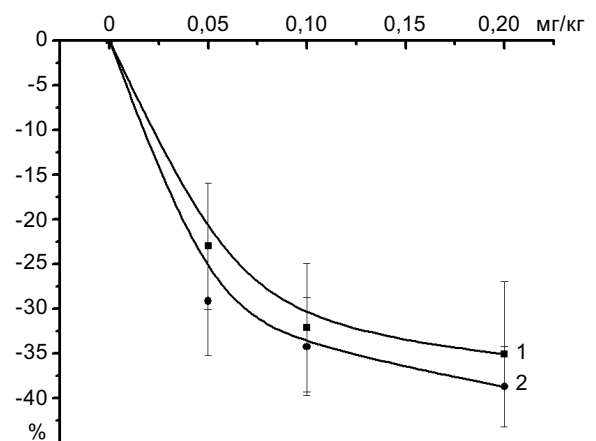


Рис. 2. Залежність перфузійного тиску в стеговій артерії (крива доза-ефект) від введеної дози флокаліну (1) та пінацидилу (2) (в відсотках від вихідного рівня) в експериментах на анестезованих собаках. $P<0,05$ порівняно з вихідним рівнем

введенні в перфузовану кров'ю стегову артерію, що практично не відрізняються від ефектів відомого активатора K_{ATP} -каналів пінацидилу. Виявлено, що використання в експерименті великих доз флокаліну (1,0 мг/кг і більше) є досить небезпечним внаслідок можливого різкого зниження системного артеріального тиску – до 40 – 50 мм рт.ст. Оптимальними кардіопротекторними дозами флокаліну в експериментах з гострою ішемією та реперфузією міокарда слід вважати 0,1–0,2 мг/кг.

Р.Б. Струтинский

ВАЗОДИЛАТАТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ФЛОКАЛИНА – ФТОРСОДЕРЖАЩЕГО АКТИВАТОРА АДЕНОЗИНТРИФОСФАТ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

В экспериментах на больших животных (анестезированных собаках) показано, что амплитуда и длительность гипотензивного эффекта флокалина сопоставляется с величиной введенной дозы – чем выше доза, тем сильнее и продолжительнее эффект. При введении флокалина в перфузированную кровью бедренную артерию и внутривенно, он имеет выраженные дозозависимые вазодилаторные эффекты, которые практически не отличаются от эффектов известного активатора ATP -чувствительных калиевых каналов пинацидила, фторсодержащим аналогом которого он является. Однако следует заметить, что при исследовании флокалина на безвредность выявлено, что он в 3,5 раза менее токсичен, чем пинацидил. Регистрация системного артериального давления (САД) показала, что при внутривенном введении пороговая доза флокалина составляет 0,05 мг/кг – дилаторная реакция длительностью около 3 мин и амплитудой $9,52\% \pm 2,01\%$ ($n=7$, $P<0,05$). Введение флокалина в дозах 0,5 мг/кг и выше уменьшало САД более значительно – на 37 % и выше. При этом дозы 0,5; 0,75; 1,0 та 1,5 мг/кг уменьшали этот показатель от исходного уровня на $42,07 \pm 6,18$ ($n=5$, $P<0,05$); $44,22 \pm 4,87$ ($n=3$, $P<0,05$); $44,3 \pm 4,59$ ($n=5$, $P<0,05$) и $66,28$ мм рт.ст. $\pm 3,15$ мм рт.ст. ($n=3$, $P<0,05$) соответственно. При внутривенном введении больших доз флокалина (0,75–1,5 мг/кг) очень часто САД снижался до 40–50 мм рт.ст. Следует отметить, что такое опасное снижение артериального давления было относительно кратковременным и длилось не более 15 мин, по истечении которых оно постепенно (обычно на протяжении часа) восстанавливалось. Введение флокалина в бедренную артерию и измерение перфузионного давления в ней же показало практически аналогичные результаты. Оптимальные с нашей точки зрения кардиопротекторные дозы

флокалина – 0,1 и 0,2 мг/кг (доишемическое введение которых в экспериментах с острой ишемией и реперфузией миокарда уменьшает размер инфаркта последнего в среднем на 37–40 %) достоверно снижают САД в первые 5 и 25 мин соответственно.

Ключевые слова: K_{ATP} -каналы, вазодилатация, артериальное давление крови, флокалин.

R.B. Strutynskiy

THE VASODILATATORY EFFECTS OF FLOCALIN, A FLUORINE-CONTAINING K_{ATP} CHANNEL OPENER.

In experiments on anesthetized dogs it was shown that the amplitude and duration of hypotensive effect of flocalin, a fluorine-containing pinacidil analogue, were dose-dependent and similar to those evoked by the known ATP -sensitive potassium channel opener pinacidil. However, flocalin appeared to be 3,5 times less toxic than pinacidil. Registration of systemic arterial pressure (SAP) has shown that following intravenous introduction of the threshold dose of flocalin (0,05 mg/kg) the dilatation lasts around three minutes with the amplitude $9,52\% \pm 2,01\%$ ($n=7$, $P<0,05$). Introduction of flocalin in a dose 0,5 mg/kg and above reduced SAP on more than 37%. Flocalin at 0,5, 0,75, 1,0 and 1,5 mg/kg reduced SAP by $42,07 \pm 6,18$ ($n=5$, $P<0,05$); $44,22 \pm 4,87$ ($n=3$, $P<0,05$); $44,3 \pm 4,59$ ($n=5$, $P<0,05$) and $66,28 \pm 3,15$ mm Hg ($n=3$, $P<0,05$), accordingly. Intravenous introduction of high doses of flocalin (0,75 – 1,5 mg/kg) quite often reduced SAP to 40 - 50 mm Hg. However, such dangerous reduction in arterial pressure was comparatively short and lasted not more than 15 minutes, and then (usually within an hour) SAP gradually restored. Introduction of flocalin in hip artery, while measuring the perfusion pressure, produced practically similar results. In our opinion, the optimal cardioprotective doses of flocalin were 0.1 and 0.2 mg/kg. In experiments with acute ischemia and reperfusion of myocardium, preischemic introduction of flocalin at 0.1 and 0.2 mg/kg reduced an infarct size of myocardium by 37-40% and reduced SAP within first 5 and 25 minutes, accordingly. Key words: K_{ATP} channels, vasodilatation, arterial blood pressure, flocalin.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А. Розробка та підготовка до впровадження нового вітчизняного кардіопротекторного препарату-фторвмісного активатора ATP -залежних калієвих каналів Флокалін // Наука та інновації. – 2006. – 2, №4. – С.77–82.
2. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А., Шаламай А.С. Організація заводського виготовлення препарату Флокалін –

- нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора // Там само. – 2009. – 5, №1. – С.80–84.
3. Пивовар С.М., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мойбенко О.О. та ін. Дослідження механізму дії нових фторвмісних аналогів діазоксиду на судинний тонус // Фізіол. журн. – 2004. – 50, № 2, С.27–34.
 4. Струтинський Р.Б. Дослідження вазодилаторних ефектів фтор-похідного відкривача калієвих каналів на ізольованих судинах морської свинки // Фізіол. журн. – 1998. – 44, №3. – С.119–120.
 5. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О. Моделювання активності АТФ-залежних калієвих каналів у аорті нормотензивних та гіпертензивних тварин // Там само. – 2000. – 46, №6. – С.54–60.
 6. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Пивовар С.М., Досенко В.Є., Ягупольський Л.М. АТФ-чутливі калієві канали та зміни їх функціональної активності при стрептозотонин-викликаному цукровому діабеті // Там само. – 2003. – 49, №6. – С.22–31.
 7. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. Дослідження вазомоторних ефектів нових фторвмісних синтетичних активаторів АТФ-залежних калієвих каналів // Там само. – 2000. – 46, №4. – С.17–23.
 8. Струтинський Р.Б., Нещерет О.П., Тумановська Л.В., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну в експериментах *in vivo*: вплив на гемодинаміку та ураження міокарда за умов його ішемії – реперфузії // Там само. – 2009. – 55, №5. – С.
 9. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Мойбенко О.О. АТФ-зависимые калиевые каналы и их роль как центрального звена кардиопротекции при ишемии-реперфузии миокарда. – В кн.: Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008. – С. 206–252.
 10. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Ровенець Р.А., Піскун О.В., Ягупольський Л.М., Мойбенко О.О. Вплив активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну на функціонування ізольованого серця // Фізіол. журн. – 2005. – 51, № 6, С.18–24.
 11. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних та мітохондріальних аденозинтрифосфатзалежних калієвих K^{ATP} -каналів // Там само. – 2008. – 54, №6. – С.15–23.
 12. Струтинський Р.Б., Французова С.Б., Ровенець Р.А., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Флокалін-новий вітчизняний кардіопротектор. – В кн.: V Нац. конгрес патологіологів України з міжнародною участю «Сучасні проблеми патологіології: від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів» (17–19 вересня 2008 р., Запоріжжя) // Патологія. – 2008. – 5, №3. – С.22.
 13. Клебанов Б.М., Малетіна І.І., Петко К.І., Шаваран С.С., Ягупольський Л.М. Пат. 17071А Україна, МПК⁶ А 61 К 31/03. N-(1,2,2-триметилпропіл)-N'ю-ціано – N'ю-арилгуанідини з фторвмісними замісниками в ароматичному ядрі, які проявляють гіпотензивну та кардіотонічну дію – № 95041977; Заяв. 26.04.95; Опубл. 31.10.97. – Промислова власність. – 1997. – №5. – С.3.1.76.
 14. Babenko A.P., Gonzales G., Aguilar-Bryan L., Bryan J. Reconstituted human cardiac K^{ATP} channels. Functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells // *Circulat. Res.* – 1998. – 83. – P.1132–1143.
 15. Benndorf K., Thierfelder S., Doepfer B., Gebhardt G., Hirche H. Role of Cardiac K^{ATP} Channels During Anoxia and Ischemia // *News Physiol. Sci.* – 1997. – 12, №4. – P.78–83.
 16. Dunne M.J., Aynsley-Green A., Lindley K.J. Nature's K^{ATP} channels knockout // *Ibid.* – H.197–203.
 17. Jahāndir A., Terzic A. K^{ATP} channel therapeutics at the bedside // *J. Mol. and Cell. Cardiol.* – 2005. – 39. – P. 99–112.
 18. Jiang C., Haddad G.G. Modulation of K^{+} channels by intracellular ATP in human neocortical neurons // *Neurophysiology.* – 1997. – 77, №1. – P.93–102.
 19. Nelson M.T., Quayle J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial muscle // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1995. – 268. – P.C799–C822.
 20. Noma A. ATP-regulated K^{+} channels in cardiac muscle // *Nature.* – 1983. – 305. – P.147–148.
 21. Quayle J.M., Nelson M.T., Standen N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle // *Physiol Rev.* – 1997. – 77, №4. – P.1165–1232.
 22. Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T., Sperelakis N. ATP-sensitive K^{+} channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1998. – 274. – P. 25–37.
 23. Zhang D.X., Chen Y.-F., Campbell W.B., Zou A.-P., Gross G.J., Li P.-L. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels // *Circulat. Res.* – 2001. – 89(12). – P. 1177–1183.

Ю.В. Лебідь, В.Є. Досенко, Г.Г. Скибо

Експресія мРНК субодиниць протеасоми (PSMB5 та PSMB9) у нейронах гіпокампа при експериментальному цукровому діабеті: зв'язок із процесами апоптозу та некрозу

Цілою низкою досліджень доведено, що довготривалий перебіг цукрового діабету супроводжується розвитком дисфункції гіпокампа – структури, що бере участь у формуванні когнітивних функцій і визначає особливості стрес-реактивності. Метою нашої роботи стало вивчення експресії мРНК субодиниць протеасоми PSMB5 і PSMB9 при розвитку стрептозотозинного цукрового діабету з паралельним дослідженням процесів клітинної загибелі (апоптозу та некрозу) нейронів у різних зонах (CA1, CA2 та CA3) гіпокампа. Вивчення стану нейронів гіпокампа проведено з використанням хроматинового барвника Hoechst-33342 та з застосуванням імуногістохімічного визначення маркера апоптотичної загибелі клітин каспази-3. За допомогою конфокального мікроскопа Olympus FV1000 здійснювали візуалізацію каспази-3 – імунопозитивних клітин і нейронів із ознаками конденсації хроматину (Hoechst-33342) у зрізах гіпокампа щурів на 3-тю та 7-му добу від введення стрептозотозину. Рівень експресії мРНК субодиниць протеасоми PSMB5 та PSMB9 визначали методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Отримані результати свідчать про те, що на 3-тю та 7-му добу розвитку діабету збільшується рівень мРНК PSMB9 (з $4,807 \pm 0,392$ до $20,023$ ум. од. $\pm 4,949$ ум. од. на 3-тю добу та до $20,253$ ум. од. $\pm 5,141$ ум. од. на 7-му добу). Найбільша кількість клітин із ознаками конденсації хроматину була наявною на 3-тю добу в CA2 зоні (11,51 %), а на 7-му добу – в CA3 зоні гіпокампа (12,49 %), що вказує на різну інтенсивність загибелі клітин через некроз під час розвитку цукрового діабету. Збільшення кількості каспази-3-позитивних клітин ($137,59 \text{ мкм}^2 \pm 17,91 \text{ мкм}^2$ у контролі, $143,39 \text{ мкм}^2 \pm 21,45 \text{ мкм}^2$ на 3-ю добу, $293,42 \text{ мкм}^2 \pm 34,69 \text{ мкм}^2$ на 7-му добу) супроводжувалося зниженням їх площі ($36,54 \text{ мкм}^2 \pm 0,92 \text{ мкм}^2$ у контролі, $32,10 \pm 0,91$ і $30,53 \text{ мкм}^2 \pm 1,05 \text{ мкм}^2$ на 3-тю і 7-му добу відповідно), що свідчить про активізацію проапоптотичних процесів. Таким чином, можна дійти висновку, що в перший тиждень розвитку цукрового діабету відбуваються процеси пошкодження та дегенерації клітин гіпокампа.

Ключові слова: цукровий діабет 1-го типу, гіпокамп, пошкодження нейронів, протеасоми.

ВСТУП

Відомо, що цукровий діабет 1-го та 2-го типу провокує виникнення структурних і функціональних змін у центральній нервовій системі, зокрема у гіпокампі експериментальних тварин. У пацієнтів, що хворіють на цукровий діабет, упродовж тривалого часу також порушується запам'ятовування та навчання, знижується рівень

© Ю.В. Лебідь, В.Є. Досенко, Г.Г. Скибо

уважності та швидкості перебігу розумових процесів [38, 40]. Можливо, що початкові зміни у нейронах гіпокампа, які формуються задовго до перших симптомів порушення когнітивної сфери, створюють підґрунтя для розвитку діабетичної енцефалопатії в подальшому. Молекулярно-генетичні та клітинні механізми формування зазначених патологічних змін, що можна віднести до нейродегенеративних,

активно вивчаються останніми роками. Зокрема, велика увага приділяється дослідженню протеасомного протеолізу, що забезпечує як широке коло регуляторних внутрішньоклітинних процесів, так і контроль за якістю та утилізацією ушкоджених та різним чином модифікованих протеїнів [16, 17, 26]. При цьому незаперечним на сучасному етапі є те, що порушення убіквітинзалежного протеасомного протеолізу – важлива патогенетична ланка розвитку найбільш поширених нейродегенеративних захворювань [14, 15, 27]. Проте їх значення при ураженні ЦНС під час розвитку цукрового діабету невивчені. Невирішеним залишається і питання про експресію різних субодиниць протеасоми в нервових клітинах, особливо про експресію субодиниць імунпротеасоми. В праці Mishto M. та співавт. доведено наявність експресії мРНК і білку однієї з субодиниць імунпротеасоми PSMB9 (LMP2) у гіпокампі людини [32]. Автори роблять висновок, що збільшення експресії LMP2 та однієї з субодиниць конститутивної протеасоми (PSMB1) є характерною ознакою дегенерації мозку, в першу чергу гіпокампа, в процесі старіння. З іншого боку, накопичуються дані про спільні риси нейродегенерації при старінні та цукровому діабеті [4, 6, 34]. Зокрема, вони виявляються у вигляді апоптотичної загибелі нейронів, астрогліозу, змін архітектоники різних зон головного мозку [28]. Стосовно апоптотичної загибелі як добре відрегульованого механізму самознищення клітини, особливий інтерес знов таки становлять процеси убіквітинзалежного протеасомного протеолізу, що й забезпечують вибіркочку деградацію як апоптотичних, так і проти-апоптотичних білків [23, 29, 41].

Мета нашого дослідження – вивчення експресії субодиниць протеасоми PSMB5 та PSMB9 у тканині гіпокампа під час розвитку стрептозотоцинового цукрового діабету із паралельним дослідженням процесів клітинної загибелі (апоптозу та

некрозу) нейронів у різних зонах (CA1, CA2 та CA3) гіпокампа.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 42 статевозрілих самцях щурів лінії Вістар масою 200–250 г. Тварини знаходилися в умовах природного світлового режиму та у вільному доступі до води та їжі. Всі експерименти були виконані з дотриманням норм та принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Для дослідження змін стану нервової системи була використана стрептозотоцинова модель індукції цукрового діабету. Цей спосіб моделювання діабету є визнаним у світі, оскільки стрептозототин вибірково пошкоджує β -клітини острівців Лангерганса та дуже швидко метаболізується в організмі без утворення токсичних речовин [2]. Цукровий діабет моделювали одноразовою внутрішньоочеревиною ін'єкцією стрептозототину ("Sigma-Aldrich", Німеччина) в дозі 45 мг/кг, що був попередньо розчинений в 0,1 М цитратному (рН 4,5). Тваринам контрольної групи вводили аналогічний об'єм цитратного буфера, що не містив стрептозототину. На 3-тю добу після введення стрептозототину вимірювали вміст глюкози в плазмі крові за допомогою приладу для експрес-аналізу Smartest (Тайван). В експеримент відбирали щурів із рівнем глікемії вищим за 10 ммоль/л та ознаками розвитку цукрового діабету: підвищеним споживанням води та поліурією. Вже на 3-тю добу від введення стрептозототину реєструвалося збільшення вмісту цукру до $14,3 \text{ ммоль/л} \pm 0,6 \text{ ммоль/л}$.

Тварин наркотизували каліпсолом (75 мг/гк) і перфузували транскардіально спочатку 50 мл фосфатного буфера, а потім – 200 мл 4%-го формальдегіду. Дослідження тварин з діабетом проводили на 3-тю та 7-му добу після введення стрептозототину. За допомогою мікротому ("Campden Instr.", Німеччина) створювали

фронтальні зрізи мозку 50 мкм завтовшки, двічі промивали у фосфатному буфері та інкубували із моноклональними мишачими первинними антитілами проти каспази-3 (“Sigma-Aldrich”, Німеччина) або (NeuN (від. англ. Neuronal nuclei), “Dako”, Данія) у розведенні 1:800 та 1:1000 відповідно. Антитіла були попередньо розведені 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,4) з додаванням Triton X-100 та сироватки у співвідношенні 1:1000. Після 24-годинної інкубації з первинними антитілами зрізи відмивали 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,42) та наносили вторинні антитіла Alexa-488, що були попередньо розведені фосфатним буфером у співвідношенні 1:1000. Інкубацію з вторинними антитілами проводили при 4°C протягом 48 год.

Забарвлення хроматиновим флуорофром Hoeschst-33342 виконували на зрізах мозку 50 мкм завтовшки та промивали їх в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 1,9 % NaCl двічі по 10 хв. Потім після промивання в 0,1 М безсольовому фосфатному буфері (рН 7,4), інкубували в 0,1 мкмоль/л розчині Hoeschst-33342 протягом 15 хв при 37 °C. Зрізи переносили на

предметні скельця та заключали в рідину, що стабілізує флуоресцентні барвники (“Dako”, Данія).

Ми використовували Hoeschst-33342 для ідентифікації клітин з ознаками конденсації ядерного матеріалу. Кількість клітин з компактним ядром, яке інтенсивно флуоресцює, може відображати кількість пошкоджених нейронів під час дії тих чи інших факторів. Оскільки Hoeschst-33342 забарвлює всі клітини, що мають ядра, виникла необхідність відокремити саме нейрони від астроцитів та інших клітин. Для уникнення помилкового врахування клітин інших типів ми здійснили забарвлення за допомогою Hoeschst-33342 з одночасним визначенням нейронів (NeuN) (рис. 1). Під час визначення кількості клітин з ознаками нейродегенерації враховували тільки NeuN-позитивні клітини.

Для дослідження рівня експресії мРНК щурів декапітували під каліпсоловим наркозом і вилучали гіпокамп. РНК виділяли з тканини гіпокампа із використанням набору Trizol RNA-prep (“Isogen”, Росія). Концентрацію РНК вимірювали за допомогою спектрофотометра ND1000 (“NanoDrop

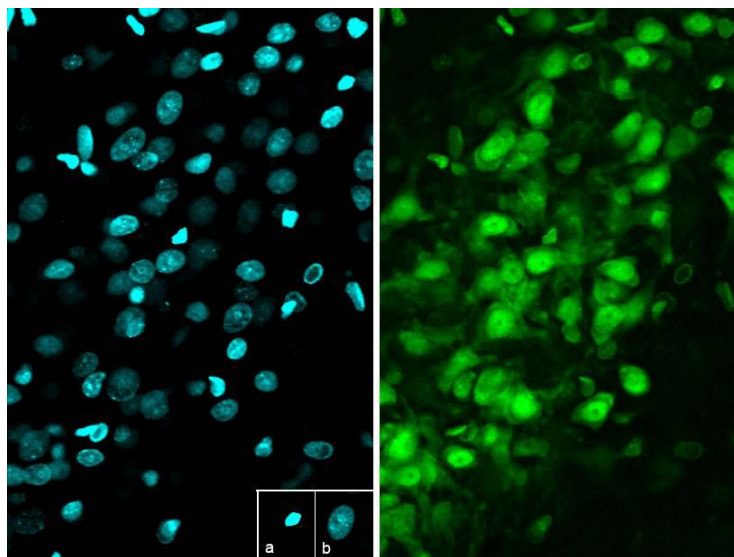


Рис. 1. Подвійне забарвлення з одночасною візуалізацією Hoeschst-33342 (ліворуч) та NeuN -позитивних нейронів (праворуч) пірамідального шару гіпокампа у щурів у нормі: а – нейрон з конденсованим та інтенсивно флуоресцюючим ядром; б – нейрон з хроматином, який дифузно розподілений в ядрі та помірно флуоресцює

Technologies Inc”, США). Зворотну транскрипцію проводили із використанням набору First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва), застосовуючи 2–2,5 мкг загальної РНК. Суміш для зворотної транскрипції містила у кінцевій концентрації такі компоненти: 50 ммоль тріс-НCl (рН 8,3), 50 ммоль КCl, 4 ммоль MgCl₂, 40 ммоль дитіотреїтолу, 40 од. інгібітора РНКаз RiboLock (“Fermentas”, Литва), 0,2 мкг гексимерного праймера, 1 ммоль суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів та 40 од. зворотної транскриптази M-MuLV (“Fermentas”, Литва). Проби інкубували протягом 1 год при 37°C та зупиняли реакцію нагріванням до 70°C впродовж 10 хв. Отриману таким чином одноланцюгову кДНК використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі із застосуванням детекційної системи Custom TaqMan® (“Applied Biosystems”, США) для субодиниці протеасоми PSMB9 та PSMB5. Програма ампліфікації складалася з початкової денатурації при 95°C протягом 20 с та з 45 циклів денатурації (95°C, 3 с), приєднання праймерів та елонгації (60°C, 30 с) та проводилася за використання системи 7500 Fast Real-time PCR (“Applied Biosystems”,

США). Аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR Software (“Applied Biosystems”, США). Рівень експресії розраховувався за загальноприйнятою формулою $2^{-\Delta Ct}$.

Статистичну оцінку вірогідності відмінностей проводили за допомогою критерію t Стьюдента та однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Достовірними вважали відмінності з рівнем значущості більшим ніж 95 % (P<0,05).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених експериментів вказують на суттєві зміни як на генетичному (експресія мРНК PSMB5 та PSMB9, так і на клітинному (апоптотична та некротична загибель нейронів гіпокампа) рівні на ранніх стадіях експериментального цукрового діабету. Вихідний рівень експресії мРНК PSMB5 у гіпокампі контрольних тварин значно поступається рівню експресії PSMB9 (субодиниця імунопротеасоми) і становить $0,493 \pm 0,021$ та $4,807$ ум. од. $\pm 0,392$ ум. од. відповідно (рис. 2). Тобто конститутивний рівень експресії PSMB5 майже в 10 разів нижчий, ніж PSMB9.

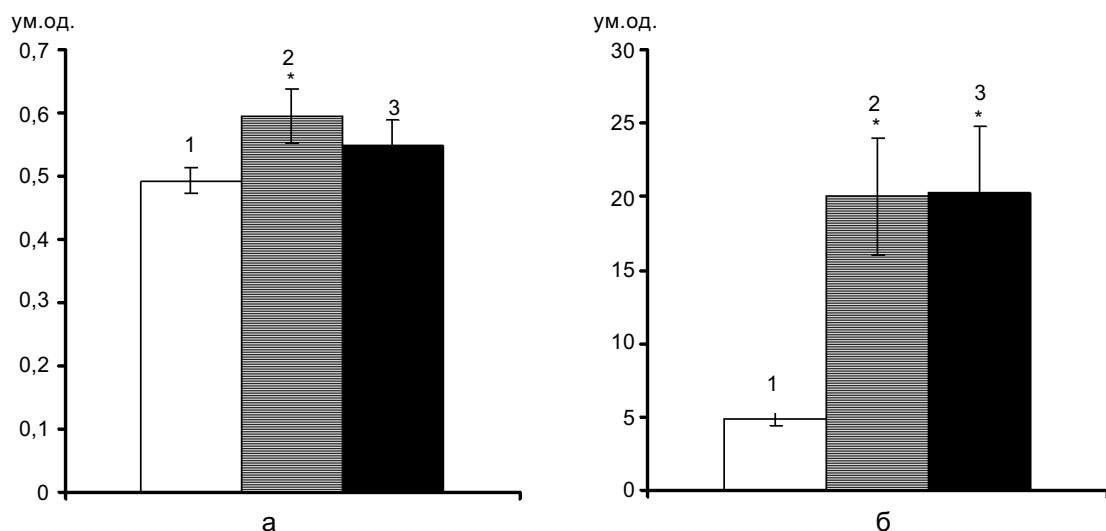


Рис. 2. Діаграми рівня експресії PSMB5 (а) та PSMB9 (б) в гіпокампі контрольних щурів (1) та тварин з цукровим діабетом тривалістю 3 (2) та 7 (3) діб.*P < 0,05 відносно контролю

Вірогідні змін експресії мРНК PSMB5 під час моделювання цукрового діабету відбуваються на 3-тю добу, наприкінці першого тижня експресія мРНК PSMB5 знову знижується до контрольного значення. Проте рівень експресії мРНК PSMB9 вірогідно збільшується вже через 3 доби після введення стрептозотоцину і залишається на високому рівні і на 7-му добу (див. рис. 2). Стійке підвищення вмісту мРНК PSMB9 може свідчити про те, що наприкінці першого тижня розвитку цукрового діабету продовжується пошкоджувальний вплив на нейрони гіпокампа, збільшення вмісту білків із зміненою третинною структурою та зберігається необхідність в протеасомній деградації білкових молекул. Проте не виключено, що імунопротеасома в мозку має зовсім інші функції, ніж в інших органах. Можна припустити, що вона бере безпосередню участь у процесах довготривалої потенціації та запам'ятовування. Підставою для такого припущення є праці James та співавт., які наводять дані про роль транскрипційного фактора Zif268 (Egr1/Krox24/NGF-IA) зниження регуляції експресії субодиниць протеасоми [10, 21]. Цей фактор

має ключове значення в процесах запам'ятовування та навчання, бо його “вимкнення” спричинює порушення цих процесів у експериментальних тварин [22, 24, 31]. Отже, супресія генів імунопротеасоми під впливом Zif268 є необхідним компонентом для формування довготривалої потенціації та запам'ятовування. А збільшення активності протеасоми внаслідок підвищення експресії її субодиниць, що показано в нашому дослідженні, спричинює погіршення когнітивних властивостей мозку тварин із цукровим діабетом.

Таким чином, можна висловити припущення, що порушення запам'ятовування та навчання, яке виникає під час розвитку діабету певною мірою, може бути зумовлено збільшенням синтезу та активності субодиниць протеасоми PSMB9, а також пошкодженням нейронів гіпокампа (див. нижче).

Виявлення апоптотичних клітин гіпокампа проводилося із застосуванням антитіл до ефекторної каспази-3. Аналіз зрізів показав, що у гіпокампі контрольних щурів є значна кількість клітин, які експресують каспазу-3 (рис. 3). Вони дифузно розподілені в тканині гіпокампа і мають

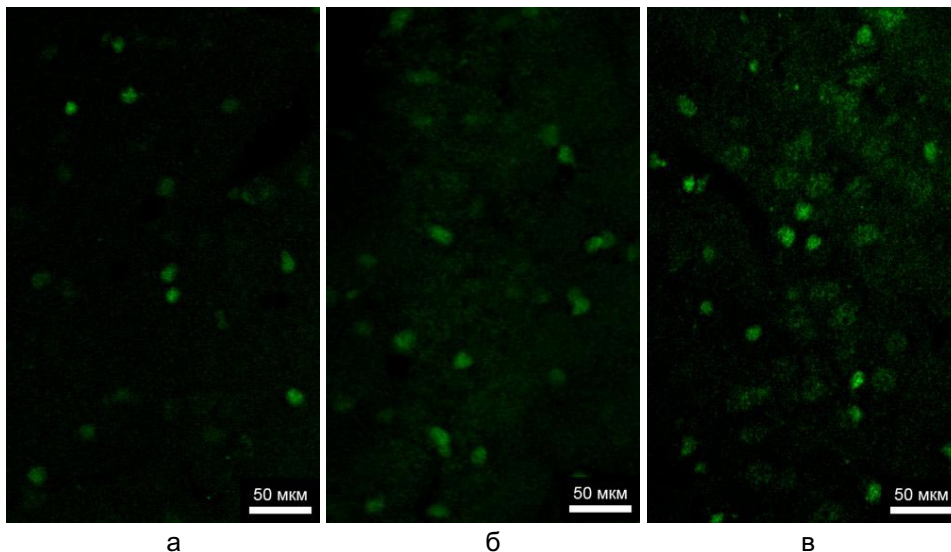


Рис. 3. Каспаза-3-імунопозитивні клітини у щурів в нормі (а), на 3-тю (б) та 7-му (в) добу розвитку цукрового діабету (реакція непрямої імуногістохімії з антитілами до каспази-3)

Таблиця 1. Морфометричні характеристики каспаза-3-позитивних клітин гіпокампа в нормі та при цукровому діабеті тривалістю 3 та 7 діб (M ± m)

Серія досліджень	Кількість клітин на 1 мм ²	Площа клітин, мкм ²	Інтенсивність флуоресценції, ум. од.
Контроль	137,59 ± 17,91	36,54 ± 0,92	12,97 ± 0,33
Діабет			
3-тя доба	143,39 ± 21,45	32,10 ± 0,91*	12,58 ± 0,34*
7-ма доба	293,42 ± 34,69**	30,53 ± 1,05*	12,47 ± 0,51*

* P < 0,05 порівняно з контрольною групою, ** P < 0,001.

різну інтенсивність флуоресценції. В період розвитку цукрового діабету кількість каспази-3 прогресивно збільшувалася і перевищувала контрольні значення на 53 % (7-ма доба; табл. 1). Площа цих клітин при цьому зменшувалася, що є характерним для клітин, що зазнають апоптотичної загибелі. Середні значення інтенсивності флуоресценції суттєво не змінювалися в динаміці експерименту. Таким чином, на 7-му добу розвитку експериментального цукрового діабету вірогідно підвищувалася кількість клітин, які синтезують каспазу-3, що вказує на активацію апоптотичної загибелі клітин та може бути причиною зниження кількості нейронів пірамідального шару гіпокампа.

Для визначення процесів некротичної загибелі нами був застосований барвник Hoechst-33324, який забарвлює ядерний

матеріал і дає змогу оцінити кількість клітин із ознаками конденсації хроматину, що є характерним для некротичної дегенерації. В гіпокампі контрольних щурів міститься певна кількість клітин з ознаками конденсації хроматину (табл. 2), яка вірогідно зростає на 3-тю та 7-му добу розвитку цукрового діабету. Кількість некротичних клітин суттєво відрізнялася залежно від зони гіпокампа, що досліджувалася: найбільш виражені зміни спостерігалися у CA1 та CA3-зоні та були меншими у CA2-зоні. Співвідношення кількості Hoechst-позитивних клітин і числа нейронів було найбільшим в CA3-зоні, що свідчить про вразливість нейронів указаної зони і про розвиток нейродегенеративного процесу.

Отже, значне підвищення експресії субодиниці імунопротеасоми збігається з активацією апоптотичної та некротичної

Таблиця 2. Кількість клітин з ознаками конденсації хроматину (Hoechst-33342) в різних зонах гіпокампа в нормі та на 3-тю та 7-му добу розвитку експериментального цукрового діабету (M ± m)

Серія досліджень	Зона	Кількість конденсованих ядер нейронів на 1 мм ⁻²	Кількість клітин з ознаками конденсації хроматину (від загальної кількості NeuN ⁺ -клітин), %
Контроль	CA1	6,45 ± 0,36	2,91
	CA2	15,36 ± 0,66	6,98
	CA3	14,27 ± 0,63	8,47
Діабет			
	3-тя доба		
	CA1	8,47 ± 0,54*	3,81
CA2	20,58 ± 1,31**	11,51	
CA3	17,00 ± 0,69***	9,84	
7-ма доба			
	CA1	9,73 ± 0,40*	4,73
	CA2	16,54 ± 0,88	9,84
CA3	19,14 ± 0,74*	12,49	

* P < 0,05, ** P < 0,001, *** P < 0,01.

загибелі нейронів гіпокампа на ранніх стадіях цукрового діабету. Ми припускаємо, що ці події пов'язані між собою і нейродегенерація запускається саме внаслідок активації імунопротеасоми.

У цьому аспекті надзвичайно важливим є питання про механізми активації експресії генів, що кодують субодиниці протеасом. Згідно з літературними даними, потужний стимулювальний вплив на експресію компонентів протеасоми мають глюкокортикоїди [9]. У працях Mitchell доведено, що процес кахектичного зменшення маси м'язів зумовлений збільшенням експресії субодиниць протеасоми під впливом глюкокортикоїдів, що підтверджувалося застосуванням антагоністів глюкокортикоїдних рецепторів, використання яких запобігало вказаному ефекту. Описано навіть специфічну протеасомрегуляторну сироваткову кіназу, що регулюється глюкокортикоїдами (від англ. proteasome-regulatory kinase serum/glucocorticoid-regulated kinase), яка опосередковує вплив глюкокортикоїдів на експресію генів протеасоми [5, 33]. У наших попередніх працях показано, що моделювання пролонгованого іммобілізаційного стресу спричинювало збільшення активності протеасоми в тканинах гіпокампа, а найбільшою мірою – в синапсомах нейронів цієї частини мозку [1]. Також нами показано, що введення блоатора синтезу глюкокортикоїдних гормонів метирапону призводило до зменшення загибелі нейронів гіпокампа в ранній період розвитку цукрового діабету [25].

Таким чином, є усі підстави вважати, що при цукровому діабеті збільшується вміст глюкокортикоїдів, що стимулюють експресію генів субодиниць протеасоми, зокрема в клітинах гіпокампа. До того ж показано, що експресія PSMB5 збільшується одночасно в нейронах та в астроцитах, що розташовані навколо них. Вважають, що нейрони збільшують продукцію PSMB5 і PSMB9 у відповідь на дію прозапальних цитокінів, зокрема γ -інтерферону,

які продукуються клітинами активованої астроглії [11]. Припускається, що надмірна активація астроцитів та їхня проліферація в процесі нейродегенерації може негативно впливати на життєдіяльність нейронів, зокрема внаслідок синтезу протеогліканів, що обмежують надходження факторів росту, нейротрофінів (NGF, NCGF) до нервових клітин. Нестача трофічних цитокінів є фактором запуску апоптотичної загибелі [12, 19]. Також можливим механізмом запуску апоптозу в нейронах гіпокампа, що експресують надмірну кількість імунопротеасоми, є імунна відповідь локальних імуноцитів мозку на клітини, що презентують надлишок пептидів у комплексі з білками головного комплексу гістосумісності першого типу [13]. Відомо, що субодиниці імунопротеасом, які індукуються інтерфероном, приймають участь у процесингу білків та їх презентації молекулами ГКГС-I [3, 37]. Збільшення створення пептидів для презентації ГКГС-I може впливати на нейрональну пластичність та електричні властивості нейронів, але питання щодо функціонального значення цього процесу залишаються не до кінця визначеними [7, 35].

Дещо складніше пояснити розвиток некрозу нейронів гіпокампа при моделюванні цукрового діабету. Лавиноподібний, нерегульований, незворотний характер розвитку некрозу нібито не надає можливості протеасомі втрутитися в цей процес. Однак в деяких дослідженнях показано, що протеасомний протеоліз бере участь в деградації супероксиддисмутази та каталази — ключових антиоксидантних ферментів [8, 18, 20]. У багатьох дослідженнях показано, що активація гіпоталамо-гіпофізарно-наднирниковозалозної системи, що спостерігається і при моделюванні цукрового діабету, спричинює збільшення продукції вільних радикалів [30, 36, 39]. Таким чином, збільшення експресії субодиниць протеасоми з імовірним збільшенням активності протеасоми, може впливати на

вміст антиоксидантних білків, і внаслідок цього збільшувати вразливість клітин до вільнорадикального ушкодження, наслідком чого є некротична загибель.

Узагальнюючи вищенаведені результати, можна дійти висновку про те, що порушення когнітивної сфери у щурів з експериментальним цукровим діабетом, а можливо і людей, хворих на цукровий діабет, зумовлені гіпрекспресією субодиниць імунопротеасоми та процесами апоптотичної та некротичної загибелі клітин гіпокампа. Збільшення активності синтезу мРНК субодиниці PSMB9, таким чином, може вважатися ознакою нейродегенеративного процесу, що є притаманним не тільки для цукрового діабету, але й для нейропатій іншого генезу.

Ю.В. Лебедь, В.Е. Досенко, Г.Г. Скибо

**ЭКСПРЕССИЯ МРНК СУБЪЕДИНИЦ
ПРОТЕАСОМЫ (PSMB5 И PSMB9) В
НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ
ДИАБЕТЕ: СВЯЗЬ С ПРОЦЕССАМИ
АПОПТОЗА И НЕКРОЗА**

Многими исследованиями доказано, что длительное течение сахарного диабета сопровождается развитием дисфункции гиппокампа – структуры, которая принимает участие в формировании когнитивных функций и определяет особенности стресс-реактивности. Целью данной работы было изучение экспрессии мРНК субъединиц протеасомы PSMB5 и PSMB9 в динамике развития стрептозототинового сахарного диабета с параллельным изучением процессов клеточной смерти (апоптоза и некроза) нейронов в разных зонах (CA1, CA2 и CA3) гиппокампа. Изучение состояния нейронов проведено с использованием хроматинового красителя Hoechst-33342 и с применением иммуногистохимического маркера апоптотической гибели клеток каспазы-3. С помощью конфокального микроскопа Olympus FV1000 осуществляли визуализацию каспазы-3 – иммунопозитивных клеток и нейронов с признаками конденсации хроматина (Hoechst-33342) в срезах гиппокампа крыс на 3-и и 7-е сутки от момента введения стрептозототина. Уровень экспрессии мРНК субъединиц протеасомы PSMB5 и PSMB9 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на 3-и и 7-е сутки развития диабета происходит увеличение уровня мРНК PSMB9 (с $4,807 \pm 0,392$ до

$20,023$ усл. ед. $\pm 4,949$ усл. ед. на 3-и сутки и до $20,253$ усл. ед. $\pm 5,141$ усл. ед. на 7-е сутки). Максимальное количество клеток с признаками конденсации хроматина определялось на 3-и сутки в CA2 зоне (11,51 %), а на 7-е сутки – в CA3 зоне гиппокампа (12,49 %), что указывает на различную интенсивность гибели клеток путем некроза по мере развития сахарного диабета. Увеличение количества позитивных клеток каспазы-3 ($137,59$ мкм² $\pm 17,91$ мкм² в контроле, $143,39$ мкм² $\pm 21,45$ мкм² на 3-и сутки, $293,42$ мкм² $\pm 34,69$ мкм² на 7-е сутки) сопровождалось снижением их площади ($36,54$ мкм² $\pm 0,92$ мкм² в контроле, $32,10$ мкм² $\pm 0,91$ мкм² на 3-и сутки и $30,53$ мкм² $\pm 1,05$ мкм² на 7-е сутки), что свидетельствует об активизации апоптотических процессов. Обобщая вышеизложенные результаты, можно прийти к выводу, что в 1-ю неделю развития сахарного диабета активизируются процессы повреждения и дегенерации клеток гиппокампа.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, гиппокамп, повреждение нейронов, протеасома

Y.V. Lebed, V.E. Dosenko, G.G. Skibo

**EXPRESSION OF PROTEASOME SUBUNITS
PSMB5 AND PSMB9 MRNA IN HIPPOCAMPAL
NEURONS: LINK WITH APOPTOSIS AND
NECROSIS**

There is a huge body of evidence showing that long-termed diabetes mellitus is followed with hippocampal dysfunction. The goal of this work was to investigate the expression of proteasome subunits PSMB5 and PSMB9 mRNA in CA1, CA2 and CA3 areas of hippocampus in parallel with processes of cell death (apoptosis and necrosis) in development dynamics of streptozotocine-induced diabetes. We have studied hippocampal neurons using chromatine dye Hoechst-33342 and immunohistochemical detection of apoptotic cell death marker caspase-3. At day 3 and 7 after injection of streptozotocine we have performed visualization of caspase-3- immunopositive neurons showing signs of neurodegeneration in hippocampal sections using confocal microscope Olympus FV1000. The rate of proteasome subunits PSMB5 and PSMB9 mRNA expression was determined with RT-PCR. The results indicated elevation of PSMB9 mRNA content (from $4,807 \pm 0,392$ arbU up to $20,023 \pm 4,949$ arbU on day 3 and up to $20,253 \pm 5,141$ arbU on day 7). A maximal number of cells with signs of chromatin condensation was observed at day 3 and day 7 in CA2 and CA3 area (11,51% and 12,49% respectively). That indicates an intensification of proapoptotic processes. Summarizing the results presented above we can conclude that during the first week of diabetes mellitus development, hippocampal cells undergo the process of impairment and degeneration.

Key words: type 1 diabetes mellitus, hippocampus, neuronal injury, proteasome.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Досенко В.Е., Загорий В.Ю., Мойбенко А.А. Изменения протеосомальной активности и активности нейтральных протеинкиназ в тканях головного мозга при старении // *Нейрофизиология*. – 2005. – **37**, № 1. – С.11–15.
2. Полторак В.В., Блох К.О. Стрептозотоциновый и вирусный инсулин-зависимый сахарный диабет (аутоимунные аспекты) // *Пробл. эндокринологии*. – 1989. – **35**, № 3. – С.81–88.
3. Aki M., Shimbara N., Takashina M., Akiyama K., Kagawa S., Tamura T., Tanahashi N., Yoshimura T., Tanaka K., Ichihara A. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes // *J. Biochem.* – 1994. – **115**, №2. – P.257–269.
4. Artola A. Diabetes-, stress- and ageing-related changes in synaptic plasticity in hippocampus and neocortex – the same metaplastic process? // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – **585**, №1. – P.153–162.
5. Bailey J.L., Wang X., Price S.R. The balance between glucocorticoids and insulin regulates muscle proteolysis via the ubiquitin-proteasome pathway // *Miner. Electrolyte Metab.* – 1999. – **25**, №4–6. – P.220–223.
6. Biessels G.J., van der Heide L.P., Kamal A., Bleys R.L., Gispen W.H. Ageing and diabetes: implications for brain function // *Eur. J. Pharmacol.* – 2002. – **441**, №1–2. – P.1–14.
7. Bonfoco E., Krainc D., Ankarcona M. Nicotera P., Lipton S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – **92**, №16. – P.7162–7166.
8. Cao C., Leng Y., Liu X. Yi Y., Li P., Kufe D. Catalase is regulated by ubiquitination and proteasomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases // *Biochemistry*. – 2003. – **42**. – P.10348–10353.
9. Combaret L., Taillandier D., Dardevet D. Bechet D., Ralliére C., Claustre A., Grizard J. Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles // *Biochem. J.* – 2004. – **378**, №1. – P.239–246.
10. Conway A.M., James A.B., Zang J. Morris B.J. Regulation of neuronal cdc20 (p55cdc) expression by the plasticity-related transcription factor zif268 // *Synapse*. – 2007. – **61**, №6. – P.463–468.
11. de Kloet E.R. Hormones and the stressed brain // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – **1018**. – P. 1–15.
12. Feldman E.L., Sullivan K.A., Kim B. Russel J.W. Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival // *Neurobiol. Dis.* – 1997. – **4**, №3–4. – P.201–214.
13. Ferrington D.A., Hussong S.A., Roehrich H. Kappahn R.J., Kavanaugh S.M., Heuss N.D., Gregerson D.S. Immunoproteasome responds to injury in the retina and brain // *J. Neurochem.* – 2008. – **106**, №1. – P.158–169.
14. Finkbeiner S., Mitra S. The ubiquitin-proteasome pathway in Huntington's disease // *Sci. World J.* – 2008. – **8**. – P.421–433.
15. Gao X., Hu H. Quality control of the proteins associated with neurodegenerative diseases // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. – 2008. – **40**, №7. – P.612–618.
16. Goldberg A.L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy // *Biochem. Soc. Trans.* – 2007. – **35**, №1. – P.12–17.
17. Goldberg A.L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins // *Nature*. – 2003. – **426**, №6968. – P. 895–899.
18. Hoffman E.K., Wilcox H.M., Scott R.W., Siman R. Proteasome inhibition enhances the stability of mouse Cu/Zn superoxide dismutase with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis // *J. Neurol. Sci.* – 1996. – **139**. – P.15–20.
19. Huang J.Y., Hong Y.T., Chuang J.I. Fibroblast growth factor 9 prevents MPP+-induced death of dopaminergic neurons and is involved in melatonin neuroprotection in vivo and in vitro // *J. Neurochem.* – 2009. – **109**, №5. – P.1400–1412.
20. Hyun D.H., Lee M., Halliwell B., Jenner P. Proteasomal inhibition causes the formation of protein aggregates containing a wide range of proteins, including nitrated proteins // *J. Neurochem.* – 2003. – **86**. – P.363–373.
21. James A.B., Conway A.M., Morris B.J. Regulation of the neuronal proteasome by Zif268 (Egr1) // *J. Neurosci.* – 2006. – **26**, №5. – P.1624–1634.
22. Jarvis E.D., Scharff C., Grossman M.R., Ramos I.A., Nottebohm F. For whom the bird sings: context-dependent gene expression // *Neuron*. – 1998. – **21**, №4. – P.775–788.
23. Jesenberger, Jentsch S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – **3**, №2. – P. 112–121.
24. Kaczmarek L., Zangenehpour S., Chaudhuri A. Sensory regulation of immediate-early genes c-fos and zif268 in monkey visual cortex at birth and throughout the critical period // *Cereb. Cortex*. – 1999. – **9**, №2. – P.179–187.
25. Lebed Y., Orlovsky M.A., Skibo G.G. Metyrapone prevents neuronal degeneration during first two weeks of the development of streptozotocine-induced diabetes mellitus // *FENS Abstr.* – 2008. – **4**. – P.119–125.
26. Lecker S.H., Goldberg A.L., Mitch W.E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states // *J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2006. – **17**, №7. – P.1807–1819.
27. Li X., Li H., Li X.J. Intracellular degradation of misfolded proteins in polyglutamine neurodegenerative diseases // *Brain Res. Rev.* – 2008. – **59**, №1. – P.245–252.

28. Li Z.G., Zhang W., Grunberger G. Sima A.A. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes // *Brain Res.* — 2002. — **946**, № 2. — P.221–231.
29. Liu C.H., Goldberg A.L., Qiu X.B. New insights into the role of the ubiquitin-proteasome pathway in the regulation of apoptosis // *Chang Gung. Med. J.* — 2007. — **30**, №6. — P.469–479.
30. Mariappan N., Elks C.M., Sriramula S. Guggilam A., Borkhsenions., Francis J. NF- κ B-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes // *Cardiovasc. Res.* — 2009. — **85**, №3. — P.473–483.
31. Mello C., Velho T.A., Pinaud R. Song-induced gene expression: a window on song auditory processing and perception // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2004. — **1016**. — P.263–281.
32. Mishto M., Bellavista E., Santoro A., Stolzing A., Ligorio C., Nacmias B., Spazzafumo L., Chiappelli M., Licastro F., Sorbi S., Pession A., Ohm T., Grune T., Franceschi C. Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains // *Neurobiol. Aging.* — 2006. — **27**, №1. — P.54–66.
33. Mitch W.E., Bailey J.L., Wang X., Jurkowitz C., Newby D., Price S.R. Evaluation of signals activating ubiquitin-proteasome proteolysis in a model of muscle wasting // *Amer. J. Physiol.* — 1999. — **276**, №5 Pt 1. — P.C1132–C1138.
34. Nass N., Bartling B., Navarrete S.A. Scheubel R.J., Burgermann J., Silber R.E., Simm A. Advanced glycation end products, diabetes and ageing // *Z. Gerontol. Geriatr.* — 2007. — **40**, №5. — P.349–356.
35. Neumann H., Cavalie A., Jenne D.E. Wekerle H. Induction of MHC class I genes in neurons // *Science.* — 1995. — **269**, №5223. — P.549–552.
36. Perez –Matute P., Zulet M.A., Martinez J.A. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2009. — **9**, №6. — P.771–779.
37. Piccinini M., Mostert M., Croce S. Baldovino S., Papotti M., Rinaudo M.T. Interferon-gamma-inducible subunits are incorporated in human brain 20S proteasome // *J. Neuroimmunol.* — 2003. — **135**, №1–2. — P.135–140.
38. Prikryl R. Cognitive functions impairment in diabetes mellitus patients // *Cas. Lek. Cesk.* — 2007. — № 146. — P. 434–437.
39. Sivitz W.I., Yorek M.A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities // *Antioxid. Redox. Signal.* — 2009. — **12**, №4. — P.537–577.
40. Wessels A. M., Rombouts S. A., Remijnse P. L. Boom Y., Scheltens P., Barkhof F., Heine R.J., Snoek F.J. Cognitive performance in type 1 diabetes patients is associated with cerebral white matter volume // *Diabetologia.* — 2007. — № 50. — P. 1763–1769.
41. Wolf B.B., Schuler M., Echeverri F., Green D.R. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation // *J. Biol. Chem.* — 1999. — **274**, №43. — P.30651–30656.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: lebed@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до
редакції 24.09.2009

О.В. Аكوпова, А.В. Коцюрба, О.М. Харламова, Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач

Роль мітохондрій у NO-залежній регуляції активності Na^+ , K^+ -АТФази аорти щурів

За умов *in vivo* досліджено взаємодію двох іонотранспортних механізмів серцево-судинної системи (Na^+ , K^+ -АТФази аорти щурів та Ca^{2+} -акумуляційної системи мітохондрій) у короткотерміновій відповіді на дію донора NO нітрогліцерину (НГ). Активність Na^+ , K^+ -АТФази визначали в аорті, тоді як акумуляцію Ca^{2+} – в ізольованих мітохондріях міокарда щурів, виходячи з припущення, що метаболічні перетворення в мітохондріях міокарда під дією NO подібні до тих, що відбуваються в мітохондріях тканин аорти. Одержані результати показують дозозалежну скоординовану дію NO на активність Na^+ , K^+ -АТФази та накопичення Ca^{2+} в мітохондріях. Встановлено, що активація Na^+ , K^+ -АТФази низькими дозами НГ (0,25 мг/кг) супроводжується збільшенням накопичення Ca^{2+} у мітохондріях внаслідок інгібування мітохондріальної пори. Проте подальше збільшення дози НГ призводить до реципрокних змін досліджених показників – зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази відносно контролю та навпаки – підвищення накопичення Ca^{2+} , яке сягає максимальних значень при введенні 1,0 мг/кг НГ. Паралельно у мітохондріях спостерігається різке збільшення генерації активних форм азоту та кисню (АФА й АФК), продуктів їх токсичної дії – нітрозотіолів і вільного заліза (Fe^{2+}). Установлено певну кореляцію між накопиченням Ca^{2+} , вивільненням заліза з мітохондрій і перерозподілом АФК в аорті на користь утворення $\cdot\text{OH}$ -радикала при відповідному зменшенні пулів H_2O_2 та $\cdot\text{O}_2^-$ в аорті і нітрозотіолів в ізольованих мітохондріях. Таким чином, висунуто гіпотезу, що особливістю метаболізму АФК і АФА в аорті є перерозподіл їх утворення на користь $\cdot\text{OH}$ -радикала, з пулів H_2O_2 та $\cdot\text{O}_2^-$ внаслідок активації реакції Хабер-Вайсса, каталізованих вивільненими з мітохондрій іонами заліза, а також внаслідок вільнорадикального розпаду пероксинітриду, джерелом якого є мітохондріальний пул нітрозотіолів. Отже, результати експерименту вказують на важливу роль мітохондрій в індукованій іонами заліза активації вільнорадикальних перетворень АФК і АФА, що призводить до посилення оксидативного стресу та інгібування Na^+ , K^+ -АТФази. Відновлення активності ферменту потужним антиоксидантом мелатоніном, підтверджує оксидативну природу інгібування Na^+ , K^+ -АТФази в аорті щурів.

Ключові слова: Na^+ , K^+ -АТФаза, мітохондрії, Ca^{2+} , активні форми кисню, активні форми азоту, аорта, міокард, оксидативний стрес.

ВСТУП

Зміни вмісту NO та його метаболітів, так званих активних форм азоту (АФА), забезпечують контроль судинного тонуусу у серцево-судинній системі. Відомо, що вазодилататорна дія NO опосередковується сукупною роботою різних іонотранспортних систем клітини: каналів, обмінників, транспортних ферментів. Важливу роль у контролі судинного тонуусу,

як відомо, відіграє Na^+ , K^+ -АТФаза (натрієвий насос), фермент, що забезпечує електрогенний трансмембранний обмін Na^+ та K^+ проти градієнта концентрацій катіонів внаслідок гідролізу АТФ [4]. Підтримання високого мембранного потенціалу перешкоджає надходженню Ca^{2+} з позаклітинного середовища як через потенціалкерівані кальцієві канали, так і через Na^+ - Ca^{2+} -обмінник, робота якого також залежить від мембранного потенціалу – ($\Delta\Psi_m$) [11].

© О.В. Аكوпова, А.В. Коцюрба, О.М. Харламова, Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач

Останнім часом багато уваги у механізмах регуляції внутрішньоклітинного Ca^{2+} приділяють мітохондріям, їх кальцій-транспортній системі, завдяки якій ці органели здатні акумулювати велику кількість кальцію у відповідь на дію фізіологічно активних агентів [7]. Тим важливішим є вивчення взаємодії іонотранспортних систем мітохондрій і плазматичної мембрани у регуляції кальцієвого гомеостазу клітин у фізіологічних умовах. Але ні Ca^{2+} -акумулювальна система мітохондрій, ні Na^+ , K^+ -АТФаза у тканинах серцево-судинної системи не привертала достатньо уваги як потенційна мішень дії NO – універсального регулятора багатьох фізіологічних функцій.

Відомо, що у клітині «скупчення» мітохондрій розташоване безпосередньо поблизу плазматичної мембрани, а також саркоплазматичного ретикулума (СР) та клітинного ядра [8, 15, 23]. Така внутрішньоклітинна локалізація є передумовою тісного функціонального взаємозв'язку мітохондрій з плазматичною мембраною клітин, СР і клітинним ядром [15], що може проявлятися у передачі клітинних сигналів різного походження. Нещодавні дослідження вказують на існування спільних контактних сайтів, що передають кальцієві сигнали між мітохондріями та СР [23].

Оскільки більшість внутрішньоклітинно утворених АФК і АФА також є сигнальними молекулами [19], значний інтерес становлять дослідження їх участі у взаємодії мітохондрій з плазматичною мембраною клітин, зокрема виявлення можливої ролі мітохондрій у регуляції активності Na^+ , K^+ -АТФази, що за нашими попередніми даними може проявлятися у відповідь на дію екзогенного NO. Широко застосовуваний у клініці нітрогліцерин (гліцеролтринітрат) в організмі стає донором NO внаслідок біотрансформації, механізм якої досі невідомий. Припускають, що у перетворенні нітрогліцерину бере участь

певна сукупність ферментів, серед яких система цитохрому Р-450, глутатіон-S-трансфераза [18], а також мітохондріальна ізоформа альдегіддегідрогенази ALDH-2 [14]. Відомо також, що перетворення нітрогліцерину полегшується за наявності тіолів як відновних агентів [18].

Нещодавно нами було висловлено припущення, що інгібування Na^+ , K^+ -АТФази аорти щурів зумовлене активацією метаболізму АФК і АФА під впливом екзогенного NO [2]. Раніше встановили, що мітохондрії відіграють значну роль у перетвореннях АФК і АФА під дією донора NO [1]. Отже, метою цієї роботи було подальше висвітлення ролі мітохондрій у регуляції метаболізму АФК і АФА, а також з'ясування можливого впливу мітохондрій на регуляцію активності Na^+ , K^+ -АТФази за допомогою окисного метаболізму АФК і АФА у відповідь на дію різних доз фармакологічного донору NO нітрогліцерину. Досліджуючи роль метаболізму АФК і АФА у взаємодії мітохондрій з плазматичною мембраною клітин аорти, ми виходили з припущення, що метаболічні перетворення в мітохондріях міокарда, які активуються під дією NO, подібні до тих, що відбуваються і в мітохондріях тканин аорти. Тому у дослідах нами були використані ізольовані мітохондрії міокарда щурів.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих щурах лінії Вістар масою 200–250 г. Нітрогліцерин вводили внутрішньоочеревинно у дозах 0,25, 0,5, 1,0 і 1,5 мг/кг. Контрольним щурам вводили фізіологічний розчин. Аорти і серця, видалені через 5 хв після введення нітрогліцерину, ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (2°C), подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища: 250 ммоль/л сахарози, 20 ммоль/л тріс-НСІ-буфера, 1 ммоль/л ЕДТА; рН 7,4.

Для виділення мітохондрій гомогенат центрифугували 7 хв при 700 g (4°C), після чого супернатант центрифугували 15 хв при 11000 g (4°C). Осад суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА та зберігали при 4°C . Вміст білка знаходили за методом Лоурі.

Активність Na^+ , K^+ -АТФази визначали у гомогенаті аорти при 37°C у середовищі такого складу (ммоль/л): тріс- HCl -буфер – 25, MgCl_2 – 5, NaCl – 100, KCl – 10, Na_2ATP – 3, рН 7,4 у об'ємі 1 мл за приростом неорганічного фосфору (P_i) методом Фіске–Суббароу як різницю між загальною Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТФазною активністю та Mg^{2+} -АТФазною активністю за наявності 10^{-3} моль/л убаїну та виражали у мікромолях P_i на 1 мг білка за 1 год.

Транспорт кальцію реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 654 нм за наявності 70 мкмоль/л арсеназо-III. Для цього мітохондрії поміщали у середовище такого складу (ммоль/л): KCl – 120, KH_2PO_4 – 1, Na_2ATP – 1, MgCl_2 – 1, CaCl_2 – 0,1, тріс- HCl -буфер – 20 (рН 7,4). Кальцієву ємність визначали як максимальну кількість кальцію, акумульовану у мітохондріях, і виражали у наномолях Ca^{2+} на 1 мг білка.

Концентрацію стабільних метаболітів NO, нітриту (NO_2^-) та нітрозотіолів визначали спектрофотометричним методом Гріна [16]. Вміст високомолекулярних нітрозотіолів (нітрозильованих білків, ВМНТ) знаходили як різницю між загальним вмістом нітрозотіолів і вмістом низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ), як описано нами раніше [1]. Основну частку НМНТ становить нітрозоглутатіон. Вміст нітрату (NO_3^-) визначали бруциновим методом [6], пероксиду водню (H_2O_2) – спектрофотометрично у KJ /лактопероксидазній системі у 0,05 моль/л фосфатному буфері (рН 7,33) при довжині хвилі 353 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання $26000 \text{ моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [17].

Утворення гідроксильного радикала

($\cdot\text{OH}$) оцінювали за методом Conte та співавт. [13] в інкубаційній суміші: 20 ммоль/л 2-деокси-D-рибози, 1 ммоль/л H_2O_2 у 20 ммоль/л Na -фосфатному буфері (рН 7,4); генерацію $\cdot\text{OH}$ -радикала оцінювали за утворенням малонового діальдегіду, який визначали за зміною поглинання при довжині хвилі 532 нм і виражали в одиницях поглинання OD за 1 год на 1 мг білка.

Швидкість генерації супероксид-аніона ($\cdot\text{O}_2^-$) визначали в інкубаційній суміші за окисненням цитохрому с (рН 7,4) за зміною поглинання при довжині хвилі 550 нм після 30-хвилинної інкубації, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання $21000 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [10].

Вміст вільного заліза (Fe^{2+}) визначали за стандартною методикою, застосовуючи реактиви фірми «Філісит Діагностика» (Україна).

У роботі використано такі реагенти: додецилсульфат Na , тріс (основа), (“Serva”; ФРН), Na_2ATP (“Reanal”; Угорщина), убаїн, сульфаніламід, N-нафтилендіамін-гідрохлорид, бруцин, цитохром с, 2-деокси-D-рибоза, лактопероксидаза (“Sigma”, США), арсеназо-III, рутенієвий червоний, циклоспорин А (“Fluka”; ФРН) та реактиви вітчизняного виробництва марки ч.д.а. Розчини готували на бідистильованій воді. Достовірність оцінювали за критерієм t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ вважали статистично значимим.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 наведено результати вивчення впливу нітрогліцерину на активність Na^+ , K^+ -АТФази аорти та акумуляцію Ca^{2+} у мітохондріях серця щурів. Показано дозозалежну модульовальну дію NO на досліджувані іонотранспортні механізми серцево-судинної системи. Так, Ca^{2+} у мітохондріях накопичується у межах $\leq 1 \text{ мг/кг}$ нітрогліцерину від ($38,2 \pm 6,2$) до ($110,0 \pm 8,0$)

нмоль Ca^{2+} /мг білка, і лише за дії великих доз нітрогліцерину спостерігається 50 %-ве зниження кальцієвої ємності мітохондрій. Активність Na^+ , K^+ -АТФази, навпаки, спочатку стрімко, на 87,5 %, зростає за дії низьких доз нітрогліцерину (0,25 мг/кг) від $(7,6 \pm 0,5)$ у контролі до $(14,3 \pm 0,5)$ мкмоль $\text{P}_i \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ ($P < 0,01$) із подальшим поступовим дозозалежним зниженням відносно контролю до -56,7 % при 1,0 мг/кг нітрогліцерину. Отже, дія низьких його доз з одного боку призводить до посилення акумуляції Ca^{2+} у мітохондріях і, відповідно, до видалення іонів кальцію із цитозолу у мітохондріальний матрикс, а з іншого – до активації електрогенного Na^+ , K^+ -антипорту, Na^+ , K^+ -АТФази, функціональна активність якої, як уже зазначалося, спрямована на підтримання високого мембранного потенціалу клітин, що перешкоджає надходженню Ca^{2+} з позаклітинного простору через потенціалкервані кальцієві канали та Na^+ - Ca^{2+} -обмінник сарколеми [11]. Таким чином, одержані результати свідчать, що як активація Na^+ , K^+ -АТФази, так і посилена акумуляція Ca^{2+} у мітохондріях, які спрямовані на зниження цитозольного Ca^{2+} , є складовими у вазодилаторних реакціях, зумовлених введенням низьких доз нітрогліцерину.

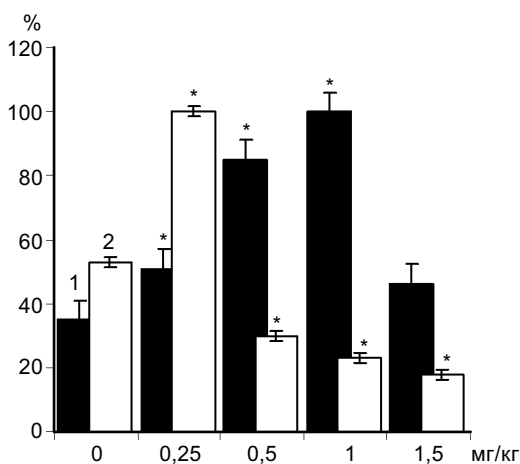


Рис. 1. Вплив різних доз нітрогліцерину (мг/кг) *in vivo* на активність Na^+ , K^+ -АТФази (1) та акумуляцію Ca^{2+} у мітохондріях (2) у відсотках відносно максимальних значень

Раніше нами було показано [3], що накопичення Ca^{2+} у мітохондріях, кальцієва ємність за інших рівних умов визначається балансом між акумуляцією Ca^{2+} через кальцієвий уніпортер та вивільненням іонів кальцію через циклоспоринчутливу мітохондріальну пору. Тому для з'ясування впливу NO *in vivo* на здатність мітохондрій до відкриття пори нами було досліджено нечутливе до рутенієвого червоного (блокатора уніпортера) та чутливе до циклоспорину А, інгібітора пори, вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій після накопичення у мітохондріях однакової його кількості: 30 нмоль/мг білка. Одержані результати (рис. 2) показують, що введення донора NO *in vivo* у дозі 1 мг/кг, яка максимально стимулює накопичення Ca^{2+} у мітохондріях і одночасно максимально інгібує активність Na^+ , K^+ -АТФази, призводить до пригнічення циклоспоринчутливого вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій. Таким чином, оксид азоту ефективно пригнічує відкриття мітохондріальної пори не тільки *in vitro*, як було показано нами раніше [1], але й *in vivo*, при збільшенні вмісту АФА у серцево-судинній системі вище від базального.

Для подальшого з'ясування впливу NO на метаболізм АФК і АФА у серцево-

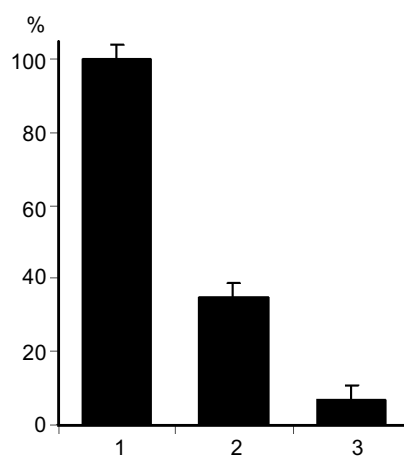


Рис. 2. Вплив нітрогліцерину (мг/кг) на циклоспоринчутливе вивільнення Ca^{2+} (%) з мітохондрій міокарда щурів після його акумуляції: 1 – контроль; 2 – введення нітрогліцерину; 3 – контроль за наявності циклоспорину А

судинній системі та висвітлення механізмів короткотермінової відповіді іонотранспортних систем мітохондрій і плазматичної мембрани на дію нітрогліцерину, нами було досліджено вплив різних доз цього фармакологічного донора NO на деякі показники оксидативного та нітрозативного стресу, а саме, на вміст АФК і АФА, відповідно, в аорті та ізольованих мітохондріях міокарда щурів. Висновки про вміст АФА робили на основі визначення вмісту його стабільних метаболітів: нітрит- та нітрат-аніонів (NO_2^- та NO_3^-), НМНТ, а також ВМНТ, які є формою депонування і джерелом NO у його метаболічних перетвореннях [5].

Результати визначення вмісту АФК і АФА (рис. 3, 4) вказують на певні відмінності їх метаболізму в аорті та в ізольованих мітохондріях серця щурів внаслідок дії нітрогліцерину. Так, хоча загальний вміст АФА як в аорті, так і в ізольованих мітохондріях зростає за його дії від $1,63 \pm 0,04$ до $2,4$ нмоль/мг $\pm 0,07$ нмоль/мг та $0,71 \pm 0,03$ до $2,9$ нмоль/мг $\pm 0,05$ нмоль/мг відповідно оцінка змін відносного вмісту АФА за дії кожної із доз нітрогліцерину (див. рис. 3) показує, що в мітохондріях спостерігається перерозподіл АФА на користь більш окис-

нених їх форм, головним чином нітрату, кінцевого продукту перетворень NO (при зовсім незначному вмісті нітрит-аніона). Також у мітохондріях значно зменшується пул НМНТ, порівняно із цілою тканиною, що спостерігали і раніше [1]. Результати також свідчать, що в ізольованих мітохондріях (див. рис. 3,б) відбувається майже 50%-ве вичерпання пулу ВМНТ на користь утворення NO_3^- . В аорті, навпаки, спостерігається окиснення NO лише до нітриту, при зовсім незначному вмісті нітрат-аніона, а також набагато більший відносний вміст НМНТ порівняно з їх пулом у мітохондріях. Також в аорті, на відміну від мітохондрій, спостерігається загальний приріст вмісту нітрозильованих білків (див. рис. 3,а).

Очевидно, що зміни вмісту АФА в аорті є безпосереднім наслідком введення донора NO, нітрогліцерину та його ферментативних перетворень [14, 18]. Втім однією з вірогідних причин, що визначають відносні зміни вмісту АФА у мітохондріях і в аорті, на нашу думку, також є метаболізм АФК і активація вільно-радикальних та окисно-відновних реакцій за участю високо-реактивних метаболітів кисню. Так, внаслідок збільшення надходження Ca^{2+} до

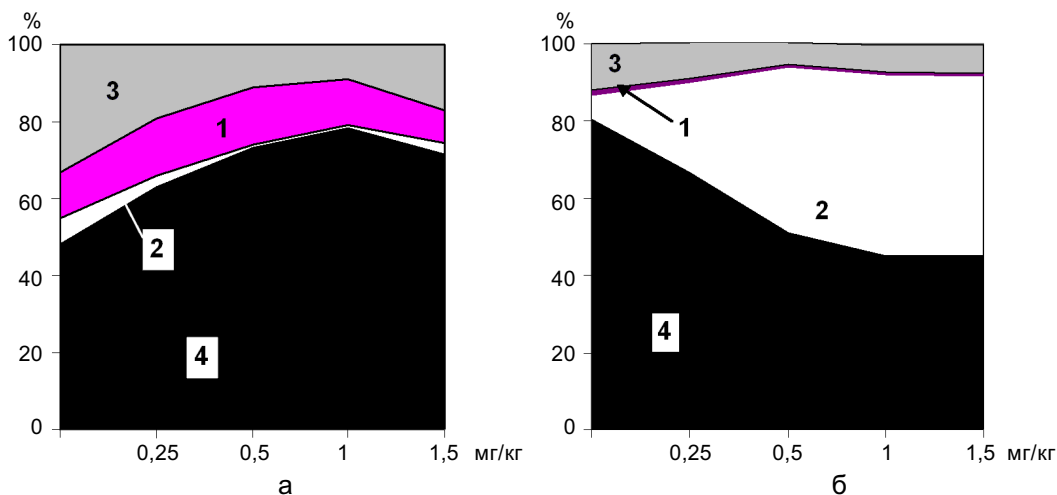


Рис. 3. Вплив різних доз нітрогліцерину *in vivo* на зміну відносного вмісту активних форм азоту (АФА) в аорті (а) та мітохондріях серця (б) щурів. За 100 % приймали загальний вміст АФА за дії кожної дози нітрогліцерину; відносний вміст окремих АФА виражали у відсотках від його загального вмісту: 1 – нітрит, 2 – нітрат, 3 – низькомолекулярні нітрозотіоли, 4 – високомолекулярні нітрозотіоли

мітохондріального матриксу (див. рис. 1), як відомо, відбувається активація мітохондріальних дегідрогеназ [22] і мітохондріальної NO-синтази (NOS) [12], що має призводити до початкового приросту вмісту АФК і АФА. Закономірним є припущення, що активація метаболізму останніх відбувається в міру збільшення накопичення Ca^{2+} у мітохондріях внаслідок пригнічення мітохондріальної пори оксидом азоту, який, імовірно, синтезується кальцій-залежними ізоформами мітохондріальної NOS (див. рис. 2). Відповідно зі збільшенням кальцієвої ємності мітохондрій (див. рис. 1), внаслідок активації дегідрогеназ, спостерігається підвищення вмісту АФК: гідропероксиду супероксид-аніона та гідроксил-радикала (див. рис. 4,б). Вміст стабільного метаболіту кисню, гідропероксиду збільшується від $95,0 \pm 0,7$ до $269,7$ нмоль/мг білка $\pm 0,4$ нмоль/мг білка; одночасно різко зростає і швидкість утворення нестабільних АФК, супероксид-аніона та гідроксил-радикала. Значний приріст вмісту АФК, що відбувається разом зі збільшенням дози нітрогліцерину та надходження Ca^{2+} до мітохондрій, є вірогідною причиною посилення реакцій

окиснення АФА та збільшення відносного вмісту NO_3^- (див. рис. 3,б).

Натомість в аорті знижується загальний пул АФК із збільшенням дози нітрогліцерину до 1 мг/кг (див. рис. 4,а), що можливо відповідає загальному менш окисненому стану АФА, значному переважанню вмісту NO_2^- над NO_3^- і значно більшому відносному вмісту НМНТ порівняно з ізольованими мітохондріями (див. рис. 3,а). Так, вміст гідропероксиду в аорті за дії нітрогліцерину (1 мг/кг) знижується від $44,1 \pm 3,3$ до $4,1$ нмоль/мг білка $\pm 0,7$ нмоль/мг білка. Одночасно знижується і швидкість утворення супероксид-аніона (див. рис. 4,а). Особливості метаболізму АФК в аорті, однак, полягають у тому, що на тлі зниження вмісту H_2O_2 та O_2^- спостерігається одночасне реципрокне збільшення швидкості генерації високотоксичного $\cdot OH$ -радикала (див. рис. 4,а). Однією з загальновідомих причин зниження вмісту АФК може бути активація антиоксидантних ферментів – каталази та супероксиддисмутази. Однак одержані результати, що вказують на вичерпання пулів H_2O_2 та O_2^- та відповідне збільшення швидкості генерації $\cdot OH$ -радикала, є свідченням не пригнічення, а навпаки – поси-

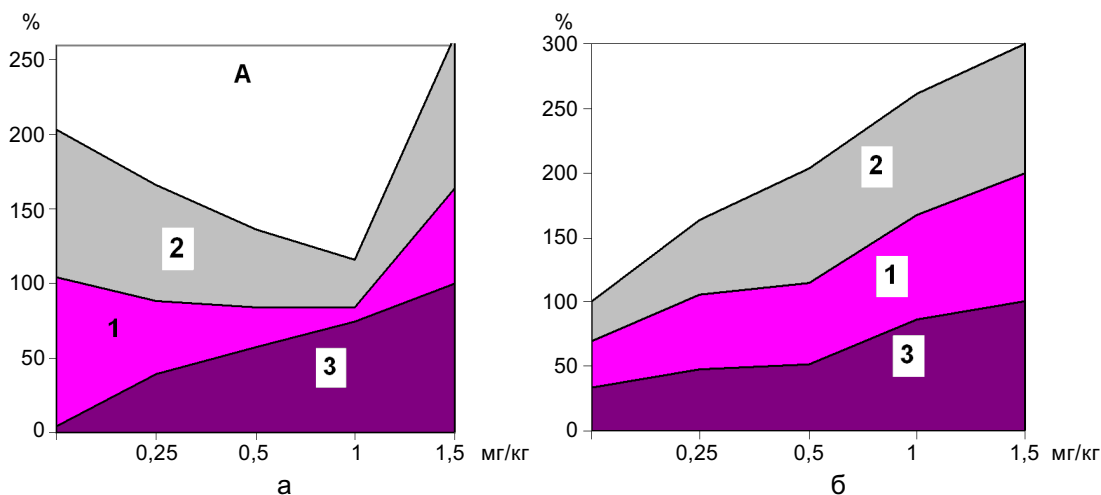
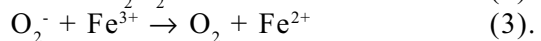
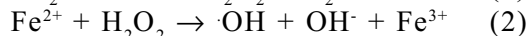
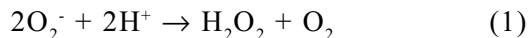


Рис. 4. Зміна вмісту активних форм кисню (АФК) в аорті (а) та мітохондріях міокарда (б) при дії нітрогліцерину (мг/кг). За 100 % приймали максимальне значення, встановлене для кожного із показників: 1 – гідропероксид; 2 – супероксид-аніон; 3 – $\cdot OH$ -радикал. Діаграми не перекриваються між собою. Загальний вміст АФК за дії окремих доз нітрогліцерину (%) є сумою вмісту кожного з показників у відсотках від їх максимальних значень. Вміст $\cdot O_2^-$ та $\cdot OH$ -радикалів оцінювали за швидкістю їх утворення в умовних одиницях поглинання з розрахунку на 1 мг білка $\cdot год^{-1}$

лення окисного неферментативного метаболізму АФК в аорті за дії донора NO. Для пояснення спостережуваних змін вмісту АФК в аорті щурів (див. рис. 4,а) як робочу гіпотезу можна висунути думку, що мітохондрії, і зокрема їх здатність до накопичення Ca²⁺, яка посилюється більш ніж удвічі при дії донора NO і призводить до посиленого споживання кисню, відіграють важливу роль у метаболізмі АФК у відповідь на дію NO також і в аорті, як, можливо, і в інших тканинах організму.

Так, за результатами, одержаними на ізольованих мітохондріях, спостерігається помітна кореляція між рівнем акумуляції Ca²⁺ та вивільненням іонізованого заліза з мітохондрій, вміст якого підвищується від 0,12±0,01 до 6,23 нмоль/мг білка ± 0,71 нмоль/мг білка при збільшенні накопичення Ca²⁺ від 38,2±6,2 до 110,0 нмоль/мг білка ± 8,0 нмоль/мг білка (рис. 5,а). При цьому за умов максимального накопичення Ca²⁺ (1 мг/кг нітрогліцерину) вміст вільного заліза в мітохондріях також сягає максимуму та різко зменшується при подальшому зниженні вмісту Ca²⁺ зі збільшенням дози нітрогліцерину до 1,5 мг/кг (див. рис. 5,а). Відомо, що залізо є каталізатором багатьох окисно-відновних реакцій за участю

кисню та його похідних, і зокрема – реакцій Хабер–Вайса з утворенням ·ОН-радикала з гідропероксиду. У цих реакціях залізо й само зазнає окисно-відновних перетворень, причому обидві форми заліза (як дво-, так і тривалентне) беруть участь у метаболізмі АФК:



Отже, можна припустити наступний вірогідний розвиток подій, що можуть відбуватися внаслідок значної акумуляції Ca²⁺, посиленої блокуванням мітохондріальної пори оксидом азоту.

Як відомо, акумуляція Ca²⁺ у мітохондріях супроводжується вивільненням протонів з мітохондріального матриксу та закисненням позамітохондріального середовища [24]. Можливо, що посилене вивільнення протонів з матриксу та локальне закиснення цитозолу внаслідок збільшення накопичення Ca²⁺ у свою чергу сприяє неферментативному розпаду супероксид-аніона з утворенням гідропероксиду (1). Взаємодія гідропероксиду з двовалентним залізом, пул якого зростає з надходженням Ca²⁺ до матриксу мітохондрій (див. рис. 5), призводить до утворення гідроксил-ради-

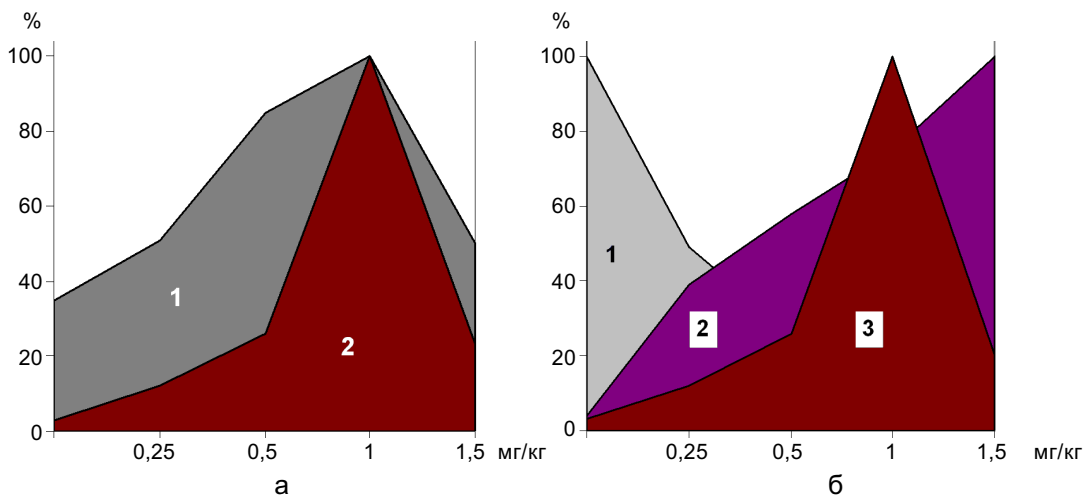
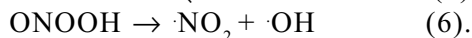
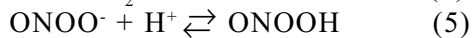


Рис. 5. Вплив різних доз нітрогліцерину на накопичення Ca²⁺ (1) та вивільнення Fe²⁺ (2) у мітохондріях серця щурів (а) та на зміну вмісту гідропероксиду (1), швидкість утворення ·ОН-радикала (2) в аорті та вивільнення Fe²⁺ (3) в мітохондріях міокарда щурів (б).

За віссю абсцис: доза нітрогліцерину, за віссю ординат: зміна показників у відсотках від максимальних значень

кала (2), вміст якого збільшується в міру вичерпання пулу H_2O_2 (див. рис. 5,б). І вже подальшим кроком, як можна припустити, є відновлення тривалентного заліза (продукту реакції (2)) супероксид-аніоном (3), що у свою чергу призводить до вичерпання пулу $\cdot\text{O}_2^-$ (див. рис. 4,а) та регенерації заліза, яке знов каталізує розпад гідропероксиду (2), утворюючи свого роду замкнений цикл каталітичних реакцій розпаду гідропероксиду з наступним відновленням каталізатора (двовалентного заліза). На підтвердження висловленої думки, результати експерименту вказують на помітну кореляцію між накопиченням Ca^{2+} та вивільненням заліза (див. рис. 5,а); вивільненням заліза та утворенням $\cdot\text{OH}$ -радикала (див. рис. 5,б); збільшенням вмісту $\cdot\text{OH}$ -радикала та відповідним зниженням пулів H_2O_2 та $\cdot\text{O}_2^-$ (див. рис. 4,а; 5,б).

Зважаючи на вищесказане, можна припустити, що майже 50%-ве відносне зниження пулу нітрозильованих білків у мітохондріях міокарда (див.рис. 3,б) також зумовлене дозо-залежним збільшенням вмісту вільного заліза, під дією якого (як і під дією інших металів перехідної валентності, наприклад міді) може відбуватися розпад нітрозотіолів з вивільненням NO [5]. Цей пул NO , вивільнений із нітрозотіолів як тимчасового депо оксиду азоту, потенційно є токсичним і для мітохондрій, і для клітин у цілому як одне із суттєвих джерел пероксинітриту внаслідок взаємодії з АФК за такими перетвореннями [21]:



Вивільнений у великих кількостях пероксинітрит (4), як і гідропероксид (2), надалі також може стати джерелом $\cdot\text{OH}$ -радикала (6), внаслідок вільнорадикального розпаду, вже без участі заліза, що, можливо, і відбувається в аорті та ізольованих мітохондріях за дії надто високих доз нітрогліцерину (1,5 мг/кг), за яких акумуляція Ca^{2+} у мітохондріях і вивільнення

заліза різко знижується (див. рис. 5,а,б), вірогідно, через сильне оксидативне ушкодження.

Отже, наведені міркування підводять до висновку, що саме вивільнення іонізованого заліза з мітохондрій внаслідок посиленої акумуляції Ca^{2+} під дією NO у фізіологічних умовах є поворотною подією у подальшому метаболізмі АФК і АФА та вірогідною причиною оксидативного стресу в аорті щурів. І хоча зроблені нами висновки на цей час мають дещо гіпотетичний характер, вони досить добре пояснюють значне інгібування Na^+ , K^+ -АТФази аорти при дії великих доз нітрогліцерину, з одного боку, $\cdot\text{OH}$ -радикалом, а з іншого, можливо, і пероксинітритом, який утворюється внаслідок декомпозиції ВМНТ під дією вільного заліза [5] і взаємодії вивільненого NO з АФК (4,5) [21]. Слід зазначити, що і саме залізо, внаслідок комплексоутворення з АТФ, є високоефективним інгібітором Na^+ , K^+ -АТФази, причому також внаслідок генерації $\cdot\text{OH}$ -радикала за наявності H_2O_2 і розриву пептидних зв'язків, важливих для ферментативної активності [20].

Слід зазначити, що активність Na^+ , K^+ -АТФази після її пригнічення високими дозами нітрогліцерину, за нашими даними [2], майже повністю (на 80 % від контролю) відновлюється мелатоніном, потужним антиоксидантом [9], що незаперечно вказує на оксидативну природу інгібіторної дії NO на Na^+ , K^+ -АТФазу в аорті щурів. Наші результати переконливо свідчать, що активність Na^+ , K^+ -АТФази залежить від метаболічних перетворень як АФА, так і АФК, причому особливістю метаболізму АФК, стимульованого дією нітрогліцерину, є їх перерозподіл на користь утворення $\cdot\text{OH}$ -радикала внаслідок активації реакцій Хабер–Вайсса, каталізованих вивільненими з мітохондрій іонами заліза, що призводить до посилення оксидативного стресу та інгібування Na^+ , K^+ -АТФази, незважаючи на загальне зниження вмісту АФК в аорті щурів. Інгібування Na^+ , K^+ -АТФази, маркер-

ного ферменту плазматичних мембран аорти, як показують результати проведеного експерименту, має виражену мітохондріальну «складову». Отже, регуляція мітохондріального транспорту Ca^{2+} і блокування мітохондріальної пори оксидом азоту *in vivo* призводить до перерозподілу шляхів метаболічних перетворень АФК і АФА і до модуляції активності іонотранспортних систем плазматичної мембрани вільнорадикальними активними формами кисню й азоту мітохондріального походження. Швидка інактивація Na^+ , K^+ -АТФази продуктами біотрансформації нітрогліцерину NO, АФА та АФК, яка своїм зворотним боком може мати посилене надходження Ca^{2+} до клітин аорти та активацію кальцій-залежних сигнальних шляхів, є свідченням регуляторної ролі вільних радикалів в серцево-судинній системі на рівні мітохондріальної та плазматичної мембран.

О.В. Аكوпова, А.В. Коцюруба, О.Н. Харламова, Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач

РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В NO-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ Na^+ , K^+ -АТФази АОРТЫ КРЫС

В опытах *in vivo* изучено взаимодействие двух ионотранспортных механизмов сердечно-сосудистой системы (Na^+ , K^+ -АТФаза аорты крыс и кальцийаккумулирующей системы митохондрий сердца) в краткосрочном ответе на введение донора NO, нитроглицерина (НГ). Активность Na^+ , K^+ -АТФазы определяли в аорте, тогда как накопление Ca^{2+} – в изолированных митохондриях сердца, предполагая, что процессы метаболизма в митохондриях сердца под действием NO близки к таковым в митохондриях клеток аорты. Результаты эксперимента показывают дозозависимое скоординированное действие NO на активность Na^+ , K^+ -АТФазы и накопление Ca^{2+} в митохондриях. Активация Na^+ , K^+ -АТФазы низкими дозами НГ сопровождается повышением накопления Ca^{2+} в митохондриях вследствие подавления митохондриальной поры. Однако повышение дозы НГ (до 1 мг/кг) приводит к снижению активности Na^+ , K^+ -АТФазы по сравнению с контролем. Накопление Ca^{2+} , напротив, возрастает и достигает максимума при введении 1 мг/кг НГ. Параллельно в митохондриях происходит резкое повышение уровня содержания активных форм кислорода (АФК), активных форм азота (АФА), их токсичных производных – нитрозотиолов и свободного железа (Fe^{2+}). Наблюдается

соответствие между накоплением Ca^{2+} , высвобождением Fe^{2+} и повышением уровня $\cdot\text{OH}$ -радикала, при исчерпании пулов H_2O_2 и O_2^- в аорте и нитрозотиолов в митохондриях. По нашему мнению, особенностью метаболизма АФК в аорте в ответ на действие NO является их перераспределение в пользу $\cdot\text{OH}$ -радикала за счет пулов H_2O_2 и $\cdot\text{O}_2^-$ вследствие активации реакций Хабер–Вайсса, катализируемых ионами железа, и свободнорадикального разложения пероксинитрита, источником которого служит митохондриальный пул нитрозотиолов. Таким образом, эксперимент выявляет важную роль митохондрий в индуцируемой ионами Fe^{2+} активации свободнорадикальных превращений АФК и АФА, ведущих к усилению оксидативного стресса и ингибированию Na^+ , K^+ -АТФазы в аорте крыс. Восстановление активности фермента мощным антиоксидантом мелатонином, свидетельствует об оксидативной природе угнетения Na^+ , K^+ -АТФазы оксидом азота в аорте крыс.

Ключевые слова: Na^+ , K^+ -АТФаза, аорта, кальциевая емкость, митохондрии миокарда, АФК, АФА, оксидативный стресс.

**O.V. Akopova, A.V. Kotsiuruba,
O.N. Kharlamova, Yu.P. Korkach, V.F. Sagach**

THE ROLE OF MITOCHONDRIA IN THE NO-DEPENDENT REGULATION OF Na^+ , K^+ -ATPase ACTIVITY IN RAT AORTA

In experiments *in vivo* we studied the interaction between two ion-transporting mechanisms of cardiovascular system - Na^+ , K^+ -ATPase of rat aorta and Ca^{2+} -uptake system of mitochondria in short-term response to different doses of NO donor, nitroglycerine (NG). The activity of the Na^+ , K^+ -ATPase was determined in rat aorta, and mitochondrial uptake of Ca^{2+} was studied in rat heart mitochondria assuming that metabolism induced by NO in cardiac mitochondria is similar to that in rat aortic mitochondria. The data show a coordinated dose-dependent action of NG on Na^+ , K^+ -ATPase activity as well as Ca^{2+} -uptake in mitochondria. An activation of Na^+ , K^+ -ATPase by low dose of NG (0,25 mg/kg body weight) is accompanied by the activation of Ca^{2+} -uptake in mitochondria as a result of inhibition of permeability transition pore. However, further increase of the dose of the drug leads to reciprocal changes of studied parameters: the decrease in Na^+ -pump activity below the control level and the increase of Ca^{2+} -uptake in mitochondria with a peak at 1,0 mg/kg NG, which takes place in parallel with the dramatic rise in the level of ROS and RNS together with their toxic products, nitrosothiols (NT) and free iron (Fe^{2+}) content in mitochondria. Strong correlation between Ca^{2+} -uptake and Fe^{2+} -release, Fe^{2+} -release and $\cdot\text{OH}$ -radical formation, the rise in $\cdot\text{OH}$ -radical level and the decrease of that of H_2O_2 and mitochondrial NT together with the inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase favor a hypothesis that oxidative stress in rat aorta is of mitochondrial origin due to an enhanced uptake of Ca^{2+} into mitochondrial matrix, Fe^{2+} deliverance and manifold increase in $\cdot\text{OH}$ -radical formation from decomposi-

tion of hydroperoxide in Haber-Weiss reaction and the decomposition of mitochondrial NT via formation of peroxynitrite, both catalysed by Fe^{2+} , with subsequent release of $\cdot\text{OH}$ -radical. Effective abolition of Na^+, K^+ -ATPase inhibition by potent antioxidant melatonin gives the evidence of the oxidative nature of Na^+, K^+ -ATPase inhibition by nitric oxide in rat aorta. Key words: Na^+ , K^+ -ATPase, aorta, Ca^{2+} -uptake, heart mitochondria, ROS, RNS, oxidative damage.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

A.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Акопова О.В., Коцюрyба А.В., Ткаченко Ю.П., Сагач В.Ф. Оксид азоту пригнічує відкриття мітохондріальної пори і збільшує кальцієву ємність мітохондрій *in vivo* // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, №3. – С. 3–11.
- Акопова О.В., Харламова О.М., Коцюрyба А.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Вплив оксиду азоту на Na^+ , K^+ -АТФазу в тканині аорти щурів // Там само. – 2009. – **55**, №1. – С.27–35.
- Акопова О.В. Роль мітохондріальної пори в трансмембранном обміне кальція в мітохондріях // Укр.біохім. журн. – 2008. – **80**, №3. – С.40–47.
- Болдырев А.А. Na^+ , K^+ -АТРаза как олигомерный ансамбль // Биохимия. – 2001. – **66**. – С.1013–1025.
- Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биологических системах // Биохимия, 1998. – **63**, №7. – С.924–938.
- Коркач Ю.П., Дудченко Н.О., Коцюрyба А.В., Присяжна О.Д., Сагач В.Ф. Роль негемового заліза у протекторній дії екдистерону на розвиток стрептозотоцин-індукованої гіпоглікемії у щурів // Укр.біохім. журн. – 2008. – **80**, №1. – С.46–51.
- Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.А. Иони кальцію у функції мозку – від фізіології до патології. – К.: Наук. думка. – 2005. – 198 с.
- Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. – М.: Наука, 1989. – 564 с.
- Acuna-Castroviejo D., Martin M., Macias M., Escames G., Leon J., Khaldy H., Reiter R.J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics // J. Pineal Res. – 2001. – **30**. – P.65–74.
- Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals // Cell Biol. – 1990. – **68**, №5. – P.989–998.
- Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness // Amer. J. Physiol. – 1993. – **264**. – P. C1367–C1387.
- Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration // Biochim. Biophys. Acta. 1999. – **1411**. – P.351–369.
- Conte D., Narindrasorosa K.S., Sarcar B. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generated free radicals and caused DNA damage // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, №9. – P.5125–5130.
- Daiber A., Wenzel P., Oelze M., Schuhmacher S., Jansen T., Munzel T. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) – maker of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycerine treatment // Chem. Biol. Interact. – 2009. – **178**, №1-3. – P. 40–47.
- Frieden M., James D., Castelbou C. Danckaert A., Martinon J.-C., Demareux N. Calcium homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1 // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**. – P.22704–22714.
- Green L.C., David A.W., Glogovski J. Analysis of nitrate, nitrite and $[\text{15N}]$ nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, №1. – P.131–138.
- Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/ H_2O_2 /iodide system // Eur. J. Biochem., 1984. – **141**, №1. – P. 69–74.
- Ignarro L.J., Napoli C., Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide // Circulat. Res. – 2002. – **90**, №1. – P.21–28.
- Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction // FASEB J. – 1997. – **11**. – P.118–124.
- Patchornik G., Goldshleger R., Karlsh S.J.D. The complex ATP-Fe^{2+} serves as a specific affinity cleavage reagent in ATP-Mg^{2+} sites of Na^+ , K^+ -ATPase: altered ligation of Fe^{2+} (Mg^{2+}) ions accompanies the $\text{E}_1\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{P}$ conformational change // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – **97**, №22. – P.11954–11959.
- Pfeiffer S., Gorren A.C.F., Schmidt K., Wermer E.R., Hansert B., Bohle D.S., Mayer B. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in 2:1 stoichiometry // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**, №6. – P.3465–3470.
- Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game // J. Physiol., 2000. – **529**, №1. – P. 37–47.
- Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F.S., Fogarty K.E., Lifshitz L.M., Tuft R.A., Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses // Science. – 1998. – **280**. – P.1763–1766.
- Rossi C.S., Bielawsky J., Lehninger A.L. Separation of H^+ and OH^- in the extramitochondrial and mitochondrial phases during Ca^{2+} -activated electron transport // J. Biol. Chem. – 1966. – **241**, №8. – P.1919–1921.

In-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

In-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: circula@biph.kiev.ua; ruba@biochem.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 02.06.2009

О.В. Власенко, О.В. Довгань, В.О. Майський, О.І. Пілявський, А.В. Мазниченко

Ламінарний розподіл активних нейронів у спинному мозку при реалізації харчодобувних стереотипних рухів у щурів

*Порівняльне дослідження експресії раннього гена *c-fos* (маркера нейронної активності) і НАДФН-діафоразної реактивності (НАДФН-др) проводилося в шийному відділі спинного мозку контрольних (інтактних) щурів, після триденного голодування тварин і після реалізації тривалих (4–12 повторень за хвилину протягом 30 хв) мотивованих стереотипних харчодобувних рухів передньою кінцівкою. У порівнянні з контролем, у щурів у стані голоду і у тварин, які виконували рухи, спрямовані на захоплення їжі, кількість Фос-імунореактивних (Фос-ір) клітин у дорсальному і вентральному розі в 40-мікрометровому фронтальному зрізі була достовірно більшою ($P < 0,05$). Кількість Фос-ір-нейронів у більшості шарів сірої речовини спинного мозку у щурів, що знаходяться в стані голоду, перевищувала кількість таких клітин у мозку тварин, що тривало виконували стереотипні рухи. Підвищена Фос-імунореактивність у поверхневих (2і, 3) і глибоких (4, 5) шарах дорсального рогу, очевидно, була викликана сигналами від периферичних і супраспінальних структур. Мічені Фос-ір-клітини були виявлені в шарах 6–8 і 9, що вказує на активність інтернейронів і мотонейронів, залучених у формування оперантних рухів передньою кінцівкою. У тварин усіх груп спостерігалася однаково висока щільність НАДФН-др/NO-генеруючих нейронів у сегментах С6/С7 у желатинозній субстанції (шар 2і), а також у шарах 7 і 10. НАДФН-др-клітини та Фос-ір-нейрони були перемішані в шарах сірої речовини мозку, однак подвійного забарвлення клітин не спостерігалось. Можна припустити, що НАДФН-др/NO-генеруючі нейрони спинного мозку не активуються при реалізації досліджуваних оперантних рефлексів, на відміну від реакцій, що містять ноцицептивні компоненти.*

Ключові слова: оперантний рефлекс, експресія *c-fos*, НАДФН-д реактивність, спинний мозок, щур.

ВСТУП

Давно встановлено, що експресія гена “раннього реагування” *c-fos* знаходиться у чіткому зв’язку з інтенсивністю нейронної активності у різних ділянках спинного [14] та головного [22] мозку. У своїх ранніх роботах ми також використали метод імуногістохімічної демонстрації експресії *c-fos* для виявлення нейронної активації у різних шарах спинного мозку та визначення центральних нейронних ланцюгів передачі ноцицептивних м’язових сигналів до лімбічних і гіпоталамічних центрів головного мозку у щурів і кішок; паралельно вивчався

і розподіл НАДФН-діафоразореактивності (НАДФН-др) у досліджуваних зонах мозку [2, 20, 24]. Важливою знахідкою в цих дослідженнях було те, що експресія *c-fos* або наявність Фос-імунореактивних- (Фос-ір-) нейронів, реєструвалася при різноманітній ноцицептивній стимуляції і запаленні м’язів, головним чином у поверхневих шарах сірої речовини спинного мозку (шар 1 та верхня частина шару 2 (2о)), а також у шийці дорсального рога (шар 5). Подвійне мічення (Фос-ір і НАДФН-др) нейронів було зареєстроване в структурах головного мозку, головним чином у гіпоталамусі та мигдалеподібному тілі [20].

© О.В. Власенко, О.В. Довгань, В.О. Майський, О.І. Пілявський, А.В. Мазниченко

Слід відмітити, що характерні патерни експресії *c-fos* у корі головного мозку і, особливо, у моторній корі великих півкуль щурів, що реалізували мотивовані стереотипні умовно-рефлекторні (оперантні) рухи передньою кінцівкою, дуже відрізняються від патернів експресії *c-fos* у корі щурів у нормі або під час розвитку м'язового болю. Нами вперше було показано, що у моторній зоні кори щільність розподілу Фос-ір-нейронів у тварин, натренованих протягом 2 тиж реалізувати оперантні харчодобувні рефлекси (захват харчових кульок передньою кінцівкою), була достовірно меншою у порівнянні з контрольними тваринами [3].

Вивчення пластичних змін при закріпленні оперантних рефлексів у тварин, традиційно фокусувалося на центрах головного мозку та ігнорувалося значення таких змін у спинному мозку, тобто на рівні кінцевого шляху реалізації моторних програм. Але і раніше висувалися припущення, що моторна кора та спинний мозок мають змогу значною мірою змінювати свою структуру і функцію у відповідь на інтенсивні та тривалі рухові акти [7, 8, 11]. Також встановлено, що закріплення моторних програм змінює щільність ГАМКергічних терміналей на спінальних мотонейронах [26]. Однак внесок структур спинного мозку, насамперед його шийного відділу, в закріплення моторних програм залишається ще недостатньо вивченим.

Метою цього дослідження було виявлення ламінарного розподілу Фос-ір- та НАДФН-др-нейронів та їх кількісного аналізу в шийному відділі спинного мозку контрольних щурів і тварин у стані голодування, а також після реалізації повторних стереотипних рухів передньою кінцівкою в умовах високої мотивації – досягнення і захват їжі. Припускається, що такий аналіз Фос-імунореактивності дасть змогу виявити ділянки сірої речовини спинного мозку, які беруть особливу участь на кінцевому шляху в формуванні і реалізації закріпленої

моторної програми стереотипних харчодобувних рухів передньою кінцівкою, а також встановити функціонально пов'язані структурні зміни нейронної реорганізації в таких ділянках і можливу причетність спінальних НАДФН-др-нейронів (НО-генеруючих клітин) до таких змін.

МЕТОДИКА

Експериментальні групи та стимуляційний протокол. В експериментах було використано три групи щурів-самців лінії Вістар масою 250–300 г. До 1-ї (контрольної) групи увійшли інтактні тварини (n=4); до 2-ї – тварини, які голодували протягом 3 діб при вільному доступі до води (n=4); до 3-ї групи – тварини, які виконували харчодобувні рухи (n=4). Мотивовані голодом (24 год) тварини 3-ї групи у послідовних сесіях (12 тренувальних сесій по 30 хв протягом 12 діб, 4–12 захватів їжі за хвилину) оперантного рефлексу виробляли стереотипний рух передньою лівою кінцівкою та пальцями для захоплення харчових кульок (близько 120–360 штук за одну сесію) з годівниці. Усі експерименти було виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

Перфузія. Щурів 1-ї, 2-ї (та 3-ї груп, через 2 год після тренування) під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 90 мг/кг, „Sigma”, США, внутрішньоочередово) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером (СФБ), який містив 0,2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину. Далі перфузію продовжували 4%-м параформальдегідом, розчиненим у 0,2 моль/л фосфатному буфері (ФБ); рН 7,3. Сегменти шийного потовщення (С6 та С7) спинного мозку кожної тварини швидко виділяли та фіксували протягом 12 год, а потім для кріопротекції витримували 48 год при 4°C у 30 %-му розчині сахарози, який готувався

на 0,1 моль/л ФБ. На заморожувальному мікромомі були зроблені зрізи (40 мкм завтовшки), які збирали у лунки з СФБ для подальшого імуногістохімічного та гістохімічного забарвлення.

Фос-імуногістохімія. Фос-ір-ядра (мічені нейрони) виявляли за допомогою стандартної авідин-біотин-пероксидазної методики з використанням поліклональних кролячих антитіл, спрямованих проти ядерного білка *c-Fos* („Oncogene Research”, Ab-5, США) і комерційного набору (ABC; „Vector”, РК 4001, США) [5, 13, 24]. Фос-ір-ядра нейронів у шарах спинного мозку підраховували під мікроскопом, а їх локалізацію визначали за атласом [23]. Мічені нейрони ідентифікували за темно-коричневим забарвленням їх ядер при збільшеннях у 250 та 400 крат.

НАДФН-діафоразна гістохімія. Для виявлення НАДФН-др-нейронів забарвлені на *c-Fos* зрізи витримували 1 год при 37 °С у 0,1 моль/л ФБ, який містив 0,3 % детергента Triton X-100, 0,2 мг/мл нітроблакитного тетразолію та 0,5 мг/мл редукованого β -НАДФН („Sigma”, США) [25]. НАДФН-др-нейрони ідентифікували у зрізах мозку за блакитним забарвленням їх цитоплазми.

Статистика. Кількість Фос-ір- та НАДФН-др-нейронів підраховували у шийних сегментах С6/С7 у шарах 1–10 сірої речовини спинного мозку щурів 1-ї та 2-ї групи унілатерально, а 3-ї групи – іпсилатерально, за атласом [23]. Щоб отримати середню кількість \pm стандартна похибка середнього Фос-ір- та НАДФН-др-нейронів, використовували близько 8–12 подвійно забарвлених зрізів від досліджуваних рівнів спинного мозку кожної тварини. Порівнювали середні кількості забарвлених клітин за допомогою однопараметричного статистичного дисперсійного аналізу (ANOVA). Варіаційні фактори мали такі

умови: групи тварин та шари сірої речовини спинного мозку. Достовірність визначали як $P < 0,05$. Якщо різниця між середніми була знайдена, застосовували апостеріорний критерій Ньюмена – Кеулса.

РЕЗУЛЬТАТИ

Експресія *c-fos* у спинному мозку у нормі та під час голодування щурів. Середня кількість Фос-ір-клітин (мічених нейронів) у шийних сегментах С6/С7 (рівні представництва передніх кінцівок) контрольних тварин була незначною – 5–7 клітин у 40-мікрометровому фронтальному зрізі. Однак у мозку щурів після довготривалого голодування у порівнянні із нормою середня кількість мічених нейронів була достовірно більшою у шарах 1–9 сірої речовини спинного мозку ($P < 0,05$). Висока щільність Фос-ір-нейронів відмічалася в желатинозній субстанції (шар 2і – $6,5 \pm 0,5$ мічених клітин на зріз), власному ядрі (шари 3 та 4 – $20,05 \pm 0,9$ та $5,6 \pm 0,4$ Фос-ір-клітин відповідно) та у шарі 7 (інтермедіальна зона вентрального рога – $5,8 \pm 0,6$ Фос-ір-нейронів) з максимальною щільністю мічених нейронів у шарі 3 дорсального рога сірої речовини. Від 7 до 12 мічених нейронів було зареєстровано у вентральному розі (шари 7–10) цих сегментів і невелика кількість у латеральному спінальному ядрі з обох боків мозку. Додатково відзначимо активність у латеральних і медіальних моторних ядрах (2–3 Фос-ір-клітини великих розмірів, близько 40 мкм у діаметрі, на зріз; рис. 1). Таким чином, рівень Фос-імунореактивності в різних шарах сірої речовини сегментів шийного потовщення С6/С7 у тварин після голодування представлено у такій послідовності: шар 3 > шар 2 > шар 7 > шар 4. Мікрофотографії (рис. 2) фронтального зрізу шийного сегмента С7 спинного мозку щура після голодування демонструють активність експресії *c-fos* у різних шарах сірої речовини. Відмічаються поодинокі

мічені клітини великих розмірів у поверхневих шарах 1 і 2, власному ядрі, шийці дорсального рога (шар 5) та інтермедіальній зоні сірої речовини.

Посилення експресії c-fos у спинному мозку щурів після реалізації оперантних харчодобувних рухів. У порівнянні з інтактними щурами у мозку тварин, що виконували харчодобувні рухи лівою передньою кінцівкою після 30-хвилинної реалізації моторної програми оперантного рефлексу, спостерігалася достовірно більша кількість Фос-ір-нейронів у шарах 1–5 ($P < 0,05$). Найбільша середня кількість мічених клітин у мозку щурів 3-ї групи була виявлена у шарах 2, 3 і 4 ($9,2 \pm 1,2$, $6,05 \pm 0,5$ та $5,8 \pm 0,6$ відповідно, $P < 0,05$) сегментів С6/С7 (див. рис. 1). Невелике число мічених нейронів спостерігалося також і в інших шарах (1 та 5–10) дорсального та вентрального рогів. Рівні експресії c-fos в різних шарах сірої речовини цих сегментів спинного мозку у тварин після реалізації оперантних харчодобувних рухів визнача-

лися у такій послідовності: шар 2 > шар 3 > шар 4 > шари 1, 5–10. Слід відмітити, що загальна інтенсивність експресії c-fos була значно вищою у мозку тварин у стані голодування у порівнянні з тваринами, які виконували оперантні харчодобувні рухи. Однак патерни ламінарного розподілу мічених нейронів значно не змінювались. Основні фокуси локалізації мічених клітин в обох випадках залишалися у тих самих регіонах – жеатинозна субстанція та власне ядро сірої речовини спинного мозку. Мікрофотографії зрізу сегмента С7 спинного мозку щура після виконання харчодобувних рухів ілюструють активність Фос-ір-нейронів у поверхневих шарах дорсального рога (рис. 3, а) та Фос-імунореактивність у моторному ядрі та зоні навколо центрального каналу (див. рис. 3, б, в).

НАДФН-діафоразна реактивність та її колокалізація з Фос-імунореактивністю у спинному мозку. На відміну від Фос-імунореактивних ядер чорного кольору, НАДФН-др-нейрони диференціювалися за

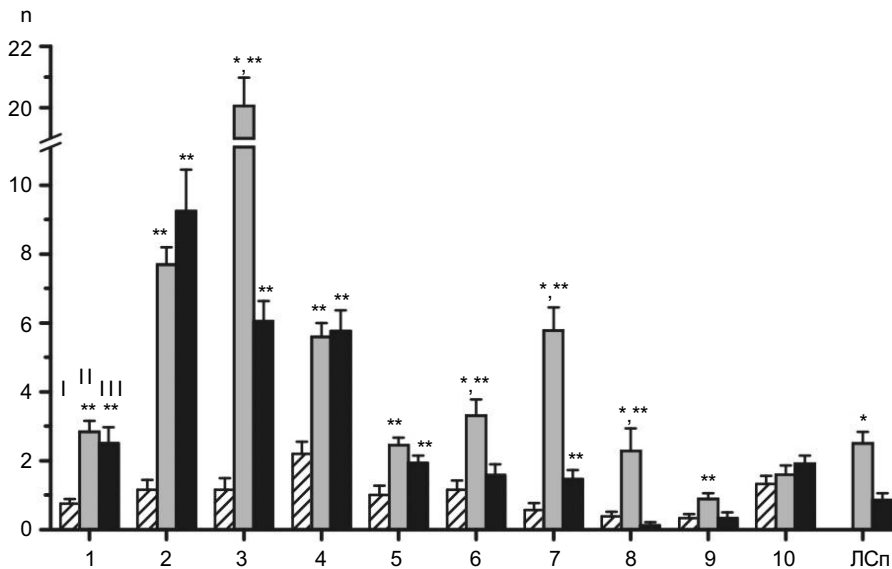


Рис. 1. Розподіл середньої кількості (n) ± стандартна похибка середнього Фос-імунореактивних нейронів на зріз у шарах 1–10 та латеральному спінальному ядрі (ЛСп) у шийному потовщенні (С6/С7). I, II, III – середня кількість мічених нейронів (унілатерально для щурів груп 1 і 2 та іпсилатерально для щурів 3-ї групи) в мозку тварин трьох груп: інтактна, при голодуванні та після виконання стереотипних харчодобувних рухів відповідно. * $P < 0,05$ між значеннями середньої кількості мічених нейронів у мозку тварин, які голодують і таких, що виконували оперантні харчодобувні рухи; ** $P < 0,05$ відмінності показників тварин, які голодують, або тих, що виконували оперантні харчодобувні рухи у порівнянні з інтактними щурами

блакитним забарвленням їх цитоплазми, ядра таких клітин не забарвлювалися. НАДФН-др-клітини у тварин усіх трьох груп були зареєстровані в одних і тих самих ділянках сірої речовини, але достовірної різниці між середніми значеннями кількості позитивних нейронів у шарах 1–10 спинного мозку тварин різних груп знайдено не було (рис. 4). Позитивні NO-генеруючі клітини розташовувалися по всій довжині желатинозної субстанції та, головним чином, у медіальних зонах сірої речовини та навколо центрального каналу (рис. 5). У сірій речовині мозку досліджуваних тварин спостерігалися інтенсивно та слабо забарвлені клітини, так звані позитивні нейрони I та II типу. Для статистичної оцінки середніх значень кількості НАДФН-др-нейронів враховували тільки інтенсивно

забарвлені клітини великих розмірів [18]. НАДФН-др-/NO-генеруючі нейрони у фронтальних зрізах мозку локалізувалися у желатинозній субстанції, у власному ядрі, шийці дорсального рога та у вентральному розі за виключенням моторних ядер. У мозку тварин 2-ї та 3-ї групи НАДФН-др-нейрони I типу були перемішані з Фос-ір-нейронами, особливо у шарах 2 і 3 сегментів шийного потовщення С6/С7, де була виявлена досить висока щільність мічених клітин. У цих шарах також наявні НАДФН-др-нейрони II типу, в яких подвійного забарвлення (Фос-ір і НАДФН-др) нами виявлено не було.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати наших досліджень експресії *c-fos* у спінальних нейронах щурів прямо

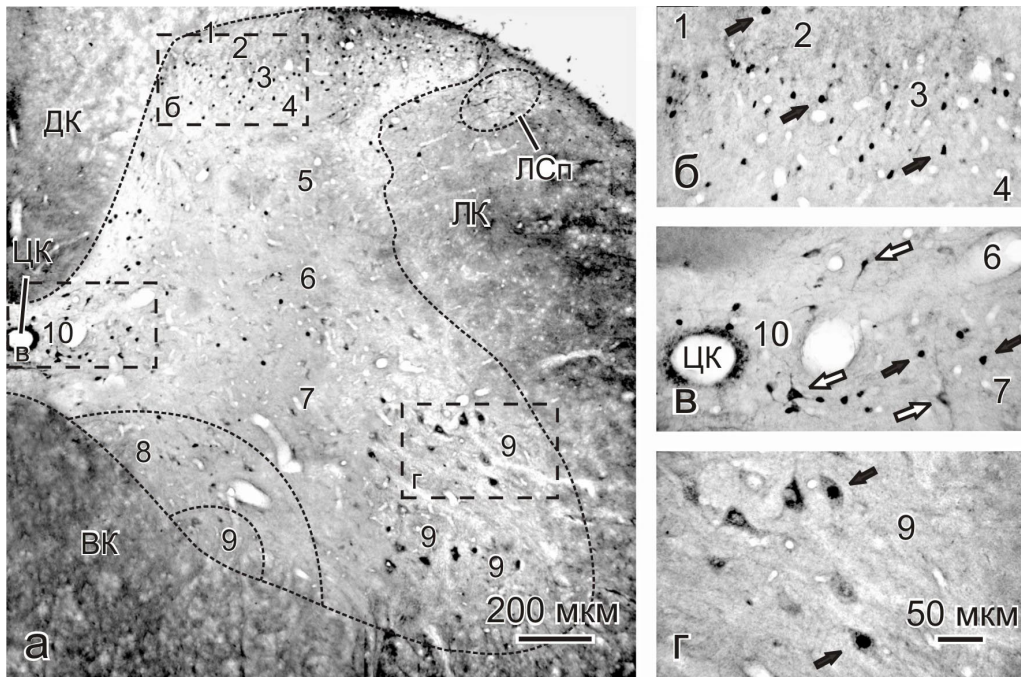


Рис. 2. Фос-імунореактивні та НАДФН-діафоразореактивні нейрони на фронтальному зрізі шийного сегмента С7 (праворуч) спинного мозку щура після голодування. Зони локалізації позитивних Фос-ір- та НАДФН-др-нейронів у шарах 1–10 дорсального і вентрального рога на (а), які позначені пунктирними лініями, представлені при великому збільшенні на б–г; б – велике скупчення Фос-ір-клітин у шарі 3 сірої речовини спинного мозку; в – позитивні клітини в інтермедіальній ділянці (шар 7), та зони навколо центрального каналу (шар 10); г – мічені мотонейрони в латеральному моторному ядрі. Чорні стрілки – Фос-ір-ядра, білі – НАДФН-др-нейрони. Структури: ВК, ДК та ЛК – вентральний, дорсальний та латеральний канатики; ЛСп – латеральне спінальне ядро; ЦК – центральний канал. Масштабна лінія на а – 200 мкм, на б–г – 50 мкм

вказують на те, що довготривале тренування тварини на виконання комплексної моторної програми захоплення їжі з годівниці передньою кінцівкою (закріплення оперантного рефлексу) і її остання реалізація через 12 діб тренування призводять до достовірно більшої кількості Фос-ір-нейронів (білатерально) в дорсальному та вентральному рогах шийного потовщення спинного мозку. Нами виявлені специфічні патерни експресії *c-fos* у спинному мозку як у щурів після тривалого голодування, так і у щурів після реалізації оперантних рефлексів (харчодобувні рухи). У щурів 2-ї та 3-ї групи, зона інтенсивної експресії *c-fos* у дорсальному розі покривала власне ядро і желатинозну субстанцію (шар 2i), а у вентральному – інтермедіальну сіру речовину, включаючи і моторні ядра, де були зареєстровані інтенсивно забарвлені ядра мотонейронів (див. рис. 2, г, 3, б). Відмітимо, що топографія Фос-ір-нейронів

мала медіальний характер локалізації у сірій речовині спинного мозку (див. рис. 5). Ці патерни експресії *c-fos* відрізнялися від патернів в умовах ноцицептивної або стомлювальної стимуляції м'язів кінцівок, коли основні фокуси Фос-імунореактивності були локалізовані у поверхневих шарах (1 і 2o) та шийці дорсального рога. Причому під час ноцицептивних або стомлювальних подразнень м'язів кінцівок не було зареєстровано мічених мотонейронів [2, 20, 24]. Важливо відмітити, що в нашій роботі Фос-ір-нейрони були локалізовані в ділянках, які традиційно пов'язують з передачею неноцицептивних сигналів [7, 15, 16]. Нейрони в цих регіонах отримують входи від аферентів великого та середнього діаметрів (групи I та II) м'язів, сухожилок і шкіри [10]. Така розбіжність у розподілі експресії *c-fos* у спинному мозку добре підтверджує той факт, що характерні патерни ламінарного розподілу Фос-ір-

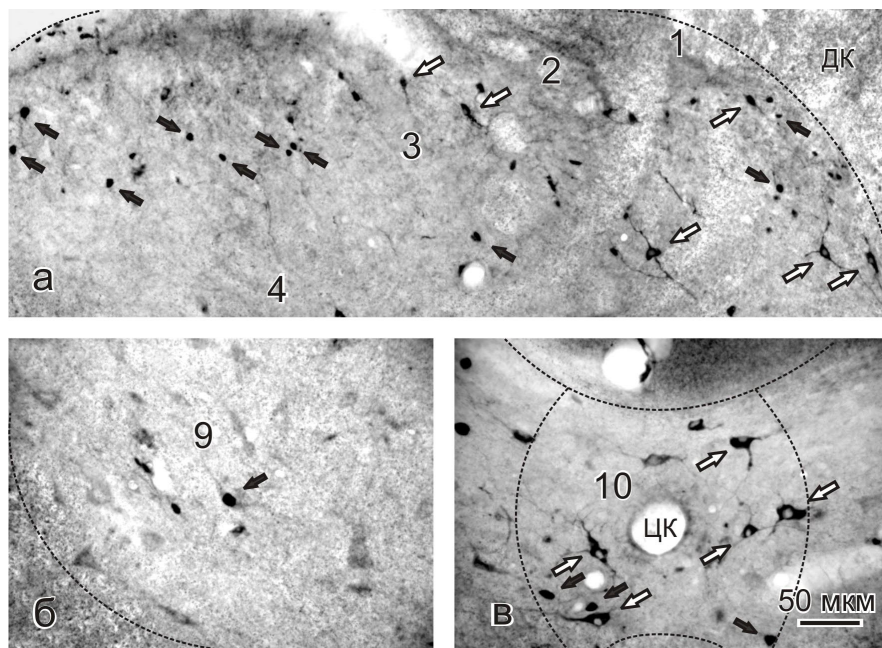


Рис. 3. Фос-імунореактивні та НАДФН-діафоразореактивні нейрони на фронтальному зрізі шийного сегмента С7 (ліворуч) спинного мозку щура після реалізації тваринами харчодобувних рефлексів: а – мічені нейрони у шарах 1–4 сірої речовини спинного мозку, б – моторне ядро (шар 9), в – зона навколо центрального каналу (шар 10). Чорні стрілки – Фос-ір-ядра, білі – НАДФН-др-нейрони. Структури: ДК – дорсальний канатик; ЦК – центральний канал. Масштабна лінія на а–в – 50 мкм

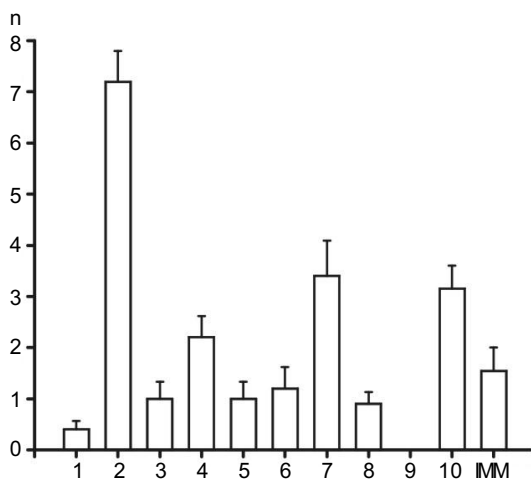


Рис. 4. Розподіл середньої кількості (n) ± стандартна похибка середнього НАДФН-діафоразореактивних нейронів I типу на зріз (унілатерально) у шарах 1–10 та інтермедіомедіальному ядрі (IMM) сірої речовини шийного потовщення С6/С7 спинного мозку у інтактних щурів. Патерни розподілу таких нейронів у тварин, які голодують, та тварин після виконання стереотипних харчодобувних рухів достовірно не відрізнялися

нейронів утворюються завдяки стимулам різної модальності. У ділянках сірої речовини, які отримують невеликі входи, локалізуються як збуджувальні, так і гальмівні спінальні інтернейрони, які входять до ланцюгів пропріоспінальних комісуральних і висхідних спіноцеребральних шляхів. Відома і пряма проекція аферентів групи Ia на іпсилатеральні групи

мотонейронів, а через комісуральні зв'язки – й на мотонейрони протилежного боку спинного мозку [9].

Раніше вже було показано, що ходіння (30–60 хв) щурів по самохідній доріжці, яке не призводило до стомлення м'язів кінцівок, викликало активацію нейронів у ділянках сірої речовини шийних сегментів, в яких розташовуються нейрони, що реагують на неноцицептивні стимули [8, 15]. У нашій моделі оперантного рефлексу при виконанні тваринами 30-хвилинної моторної програми нестормлювальних рухів передньою кінцівкою також була зареєстрована експресія *c-fos* у цих ділянках.

Відомо, що формування моторних навичок (напрацювання оперантного рефлексу) протягом багатьох днів пов'язане зі структурними та функціональними змінами у мозку [17, 21], а напрацювання оперантного рефлексу може призводити до змін щільності синапсів у спинному мозку та моторній корі і навіть до ініціації ангиогенезу [7]. У нашій попередній роботі виявлені ознаки звуження фокусів нейронної активації в моторній і лімбічній корі головного мозку під час закріплення моторних навичок. Такі функціональні зміни у корі, можливо, пов'язані з посиленням гальмівних механізмів, які відіграють важливу роль у розвитку феномена навчання [3].

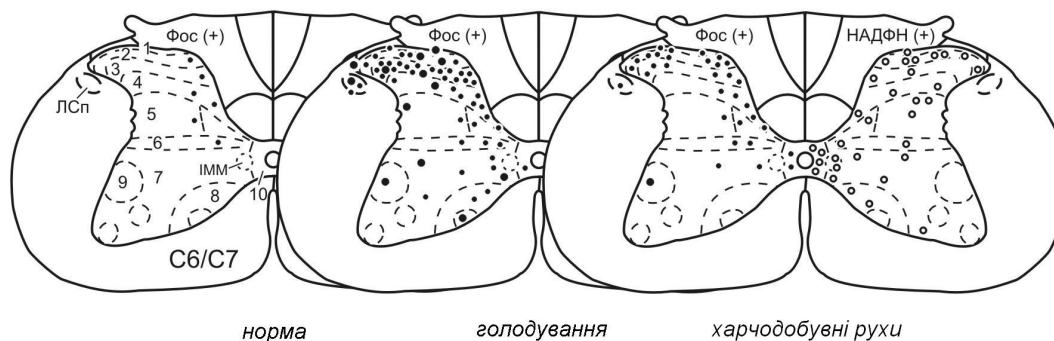


Рис. 5. Фронтальні зрізи шийного потовщення (сегменти С6/С7) з показниками середньої щільності Фос-імунореактивних (точки) та НАДФН-діафоразореактивних (кружечки) нейронів у шарах 1–10, латеральному спінальному ядрі (ЛСп) та інтермедіомедіальному ядрі (IMM) сірої речовини спинного мозку. Малі та великі точки відображають локалізацію малих і великих Фос-ір-нейронів відповідно

Результати цієї роботи демонструють, що напрацювання тваринами стереотипних рухів протягом 12 діб призводить до змін активації спінальних нейронів, які залежать від специфіки поведінкових вимог моторної задачі. Полегшення аферентних входів груп Ia і II м'язових і шкірних аферентів можуть призводити не тільки до пластичних змін структури та функції спинного мозку, але і до паралельних подібних пластичних змін у корі головного мозку при напрацюванні харчодобувних рухів [1, 4].

Слід зазначити, що у тварин 2-ї та 3-ї групи, особливо 2-ї (при голодуванні), ми реєстрували велику кількість Фос-ір-нейронів у латеральному спінальному ядрі (ЛСп) з обох боків спинного мозку. Як відомо, ЛСп розташовується у дорсальній ділянці латерального канатика в усіх гризунів і задіяне насамперед у передаванні в таламус ноцицептивної інформації [6]. Нейрони цього ядра є також джерелами прямих проєкцій до гіпоталамуса. Нещодавно було зроблене припущення, що ЛСп функціонує як інтегративне ядро і залучене в автономну та гомеостатичну функцію, а також має відношення до розвитку мотиваційно-афективних реакцій, які мають прямий зв'язок з автономними реакціями [7, 12].

Наші результати показують, що розподіл НАДФН-др/НО-генеруючих нейронів та їх середня кількість в 40-мікрометровому зрізі мозку шийного потовщення у щурів 2-ї та 3-ї групи якісно та кількісно не відрізнялися від таких нейронів у мозку контрольних щурів. Також ми не виявили у сірій речовині мозку подвійно мічених (Фос-ір і НАДФН-др) спінальних нейронів як у контрольних, так і у інших груп тварин. Відомо, що НАДФН-др/НО-генеруючі нейрони у спинному мозку ідентифікуються як пропріоспінальні або інтрасегментарні [19].

Підсумовуючи, можна вважати що, описані патерни розподілу спінальних Фос-ір-нейронів шийного відділу спинного мозку відображають можливу причетність цих

популяцій інтернейронів і мотонейронів до формування та реалізації харчодобувних рухів передньою кінцівкою. Відсутність ознак Фос-імунореактивності в НАДФН-др-клітинах, при здійсненні цілеспрямованих рухів, можливо, є одним із доказів того, що такі рухи не мають ноцицептивного компонента. Такі нейрони задіяні здебільшого при надходженні до спинного мозку імпульсації від ноцицептивних рецепторів [24].

Роботу виконано за підтримки гранту „Молекулярні основи функціонування геному (2009–2010)” НАН України.

О.В. Власенко, А.В. Довгань, В.А. Майский, А.И. Пилявский, А.В. Мазниченко

ЛАМИНАРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СПИНАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ, КОТОРЫЕ АКТИВИРУЮТСЯ В СОСТОЯНИИ ПИЩЕВОЙ ДЕПРИВАЦИИ ИЛИ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ПИЩЕДОБЫВАТЕЛЬНЫХ СТЕРЕОТИПНЫХ ДВИЖЕНИЙ У КРЫС

Сравнительное исследование экспрессии раннего гена *c-fos* (маркера нейронной активности) и НАДФН-диафоразной реактивности (НАДФН-др) проводили в шейном отделе спинного мозга контрольных (интактных) крыс после трехдневного голодания животных и после реализации длительных (4–12 повторений в минуту в течение 30 мин) мотивированных стереотипных пищедобывательных движений передней конечностью. По сравнению с контролем, у крыс в состоянии голода и животных, которые выполняли движения, направленные на захват пищи, количество Фос-иммунореактивных (Фос-ир) клеток в дорсальном и вентральном роге в 40-микрометровом фронтальном срезе было достоверно выше ($P < 0,05$). Количество Фос-ир нейронов в большинстве слоев серого вещества мозга крыс, находящихся в состоянии голода, отчетливо превышало количество таких клеток в мозгу животных, длительно выполнявших стереотипные движения. Повышенная Фос-иммунореактивность в поверхностных (2i, 3) и глубоких (4, 5) слоях дорсального рога, очевидно, была вызвана сигналами от периферических и супраспинальных структур. Меченые Фос-ир клетки были обнаружены в слоях 6–8 и 9, что указывает на активность интернейронов и мотонейронов, вовлеченных в формирование оперантных движений передней конечностью. У животных всех групп наблюдалась одинаково высокая плотность НАДФН-др/НО-генерирующих нейронов в сегментах С6/С7 в желатинозной субстанции (слой 2i), а также слоях 7 и 10. НАДФН-др-клетки и Фос-ир-нейроны были перемешаны в слоях серого вещества

мозга, однак подвійного окрашивания не наблюдалось. Можно предположить, что НАДФН-др/NO-генерирующие нейроны спинного мозга не активируются при реализации изучаемых оперантных рефлексов в отличие от реакций, содержащих ноцицептивные компоненты.

Ключевые слова: оперантный рефлекс, экспрессия *c-fos*, НАДФН-диафоразная реактивность, спинной мозг, крыса.

**O.V. Vlasenko, O.V. Dovgan', V.A. Maisky,
A.I. Pilyavskii, A.V. Maznychenko**

LAMINAR DISTRIBUTION OF THE ACTIVE SPINAL NEURONS DURING THE FEEDING-RELATED STEREOTYPED MOVEMENTS IN THE RAT

The comparative study of expression of early *c-fos*-gene (marker of neuronal activation) and NADPH-diaphorase reactivity (NADPH-dr) was performed in the cervical spinal cord of rats in the control (intact) animal, in the state of starvation and after realization of long-lasting (repeated 4 to 12 times per minute for 30 min) motivated stereotyped food-procuring forelimb movements. In comparison with control rats; in the starving rats or rats showed forelimb movement to reach-to-grasp the food, the number of Fos-immunoreactive (Fos-ir) cells in the dorsal and ventral horns of a 40- μ m-thick slice was significantly greater ($P < 0.05$). The number of Fos-ir neurons in the starving state clearly exceeded that in the most layers after realization of movements. Increase of Fos immunoreactivity in the superficial (2i, 3) and deeper (4, 5) layers of the dorsal horn was initiated, evidently, by signals from peripheral and supraspinal structures. We also found labelled cells within layers 6–8, and 9 demonstrating the activity of interneurons and motoneurons directly involved into generation of operant forelimb movements. According to our data, high density of NADPH-dr/NO-generating neurons in the C6/C7 segments are observed in the substance gelatinosa (layer 2i) and layers 7 and 10. NADPH-dr cells and Fos-ir neurons were intermixed within the layers but did not demonstrate double-labelling. It is possible to suggest that NADPH-dr/NO-generating cells of the spinal cord did not operate under realization of the studied operant reflexes, which did not include nociceptive component.

Key words: operant reflex, expression *c-fos*, NADPH-diaphorase reactivity, spinal cord, rat.

M.I. Pirogov National Medical University, Vinnitsa;

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Власенко О.В., Довгань О.В., Пілявський О.І., Майський В.О., Мазниченко А.В. Зміни експресії *c-fos* та НАДФН-діафоразної активності в різних ядрах гіпоталамуса під час відсторонення від їжі або реалізації оперантних їждобувних рухів у щурів // *Нейрофізіологія / Neurophysiology.* – 2009. – **41**, №2. – С. 173–182.
2. Власенко О.В., Майський В.О., Мазниченко А.В., Пілявський О.І., Мороз В.М. Дослідження експресії *c-fos* і НАДФН-діафоразної активності у спинному та головному мозку при розвитку стомлення м'язів ший у щурів // *Фізіол. журн.* – 2006. – **52**, №6. – С. 3–14.
3. Власенко О.В., Пілявський А.І., Майський В.А., Мазниченко А.В. Fos-иммунореактивность и НАДФН-д-реактивность в коре больших полушарий крыс, реализующих мотивированные стереотипные движения передней конечностью // *Нейрофизиология / Neurophysiology.* – 2008. – **40**, №4. – С. 351–361.
4. Довгань О.В., Власенко О.В., Майський В.О., Пілявський О.І., Мазниченко А.В. Топографія Fos-иммунореактивних та НАДФН-д-реактивних нейронів у лімбічних структурах основи переднього мозку та гіпоталамусі при реалізації мотивованих стереотипних рухів у щурів // *Нейрофізіологія / Neurophysiology.* – 2009. – **41**, №1. – С. 19–27.
5. Майський В.О., Пілявський О.І., Мазниченко А.В., Даценко В.В., Павлюченко В.Б., Костюков О.І., Мойбенко О.О. Центральні нейронні ланцюги рефлексу Бекольда-Яріша у щурів // *Фізіол. журн.* – 2005. – **51**, №2. – С. 24–38.
6. Abbadie C., Skinner K., Mitrovic I., Basbaum A.I. Neurons in the dorsal column white matter of the spinal cord: complex neuropil in an unexpected location // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – **96**. – P. 260–265.
7. Adkins D.L., Boychuk J., Remple M.S., Kleim J.A. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord // *J. Appl. Physiol.* – 2006. – **101**. – P. 1776–1782.
8. Ahn S.N., Guu J.J., Tobin A.J., Edgerton V.R., Tillakaratne N.J. Use of *c-fos* to identify activity-dependent spinal neurons after stepping in intact adult rats // *Spinal Cord.* – 2006. – **44**. – P. 547–559.
9. Bannatyne B.A., Edgley S.A., Hammar I., Jankowska E., Maxwell D.J. Differential projections of excitatory and inhibitory dorsal horn interneurons relaying information from group II muscle afferents in the cat spinal cord // *J. Neurosci.* – 2006. – **26**. – P. 2871–2880.
10. Brown A.G. Organization of the Spinal Cord. The Anatomy and Physiology of Identified Neurons. – New York: Springer, 1981. – 238 p.
11. Dai X., Noga B.R., Douglas J.R., Jordan L.M. Localization of spinal neurons activated during locomotion using the *c-fos* immunohistochemical method // *J. Neurophysiol.* – 2005. – **93**. – P. 3442–3452.
12. Gamboa-Esteves F.O., Tavares I., Almeida A., Batten T.F., McWilliam P.N., Lima D. Projection sites of superficial and deep spinal dorsal horn cells in the nucleus tractus solitarii of the rat // *Brain Res.* – 2001. – **921**. – P. 195–205.
13. Hsu S.-M., Raine L., Fanger H. Use of avidin-biotin

- peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures // *J. Histochem. Cytochem.* – 1981. – **29**. – P. 577–580.
14. Hunt S.P., Pini A., Evan G. Induction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation // *Nature.* – 1987. – **328**. – P. 632–634.
 15. Jasmin L., Gogas K.R., Ahlgren S.C., Levine J.D., Basbaum A.I. Walking evokes a distinctive pattern of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem and spinal cord of the rat // *Neurosci.* – 1994. – **58**. – P. 275–286.
 16. Kalueff A.V., Maisky V.A., Pilyavskii A.I., Makarchuk N.E. Persistent *c-fos* expression and NADPH-d reactivity in the medulla and the lumbar spinal cord in rat with short-term peripheral anosmia // *Neurosci. Lett.* – 2001. – **301**. – P. 131–134.
 17. Kleim J.A., Lussnig E., Schwarz E.R., Comery T.A., Greenough W.T. Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning // *Neurosci.* – 1996. – **16**. – P. 4529–4535.
 18. Luth H.J., Hedlich A., Hilbig H., Winkelmann E., Mayer B. Morphological analyses of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase positive structures in human visual cortex // *J. Neurocytol.* – 1994. – **23**. – P. 770–782.
 19. Marsala J., Lukacova N., Cizkova D., Lukac I., Kucharova K., Marsala M. Premotor nitric oxide synthase immunoreactive pathway connecting lumbar segments with the ventral motor nucleus of the cervical enlargement in the dog // *J. Chem. Neuroanat.* – 2004. – **27**. – P. 43–54.
 20. Maznychenko A.V., Pilyavskii A.I., Kostyukov A.I., Lyskov E., Vlasenko O.V., Maisky V.A. Coupling of *c-fos* expression in the spinal cord and amygdala induced by dorsal neck muscles fatigue // *Histochem. Cell Biol.* – 2007. – **128**. – P. 85–90.
 21. Monfils M.H., Plautz E.J., Kleim J.A. In search of the motor engram: motor map plasticity as a mechanism for encoding motor experience // *Neuroscientist.* – 2005. – **11**. – P. 471–483.
 22. Morgan J.I., Cohen D.R., Hempstead J.L., Curran T. Mapping patterns of *c-fos* expression in the central nervous system after seizure // *Science.* 1987. – **237**. – P. 192–197.
 23. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. – San Diego: Acad. Press, 1997.
 24. Pilyavskii A.I., Maisky V.A., Kalezić I., Ljubisavljevic M., Kostyukov A.I., Windhorst U., Johansson H. *c-fos* expression and NADPH-diaphorase reactivity in spinal neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat // *Brain Res.* – 2001. – **923**. – P. 91–102.
 25. Vincent S.R., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain // *Neuroscience.* – 1992. – **46**. – P. 755–784.
 26. Wang Y., Pillai S., Wolpaw J.R., Chen X.Y. Motor learning changes GABAergic terminals on spinal motoneurons in normal rats // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – **23**. – P. 141–150.

Вінницьк. нац. мед. ун-т ім. М.І. Пирогова;
 Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
 E-mail: maznychenko@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до
 редакції 05.04.2010

Т.Ю. Вознесенська, Т.М. Бризгіна, В.С. Сухіна, Н.В. Макогон, І.М. Алексєєва

Вплив інгібітора активації NF- κ B куркуміну на оогенез і загибель фолікулярних клітин при імунному ушкодженні яєчників мишей

*В експерименті на мишах лінії СВА вивчали вплив інгібітора активації ядерного транскрипційного фактора κ B (NF- κ B) куркуміну (речовини рослинного походження – *Curcuma longa*) на мейотичне дозрівання ооцитів і загибель фолікулярних клітин через апоптоз і некроз при імунному ушкодженні яєчників, викликаному імунізацією тварин антигеном алогенного яєчника. NF- κ B відіграє ключову роль у регуляції транскрипції генів, які кодують прозапальні чинники (цитокіни, молекули адгезії, індукційні NO-синтазу та циклооксигеназу), а також регулює проліферацію і загибель клітин. Встановлено, що імунізація мишей посилювала загибель фолікулярних клітин через апоптоз і некроз, призводила до розвитку запальних процесів в організмі (за лейкограмою крові) і порушувала мейотичне дозрівання ооцитів у метафазі I і II. Інтрагастральне введення куркуміну ("Sigma", США) в дозі 2 мг на тварину 4 рази на тиждень протягом усього періоду імунізації призводило до зниження кількості фолікулярних клітин, що гинули через апоптоз і, особливо, некроз, до послаблення запальних процесів та до покращення оогенезу.*

Ключові слова: яєчник, імунне запалення, мейотичне дозрівання ооцитів, фолікулярні клітини, апоптоз, некроз, куркумін.

ВСТУП

Аутоімунні захворювання жіночої репродуктивної системи, особливо яєчників, широко розповсюджені та негативно позначаються на народжуваності [7, 14, 16, 18]. Аутоімунне ушкодження яєчників – типовий процес імунного запалення, найважливішим механізмом якого є дія прозапальних і антизапальних чинників. Останнім часом у виникненні аутоімунних захворювань велику увагу приділяють ядерним транскрипційним факторам, зокрема κ B (NF- κ B). Він відіграє критичну роль в активації транскрипції генів, що кодують прозапальні чинники (цитокіни, молекули адгезії, індукційні NO-синтазу та циклооксигеназу), а також регулює проліферацію і загибель клітин [13, 21]. Саме тому як в експерименті, так і в клініці є спроби вико-

ристовувати блокатори активації NF- κ B при лікуванні запальних процесів. Серед інгібіторів активації NF- κ B найбільш поширеним є куркумін – речовина рослинного походження (*Curcuma longa*). Встановлено, що він інгібує експресію генів цитокінів, які продукуються Т-хелперами [10]. Куркумін регулює як проліферацію, так і апоптоз Т-лімфоцитів людини і щурів, тобто він діє на спільні сигнальні шляхи клітинного росту та загибелі [20]. Показано, що при деяких аутоімунних захворюваннях (ревматоїдний артрит, псоріаз, хвороба Альцгеймера) він послаблює запальні процеси [6, 8, 9]. Кількість праць щодо ефективності його застосування в медицині з року в рік зростає. Але невідомо, чи не призведе блокада NF- κ B, який впливає на велику кількість біохімічних процесів в організмі, до погіршення ситуації, тим більше, що

© Т.Ю. Вознесенська, Т.М. Бризгіна, В.С. Сухіна, Н.В. Макогон, І.М. Алексєєва

багато так званих прозапальних чинників відіграють суттєву фізіологічну роль. Питання про ефективність і доцільність анти-NF- κ B-терапії потребує подальшого вивчення.

Метою нашого дослідження було вивчити вплив куркуміну на мейотичне дозрівання ооцитів і загибель фолікулярних клітин через апоптоз і некроз при імунному ушкодженні яєчників у мишей.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих самиць мишей лінії СВА масою 18–22 г. при дотримуванні положень Конвенції з біоетики Ради Європи (Страсбург, 1986).

Імунне ушкодження яєчників викликали імунізацією антигеном алогенного яєчника. Для отримання антигена використовували яєчники білих безпородних мишей. На першому етапі мишей імунізували підшкірно гомогенатом алогенного яєчника (1,5–2,0 мг білка на тварину) в повному ад'юванті Фрейнда. Надалі антиген у зростаючих дозах вводили внутрішньовенно (0,5 мг; 0,75 мг; 1,0 мг білка на тварину) через 2 доби на 3-тю. Через 6 діб після останнього введення антигена тварин наркотизували, декапітували, яєчники і кров використовували для досліджень. Куркумін, суспендований у соняшниковій олії, вводили інтрагастрально в дозі 2 мг на тварину 4 рази на тиждень протягом всієї імунізації. Було досліджено 3 групи мишей: 1-ша група – контроль: введення за схемою імунізації фізіологічного розчину та інтрагастральне введення соняшникової олії; 2-га – імунізація антигеном алогенного яєчника та інтрагастральне введення розчинника куркуміну – соняшникової олії; 3-тя – куркумін на тлі імунізації: імунізація та інтрагастральне введення куркуміну, суспендованого в соняшниковій олії.

Для дослідження мейотичного дозрівання ооцитів з яєчників виділяли зрілі

фолікули, тобто великі фолікули, які містили багато шарів фолікулярних клітин та яйцеклітину з вираженою прозорою оболонкою та визначали їх кількість. Кумулюсно-ооцитарні клітинні комплекси культивували протягом 20 год у культуральному середовищі DME з 5 % ембріональної телячої сироватки при 37 °C. Після культивування протягом 4 год підраховували кількість ооцитів, що перебували на стадії метафази I – розчинення зародкового пухирця, після культивування протягом 20 год – кількість ооцитів, що перебували на стадії метафази II – формування першого полярного тільця.

Оцінку апоптотичної і некротичної загибелі фолікулярних клітин проводили одразу після їх виділення з яєчника за морфологічними ознаками. Морфологічну оцінку вважають «золотим стандартом» вивчення апоптозу, оскільки не всі біохімічні показники виявляються при деяких його видах або і при некротичній загибелі. Використовували метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот – Хехст 33342 і йодидом пропідіуму [2]. Цей метод дає можливість визначити кількість живих, апоптотичних, первинно- і вториннонекротичних клітин. Йодид пропідіуму проникає лише в клітини з ушкодженими мембранами (тобто некротичні) або клітини з ушкодженням плазматичної мембрани на різних стадіях розвитку апоптозу (вторинний постапоптотичний некроз) і забарвлює їх ядра в оранжевий колір. Хехст 33342 проникає також через неушкоджені мембрани та забарвлює ядра живих і апоптотичних клітин в зелено-синій колір. Зв'язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні риси ядерного матеріалу, притаманні апоптозу: периферичне розташування хроматину, його конденсацію, пікноз і фрагментацію ядер, а також розпад клітин на апоптотичні тільця. Морфологічні дослідження проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа Люмам II-1 з

водно-імерсійним об'єктивом $\times 85$. Використовували відеосистему передачі зображення з мікроскопа на комп'ютер. Визначали відсоток живих, апоптотичних, первинно- і вториннонекротичних клітин при підрахунку не менш як 200 клітин.

Статистичну обробку результатів експериментів проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з наступним порівнянням середніх значень між групами за тестом Ньюмана–Кейлса з використанням програми Statistica.6; $P < 0,05$ вважалось статистично вірогідним. Перед статистичним аналізом до всіх результатів, виражених у відсотках, застосовували арксинус-перетворення за Фішером [1]. При визначенні зв'язків між показниками використовували лінійний кореляційний аналіз за Пірсоном [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імунізація мишей антигеном алогенного яєчника викликала суттєве ушкодження яєчників. Виявлено значне зменшення кількості виділених з яєчника фолікулів з $15,9 \pm 0,6$ в контролі до $8,1 \pm 0,3$ при імунізації ($P < 0,001$). Виявлялися ооцити з атиповою морфологією (з нерівномірно гранульо-

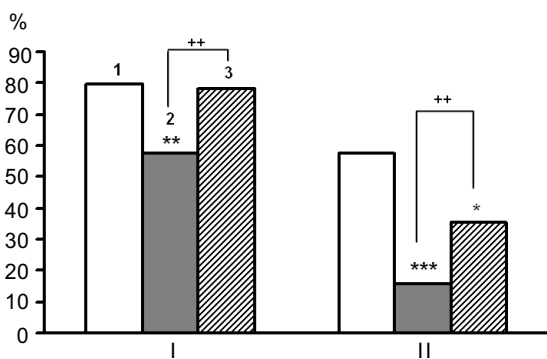


Рис. 1. Зміни мейотичного дозрівання ооцитів мишей під впливом куркуміну за умов імунного ушкодження яєчників: I – метафаза I, II – метафаза II; 1 – контроль, 2 – імунізація, 3 – куркумін на тлі імунізації. За віссю ординат – відсоток від загальної кількості клітин.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ відносно контролю; ++ $P < 0,01$ відносно імунізації

ваною цитоплазмою та ознаками її фрагментації). Спостерігалася деградація частини фолікулярних клітин. Суттєво порушувався оогенез (рис. 1): зменшувався відсоток ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець (метафаза I) та формували перше полярне тільце (метафаза II). Пригнічення оогенезу супроводжувалося зменшенням кількості живих фолікулярних клітин і збільшенням кількості клітин, що гинули через апоптоз і некроз (рис 2, 3). У лейкограмі крові відбувалися зміни, що свідчили про розвиток запалення – підвищувався відсоток нейтрофільних гранулоцитів, в тому числі паличкоядерних нейтрофілів (загальне число нейтрофілів: контроль – $26,0 \% \pm 3,2 \%$; імунізація – $33,3 \% \pm 2,0 \%$, паличкоядерні: контроль – $3,2 \% \pm 0,4 \%$; імунізація – $7,4 \% \pm 0,8 \%$; $P < 0,001$).

Застосування куркуміну суттєво поліпшувало мейотичне дозрівання ооцитів на стадії метафази I і II (див. рис. 1). Також посилювалася життєздатність фолікулярних клітин, пригнічуючи як апоптоз, так і некроз (див. рис. 2, 3). Слід відмітити значний антинекротичний ефект куркуміну, який призвів до збільшення співвідношення апоптоз/некроз: за умов самої імунізації – $6,2 \pm 0,9$ та при застосуванні куркуміну –

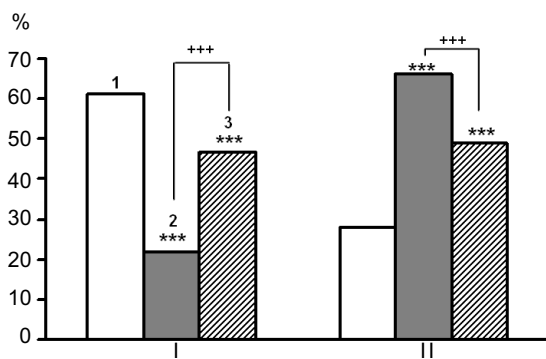


Рис. 2. Зміни кількості живих та апоптотичних фолікулярних клітин під впливом куркуміну за умов імунного ушкодження яєчників: I – живі клітини, II – апоптоз; 1 – контроль, 2 – імунізація, 3 – куркумін на тлі імунізації. За віссю ординат – відсоток від загальної кількості клітин. *** $P < 0,001$ відносно контролю; +++ $P < 0,001$ відносно імунізації

10,8±0,7 (P<0,001). Суттєвим було також зменшення вторинного постапоптотичного некрозу: контроль – 5,3 % ± 0,9 %; імунізація – 14,8 % ± 1,1 % (P<0,001); куркумін на тлі імунізації – 10,3 % ± 0,6 % (P<0,05).

Проведений кореляційний аналіз виявив негативний лінійний зв'язок між загибеллю фолікулярних клітин і здатністю ооцитів до відновлення мейозу за умов введення куркуміну на тлі імунізації антигеном алогенного яєчника (таблиця). Це свідчить

на користь припущення, що протективна дія куркуміну на оогенез опосередковується, принаймні частково, його позитивним впливом на життєздатність фолікулярних клітин. Під впливом куркуміну знижувався відсоток паличкоядерних нейтрофілів у крові, який був підвищений внаслідок імунізації (контроль – 3,2 % ± 0,4 %; імунізація – 7,4 % ± 0,8 %, P<0,001; куркумін на тлі імунізації – 3,6 % ± 0,5 %; P<0,001).

Коефіцієнти кореляції показників некротичної й апоптотичної загибелі фолікулярних клітин (X) і кількості ооцитів на стадії метафази I (Y) та рівняння лінійної регресії за умов введення куркуміну на тлі імунізації антигеном алогенного яєчника

Показник оогенезу	Показник клітинної загибелі	Коефіцієнт кореляції	Вірогідність коефіцієнта кореляції (P)	Рівняння лінійної регресії
Відсоток ооцитів на стадії метафази I (Y)	відсоток апоптозу (X)	-0,62	<0,01	Y=96,3-0,5*X
	відсоток некрозу (X)	-0,48	<0,05	Y=87,5-1,7*X

Одержані результати свідчать про те, що імунне ушкодження яєчників відбувається на рівні дозрівання ооцитів і виживання фолікулярних клітин. Вірогідний негативний кореляційний зв'язок між загибеллю фолікулярних клітин і мейотичним дозріванням ооцитів є вагомим аргументом на користь їх причинно-наслідкових взаємо-

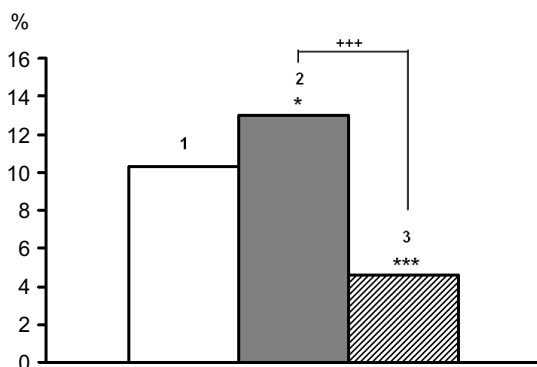


Рис. 3. Зміни кількості некротичних фолікулярних клітин під впливом куркуміну за умов імунного ушкодження яєчників: 1 – контроль, 2 – імунізація, 3 – куркумін на тлі імунізації. За всією ординат – відсоток від загальної кількості клітин.

* P<0,05, *** P<0,001 відносно контролю; +++ P<0,001 відносно імунізації

відносин, показуючи, що зменшення загибелі фолікулярних клітин може бути причиною поліпшення оогенезу. Застосування інгібітора активації NF-κB куркуміну на тлі імунізації, який поліпшував оогенез і зменшував загибель фолікулярних клітин як через апоптоз, так і некроз, показує, що центральний регулятор експресії прозапальних чинників відіграє суттєву роль в імунному ушкодженні яєчників. Його роль може реалізуватися через посилення експресії прозапальних цитокінів насамперед фактора некрозу пухлин-α (ФНП-α). Застосування інгібіторів NF-κB можна вважати різновидом антицитокінової, в тому числі анти ФНП-α-терапії. В терапії такого роду при ушкодженні яєчників міститься і деяка загроза, оскільки цитокіни, зокрема ФНП-α, відіграють важливу фізіологічну роль у розвитку фолікулів, їх атрезії, овуляції, функціонуванні жовтого тіла, стероїдогенезі [3, 5, 12]. Одержані в нашій роботі результати про позитивний ефект інгібітора активації NF-κB куркуміну на оогенез при імунному ушкодженні

яєчників свідчить про доцільність такої терапії. Не менш суттєвим компонентом участі NF- κ B у розвитку імунного запалення є його вплив на клітинний гомеостаз. Відомо, що активація цього транскрипційного фактора може призводити як до виживання, так і до загибелі клітин залежно від типу клітин, їх функціонального стану та наявності інших сигналів активації [11, 13, 19]. Наші результати показали, що інгібіція активації NF- κ B куркуміном при імунному ушкодженні яєчників сприяє виживанню фолікулярних клітин внаслідок зменшення їх апоптотичної та некротичної загибелі, що забезпечує поліпшення оогенезу. Важливий ефект куркуміну – зменшення кількості фолікулярних клітин, загиблих через некроз, оскільки саме він значною мірою ініціює імунний запальний процес внаслідок виходу в навколишнє середовище внутрішньоклітинних антигенів, до яких не толерантна імунна система. Доказом цього в наших дослідженнях є послаблення запалення під впливом куркуміну (за лейкограмою крові).

Більшість даних літератури відносно механізму дії куркуміну свідчить про його здатність блокувати деградацію інгібітора NF- κ B і, таким чином, перешкоджати активації фактора і його транслокації із цитоплазми в ядро [4, 8, 15, 17]. Показано, що куркумін пригнічує експресію генів прозапального цитокіну ФНП- α , індукцибельних циклооксигенази, NO-синтази і ліпоксигенази, а також модулює проліферацію і апоптоз клітин, що може бути наслідком його впливу на активацію NF- κ B [4, 6, 8, 15, 17]. Відомо також, що куркумін діє як антиоксидант [15, 17], що може розширювати спектр його позитивного впливу при запальних процесах.

Таким чином, дослідження дії інгібітора активації NF- κ B куркуміну при імунному ушкодженні яєчників у мишей, яке відповідає окремим рисам аутоімунних процесів у жінок, свідчать про участь NF- κ B в імунному запаленні яєчника, в розвит-

ку якого суттєву роль відіграє загибель клітин через апоптоз і, особливо через некроз, а також про доцільність використання інгібіторів його активації як терапевтичні засоби.

**Т.Ю. Вознесенская, Т.М. Брызгина,
В.С. Сухина, Н.В. Макогон, И.Н. Алексеева**

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА АКТИВАЦИИ NF- κ B КУРКУМИНА НА ООГЕНЕЗ И ГИБЕЛЬ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИММУННОМ ПОРАЖЕНИИ ЯИЧНИКОВ МЫШЕЙ

В эксперименте на мышах линии СВА изучали влияние ингибитора активации ядерного транскрипционного фактора κ B (NF- κ B) куркумина (вещества растительного происхождения – *Curcuma longa*) на мейотическое созревание ооцитов и гибель фолликулярных клеток по апоптотическому и некротическому пути при иммунном поражении яичников, вызванном иммунизацией животных антигеном аллогенного яичника. NF- κ B играет ведущую роль в регуляции транскрипции генов, кодирующих провоспалительные факторы (цитокины, молекулы адгезии, индуцибельные NO-синтазу и циклооксигеназу), а также регулирует пролиферацию и гибель клеток. Показано, что иммунизация мышей увеличивала гибель фолликулярных клеток по апоптотическому и некротическому пути, что приводило к развитию воспалительного процесса в организме (по результатам лейкограммы крови) и нарушало мейотическое созревание ооцитов в метафазе I и II. Интрагастральное введение куркумина («Sigma», США) в дозе 2 мг на животное в период иммунизации снижало количество фолликулярных клеток, гибнущих по апоптотическому, а особенно по некротическому пути, ослабляло воспалительный процесс в организме и способствовало менее выраженному нарушению оогенеза.

Ключевые слова: яичник, иммунное воспаление, мейотическое созревание ооцитов, фолликулярные клетки, апоптоз, некроз, куркумин.

**T.Voznesenskaya¹, T. Bryzgina, V. Sukhina,
N. Makogon, I. Alexeyeva**

THE INFLUENCE OF AN INHIBITOR OF NF- κ B ACTIVATION CURCUMIN ON THE OOGENESIS AND FOLLICULAR CELL DEATH IN IMMUNE OVARIAN FAILURE IN MICE

In experiments on CBA mice, we studied the influence of an inhibitor of nuclear transcription factor κ B activation curcumin, obtained from *Curcuma longa*, on the meiotic maturation of oocytes and apoptotic and necrotic death of follicular cells at

immune ovary failure induced by immunization of animals with allogenic ovarian extracts. NF- κ B plays a pivotal role in the induction of genes encoding pro-inflammatory factors (cytokines, adhesion molecules, inducible NO-synthase and cyclooxygenase) and in regulation of cell proliferation and death. It has been shown that immunization of mice increased the death of follicular cells through an apoptotic and necrotic pathways, which led to inflammatory response (according to blood leukogram and impairment the oocyte meiotic maturation at metaphase I and II). Intragastric administration of curcumin (Sigma, USA, 2mg of the mouse weight, four times a week during the period of immunization) reduced the number of the follicular cells died through apoptotic and especially necrotic pathway. Curcumin attenuated an inflammatory response and improved the meiotic maturation of oocytes impaired under experimental immune ovarian failure in mice.

Key words: ovarium, immune ovary failure, meiotic maturation of oocytes, follicular cells, apoptosis, necrosis, curcumin.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

Ukrainian Academy of Sciences, Kyiv, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
2. Макогон Н.В., Вознесенська Т.Ю., Бризгіна Т.М., Сухіна В.С., Грушка Н.Г., Алексєєва І.М. Протективна дія молсидоміну при імунній патології яєчників у мишей // *Фізіол. журн.* – 2007. – **53**, №5. – С. 29–34.
3. Останин А.А., Айзикович Б.И., Айзикович И.В., Кожин А.Ю., Черных Е.Р. Роль цитокинов в регуляції репродуктивної функції // *Бюл. експерим. біології і медицини.* – 2007. – **143**, № 1. – С. 81–85.
4. Aggarwal S., Ichikawa H., Takada Y., Sandur S.K., Shishodia S., Aggarwal B. Curcumin (diferuloylmethane) down regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I kappa B alpha kinase and Akt activation // *Mol. Pharmacol.* – 2006. – **69**, № 1. – P. 195–206.
5. Bornstein S.R., Rutkowski H., Kreras J. Cytokines and steroidogenesis // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2004. – **215**, № 1–2. – P. 135–141.
6. Bright J. Curcumin and autoimmune disease // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2007. – **595**. – P. 425–451.
7. Forges T., Monnier-Barbarino P., Faure G.C., Bene M.C. Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology // *Hum. Reprod. Update.* – 2004. – **10**. – P. 163–175.
8. Hatcher H., Planalp R., Cho J. Torti F.M., Torti S.V. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials // *Cell Mol. Life Sci.* – 2008. – **65**, № 11. – P. 1631–1652.
9. Hsu C.H., Cheng A.L. Clinical studies with curcumin // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2007. – **595**. – P. 471–480.
10. Kang B., Song Y., Kim K., Choe Y.K., Hwang S.Y., Kim T.S. Curcumin inhibits cytokine profile in CD 4+ T cells by suppressing interleukin-12 production in macrophages // *Brit. J. Pharm.* – 1999. – **128**. – P. 380–384.
11. Kimura M., Haisa M., Uetsuka H., Takaoka O., Ohkawa T., Kawashima R., Yamatsuji T., Gundur M., Kaneda Y., Tanaka N., Naomoto Y. TNF combined with IFN- α accelerates NF- κ B – mediated apoptosis through enhancement of Fas expression in colon cancer cells // *Cell Death Differ.* – 2003. – **10**, № 6. – P. 718–728.
12. Kiyoshi O., Ryosuke S. Multiple role of TNF superfamily member in corpus luteum function // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2003. – **1**. – P. 95–105.
13. Kurylovicz A., Nauman J. The role of nuclear factor κ B in the development of autoimmune diseases: a link between genes and environment // *Acta biochemica Polonica.* – 2008. – **55**, № 4.
14. Luborsky J. Ovarian autoimmune disease and ovarian autoantibodies // *J. Women's Health and Gender Based Medicine.* – 2002. – **11**. – P. 585–599.
15. Maheshwari R.K., Singh A.K., Gaddipati J., Srimal R.C. Multiple biological activities of curcumin: A short review // *Life Sciences* – 2006. – **78**. – P. 2081–2087.
16. Pandedkar T.D., Wadia P. Autoimmune disorders of the ovary // *Ind. J. Exp. Biol.* – 1998. – **36**, № 5. – P. 433–436.
17. Reyes-Gordillo K., Segovia J., Shibayama M., Vergara P., Moreno M.G., Muriel P. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- κ B proinflammatory cytokines production and oxidative stress // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2007. – **1770**. – P. 989–996.
18. Santoro N. Research on the mechanisms of premature ovarian failure // *J. Gynecol. Investig.* – 2002. – **8**, № 1. – P. 10–12.
19. Shen H-M., Pervaiz S. TNF receptor superfamily – induced cell death: redox – dependent execution //

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: voz@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до
редакції 23.11.2009

Т.М. Фалалєєва, В.М. Кухарський, Т.В. Берегова

Вплив тривалого введення глутамату натрію на структурно-функціональний стан шлунка та масу тіла щурів

Вивчали вплив тривалого введення глутамату натрію на базальну шлункову секрецію кислоти, масу тіла і стан слизової оболонки шлунка щурів. Встановлено, що 10, 20, 30 добове введення глутамату натрію в дозах 15 і 30 мг/кг (відповідає 1 і 2 г/людину) призводить до ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлунка і до збільшення секреції соляної кислоти та маси тіла. Зроблено висновок, що стимулювальний вплив глутамату натрію на базальну секрецію соляної кислоти в шлунку може бути причиною патогенезу деяких кислотозалежних захворювань, а надмірне його споживання може призводити як до «синдрому китайського ресторану», так і гастритів і виразкової хвороби шлунка і дванадцятипалої кишки. Максимальні добові дози глутамату натрію, як і інших харчових добавок, мають бути переглянуті з урахуванням їх впливу на секреторний потенціал шлунка. Довготривале, надмірне та системне вживання глутамату натрію викликає розвиток ожиріння.

Ключеві слова: глутамат натрію, шлункова секреція кислоти, ожиріння, виразки шлунка.

ВСТУП

Глутамінова кислота була відкрита Рітхаузенем у 1866 р. Збудлива дія L-глутамату в головному і спинному мозку ссавців, де його знайдено у високих концентраціях, була відома з 50-х років минулого століття, проте лише з кінця 70-х стало зрозумілим, що він є основним збудливим медіатором у центральній нервовій системі хребетних [38, 39, 30]. Глутамінова кислота та її солі утворюються не лише в організмі людини, але також значна частина їх надходить з їжею. Глутамат натрію Е 621 (натрієва сіль глутамінової амінокислоти) є найвідомішим посилювачем смаку та широко використовується в багатьох харчових виробництвах як харчова добавка, що застосовується для збереження поживних властивостей харчових продуктів, надання харчовим продуктам кращого смаку, полегшення технологічної обробки продо-

вольчої сировини, здешевлення та скорочення технологічного процесу [1]. Ця харчова добавка з успіхом маскує низьку якість вихідного продукту, наприклад, старе або низькосортне м'ясо [6]. Наукові дискусії щодо безпечності споживання харчової добавки глутамату натрію розпочалися у 1968 р. після публікацій в англійському медичному журналі про те, що натрієва сіль глутамінової кислоти може бути причиною багатьох хвороб [14, 21, 25–27, 33]. Ці захворювання були об'єднані терміном „синдром китайського ресторану”, симптомами якого є різкий біль у шлунку та грудях або голові, почервоніння обличчя, підвищена температура тіла, посилення потовиділення [17, 22, 34, 42]. У особливо чутливих людей глутамат натрію часто є причиною нападів астми [9, 18]. Після таких публікацій впродовж 40 років аж до нині навколо цього питання тривають жваві дискусії [16, 18, 40]. Проведена

© Т.М. Фалалєєва, В.М. Кухарський, Т.В. Берегова

велика кількість досліджень у багатьох країнах як на здорових добровольцях, так і на людях, які себе вважають чутливими до глутамату натрію. Більшість учених стверджують, що тривале споживання цієї харчової добавки в дозі 1 г/день не справляє шкідливого впливу на організм людини та не викликає ознак „синдрому китайського ресторану” [10, 16]. За даними інших авторів тривалий прийом глутамату натрію в значно більших дозах (3 г/день [19, 29], 5 г/день [35] і навіть одноразовий прийом 12 г/день [32]) також не викликає появу симптомів „синдрому китайського ресторану” у людей. В інших працях показано, що „синдром китайського ресторану” у людей спричиняє прийом 3 г/день глутамату натрію [9, 18, 29, 41]. При цьому у частини добровольців „синдром китайського ресторану” з’являвся вже після першого прийому харчової добавки [9, 33, 34]. У інших він з’являвся в різний час упродовж 2 тиж прийому глутамату натрію [9, 41]. Таким чином, незважаючи на велику кількість праць, присвячених цій проблемі, одноставної думки щодо безпечної дози найпоширенішої харчової добавки – глутамату натрію немає.

Відкриті за останнє десятиріччя ефекти глутамату на шлункову секрецію кислоти зумовили початок розвитку нового напрямку як у вивченні функціональної ролі глутаматних рецепторів, так і в дослідженні нових шляхів регуляції секреторного процесу в шлунку. Аналізуючи дані літератури незрозумілим є те, що основний збуджувальний медіатор центральної нервової системи глутамат натрію при системному введенні не бере участі у реалізації базальної шлункової секреції кислоти [7, 8, 15, 36, 37]. Виходячи з того, що всі дослідники у вищенаведених роботах вивчали гостре введення глутамату натрію, ми припустили, що якщо гостре одноразове введення не призводить до змін шлункової секреції кислоти, то слід вивчати системну про-

лонговану дію на секрецію для потенціації ефекту та розвиток патологічних змін. На наш погляд проведення таких досліджень є доцільним у зв’язку зі зростаючою захворюваністю населення на патологію органів травлення, особливо тієї частини населення, яка харчується в ресторанах “швидкої їжі” (“фаст-фуд”), що використовують харчові добавки.

Нині також залишається дискусійним питання щодо впливу глутамату натрію на ожиріння більшості людей, які зловживають харчуванням у ресторанах “швидкої їжі”. Частина вчених вважають, що ця харчова добавка викликає порушення обміну речовин та підвищення маси тіла [11, 23, 24], проте інші [19, 29, 32, 35] стверджують, що вживання глутамату натрію навіть у великих дозах не шкодить організму людини.

Метою нашої роботи було вивчення впливу тривалого введення глутамату натрію на базальну шлункову секрецію кислоти, масу тіла та на стан слизової оболонки шлунка щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на щурах з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальним етичним принципам експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі [4, 5]. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі “Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)”. Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Дослідження проведені на 63 білих нелінійних щурах-самцях масою 145–180 г, які були розділені на 9 груп по 7 тварин у кожній. Вивчали вплив 10, 20 та 30-денного введення глютамату натрію в дозах 15 та 30 мг/кг (1 раз на добу, перорально), що відповідало 1 та 2 г/людину. Глутамат натрію розчиняли у 0,5 мл питної водопровідної дехлорованої води кімнатної температури. Щурам контрольних груп (1-, 2-, 3-тя) вводили упродовж 10, 20, 30 діб плацебо, а саме 0,5 мл питної водопровідної дехлорованої води кімнатної температури.

До 4-, 5- і 6-ї груп увійшли щури, яким протягом 10, 20 і 30 діб відповідно вводили глютамат натрію в дозі 15 мг/кг. Щури, яким упродовж 10, 20 і 30 діб вводили глютамат натрію в дозі 30 мг/кг склали 7, 8 і 9-ту групи відповідно.

Через добу після останнього введення щурам води або глютамату натрію в умовах гострого експерименту досліджували базальну шлункову секрецію соляної кислоти методом перфузії ізольованого шлунка за Гхошем та Шільдом [20]. Щурів наркотизували уретаном (“Sigma Chemical Co”, США) в дозі 1,15 г/кг маси (внутрішньоочеревинно). У зібраних 10-хвилинних пробах електротитриметрично визначали загальну кислотність перфузату за допомогою іоніміра ЭВ-74 [4] з використанням 0,01 N розчину гідроокису натрію (NaOH). Кількість NaOH, що йшла на титрування перфузату в 10-хвилинній пробі, дорівнювала дебіту соляної кислоти, що виділялася в шлунок за цей період часу. Обчислювали дебіт кислоти, що виділився впродовж досліду (120 хв) у мікромолях.

У щурів усіх груп аналізували приріст маси тіла. Після завершення дослідів щурів умертвляли за допомогою летальної дози уретану (3 г/кг, внутрішньоочеревинно) [12] та аналізували стан слизової оболонки шлунка. Для цього видаляли шлунок, розрізали його по малій кривизні, вивертали слизовою назовні та ретельно промивали

фізіологічним розчином. Після чого на гастроскопі при транслюмінаційному освітленні за допомогою лупи (x4) підраховували кількість і площу уражень.

У зв'язку з невеликим об'ємом вибірки, для перевірки розподілу на нормальність було застосовано W тест Шапіро-Вілка. Ймовірність похибки першого роду $b > 0,05$. Оскільки наші результати виявилися нормально розподілені, ми розраховували середнє значення (M), похибку середнього (m). Порівняння вибірок проводили за допомогою критерію t Ст'юдента. Для наших результатів ми приймали рівень значущості $P < 0,05$ [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив 10-, 20- та 30-добового введення глютамату натрію на шлункову секрецію кислоти. Між показниками дебіту кислоти у щурів 1-, 2-, 3-ї груп, яким перорально упродовж 10, 20, 30 діб вводили 0,5 мл води статистично значущих змін не було. Тому результати досліджень, отримані на щурах цих груп, були об'єднані в одну контрольну групу. Дебіт соляної кислоти базальної секреції у щурів контрольної групи становив $16,1 \text{ мкмоль} \pm 3,1 \text{ мкмоль}$ ($n=21$).

Введення глютамату натрію в дозі 15 мг/кг впродовж 10 діб не впливало на базальну шлункову секрецію кислоти у щурів. Подовження тривалості його введення до 20 діб збільшувало дебіт соляної кислоти до $31,9 \text{ мкмоль} \pm 5,9 \text{ мкмоль}$, що було на 185 % ($P < 0,05$) більше за відповідний показник у контролі. Після 30-добового введення глютамату натрію цей показник становив $30,5 \text{ мкмоль} \pm 2,2 \text{ мкмоль}$, що на 183 % ($P < 0,05$) перевищувало контрольні значення (рис. 1,а). Таким чином, стимулювальний ефект глютамату натрію на 20-ту і 30-ту добу на секреторну спроможність був приблизно однаковим.

Збільшення щоденної дози глютамату натрію вдвічі (30 мг/кг) справляло значно

сильніший вплив на секрецію соляної кислоти в шлунку щурів. Так, уже на 10-ту добу після введення глютаму натрію збільшувалася секреція кислоти шлунком щурів на 97 % ($P < 0,05$). При 20-добовому введенні харчової добавки дебіт базальної кислоти в шлунку підвищувався на 562 % ($P < 0,01$). Щодобове введення глютаму натрію впродовж 30 діб у дозі 30 мг/кг призводило до збільшення дебіту кислоти на 372 % ($P < 0,05$) щодо контролю (див. рис. 1,б). Між дебітом базальної шлункової секреції кислоти після 20- та 30-добового введення глютаму натрію в дозі 30 мг/кг статистично значущої різниці не було.

Отже, довготривале введення глютаму натрію призводить до суттєвого збільшення базальної секреції соляної кислоти в шлунку щурів, а гіперацидність шлункового соку є фактором ризику розвитку кислотозалежних захворювань шлунково-кишкового тракту, наприклад виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки.

Вплив 10, 20 та 30-добового введення глютаму натрію на структурний стан шлунка. Для перевірки того, чи призводить підвищений рівень шлункової секреції до розвитку ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлунка ми дослідили стан слизової оболонки шлунка в кожній дослідній групі щурів.

При введенні глютаму натрію в дозі 15 мг/кг впродовж 10 діб були зафіксовані поодинокі масивні крововиливи невеликої площі та слабо виражена гіперемія (під збільшуваним склом було видно значну кількість точкових крововиливів). У середньому площа виразок на один шлунок становила $1,72 \text{ мм}^2 \pm 0,26 \text{ мм}^2$, довжина ерозій – $2,29 \text{ мм} \pm 0,18 \text{ мм}$ (рис. 2). Кількість ерозивно-виразкових уражень на один шлунок була $2,71 \pm 0,29$ (виразок – $1,57 \pm 0,2$; ерозій $1,14 \pm 0,14$; таблиця).

20-добове введення харчової добавки (15 мг/кг) посилювало ураженість слизової оболонки шлунка, що проявлялось у збільшенні площі виразок і довжини ерозій на 145 % ($P < 0,001$) і на 143 % ($P < 0,05$) відповідно. Гіперемія слизової була більш вираженою. Кількість ерозивно-виразкових уражень на один шлунок збільшилася на 69 % ($P < 0,01$), (виразок – 64 % ($P < 0,01$); ерозій – 75 % ($P < 0,05$)).

При подовженні введення глютаму натрію (15 мг/кг) до 30 діб ступінь ураженості слизової оболонки шлунка зростала ще більшою мірою: з'являлися масивні крововиливи, слизова оболонка шлунка була яскраво-червоного кольору, що зумовлено великою кількістю точкових крововиливів і підвищеною ламкістю судин, оскільки на слизовій знаходилися навіть згустки крові. Площа виразок і довжина

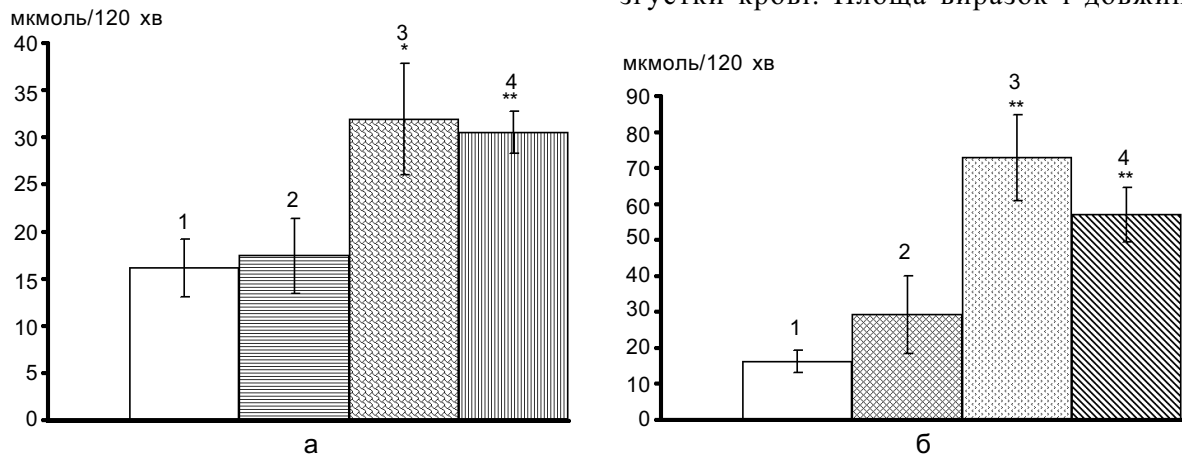


Рис. 1. Вплив тривалого введення глютаму натрію в дозі 15 (а) і 30 (б) мг/кг на базальну шлункову секрецію у щурів: 1 – контроль, 2, 3, 4 – 10, 20 і 30 діб відповідно. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ у порівнянні з контролем

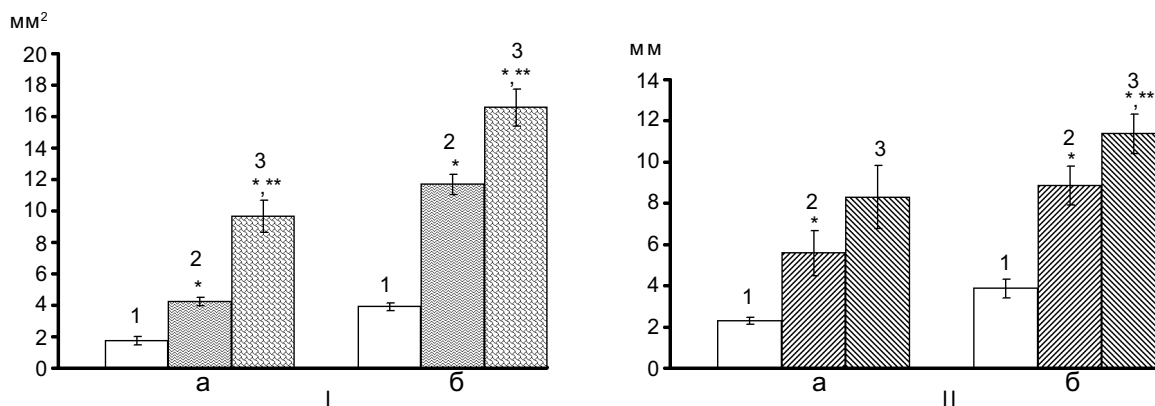


Рис. 2. Вплив тривалого введення глютаму натрію на площу виразок (I) та довжину ерозій (II) в шлунку щурів: а, б – глютаму натрію в дозі 15 і 30 мг/кг відповідно. 1 – 10 діб, 2 – 20 діб, 3 – 30 діб. *P<0,001 у порівнянні з 10-добовим введенням; **P<0,01 у порівнянні з 20-добовим введенням

ерозій збільшилися на 460 % (P<0,001) і на 262 % (P<0,05) відповідно порівняно з 10-добовим глютаму натрію введенням, та на 129 % (P<0,001) і на 49 % (P>0,05) щодо 20-добового застосування глютаму натрію (див. рис. 2). Кількість ерозивно-виразкових уражень на один шлунок збільшилася на 142 % (P<0,001) (виразок – 155 % (P<0,001); ерозій – 125 % (P<0,001)) порівняно з 10-добовим введенням речовини та на 43 % (P<0,01), (виразок – 56 % P<0,001); ерозій – 29 % (P>0,05) щодо з 20-добового введення (див. таблицю).

У разі збільшення дози глютаму натрію до 30 мг/кг через 10 діб площа виразок на один шлунок була вдвічі біль-

шою, порівняно з введенням препарату в дозі 15 мг/кг і статистично значущо не відрізнялася від 20-добового введення. Аналогічно до виразок збільшилась і довжина ерозій на один шлунок за 10 діб дії досліджуваної речовини.

При подовженні введення глютаму натрію до 20 та 30 діб ступінь ураженості слизової оболонки шлунка посилювався: фіксували масивні крововиливи, слизова оболонка шлунка була яскраво-червоного кольору. Після 20-добового введення харчової добавки в дозі 30 мг/кг площа виразок та довжина ерозій на один шлунок відповідала 30-добовому застосуванню препарату в дозі 15 мг/кг.

Вплив тривалого введення глютаму натрію в дозі 15 і 30 мг/кг (1 раз на добу, перорально) на кількість ерозивно-виразкових уражень (M±m)

Схема досліджу	Виразки	Ерозії	Кількість ерозивно-виразкових уражень
Введення глютаму натрію в дозі 15 мг/кг			
10 діб	1,57±0,20	2,29±0,18	2,71±0,29
20 діб	2,57±0,2**	5,57±1,09*	4,57±0,37**
30 діб	4,0±0,22***, ##	2,57±0,2***	6,57±0,3***, ##
в дозі 30 мг/кг			
10 діб	2,43±0,20	1,57±0,2	4,00±0,31
20 діб	4,00±0,22***	3,14±0,26***	7,14±0,34***
30 діб	4,86±0,26***, #	3,43±0,2***	8,29±0,36***, #

*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 у порівнянні з 10-добовим введенням; #P<0,05, ##P<0,01 у порівнянні з 20-денним введенням.

Після 30-добового введення глютаму натрію (30 мг/кг) площа виразок і довжина ерозій на один шлунок збільшилися на 326 і на 194 % ($P<0,001$) відповідно порівняно зі значеннями на 10-ту добу та на 42 % ($P<0,01$) і на 28 % ($P<0,05$) щодо 20-добового введення (див. рис. 3, 4). Кількість ерозивно-виразкових уражень на один шлунок зростала на 107 % ($P<0,001$) порівняно з 10-добовим застосуванням речовини в дозі 30 мг/кг та на 16 % ($P<0,05$) порівняно з 20-добовим введенням (див. таблицю).

Вплив 10, 20 та 30-добового введення глютаму натрію на приріст маси тіла щурів. У щурів всіх досліджуваних груп ми аналізували приріст маси тіла. Маса тіла контрольних щурів за 10 днів збільшилася на $10,0 \pm 0,32$, $20,6 \pm 0,24$ і на $30,4 \text{ г} \pm 0,51 \text{ г}$ відповідно.

У групі тварин, яким вводили глютаму натрію в дозі 15 мг/кг впродовж 10 днів маса тіла зросла на 52 % ($P<0,05$) більше, ніж у контрольній групі. Вживання препарату протягом 20 днів збільшило масу щурів на 139 % ($P<0,001$) більше, ніж в контролі. У тварин, яким 30 днів вводили глютаму натрію, маса тіла збільшилася на 100 % ($P<0,001$), порівнюючи з контролем за відповідний період часу (рис. 3).

Підвищення щоденної дози глютаму натрію вдвічі (30 мг/кг) також значно збільшувало масу тіла щурів: на 10, 20 і 30-

ту добу на 20 % ($P>0,05$), 170 % ($P<0,001$) і на 153 % ($P<0,001$) відповідно відносно контролю (див. рис. 3,б).

Збільшення маси тіла під впливом глютаму натрію можна пояснити тим, що ця речовина є основним збуджуючим медіатором в центральній нервовій системі [30, 38, 39], а також у центрі насичення [11, 28], стимуляція якого призводить до посилення засвоєння поживних речовин. Відомо, що глютаму натрію збільшує чутливість смакових сосочків [31], що призводить до залежності, аналогічній наркотичній [22], внаслідок чого формується залежність від їжі, багатой на цю харчову добавку.

Отже, одержані результати ставлять під сумнів загальноприйняте твердження, що використання харчової добавки глютаму натрію в розумних межах (1 г на добу) є безпечним [10, 16]. Нами показано, що щодобове введення глютаму натрію щурам у дозі 15 мг/кг (1 г на середньо статистичну людину) впродовж 20 та 30 днів приводить до ураження слизової оболонки шлунка (крововиливи, ерозії і виразки) (див. таблицю) та до збільшення секреції соляної кислоти (див. рис.1), маси тіла (див. рис. 3) в середньому вдвічі.

Твердження, що прийом глютаму натрію у кількості 3 г на добу є небезпечним для здоров'я людини [9, 18, 29, 41], не підтверджується нашими експери-

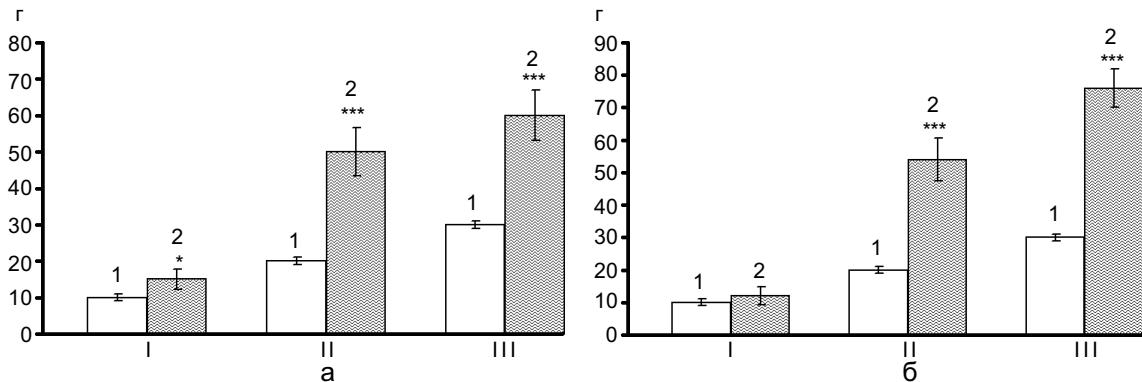


Рис. 3. Вплив тривалого введення глютаму натрію в дозі 15 (а) і 30 (б) мг/кг на зміни маси тіла у щурів: 1 - контроль; 2 – глютаму натрію. I – 10 днів, II – 20 днів, III – 30 днів. * $P<0,05$; *** $P<0,001$ у порівнянні з контролем

ментальними дослідженнями, котрі свідчать що й менша доза препарату (2 г на добу) є також небезпечною для функціонування секреторного апарату шлунка. Так, введення щурам глютамату натрію у дозі 30 мг/кг (2 г на середньо статистичну людину) впродовж 20 та 30 діб призводило до ураження слизової оболонки шлунка (крововиливи, ерозії та виразки) (див. таблицю), до надмірного збільшення секреції соляної кислоти в середньому в 5 разів (див. рис. 1) та маси тіла в середньому в 2,5 раза (див. рис. 3).

Таким чином, основний збуджувальний медіатор центральної нервової системи глютамат натрію, який за нормальних умов залучений у регуляцію секреторної функції шлунка [7] і не призводить до порушення секреторного апарату, при тривалому екзогенному введенні викликає зміни структурно-функціонального стану шлунка. І перш за все це відбувається внаслідок посилення стимулювального впливу на парієтальні клітини, тобто глютамат натрію перетворюється в патогенетичний фактор утворення ерозивно-виразкових уражень у слизовій оболонці шлунка та гіперфагії, що є причиною ожиріння.

Для інтерпретації одержаних результатів відносно людини, слід взяти до уваги той факт, що вік щурів набагато менший, ніж у людей та метаболічні процеси проходять набагато швидше. Більшість дослідників вважають, що 10 діб щурів, відповідають 3 міс людини, 20 та 30 діб відповідно 6 і 9 міс [13]. Отже, встановлена нами властивість глютамату натрію, при системному споживанні, патологічно надмірно збільшувати секрецію соляної кислоти в шлунку, слід враховувати кожній людині при формуванні щоденного раціону, адже, в наш час ця речовина широко використовується в багатьох харчових виробництвах і користується великою популярністю в світі, а посилення базальної секреції може бути причиною патогенезу

багатьох кислотозалежних захворювань. Виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки залишається найпоширенішим захворюванням органів травлення, а в останні десятиріччя простежується тенденція до неухильного збільшення кількості хворих на виразкову хворобу, що пов'язано з порушенням режиму та характеру харчування, зловживання грубою й гострою їжею, неконтрольованим застосуванням харчових добавок, а саме глютамату натрію.

Зроблено висновок, що стимулювальний вплив глютамату натрію на базальну секрецію соляної кислоти в шлунку може бути, по-перше, причиною патогенезу деяких кислотозалежних захворювань, а надмірне споживання препарату може призводити як до синдрому «китайського ресторану», так і гастритів і виразкової хвороби шлунка і дванадцятипалої кишки. По-друге, максимальні добові дози глютамату натрію мають бути переглянуті з урахуванням їх впливу на секреторний потенціал шлунка. По-третє, довготривале, надмірне та системне вживання цієї речовини викликає розвиток ожиріння.

**Т.М. Фалалеева, В.М. Кухарский,
Т.В. Береговая**

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ГЛУТАМАТА НАТРИЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЖЕЛУДКА И МАССУ ТЕЛА КРЫС

Изучали влияние продолжительного введения глютамата натрия на базальную желудочную секрецию кислоты, массу тела и состояние слизистой оболочки желудка крыс. Установлено, что 10, 20, 30 суточное введение глютамата натрия в дозах 15 и 30 мг/кг (соответствует 1 и 2 г/человека) приводит к эрозивно-язвенным поражениям слизистой оболочки желудка и к увеличению секреции соляной кислоты, массы тела. Сделан вывод, что стимулирующее влияние глютамата натрия на базальную секрецию соляной кислоты в желудке может быть причиной патогенеза ряда кислотозависимых заболеваний, а излишнее его употребление может приводить как к «синдрому китайского ресторана», так и к гастритам, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Максимальные дозы глютамата

натрия должны быть пересмотрены, учитывая его влияние на секреторный потенциал желудка. Продолжительное, излишнее и системное употребление глутамата натрия вызывает развитие ожирения.

Ключевые слова: глутамат натрия, желудочная секреция кислоты, ожирение, язвы желудка.

**T.M. Falalyeyeva, V.M. Kukharskyu,
T.V. Beregova**

THE INFLUENCE OF LONG-TERM MONOSODIUM GLUTAMATE FEEDING ON STRUCTURE AND FUNCTIONAL STATE OF STOMACH AND BODY WEIGHT IN RATS

The influence of prolonged administration of monosodium glutamate (MSG) on basal gastric acid secretion, body weight and gastric mucosa in rats was studied. We found that 10-, 20-, 30-days feeding by MSG in doses 15 to 30 mg/kg (equivalent to 1 and 2 g/person) leads to erosive and ulcerative lesions of the gastric mucosa and an increased secretion of hydrochloric acid and an increased body weight. It is concluded that the stimulating effect of MSG on the basal secretion of hydrochloric acid in the stomach may be implicated in the pathogenesis of a number of acid-dependent diseases. An excessive consumption of MSG can cause a «Chinese Restaurant Syndrome» and gastritis, gastric and duodenal ulcers. Therefore, the maximum dose of MSG should be reconsidered taking into account its influence on the secretory capacity of the stomach. We also conclude that prolonged, excessive and systemic consumption of MSG causes obesity.

Key words: Monosodium glutamate, gastric acid secretion, obesity, gastric ulcers.

Kyiv National Taras Shevchenko University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Булдаков А.С. Пищевые добавки: Справочник. – СПб.: ИТ, 1996. – 240 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
3. Гройсман С.Д., Губкин В.А., Береговая Т.В. Полуавтоматическая электротитриметрическая установка для титрования желудочного сока // Лаб. дело. – 1988. – № 9. – С. 66–67.
4. Мальцев В.И., Белоусов Д.Ю. Этическая оценка методик проведения исследований // Еженедельник Аптека. – 2001. – № 34. – С. 35.
5. Покровский В.И. Биомедицинская этика. – М., 1997. – 224 с.
6. Смоляр В.І. Проблеми використання харчових добавок в Україні. – В кн.: Тези доп. Міжнар. наук.-техн. конференції НУХТ. – К., 1998. – С. 53.
7. Фалалеева Т.М., Берегова Т.В., Штанова Л.Я. Глутаматні рецептори та їх роль у регуляції секреції кислоти в шлунку (огляд літератури) // Експерим. та

- клін. фізіологія і біохімія. – 2007. – 2, № 37. – С. 53–59.
8. Фалалеева Т.М., Дзюбенко Н.В., Суходолья А.І., Берегова Т.В. Дослідження ролі глутаматних рецепторів NMDA-типу в регуляції базальної та стимульованої інсуліном шлункової секреції у щурів // Вісник Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіол. функцій. – 2004, № 9. – С. 10–11.
9. Allen D.H., Delohery J., Baker G. Monosodium L-glutamate-induced asthma // J. Allergy and Clin. Immunol. – 1987. – 80. – P. 530–537.
10. Bazzano G., D'Elia J.A., Olson R.E. Monosodium glutamate: feeding of large amounts in man and gerbils // *Science*. – 1970. – 169. – P. 1208–1209.
11. Bray G.A. Syndromes of hypothalamic obesity in man // *Pediatr Ann.* – 1984. – 13. – P. 525–536.
12. Cao Y., Song G. Purinergic modulation of respiration via medullary raphe nuclei in rats // *Respir. Physiol. & Neurobiol.* – 2007. – 155, № 2. – P. 114–120.
13. Cutler R.G. Peroxide-producing potential of tissues: inverse correlation with longevity of mammalian species. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1985. – 82, № 14. – P.4798–4802.
14. Davies N.E. Chinese-restaurant syndrome // *N. Engl. J. Med.* – 1968. – 278, № 20. – P. 1124.
15. Falalyeyeva T., Shtanova L., Dryvecka T., Beregova T. The role of ionotropic glutamate receptors ampa/kainate type in the mechanism of formation of basal gastric acid secretion in rats // *Annales universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Lublin-Polonia, Sectio DDD.* – 2007. – 20, №.1. – P.107–111.
16. Freeman M. Reconsidering the effects of monosodium glutamate: a literature review // *J Amer. Acad. Nurse. Pract.* – 2006. – 18, № 10. – P.482–486.
17. Гарсна О.І.С., Мойано С., Фонсека І.І., Беллідо І. The Chinese restaurant syndrome // *Med. Clin. (Barc).* – 1996. – 107, № 13. – P. 518.
18. Geha R., Beiser A., Ren C. Review of alleged reactions to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study // *J. Nutr.* – 2000. – 130. – P. 1058–1062.
19. Ghadimi H., Kumar S., Abaci F. Studies on monosodium glutamate ingestion. I. Biochemical explanation of the Chinese restaurant syndrome // *Biochem. Med.* – 1971. – 5. – P. 447–456.
20. Ghosh M.H., Shild H.O. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat // *Brit. J. Pharm. Chemother.* – 1958. – 13. – P.54–61.
21. Gordon ME. Chinese-restaurant syndrome // *N. Engl. J. Med.* – 1968. – 278, № 20. – P. 1123–1124.
22. Gore M.E., Salmon P.R. Chinese restaurant syndrome: fact or fiction? // *Lancet.* – 1980. – 1. – P. 251–252.
23. He K., Zhao L., Daviglius M.L. Association of monosodium glutamate intake with overweight in Chinese adults: the INTERMAP Study // *Obesity.* – 2008. – 16, № 8. – P. 1875–1880.
24. Hermanussen M., Tresguerres J.A. Does high glutamate intake cause obesity? // *J. Pediatr. Endocrin. Metab.* – 2003. – 16, № 7. – 965–968.

25. Kandall S.R. Chinese-restaurant syndrome // N. Engl. J. Med. – 1968. – 278, № 20. – P. 1123.
26. Kwok R.H.M Chinese-restaurant syndrome // Ibid. – 1968. – 278, № 20. – P. 796.
27. McCaghren T.J. Chinese-restaurant syndrome // Ibid. – 1968. – 278, № 20. – P. 1123.
28. Monno A. Extracellular glutamate levels in the hypothalamus and hippocampus of rats after acute or chronic oral intake of monosodium glutamate // Neurosci Lett. – 1995. – 193, № 1. – P. 45–48.
29. Morselli P.L., Garattini S. Monosodium glutamate and the Chinese restaurant syndrome // Nature (Lond.). – 1970. – 227. – P. 611–612.
30. Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system // Prog. Neurobiol. – 1998. – 54, № 5. – P. 581–618.
31. Raliou M., Wiencis A., Pillias A.M. et al. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human tas1r1, tas1r3, and mGluR1 and individual taste sensitivity to glutamate // Amer. J. Clin. Nutr. – 2009. – 90, № 3. – P. 789–799.
32. Rosenblum I., Bradley J.D., Coulston, F. Single and double blind studies with oral monosodium glutamate in man // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1971. – 18. – P. 367–373.
33. Schaumburg H. Chinese-restaurant syndrome // N. Engl. J. Med. – 1968. – 278, № 20. – P. 1122.
34. Schaumburg, H.H., Byck R., Gerstl R., Mashman J.H. Monosodium L-glutamate: its pharmacology and role in the Chinese restaurant syndrome // Science (Washington, DC). – 1969. – 163. – P. 826–828.
35. Tarasoff L., Kelly M.F. Monosodium L-glutamate: A double-blind study and review // Food and Chem. Toxicol. – 1993. – 31. – P. 1019–1035.
36. Tsai L.H., Lee Y.J., Wu J.Y. Effect of excitatory amino acid neurotransmitters on acid secretion in the rat stomach // J. Biomed. Sci. – 1999. – 6. – P. 36–44.
37. Tsai L.H., Tsai W., Wu J.Y. Effect of L-glutamic acid on acid secretion and immunohistochemical localization of glutamatergic neurons in the rat stomach // J. Neurosci. Res. – 1994. – 38. – P. 188–195.
38. Watkins J.C., Evans R.H. Excitatory amino acid transmitters // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1981. – 21. – P. 165–204.
39. Watkins J.C., Jane D.E. The glutamate story // Brit. J. Pharmacol. – 2006. – 147 (Suppl. 1). – P. 100–108.
40. Williams A.N., Woessner K.M. Monosodium glutamate 'allergy': menace or myth? // Clin. Exp. Allergy. – 2009. – 39, № 5. – P. 640–646.
41. Yang W.H., Drouin M.A., Herbert M., Mao Y., Karsh J. The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind, placebo-controlled, randomized study // J. Allergy Clin. Immunol. – 1997. – 99. – P. 757–762.
42. Zautcke J.L., Schwartz J.A., Mueller E.J. Chinese restaurant syndrome: a review // Ann. Emerg. Med. – 1986. – 15, № 10. – P. 1210–1230.

О.А. Грінченко, П.І. Янчук

Шляхи впливу таурину на шлункову секрецію

У хронічних дослідях на собаках з фістулами шлунка вивчали вплив амінокислоти таурин на шлункову секрецію. Показано, що таурин не викликав секреції кислого шлункового соку поза періодом травлення, проте підсилював шлункову секрецію, стимульовану гістаміном, збільшував вміст вільної соляної кислоти та пепсину в секреті. Таурин, введений за 0,25 і 2 год до ін'єкції гістаміну, змінював концентрацію Na^+ і K^+ у шлунковому соку. Найбільші зміни основних показників шлункової секреції спостерігалися через 14 год після застосування амінокислоти. В таких дослідженнях також показано збільшення вмісту загального білка та компонентів аденілової системи в шлунковому соку. Блокада холінорецепторів атропіном, бензогексонієм і IEM-1678 зменшувала ефекти таурину на шлункову секрецію, стимульовану гістаміном. Блокада α -адренорецепторів фентоламіном не перешкоджала здійсненню ефектів таурину на гістамінову шлункову секрецію. Встановлено, що за умов блокади β -адренорецепторів обзиданом таурин не повною мірою проявляє свій потенціювальний вплив на гістамінову шлункову секрецію. Отримані результати свідчать про те, що таурин впливає на секрецію шлункового соку, стимульовану гістаміном, а в реалізації цих ефектів беруть участь M- і H-холіно- та β -адренорецептори.

Ключові слова: таурин, шлункова секреція, амінокислоти, холінорецептори, адренорецептори, нервова система.

ВСТУП

Відомо, що таурин (2-аміноетансульфонова кислота) є високостабільною сполукою, яка мало метаболізується в організмі, проте виявлена майже в усіх тканинах. Вона синтезується в організмі ссавців з сірко-вмісних амінокислот метіоніну та цистеїну, а ззовні надходить з їжею переважно тваринного походження та є для людини відносно незамінним нутрієнтом. Ця амінокислота не входить до складу білкових молекул, за винятком деяких пептидів. Найбільша кількість таурину знаходиться у збудливих тканинах – ЦНС, серцевому і скелетних м'язах та ендокринних залозах. Ферменти, які беруть участь у проміжних процесах синтезу таурину, виявлені в синапсоматомах і мікросоматомах головного мозку, сітківці, печінці, нирках [1, 7]. Таурин впливає на функціонування фоторецепторів сітківки, імунологічну пам'ять, скоротливу

активність серцевого м'яза, обмін ліпідів у печінці, має протекторну дію проти токсичних пошкоджень серця, печінки та шлунка, гальмує імпульсну активність нейронів різних ділянок головного мозку [3, 15, 17]. Таурину властива радіопротекторна, мембраностабілізувальна дії, він проявляє антиаритмічні та нормотензивні властивості. Ендогенна концентрація таурину є інформативним показником при патологічних станах, які супроводжуються розвитком метаболічного дисбалансу [4]. Ця амінокислота кон'югує в гепатоцитах з жовчними кислотами, утворюючи таурохолеві жовчні кислоти, затримує розвиток гіперхолестеринемії, покращує обмін ліпідів у печінці, прискорює регресію атеросклеротичних пошкоджень після утримання тварин на дієті, збагаченій тригліцеридами і холестерином [20]. Таурин змінює вміст глюкози в плазмі крові, за наявності інсуліну

© О.А. Грінченко, П.І. Янчук

стимулює гліколіз і посилює утилізацію кисню в серцевому м'язі [9, 12]. Властивості цієї сполуки дають змогу використовувати лікарські препарати на його основі як ефективні засоби при ураженнях печінки, патологіях серцево-судинної та центральної нервової систем, катарактах і глаукомі, цукровому діабеті, інтоксикаціях [6, 11]. Крім того, враховуючи високий ступінь нутрієнтної незамінності таурину, виправдана необхідність його введення до складу продуктів харчування, насамперед дитячого [5]. Тому є актуальним з'ясування механізмів дії цієї амінокислоти на фізіологічні функції як з фундаментальної точки зору, так і для застосування таурину в медичній практиці для метаболічної корекції і лікування багатьох захворювань. Великий вміст таурину в секреторних клітинах травного тракту та структурах нервової системи зумовлює вивчення його ролі у регуляції секреторних процесів.

Метою нашої роботи було дослідити вплив таурину на рівень секреції та хімічний склад шлункового соку, а також з'ясувати роль нервової системи у реалізації цього впливу.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на безпородних собаках з фістулами шлунка за умов хронічного експерименту після 18-годинної харчової депривації. Впродовж 1,5 год спостереження збирали 6 п'ятнадцятихвилинних проб шлункового соку, враховуючи його об'єм (в мілілітрах). У кожній пробі шлункового соку визначали концентрації вільної соляної кислоти в титрувальних одиницях, пепсину (за методом Ханта) і загального білка (спектрофотометричним методом у міліграмах на мілілітр), компонентів аденілової системи (спектрофотометрично) в міліграм-процентах з наступним розрахунком дебітів зазначених складових та концентрації Na^+ і K^+ (за

допомогою фотометрії полум'я) в мілімолях на літр.

У дослідженнях використовували препарати: таурин ("Sigma", США), стимулятор шлункової секреції гістамін ("Здоров'я", Україна), М-холінолітик атропін ("Дарниця", Україна), гангліоблокатор бензогексоній ("Здоров'я", Україна), селективний блокатор передачі в парасимпатичних гангліях ІЕМ-1678 (Інститут експериментальної медицини РАМН, Санкт-Петербург), α -адреноблокатор фентоламін ("Гегюжес пірмої", Литва), β -адреноблокатор обзидан ("Арцнайmittelwerk Дрезден ГмбХ", Німеччина).

У першій частині експерименту були проведені дві серії досліджень. У першій серії собакам внутрішньошлунково вводили таурин у дозі 1,4 мг/кг, розчинений у 30 мл фізіологічного розчину і через 15 хв спостерігали за змінами базальної секреції; в другій серії – застосовували таурин у тій самій дозі *per os* і через 14 год досліджували базальну секрецію. Контролем для цих досліджень були проби шлункової секреції без застосування стимулятора.

Вплив таурину на шлункову секрецію, стимульовану гістаміном вивчали у другій частині експерименту. Були проведені три серії досліджень: 1) вводили внутрішньошлунково таурин, а через 15 хв гістамін (0,05 мг/кг, підшкірно); 2) вводили *per os* таурин і через 2 год гістамін; 3) вводили *per os* таурин, а гістамін через 14 год. Контролем при цьому були тварини, яким окремо вводили гістамін.

У третій частині експерименту вивчали зміни шлункової секреції у собак під впливом таурину за умов застосування холіно- і адреноблокаторів. Таурин вводили *per os* за 14 год до введення гістаміну. Атропін (0,06–0,08 мг/кг), бензогексоній (1,4–1,6 мг/кг), фентоламін (2–3 мг/кг), обзидан (0,2–0,3 мг/кг) вводили підшкірно, за 20 хв, а ІЕМ-1678 (2 мг/кг) підшкірно за 30 хв до введення стимулятора. Контролем

для цих досліджень були проби із пероральним введенням тваринам таурину за 14 год до введення гістаміну без застосування блокаторів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета прикладних програм Statistica 6.0, використовуючи критерій t Стьюдента, оскільки результати мали нормальний розподіл при перевірці їх за тестом Шапіро–Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності між контролем і дослідом при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення таурину собакам як внутрішньошлунково, так і *per os* не стимулювало секрецію шлункових залоз поза періодом травлення, але змінювало секрецію слизу (табл. 1). Однак такі зміни кількості виділеного слизу і рН шлункового вмісту не змінювали властивостей секреції поза періодом травлення. В таких пробах кількість виділеного слизу була меншою від контрольних значень. Результати наших досліджень доповнили дані інших авторів про вплив таурину на утворення слизу в шлунку. Так, при пошкодженні шлунка

щурів індометацином застосування таурину зменшувало розвиток виразкових уражень на 45 % порівняно з контролем. При цьому таурин не спричиняв збільшення вмісту слизу в шлунку і не призводив до нормалізації підвищеної кислотності шлунка [15].

Для встановлення модулювальних ефектів таурину, досліджували його вплив на шлункову секрецію, стимульовану гістаміном. Таурин застосовували за 15 хв (перша серія), 2 год (друга серія) і 14 год (третя серія) до введення стимулятора. Виявилось, що характер змін секреції шлункового соку на введення гістаміну в усіх серіях експериментів був однаковий, проте рівень шлункової секреції та якісний склад секрету в цих трьох серіях дещо різні. Таурин посилював стимульовану гістаміном шлункову секрецію у собак (табл.2). У першій серії дослідів рівень секреції шлункового соку за 1,5 год дослідів під впливом таурину перевищував контрольні значення на 35,9 % ($P < 0,01$), дебіт вільної соляної кислоти в секреті збільшився на 55,68 % ($P < 0,001$), а дебіт пепсину – на 82,8 % ($P < 0,001$; див. табл. 2). Зміни дебіту загального білка з перебігом дослідів не були односпрямованими, і в сумі за дослід

Таблиця 1. Вплив таурину на секрецію шлункових залоз поза періодом травлення ($M \pm m$; $n=55$)

Показники секреції	П'ятнадцятихвилинні проміжки часу	Базальна секреція	Введення таурину	
			внутрішньо-шлунково	<i>per os</i>
Об'єм секрету, мл	1	2,35±0,29	1,5±0,33	1,75±0,19
	2	1,71±0,26	1,08±0,4	2,25±1,08
	3	1,97±0,37	0,57±0,07*	0,81±0,1
	4	2,14±0,31	0,6±0,1*	0,76±0,08***
	5	1,74±0,36	1,0±0,22	0,86±0,15
	6	1,17±0,16	1,21±0,63	0,85±0,26
	всього	9,94±0,84	4,81±1,23**	6,17±1,11**
рН	1	6,0±0,19	5,14±0,14*	5,09±0,07***
	2	5,95±0,2	5,17±0,17	5,25±0,11*
	3	6,12±0,22	5,14±0,09*	5,17±0,08***
	4	6,21±0,2	5,1±0,1**	5,03±0,03***
	5	6,35±0,17	5,17±0,1***	5,23±0,14***
	6	6,24±0,18	5,07±0,07**	5,18±0,12***

Примітка. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ щодо базальної секреції.

Таблиця 2. Зміни показників гістамінової шлункової секреції під впливом таурину при різній тривалості періоду після його застосування (M±m; n=115)

Показники секреції	П'ятнадцятихвилинні проміжки часу	Гістамін	Таурин і гістамін		
			0,25 год	2 год	14 год
Об'єм шлункового соку, мл	1	7,37±0,95	10,10±1,37	21,55±2,54***	21,16±3,16***
	2	19,62±1,12	25,33±2,20*	40,40±2,54***	37,80±2,97***
	3	16,97±1,29	27,43±2,76***	33,25±2,11***	35,66±2,84***
	4	7,70±0,99	12,70±2,31*	18,55±1,62***	26,50±2,44***
	5	6,22±0,83	6,17±1,17	3,37±0,45*	12,96±1,76**
	6	3,70±0,61	1,27±0,28**	1,82±0,46*	7,47±1,51*
	всього	61,09±3,98	83,00±7,53**	118,95±7,39***	140,06±10,04***
Дебіт вільної НСІ, ммоль	1	1,11±0,17	0,81±0,07	2,61±2,61***	2,54±0,44**
	2	2,72±0,17	3,32±0,24*	5,42±0,4***	4,96±0,44***
	3	2,3±0,20	4,02±0,34***	4,65±0,33***	4,98±0,43***
	4	1,48±0,19	2,08±0,27	2,58±0,23***	3,66±0,35***
	5	0,71±0,13	0,95±0,13	0,42±0,06	1,99±0,27***
	6	0,42±0,12	0,23±0,05	0,20±0,07	1,28±0,32*
	всього	7,31±0,62	11,38±0,85***	15,89±1,11***	18,38±1,53***
Дебіт пепсину, %	1	100	156,02*	248,75***	257,88**
	2	100	136,75*	125,79***	186,53*
	3	100	146,67*	143,33	215,69**
	4	100	110,97	168,96*	288,09***
	5	100	138,17	102,69	237,1**
	6	100	174,19	177,42	503,22**
	всього	100	182,81***	233,01***	272,21***
Дебіт загального білка, мг	1	13,15±2,05	15,42±1,28	12,68±1,55	20,28±2,13*
	2	13,07±0,95	11,42±1,04	13,49±1,95	15,46±1,35
	3	11,29±1,34	8,16±0,67	7,60±0,73	12,18±1,39
	4	8,21±0,96	3,84±0,30***	5,44±0,67	11,78±1,40*
	5	3,28±0,74	4,18±1,01	2,82±0,44	11,76±1,75***
	6	1,88±0,6	2,52±0,43	2,81±0,62	7,10±1,55***
	всього	42,09±3,7	43,28±2,35	42,29±2,89	67,56±4,81***
Дебіт компонентів аденілової системи, мг	1	2,7±0,31	2,69±0,3	2,07±0,35	2,54±0,30
	2	2,55±0,21	2,18±0,42	2,16±0,49	2,5±0,29
	3	1,71±0,18	1,02±0,13*	0,71±0,14***	2,11±0,30
	4	1,36±0,16	0,33±0,04***	0,61±0,12**	1,49±0,15
	5	1,08±0,16	0,55±0,08**	0,42±0,06***	1,24±0,16
	6	1,02±0,15	0,39±0,07**	0,48±0,13	0,88±0,16
	всього	6,57±0,58	6,76±0,67	5,99±0,80	9,15±0,69**
Концентрація N _a ⁺ , ммоль/л	1	31,06±4,13	50,14±4,02**	15,41±2,89**	25,83±2,79
	2	12,11±1,73	18,83±2,31*	9,56±2,40	14,28±2,28
	3	10,74±1,52	14,72±1,88	8,20±1,38	13,46±2,21
	4	14,62±2,25	20,64±3,40	9,3±1,20	16,28±2,37
	5	22,13±2,40	21,84±5,12	22,81±3,26	24,98±5,52
	6	27,43±5,93	40,55±19,70	36,96±5,44	25,63±4,59
Концентрація K ⁺ , ммоль/л	1	15,56±0,53	11,2±0,70***	12,89±0,61**	14,04±1,05
	2	12,25±0,65	7,58±0,5***	9,97±0,59*	11,89±0,68
	3	10,13±0,76	5,91±0,47***	7,49±0,57*	8,87±0,81
	4	9,63±0,6	6,09±0,60***	5,73±0,58***	8,47±0,74
	5	7,68±0,72	6,16±0,91	6,96±0,62	8,77±0,89
	6	8,33±0,30	11,75±5,90	12,12±1,99	9,87±1,91

Примітка. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 щодо секреції на гістамін.

значення цього показника не відрізнялися від контролю. Дебіт компонентів аденілової системи (КАС) у шлунковому соку собак під впливом таурину був вірогідно нижчим за контрольні значення, починаючи з третьої проби і до кінця дослідів, однак у сумі за дослід значення цього показника не відрізнялися від контролю. Концентрація Na^+ під впливом таурину в першій серії цієї частини експерименту була більшою від контролю, а концентрація K^+ зменшувалася лише впродовж першої години спостереження.

У другій серії цієї частини дослідження рівень шлункової секреції під впливом таурину вірогідно перевищував контрольні значення в першу годину дослідів, після чого різко зменшувався і був нижчим від контрольного. Всього за час дослідів під впливом таурину об'єм шлункового соку збільшився на 94,7 % ($P < 0,001$) щодо контролю. При цьому зростали і дебїти основних складових шлункового соку. Так, дебіт вільної соляної кислоти за час спостереження збільшився на 117,4 % ($P < 0,001$), а дебіт пепсину – на 133 % ($P < 0,001$) відносно контролю. Зміни дебіту загального білка під впливом таурину як у динаміці, так і в сумі за дослід не відрізнялися від контролю. Дебіт КАС у шлунковому соку при цьому був меншим від контрольних значень упродовж дослідів. Зміни концентрації Na^+ під впливом таурину виявляли тенденцію до зниження впродовж першої години спостереження, а концентрація K^+ в шлунковому соку з перебігом дослідів під впливом амінокислоти зменшувалася.

У третій серії цієї частини експерименту об'єм шлункового соку під впливом таурину достовірно перевищував контрольні значення впродовж усього дослідів, і в сумі за дослід збільшився на 129,3 % ($P < 0,001$), поряд з цим збільшувався дебіт як вільної соляної кислоти, так і пепсину. В сумі за дослід дебіт вільної соляної кислоти в соку збільшився на 151,4 % ($P < 0,001$), а дебіт

пепсину на 172,2 % ($P < 0,001$) щодо контролю. Дебіт загального білка в шлунковому соку на таурин під час гістамінової секреції також перевищував контрольні значення впродовж усього періоду спостереження і були більшими щодо таких на один лише гістамін у сумі за дослід на 60,5 % ($P < 0,001$). Дебіт КАС при цьому перевищив контрольні значення на 39,3% ($p < 0,01$). Концентрація Na^+ і K^+ в шлунковому соку у цій серії експерименту істотно не відрізнялася від контролю.

Для з'ясування участі нервової системи у реалізації ефектів таурину на гістамінову шлункову секрецію, ми здійснювали блокаду рецепторів різних ланок автономної нервової системи. Для цього застосовували атропін, бензогексоній та ІЕМ-1678. У цій частині експериментів контролем були дослідів без введення блокаторів. Наші дослідження засвідчили (табл.3), що впродовж дослідів об'єм секретованого шлункового соку під впливом таурину та гістаміну на тлі блокади М-холінорецепторів був значно меншим порівняно з таким при дії таурину і гістаміну (контроль). У сумі за дослід на тлі дії атропіну кількість шлункового соку була меншою, ніж у контролі на 72 % ($P < 0,001$). Біохімічний аналіз шлункового соку показав, що при дії амінокислоти на тлі блокади М-холінорецепторів дебіт вільної соляної кислоти в соку за весь час дослідів знизився на 79,1 % ($P < 0,001$), дебіт пепсину на 66,6 % ($P < 0,05$), дебіт загального білка на 55,5 % ($P < 0,01$), дебіт КАС на 61,6 % ($P < 0,001$) щодо контрольних значень. На тлі блокади Н-холінорецепторів бензогексонієм об'єм шлункового соку на введення таурину та гістаміну в сумі за дослід зменшився на 78,1 % ($P < 0,001$), дебіт вільної соляної кислоти в ньому на 84,1 % ($P < 0,001$), дебіт пепсину на 62,4 % ($P < 0,05$), дебіт білка на 52 % ($P < 0,001$) і дебіт КАС на 60,3 % ($P < 0,001$) щодо контролю. Загальний об'єм шлункового соку після введення таурину і

Таблиця 3. Тривалий вплив таурину (1,4 мг/кг, per os) на шлункову секрецію, стимульовану гістаміном до і після застосування холіно- і адrenoблокаторів (M±m; n=84)

Показники секреції	Проби соку	Таурин і гістамін	Таурин, атропін і гістамін	Таурин, бензогексоній і гістамін	Таурин, ІЕМ-1678 і гістамін	Таурин, фентоламін і гістамін	Таурин, обзидан і гістамін
Об'єм соку, мл	1	21,16±3,16	2,08±0,43*	2,41±0,70***	8,75±1,06	12,87±2,27	18,28±5,12
	2	37,80±2,97	9,51±1,91***	12,51±2,49***	18,62±0,26**	50,66±4,64*	30,65±2,43
	3	35,66±2,84	13,28±2,96***	9,93±1,74***	14,25±1,45***	47,23±3,16*	28,20±2,52
	4	26,50±2,44	10,1±2,99**	4,32±0,99***	7,75±0,59***	29,23±4,04	16,30±2,72*
	5	12,96±1,76	5,54±1,74	1,13±0,08***	2,37±0,26**	11,40±3,75	5,12±1,24*
	6	7,47±1,51	1,50±0,39	1,20±0,27*	1,00±0,01*	11,19±6,09	5,0±3,20
	всього	140,06±10,04	39,26±6,69***	30,62±4,98***	52,75±1,55***	158,28±14,42	96,59±9,46*
Дебіт вільної НСІ, ммоль	1	2,54±0,44	0,12±0,02	0,14±0,05**	0,61±0,04*	1,12±0,26*	0,90±0,21
	2	4,96±0,44	0,98±0,20***	1,29±0,3***	2,12±0,03**	6,34±0,60	3,11±0,27*
	3	4,98±0,43	1,59±0,39***	1,12±0,23***	1,72±0,16***	6,81±0,46*	3,83±0,40
	4	3,66±0,35	1,31±0,52**	0,38±0,13***	0,91±0,07***	4,29±0,59	2,20±0,40*
	5	1,99±0,27	0,64±0,27*	0,04±0,01***	0,20±0,01**	1,94±0,63	1,23±0,25
	6	1,28±0,32	0,04±0,01	0,05±0,01*	0,04±0,01	1,75±0,98	0,82±0,65
	всього	18,38±1,53	3,84±0,97***	2,93±0,59***	5,49±0,18***	20,99±2,09	10,97±0,97*
Дебіт пепсину, %	1	100	0,48*	16,9	19,23	51,89	66,86
	2	100	32,11	60,3	19,25*	110,15	89,25
	3	100	61,46	56,09	16,09*	75,64	67,09
	4	100	62,02	28,29*	10,56*	72,36	45,38
	5	100	82,31	1,59**	9,98	84,13	60,32
	6	100	2,89*	2,24*	1,92*	53,21	32,69
	всього	100	33,41	37,6*	16,76*	62,01	70,46
Дебіт загального білка, мг	1	20,28±2,13	0,07±0,01***	7,98±5,07*	8,56±2,93*	23,37±4,14	35,56±5,75*
	2	15,46±1,35	11,86±3,5	15,49±1,62	5,85±1,01**	33,05±4,82***	35,7±5,98***
	3	12,18±1,39	12,82±2,71	10,63±1,04	3,07±0,48**	17,74±3,2	16,71±1,73
	4	11,78±1,40	9,02±1,67	6,6±0,65*	2,13±0,35**	10,13±1,22	13,74±1,92
	5	11,76±1,75	2,79±1,57*	0,07±0,01**	1,51±0,69*	6,19±1,07	10,59±1,57
	6	7,10±1,55	0,07±0,01*	0,07±0,01*	0,07±0,01*	2,40±2,00	2,85±1,97
	всього	67,56±4,81	30,06±5,82**	32,41±4,16***	19,49±3,74***	85,99±7,45	92,25±11,87*
Дебіт компонентів аденілової системи	1	2,54±0,30	0,09±0,01***	0,16±0,07***	1,30±0,19*	1,05±0,23*	1,43±0,23*
	2	2,5±0,29	1,45±0,30	1,85±0,32	1,15±0,02*	2,12±0,26	1,63±0,23
	3	2,11±0,30	1,68±0,35	1,61±0,25	0,67±0,07*	1,86±0,24	0,89±0,14*
	4	1,49±0,15	1,28±0,33	0,82±0,08	0,43±0,03**	1,1±0,22	0,53±0,15**
	5	1,24±0,16	1,44±0,83	0,09±0,01	0,22±0,04**	0,89±0,18	0,33±0,05**
	6	0,88±0,16	0,09±0,01**	0,09±0,01**	0,09±0,01**	0,82±0,15	0,07±0,01***
	всього	9,15±0,69	3,51±0,87***	3,63±0,58***	3,52±0,18***	6,57±0,65	4,86±0,36**

Примітка. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 щодо секреції на таурин і гістамін.

гістаміну на тлі селективної блокади передачі в парасимпатичних гангліях ІЕМ-1678 був меншим на 62,3 % (P<0,001), дебіт вільної соляної кислоти на 70,1 % (P<0,001), дебіт пепсину на 83,2 % (P<0,05), дебіт загального білка на 71,1 % (P<0,001) і дебіт КАС на 61,5 % (P<0,001) порівняно з відповідними значеннями показників після

введення таурину і гістаміну. Таким чином, порівняння змін шлункової секреції при застосуванні таурину і гістаміну (контроль) та після введення холіноблокаторів за умов дії таурину і гістаміну свідчить про те, що при блокаді рецепторів парасимпатичної нервової системи не спостерігається вираженого посилювального ефекту таури-

ну на гістамінову шлункову секрецію.

Для з'ясування можливої участі симпатичного відділу автономної нервової системи у реалізації впливів таурину на секрецію шлункових залоз були проведені дослідження із застосуванням адреноблокаторів. Результати наших досліджень показали, що зміни секреторних показників під впливом таурину і гістаміну під час блокади α -адренорецепторів фентоламіном не були вірогідними (див. табл.3).

Нами встановлено, що на тлі блокади β -адренорецепторів обзиданом об'єм секретованого шлункового соку під впливом таурину і гістаміну впродовж спроби був дещо меншим порівняно з таким без застосування блокатора. В сумі за дослід він зменшився на 31 % ($P < 0,05$). Дебіт вільної соляної кислоти в соку за таких умов зменшився на 40,3 % ($P < 0,05$), а пепсину на 37,8 % ($P > 0,05$) при зменшенні дебіту загального білка на 36,5 % ($P < 0,05$). Отримані нами результати показали, що амінокислота таурин не повною мірою проявляє свій потенціувальний вплив на шлункову секрецію, стимульовану гістаміном, за умов блокади β -адренорецепторів.

Отримані нами результати свідчать про те, що амінокислота таурин може брати участь у регуляції секреторної діяльності шлунка, збільшуючи як об'ємну швидкість секреції, стимульованої гістаміном, так і дебіти основних складових шлункового соку (вільної соляної кислоти та пепсину). Інтенсивність секреторних реакцій на одночасну дію таурину та гістаміну залежить від тривалості періоду між застосуванням амінокислоти і стимулятора шлункової секреції. Так, показники секреції шлункових залоз собак були найвищими за умов введення гістаміну через 14 год після перорального прийому таурину. Окрім збільшення основних секреторних показників, у цій серії дослідів спостерігалось статистично вірогідне збільшення дебітів

загального білка і КАС у шлунковому соку, чого не відбувалося в двох перших серіях цієї частини експерименту. Відомо, що гістамін не викликає значної секреції пепсину шлунковими залозами. В наших дослідженнях секреція ферменту посилювалася за умов застосування амінокислоти порівняно з секрецією після введення лише гістаміну. При цьому абсолютний вміст ферменту пропорційно збільшувався з подовженням тривалості періоду між застосуванням таурину та введенням гістаміну. Зміни концентрації іонів у шлунковому соку мали дещо інший характер. Так, концентрація Na^+ в секреті перевищувала контроль через 15 хв після введення таурину, тоді як через 2 год значення цього показника різко знижуються і стають меншими від контрольних. Через 14 год концентрація Na^+ в шлунковому соку наближається до контрольних значень. Через 15 хв після введення таурину цей показник знижувався відносно контролю, що спостерігалось і через 2 год, а через 14 год наближався до контрольних значень.

Таким чином, можна припустити, що таурин може здійснювати стимулювальний вплив на секрецію шлункового соку за участю парасимпатичного та симпатичного відділів АНС. За даними сучасних джерел літератури на паріетальних клітинах залоз слизової оболонки шлунка розташовані M_2 -холінерецептори, а на їхніх головних клітинах виявлені рецептори M_1 - і M_3 -підтипу [19, 22], які опосередковують холінергічну стимуляцію секреції соляної кислоти та пепсиногену, тоді як тауринових рецепторів на секреторних клітинах не виявлено, як і рецепторів до медіаторів симпатичної нервової системи. Механізми впливу таурину на секреторні процеси в шлунку нині не встановлені. Порівнюючи отримані нами результати з даними джерел літератури, слід відмітити, що таурин і некон'юговані літохолати не змінювали базальну та карбахолінову секрецію на

ізолюваних клітинах шлунка щурів, в той час як кон'югована жовчна кислота літохолетаурин викликала трикратне збільшення секреції пепсиногену головними клітинами шлунка [19]. Автори встановили, що атропін гальмував як карбахолінову, так і викликану літохолетаурином секрецію пепсиногену та дійшли висновку, що літохолетаурин є частково холінергічним агоністом. Отримані нами результати показали, що застосування атропіну, бензогексонію і IEM-1678 гальмувало шлункову секрецію на введення таурину та гістаміну, що дає змогу припустити, що таурин може бути частковим холінергічним агоністом. Деякі автори вказують на можливу нейромедіаторну роль таурину в організмі [18]. Наявність специфічних рецепторів до таурину хоч і припускається, однак до цього часу експериментально не доведена. В літературі є відомості про те, що таурин може впливати на провідність іонних каналів, що лежить в основі пригнічувального або збуджувального впливу всякого подразника на клітину. Так, автори в досліджах на базолатеральних мембранах проксимальних звивистих каналців кроликів встановили наявність двох типів калієвих каналів, провідність калію по одному з яких пригнічувалася таурином. Цей підтип калієвих каналів блокувався АТФ [16]. Іншими авторами було показано, що під впливом вазопресину, цАМФ, екстрацелюлярного АТФ і глюкогону збільшувалося звільнення таурину в печінці [21]. В природних умовах амінокислота таурин функціонує як осмоліт, антиоксидант, модулятор іонів кальцію та анальгетик. Застосування таурину у щурів з діабетом послаблювало дефіцит нервової провідності та попереджало зниження порогів механічного і термічного збудження, а також латентного періоду збудження. У малих чутливих нейронах L4-L6 дорсального ганглія цих щурів відновлення концентрації іонів кальцію у відповідь на дію KCl уповільнювалось, а за участю таурину

значною мірою відновлювалося [14]. Ці дані вказують на те, що таурин є важливим у регуляції обміну іонів кальцію в нейронах. Ендогенні амінокислоти β -аланін і таурин можуть брати участь у регуляції тонічної активності гліцинових рецепторів і здійснювати на них активуючий вплив у культурі клітин гіпокампа [8]. Крім того, таурин збільшує чутливість панкреатичних β -клітин до глюкози внаслідок змін мітохондріального метаболізму [10]. Можливо, це відбувається внаслідок підвищення кальцієвого струму, що призводить до посилення мітохондріальних метаболічних функцій і збільшення співвідношення АТФ/АДФ. Разом з тим дані літератури показують наявність у шлунку β_3 -підтипу адренорецепторів [13]. Агоністи β_3 -адренорецепторів стимулюють вивільнення гастрину та соматостатину з антральних клітин шлунка, що дає підставу зробити висновок про зв'язок гуморальних регуляторів шлункової секреції з симпатичною нервовою системою. Участь цього відділу нервової системи у реалізації ефектів таурину на шлункову секрецію може бути опосередкована шлунково-кишковими гормонами та пептидами. Слід зауважити, що оскільки таурин майже не катаболізується в організмі [1], а пік його концентрації в крові спостерігається через 2; 4,5; і 7 год після прийому *per os* і те, що концентрація таурину в крові повертається до вихідних значень через 24–30 год [2], на рівні цілісного організму до секреторної відповіді шлунка на введення таурину можуть бути залучені відразу декілька механізмів його дії. Відомо, що незважаючи на те, що таурин не є метаболічно активною сполукою та не входить до складу білкових молекул, за виключенням деяких пептидів, підвищення концентрації таурину в тканинах супроводжується посиленням синтезу білка. В наших досліджах також збільшувався абсолютний вміст загального білка в шлунковому соку під впливом

таурину. Слід відмітити, що значною мірою це підвищення пов'язане з синтезом пепсиногену залозистими клітинами слизової оболонки.

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про те, що амінокислота таурин активно впливає на функціональний стан шлункових залоз собак при їх симуляції гістаміном. При цьому на тлі підвищення рівня секреції шлункового соку спостерігається посилення секреції соляної кислоти і пепсину, що покращує перетравлювальні властивості секрету. Змінюються також і вміст загального білка, КАС, а також концентрації Na^+ і K^+ в шлунковому соку. Блокада холінорецепторів усуває, а адренорецепторів зменшує підсилювальний вплив таурину на гістамінову шлункову секрецію, що свідчить про участь холінергічних і адренергічних механізмів у реалізації ефектів амінокислоти.

О.А. Гринченко, П.І. Янчук

ПУТИ ВЛИЯНИЯ ТАУРИНА НА ЖЕЛУДОЧНУЮ СЕКРЕЦИЮ

В хронических опытах на собаках с фистулами желудка изучали влияние аминокислоты таурин на желудочную секрецию. Показано, что таурин не вызывал секрецию кислого желудочного сока вне периода пищеварения, но усиливал желудочную секрецию, стимулированную гистамином, увеличивал содержание свободной соляной кислоты и пепсина в соке. Таурин, введенный за 0,25 и 2 ч до инъекции гистамина, изменял концентрацию Na^+ и K^+ в желудочном соке. Наибольшие изменения основных показателей желудочной секреции наблюдались через 14 ч после применения аминокислоты. В таких экспериментах также показано увеличение содержания общего белка и компонентов адениловой системы в желудочном соке. Блокада холінорецепторів атропином, бензогексонієм і ІЭМ-1678 уменьшала эффекты таурин на желудочную секрецию, стимулированную гистамином. Блокада α -адренорецепторов фентоламином не устраняла тауриновые эффекты на гистаминовую желудочную секрецию. Установлено, что в условиях блокады β -адренорецепторов обзиданом таурин не в полной мере проявляет свое потенцирующее влияние на желудочную секрецию, стимулированную гистамином. Полученные результаты свидетельствуют о том, что таурин влияет на секрецию желудочного сока, стимулированную гистамином, а реализация этих эффектов осуществляется с участием

М- и Н-холино- и в-адренорецепторов.

Ключевые слова: таурин, желудочная секреция, аминокислоты, холінорецепторы, адренорецепторы, нервная система.

O.A.Grinchenko, P.I.Yanchuk

THE PATHWAYS OF TAURINE INFLUENCES ON GASTRIC SECRETION

In chronic experiments with dogs with gastric fistulas the influence of amino acid taurine on the gastric secretion was investigated. We showed that taurine did not cause acid gastric secretion out of digestion, but increased the gastric secretion stimulated by histamine, increased the contents of gastric acid and pepsine in gastric secretes. When administered either 15 minutes or two hours prior histamine injection, taurin affected the Na^+ and K^+ concentrations in gastric juice. The greatest changes in the basic indices of gastric secretion were observed 14 hours after administration of taurin. In these experiments the contents of total proteins and components of adenile system in gastric secretes was increased also. Blockade of cholіnoreceptors by atropine, benzohexonium and IEM-1678 decreased the effects of taurine on gastric secretion stimulated by histamine. Blockade of α -adrenoreceptors by phentolamine did not prevent the taurine-induced effects on histamine-stimulated gastric secretion. It is established that under conditions of the blockade of β -adrenoreceptors by obsidane, taurine does not manifest entirely its potentiating influence on the gastric secretion stimulating by histamine. The data obtained indicate that taurine affects gastric secretion stimulated by histamine and realization of this effect occurs through M- and N-cholino- and в-adrenoreceptors.

Key words: taurine, gastric secretion, amino acids, cholіnoreceptors, adrenoreceptors, nervous system.

National Taras Shevchenko University of Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гуревич В.С. Таурин и функция возбудимых клеток. – Л.: Наука. – 1986. – 112 с.
2. Елизарова Е.П., Ходжакулиев Б.Г., Заповская Л.И., Черногубова Е.В. Фармакокинетика таурин // Кардиология. – 1995. – 34, №4. – С.69–70.
3. Звягінцева Т.В., Киричок Л.Т., Кратенко Г.С. Кореція таурином стану ЦНС, наднирникових залоз та фагоцитарної активності при експериментальному стресі // Фармакологія та лікар. токсикологія. – 2008. – №56 (67). – С.58–63.
4. Нефёдов Л.И., Угляница К.Н., Солдатов В.С. и др. Механизмы регуляции метаболического баланса: результаты и перспективы применения аминокислот и их композиций в качестве универсальных биологически активных природных регуляторов направленного действия и эффективных лекарственных препаратов // Весці НАН Беларусі (сер. биол. наук). –

1998. – №4. – С.62–70.
5. Шейбак Л.Н., Нефёдов Л.И., Шейбак М.П. Значение таурина для растущего организма // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 1995. – **40**, №5. – С.48–52.
 6. Barkhatova V.P., Panteleeva E.A., Alferova V.P. et al. Neurotransmission mechanism of movement disorders in multiple sclerosis // Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S.S.Korsakova. – 2007. – **107**, №2. – P.43–48.
 7. Beetsch J.W., Olson J.E. Taurine synthesis and cysteine metabolism in cultured rat astrocytes: effects of hyperosmotic exposure // AJP: Physiol. Cell Physiol. – 1998. – **274**. – P.C866–C874.
 8. Chattapacorn S.C., McMahon L.L. Pharmacological Characterization of Glycine-Gated Chloride Currents Recorded in Rat Hippocampal Slices // J. Neurophysiol. – 2002. – **87**, №3. – P.1515–1525.
 9. Gavrovskaja L.K., Ryzhova O.V., Safonova A.F. et al. Effect of taurine and thioctamide on carbohydrate metabolism and the antioxidant system in rats with experimental diabetes // Eksp. Klin. Farmacol. – 2008. – **71**, №3. – P.34–35.
 10. Han J., Bae J.H., Kim S.Y., Lee H.Y., Jang B.C., Lee I.K., Cho C.H., Lim J.G., Suh S.II, Kwon T.K., Park J.W., Ryu S.Y., Ho W.K., Earm Y.E., Song D.K. Taurine increases glucose sensitivity of UCP2-overexpressing β -cells by ameliorating mitochondrial metabolism // AJP: Endocrinol. Metab. – 2004. – **287**. – P.E1008–E1018.
 11. Kim S.J., Ramesh C., Gupta H. Taurine-diabetes interaction: from involvement to protection // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. – 2007. – **21**, №3–4. – P.63–77.
 12. Lampson W.G., Kramier J.H., Schaffer S.W. Potentiation of the actions of insulin by taurine // Canad. J. Physiol. Pharmacol. – 1983. – **61**. – P.57–63.
 13. Lévasséur S., Bado A., Laigneau J.P., Moizo L., Reyl-Desmars F., Lewin M.J. Characterization of a beta 3-adrenoceptor stimulating gastrin and somatostatin secretions in rat antrum // AJP: Gastrointest. and Liver Physiol. – 1997. – **272**, Is.5. – P.G1000–G1006.
 14. Li F., Obrosova I.G., Abatan O., Tian D., Larkin D., Stuenkel E.L., Stevens M.J. Taurine replacement attenuates hyperalgesia and abnormal calcium signaling in sensory neurons of STZ-D rats // AJP: Endocrinol. Metab. – 2005. – **288**. – P.E29–E36.
 15. Motawi T.K., Abd Elgawad H.M., Shahin N.N. Modulation of indomethacin-induced gastric injury by spermine and taurine in rats // J. Biochem. Molec. Toxicol. – 2007. – **21**, №5. – P.280–288.
 16. Noulin J.F., Brochiero E., Lapointe J.Y., Laprade R. Two types of K channels at the basolateral membrane of proximal tubule: inhibitory effect of taurine // AJP: Renal Physiol. – 1999. – **277**, №2. – P.F290–F297.
 17. Oja S.S., Saransaari P. Pharmacology of taurine // Proc. West Pharmacol Soc. – 2007. – **50**. – P.8–15.
 18. Ortenblad N., Young J.F., Oksbjerg N., Nielsen J.H., Lambert I.H. Reactive oxygen species are important mediators of taurine release from skeletal muscle cells // AJP: Cell Physiol. – 2003. – **284**, №6. – P.C1362–C1373.
 19. Raufman J.P., Zimniak P., Bartoszko–Malik A. Lithocholytaurine interacts with cholinergic receptors on dispersed chief cells from guinea pig stomach // J. Pharmacol. and Exp. Therap. – 1998. – **274**, №6. – P.G997–G1004.
 20. Waters E., Wang J.H., Redmond H.P., Wu O.D., Kay E., Bouchier-Hayer D. Role of taurine in preventing acetaminophen – induced hepatic injury in the rat // Gastrointestinal and Liver Physiol. – 2001. – **280**. – P.G127–1279.
 21. Wettstein M., Peters–Regehr T., Kubitz R., Fischer R., Holneicher C., Monnighoff I., Haussinger D. Release of osmolites induced by phagocytosis and hormones in rat liver // J. Cell Biol. online. – 2000. – **278**. – P.431–439.
 22. Xie G., Drachenberg C., Yamada M. Cholinergic agonist-induced pepsinogen secretion from murine gastric chief cells is mediated by M1 and M3 muscarinic receptors // AGP: Gastrointest. Liver Physiol. – 2005. – **289**, №3. – P.G521–G529.

В.В. Кірошка, Ю.О. Тіщенко

Вплив вихідного гормонального статусу тварини-реципієнта на морфологічний стан та ендокринну функцію алотрансплантата оваріальної тканини

Метою дослідження був порівняльний аналіз морфофункціональних характеристик трансплантатів оваріальної тканини статевозрілих і неонатальних тварин залежно від початкового гормонального статусу тварин-реципієнтів. Алотрансплантацію оваріальної тканини або яєчників неонатальних щурів під капсулу нирки здійснювали одночасно з оваріоектомією та через 2 міс після неї. Аналіз отриманих результатів показав, що розвиток трансплантата оваріальної тканини визначається його віком і початковим гормональним статусом реципієнта. Трансплантати оваріальної тканини статевозрілих щурів зберігають свою морфологію та ендокринну функцію до 60 діб спостереження у тварин-реципієнтів з початковим гормональним статусом, що відповідає нормі. Тоді як розвиток трансплантатів яєчників неонатальних щурів до статевозрілої стадії відбувається при їх трансплантації реципієнтам з гормональним статусом, що відповідає кастрованим тваринам, тобто з низькою концентрацією статевих гормонів і підвищеним вмістом фолікулостимулювального гормону. Ключові слова: яєчник, трансплантація, оваріоектомія, реципієнт, фолікулостимулювальний гормон.

ВСТУП

Одним із основних завдань у репродуктивній фізіології нині є вивчення та ідентифікація факторів, які запускають ріст фолікулів, призводять до їх розвитку та атрезії.

Відомо, що фолікулостимулювальний гормон (ФСГ) є одним із основних ендокринних факторів, який спрямовано діє на комплексний процес дозрівання фолікулів. Так, в експериментах *in vivo* [4, 13] показано, що самиці у ліній мишей, дефіцитних за рецепторами до ФСГ або з відсутністю β -субодиниць у структурі його молекули, позбавлені репродуктивної функції. У цій лінії спостерігався фолікулогенез до преантральної стадії без овуляції. Згідно з літературними даними [14], у нормі *in vivo* ФСГ бере участь у створенні антральної порожнини за допомогою ди-

ференціації клітин гранульози, індукуючи в них експресію рецепторів до лютеїнізуючого гормону (ЛГ). ФСГ також регулює зв'язок між ооцитом і клітинами гранульози [6]. Показано [10], що взаємодія ФСГ з такими низькомолекулярними факторами, як kit-ліганд, активін А, інгібін, епідермальний або інсуліноподібний фактор росту індукує ріст фолікулів. Ці чинники опосередковано діють на гонадотропіни, таким чином регулюючи клітинні взаємодії аутокринним і паракринним механізмами. Беручи до уваги ці важливі функції ФСГ, цей гормон зазвичай додають у преантральну фолікулярну культуру *in vitro* для підтримки росту фолікула [7]. Відсутність ФСГ у культуральному середовищі призводить до дозрівання лише 10–17 % фолікулів, тоді як при додаванні його спостерігається дозозалежний ефект фолікулогенезу [5]. Максимальний розвиток фолікулів виявлено за

© В.В. Кірошка, Ю.О. Тіщенко

наявності 100 мМО/мл ФСГ [15].

Нині майже немає відомостей про те, як початковий гормональний статус тварини, а саме концентрація ФСГ у плазмі крові, впливає безпосередньо на фолікулогенез в оваріальній тканині, імплантованої тваринам після оваріоектомії.

Мета нашої роботи – порівняльний аналіз морфофункціональних характеристик трансплантатів оваріальної тканини статевозрілих і неонатальних тварин залежно від початкового гормонального статусу тварин-реципієнтів.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 60 тримісячних самицях щурів лінії Вістар масою 120–165 г, які перебували в стандартних умовах віварію ІПКіК НАН України.

Утримання та використання лабораторних тварин відповідало положенням Європейської конвенції захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986) і Національним загальноприйнятим нормам біоетики.

Тварин-реципієнтів розділили на групи: 1-ша – щури, яким алотрансплантацію оваріальної тканини статевозрілих тварин здійснювали одночасно з оваріоектомією; 2-га – через 2 міс після оваріоектомії; 3-тя – щури, яким алотрансплантацію яєчників неонатальних щурів здійснювали одночасно з оваріоектомією; 4-та – через 2 міс після оваріоектомії.

Контролем для експериментальних груп були тварини без оваріоектомії (K_1) та тварини з двобічною оваріоектомією (K_2).

Операції тваринам здійснювали в стерильних умовах під комбінованим наркозом (кетамін – 2,5 г, ксилазин – 1 мг/100 г), який вводили внутрішньоочеревинно. Для трансплантації оваріальної тканини яєчники видаляли під час оваріоектомії статевозрілих щурів, фрагментували ($0,5 - 1 \text{ мм}^3$) і поміщали в стерильне середовище 199 при кімнатній температурі. Яєчники не-

натальних тварин трансплантували цілком. Сайтом гетеротопічної трансплантації була капсула лівої нирки. Час проведення трансплантації – 20 хв.

На 30-ту та 60-ту добу після трансплантації робили евтаназію тварин за допомогою ефірного наркозу. Кров для аналізу брали внутрішньоосерцевою пункцією, центрифугували при 3000 g протягом 20 хв. Зібраний супернатант заморожували при -18°C для подальшого визначення вмісту гормонів. Вміст естрадіолу і прогестерону в плазмі крові тварин-реципієнтів визначали методом радіоімунологічного аналізу з використанням стандартних тест-наборів РІА-естрадіол-СТ і РІА-прогестерон-СТ (Білорусь) відповідно до інструкції.

Екстерповану нирку з трансплантатом фіксували в 10%-му розчині нейтрального формаліну для проведення подальшого гістологічного дослідження. Зрізи формували гематоксилі-еозином за стандартною методикою [1]. Гістологічні препарати вивчали за допомогою оптичного мікроскопа при збільшеннях об'єктиву $\times 20$ і $\times 40$. Мікрофотозйомку здійснювали на мікроскопі "Carl Zeiss Axio Observer Z1".

На гістологічних зрізах визначали фолікули на різних стадіях розвитку та класифікували згідно з методикою Gougeon [16] на: примордіальні – ооцит оточений одним шаром сплосчених клітин гранульози; первинні – ооцит оточений одним шаром кубічних клітин гранульози; преантральні – ооцит оточений більше ніж двома шарами клітин гранульози, розташованих на базальній мембрані, навколо якої знаходяться поодинокі тека-клітини; антральні – крупний ооцит оточений кількома шарами клітин гранульози з антральною порожниною, що містить фолікулярну рідину. Навколо базальної мембрани розташовується кілька шарів тека-клітин.

Аналіз морфометрії здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Axio-Vision Documentation.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених досліджень показано, що при трансплантації оваріальної тканини статевозрілих тварин в 1-ї групи на 30-ту добу (рис. 1, I) спостерігалася структура, що морфологічно відповідає нормі. Відзначено фолікули різної зрілості, характерні як для ранніх стадій фолікулогенезу (примордіальні та первинні; див. рис. 1, I,а), так і для більш пізніх (преантральні та антральні; див. рис. 1, I,б,в). Максимальний діаметр антральних фолікулів становив 671,25 мкм. Крім цього були жовті тіла (див. рис. 1, I,г), заповнені радіальними тяжами лютеїнових клітин.

При імпланстації оваріальної тканини тваринам 2-ї групи на 30-ту добу структура трансплантата була аналогічною (див. рис. 1, II). Вміст естрадіолу знаходився в межах $0,28 \text{ нмоль/л} \pm 0,06 \text{ нмоль/л}$ як у 1-й, так і у 2-й групі, а прогестерону – $65,57 \pm 9,09$ та $51,67 \text{ нмоль/л} \pm 8,77 \text{ нмоль/л}$ (рис. 2) відповідно, що достовірно не відрізняється від фізіологічної норми.

Імплантація яєчників неонатальних тварин призводила до розвитку фолікулярних кіст у щурів 3-ї групи на 30-ту добу спостереження. У 33 % тварин цієї групи відзначалася структура тканини, характерна для яєчників статевозрілих тварин (див. рис. 1, III). Проте трансплантат яєчників неонатальних щурів складається з великої фолікулярної кісти діаметром 2377,87 мкм, що заповнена дрібнозернистим секретом, слабозабарвлений еозином (див. рис. 1, III, е). Порожнина кісти оточена кількома шарами витягнутих фібробластоподібних клітин. По периферії кісти розташовані ділянки тканини з фолікулами діаметром від 168 до 400 мкм і жовтими тілами. У 67 % тварин цієї групи імплантовані яєчники на 30-ту добу розвивалися в тканину, характерну для склерокістозних яєчників (див. рис. 1, IV). Вся площа трансплантата представлена фолікулярними порожнинами діаметром від 338 до

856 мкм, заповненими незабарвленою фолікулярною рідиною або забарвленим дрібнозернистим секретом (див. рис. 1, IV, е).

Розвиток трансплантатів яєчників неонатальних щурів у тварин-реципієнтів 4-ї групи виявив на 30-ту добу спостереження наявність усіх стадій фолікулогенезу та жовтих тіл (див. рис. 1, V). Антральні фолікули мають діаметр від 262 до 1061 мкм, що можна порівняти з розміром антральних фолікулів нативної оваріальної тканини (див. рис. 1, V,в). Слід зазначити, що у трансплантатах 67 % щурів досліджуваної групи виявлені фолікулярні кісти розміром від 340 до 5396,69 мкм, внутрішня стінка яких вистелена декількома шарами витягнутих фібробластоподібних клітин (див. рис. 1, VI, е). Концентрація статевих гормонів у групах 3 та 4 становила: естрадіолу – $0,18 \pm 0,03$ і $0,22 \text{ нмоль/л} \pm 0,04 \text{ нмоль/л}$, а прогестерону – $44,32 \pm 3,6$ і $34,58 \text{ нмоль/л} \pm 6,48 \text{ нмоль/л}$ (див. рис. 2) відповідно, що достовірно вище, ніж у кастрованих тварин.

При збільшенні терміну спостереження до 60 діб у 67 % тварин 1-ї групи трансплантати оваріальної тканини продовжували зберігати структуру, типову для морфології яєчників статевозрілих особин (рис. 3, I). Тоді як у 33 % тварин-реципієнтів фолікулів не виявлено (див. рис. 3, II). Їх морфологія представлена строю оваріальної тканини та кістоподібними структурами. Видно, що порожнини кіст (див. рис. 3, II,е) заповнені гетерогенним секретом і оточені багат шаровою вистілкою клітинами гранульози та фібробластів. Діаметр порожнини кісти становить близько 570 мкм.

Якісно інша картина спостерігається у розвитку морфології оваріальної тканини на 60-ту добу при трансплантації тваринам, попередньо оваріоектомованим. При цьому розвитку трансплантата не виявлено. Структура трансплантатів представлена кістами та жовтими тілами (див. рис. 3, III,е,г). Кісти мають діаметр від 461 до

1375 мкм і характеризуються стінками, що складаються з декількох шарів лютеїнових

клітин, або ж оточені 2–3 шарами фібро-бластоподібних клітин. У частини кіст

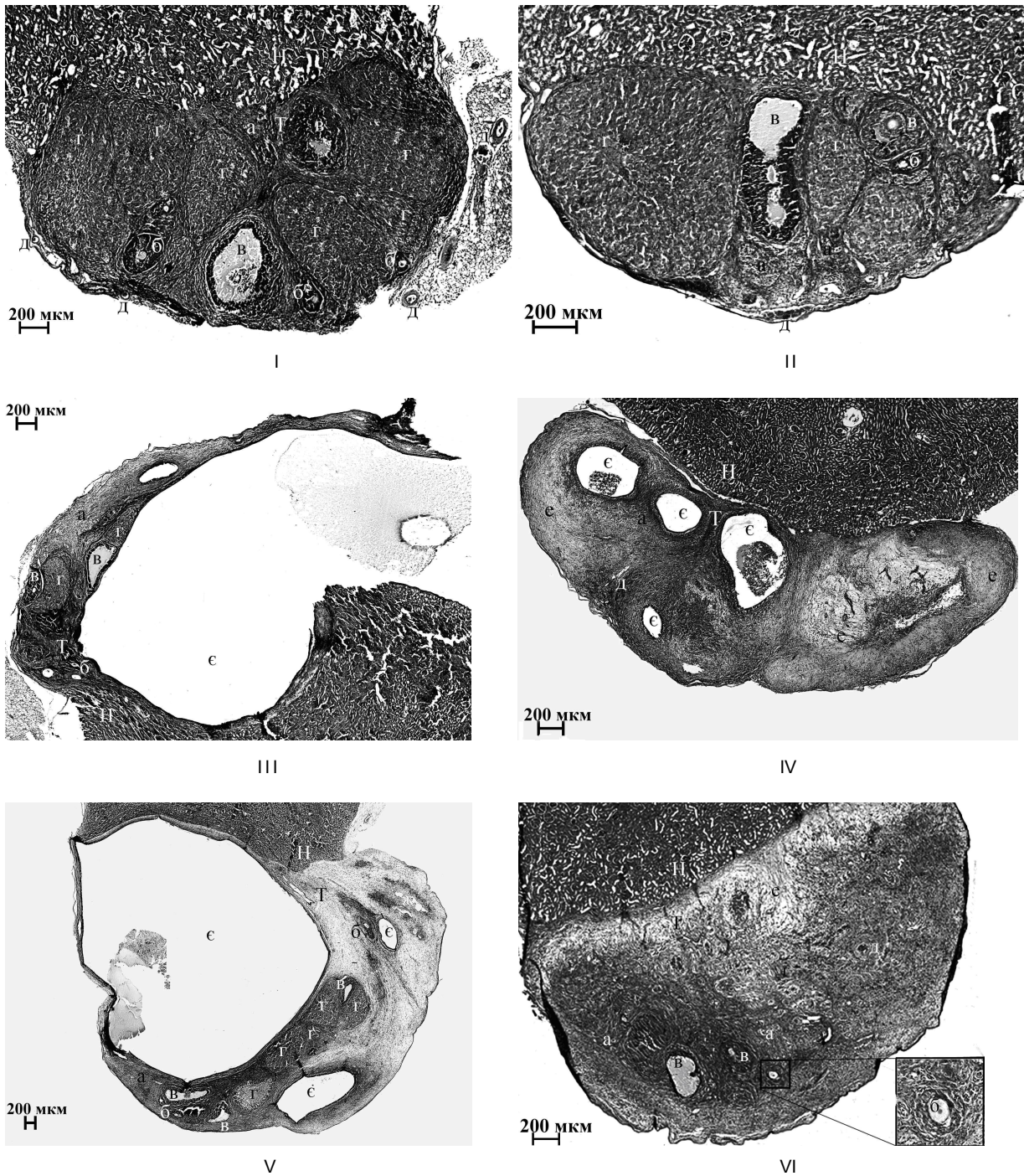


Рис. 1. Трансплантати оваріальної тканини статевозрілих і неонатальних тварин на 30-ту добу спостереження: I – 1-ша група; II – 2-га група; III, IV – 3-я група; V, VI – 4-та група; а – примордіальний фолікул, б – преантральний фолікул, в – антральний фолікул, г – жовте тіло, д – судина, е – ділянка фіброзу тканини, ж – порожнина кісти, з – тканина нирки, и – тканина трансплантата

порожнина заповнена гетерогенним секретом, який, імовірно, містить мононуклеари. Вивчення ендокринної функції показало зниження вмісту статевих гормонів у тварин групи 2 на 60-ту добу спостереження в порівнянні з групою 1. Так, вміст естрадіолу становив $0,19 \pm 0,05$ і $0,24$ нмоль/л $\pm 0,04$ нмоль/л, прогестерону $39,18 \pm 6,05$ та $52,01$ нмоль/л $\pm 6,41$ нмоль/л відповідно (див. рис. 2).

Трансплантати яєчників неонатальних щурів у тварин 3-ї групи (див. рис. 3, IV) на 60-ту добу спостереження є структурою, що складається зі строми оваріальної тканини з поодинокими примордіальними фолікулами. Значна площа досліджуваного трансплантату представлена склерозованою оваріальною тканиною, що пронизана густою мережею кровоносних судин (див. рис. 3, IV, д). У цієї групи тварин спостерігалось 2 різних типи кістоподібних структур. Один тип представлений порожнинами, оточеними вузьким колом витягнутих фібробластоподібних клітин, з прозо-

рим або ж слабозабарвленим гомогенним внутрішнім вмістом (див. рис. 3, IV, е). У деяких кіст спостерігається виселення мононуклеарів у порожнину. Середній діаметр порожнини близько 630 мкм. Інший тип кістоподібних структур (див. рис. 3, IV, ж) виселений високопризматичним чітко контурованим епітелієм з прозорим внутрішнім вмістом. Діаметр порожнини був від 275 до 675 мкм.

У тварин 4-ї групи розвиток трансплантатів яєчників неонатальних щурів на 60-у добу відбувався в двох напрямках. У 50 % тварин спостерігалися примордіальні та первинні фолікули діаметром від 88 до 152 мкм, а також жовті тіла (див. рис. 3, V, а). У решти 50 % структура трансплантата була такою, як у групі 3 (див. рис. 3, VI). Слід зазначити, що в усіх тварин цієї групи на значній площі трансплантату був фіброз оваріальної тканини. Вміст статевих гормонів був значно нижчим від фізіологічних значень. Так, вміст естрадіолу становив $0,12 \pm 0,02$ і $0,16$ нмоль/л $\pm 0,03$

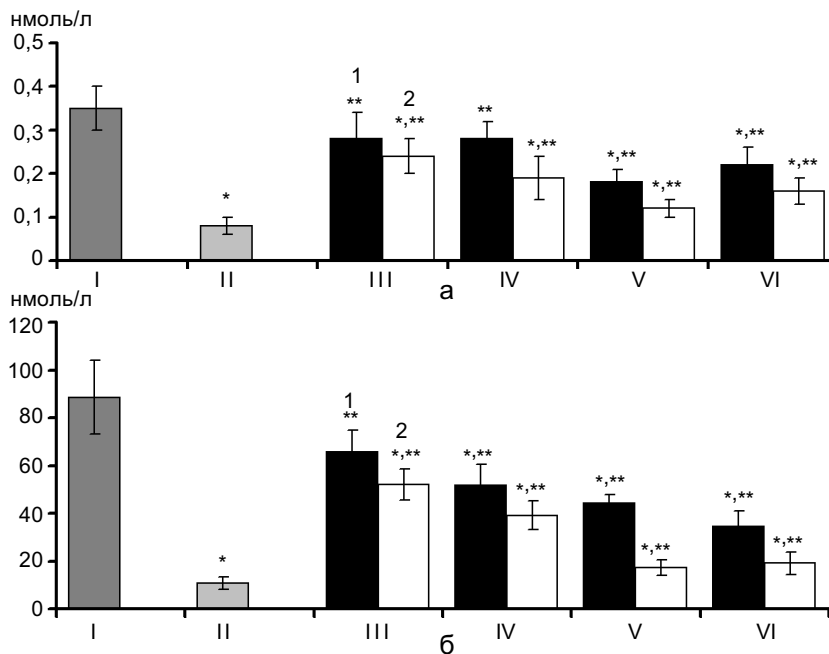


Рис. 2. Концентрація естрадіолу (а) та прогестерону (б) у плазмі крові тварин з трансплантацією статевозрілої оваріальної тканини чи яєчників неонатальних щурів: 1 – на 30-ту добу, 2 – на 60-ту добу спостереження. I – контроль без оваріоектомії (K_1), II – контроль з двобічною оваріоектомією (K_2), III – 1-ша група, IV – 2-га група, V – 3-тя група, VI – 4-та група. * $P < 0,05$ відносно K_1 , ** $P < 0,05$ відносно K_2

нмоль/л, прогестерону – $17,34 \pm 3,26$ та $19,03 \text{ нмоль/л} \pm 4,83 \text{ нмоль/л}$ у тварин груп 3 і 4 відповідно.

Аналізуючи представлені результати, можна сказати, що розвиток транслтантів та їх ендокринна функція залежить від віку

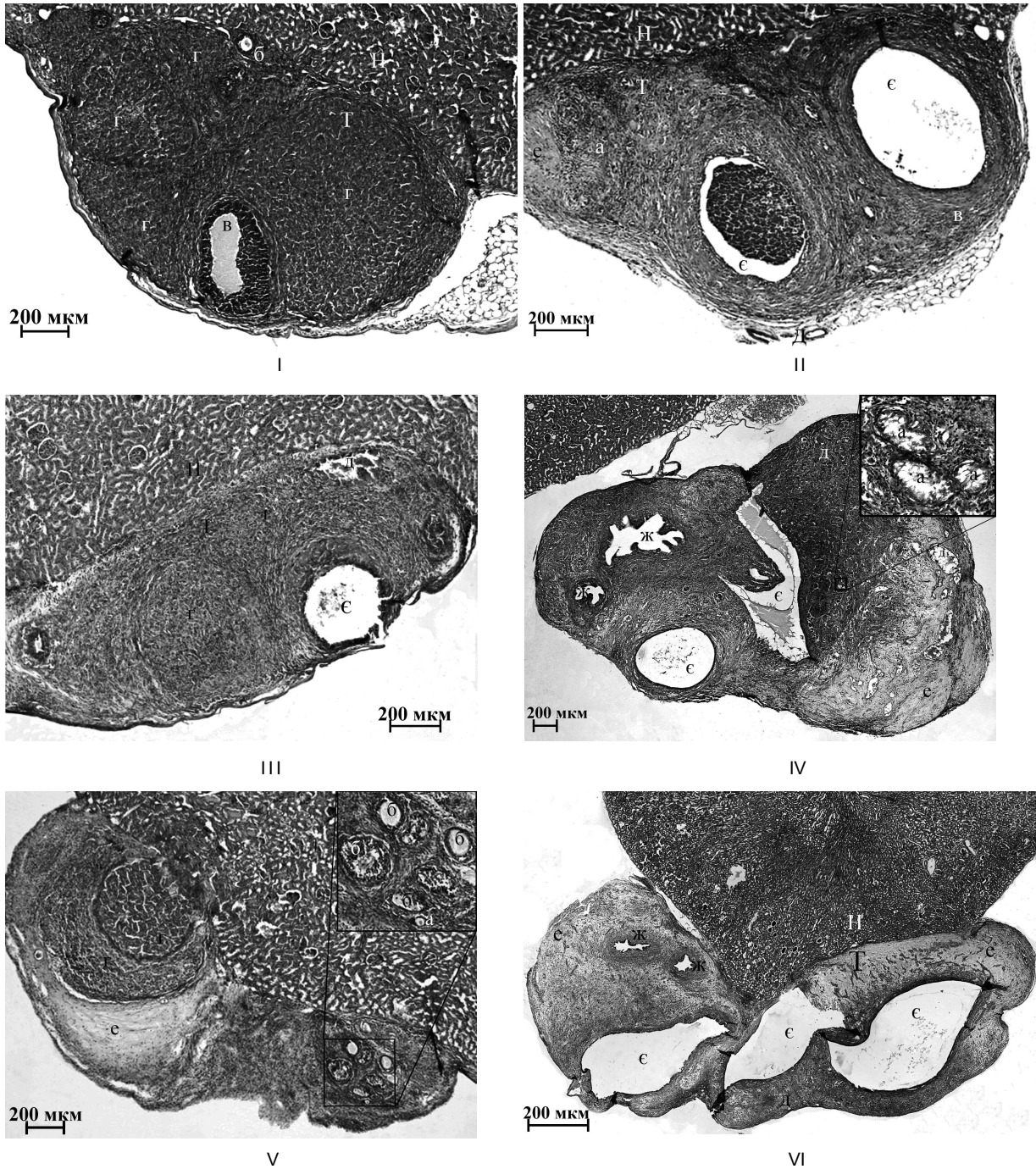


Рис. 3. Трансплантати оваріальної тканини статевозрілих і неонатальних тварин на 60-ту добу спостереження: I, II – 1-ша група; III – 2-га група; IV – 3-тя група; V, VI – 4-та група 4; а – примордіальний фолікул, б – преантральний фолікул, в – антральний фолікул, г – жовте тіло, д – судина, е – ділянка фіброзу тканини, ж – порожнина кістоми, И – тканина нирки, Т – тканина трансплантата

імплантованої оваріальної тканини, а також від гормонального статусу тварини-реципієнта. Розвиток трансплантантів яєчників неонатальних тварин у всіх досліджених випадках виявив формування фолікулярних кіст і епітеліальних кістом, що, очевидно, пов'язано з порушенням нейроендокринного регулювання гіпоталамус-гіпофізарною системою. Показано [11], що гормональний дисбаланс при ранньому постнатальному розвитку може змінювати експресію регуляторних генів в оваріальній тканині і призводити до кістозних утворень. У наших експериментах гормональний дисбаланс при трансплантації яєчників статевозрілим особинам можна пояснити такими факторами. З одного боку, підвищеним вмістом естрадіолу ($5 \cdot 10^{-7}$ моль/л) [3] в яєчниках у новонароджених щурів в перші 24 год постнатального розвитку і, як наслідок цього, подальше порушення нейроендокринних зв'язків. Як відомо [3], підвищений вміст естрогену в трансплантах яєчників неонатальних тварин може спричинити андрогенізацію оваріальної тканини і підвищення концентрації ЛГ, що на ранніх стадіях фолікулогенезу є причинами подальшого утворення полікістозу. З іншого боку, це більш висока швидкість фолікулогенезу в неонатальних яєчниках з розрахунку на одиницю часу протягом перших 3 тиж після народження в порівнянні з дозріванням примордіальних фолікулів в організмі статевозрілих самиць [12]. Фактори, що визначають швидкість фолікулогенезу залежно від віку оваріальної тканини, до цих пір залишаються не з'ясованими. Один з можливих механізмів, що визначає високу швидкість розвитку фолікула, може бути пов'язаний з високим вмістом гонадотропінів у ранній постнатальний період. Вміст ФСГ в кілька разів вище у 8–16-добових щурів, ніж у 28-добових [12], що певно і визначає активацію примордіальних фолікулів. Згідно з нашими дослідженнями, при трансплантації яєчників

неонатальних щурів тваринам-реципієнтам з підвищеною концентрацією ФСГ відбувається їх морфологічний розвиток до статевозрілої стадії на 30-ту добу спостереження. В цьому разі епітеліальні кістони відсутні на тривалих строках після трансплантації (60 діб). Цей факт, вочевидь, можна пояснити, взаємозв'язком високого вмісту ФСГ у тварин-реципієнтів і високого вмісту естрагенів в яєчниках неонатальних щурів у момент трансплантації, що й вплинуло на динаміку розвитку трансплантів неонатальних яєчників.

При трансплантації оваріальної тканини статевозрілих самиць на тривалих термінах спостереження (60 діб) ми маємо іншу картину розвитку трансплантів залежно від початкового гормонального статусу тварин-реципієнтів. У тварин з підвищеною концентрацією ФСГ відзначалась наявність гормонально активних кіст на 60-ту добу. У цьому разі підвищений вміст ФСГ гіперстимулює ріст фолікулів. Відповідно до літературних даних, це відбувається без циклічності, безперервно і при явній нестачі ЛГ [2, 9]. Отже, відбувається ріст фолікул без овуляції, що закономірно призводить до розвитку фолікулярних кіст, безперервно секретуючих естрогени, які у свою чергу пригнічують секрецію ФСГ і стимулюють вироблення ЛГ. У деяких працях відзначена кореляція між підвищеною секрецією ЛГ, високим вмістом гонадотропінів і патологічним розвитком оваріальної тканини.

ВИСНОВКИ

1. Розвиток трансплантата оваріальної тканини визначається його віком і початковим гормональним статусом реципієнта.
2. Трансплантати оваріальної тканини статевозрілих щурів зберігають свою морфологію та ендокринну функцію до 60 діб спостереження у тварин-реципієнтів з початковим гормональним статусом, що

відповідає нормі.

3. Розвиток трансплантатів яєчників неонатальних шурів до статевозрілої стадії відбувається при їх трансплантації реципієнтам з гормональним статусом, що відповідає кастрованим тваринам, тобто з низькою концентрацією статевих гормонів і підвищеним вмістом ФСГ.

В.В. Киروشка, Ю.О. Тищенко

ВЛИЯНИЕ ИСХОДНОГО ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА ЖИВОТНОГО-РЕЦИПИЕНТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ И ЭНДОКРИННУЮ ФУНКЦИЮ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ

Целью исследования был сравнительный анализ морфо-функциональных характеристик трансплантатов овариальной ткани половозрелых и неонатальных животных в зависимости от исходного гормонального статуса животных-реципиентов. Аллотрансплантацию овариальной ткани или яичников неонатальных крыс под капсулу почки осуществляли одновременно с овариоэктомией и через 2 мес после нее. Анализ полученных результатов показал, что развитие трансплантата овариальной ткани определяется его возрастом и исходным гормональным статусом реципиента. Трансплантаты овариальной ткани половозрелых крыс сохраняют свою морфологию и эндокринную функцию к 60-м суткам наблюдения у животных-реципиентов с исходным гормональным статусом, соответствующим норме. Тогда как развитие трансплантатов яичников неонатальных крыс до половозрелой стадии осуществляется при их трансплантации реципиентам с гормональным статусом, который соответствует кастрированным животным, то есть с низкой концентрацией половых гормонов и повышенным содержанием фолликулостимулирующего гормона.

Ключевые слова: яичник, трансплантация, овариоэктомия, реципиент, фолликулостимулирующий гормон.

V.V. Kiroshka, J.O. Tischenko

THE EFFECT OF INITIAL HORMONAL STATUS OF RECIPIENT ANIMALS FOR MORPHOLOGICAL STATE AND ENDOCRINE FUNCTION OF OVARIAN TISSUE TRANSPLANT

The aim of investigation was a comparative analysis of morpho-functional characteristics of allografts of mature ovarian tissue and neonatal ovary depending on initial hormonal status of recipient animals. Rats' mature ovarian tissue and neonatal

ovary were transplanted under renal capsule simultaneously with ovariectomy and 2 months later. Data analysis indicated that the development of ovarian tissue transplant was determined by its maturity and initial hormonal status of recipient. Mature ovarian tissue transplants preserve morphology and endocrine function to the 60th day after transplantation to the recipient animals with the initial hormonal status that corresponds to the norm. Neonatal ovary transplants are developed to the mature stage following transplantation to recipients with hormonal status that corresponded to the ovariectomized animals, that is, low concentration of sex hormones and an increased level of follicle-stimulating hormone.

Key words: ovary, transplantation, ovariectomy, recipient, follicle-stimulating hormone.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov;

V.N. Karazin's Kharkov National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 645 с.
2. Пищулин А.А., Карпова Е.А. Овариальная гиперандрогения и метаболический синдром // Рус. мед. журн. – 2001. – 9, № 2. – С. 93–108.
3. Abbott D.H., Padmanabhan V., Dumesic D.A. Contributions of androgen and estrogen to fetal programming of ovarian dysfunction // *Reprod. Biol. Endocrin.* – 2006. – 17, № 4. – P. 1–8.
4. Abel M.H., Wootton A.N., Wilkins V. et al. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction // *Endocrinology.* – 2000. – № 141. – P. 1795–1803.
5. Adriaens I., Cortvrindt R., Smits J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence // *Hum. Reprod.* – 2004. – № 19. – P. 398–408.
6. Albertini D.F., Combelles C.M., Benecchi E., Carabatsos M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development // *Reproduction.* – 2001. – № 121. – P. 647–653.
7. Callejo J., Jauregui M.T., Valls C. et al. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: six-month control of estradiol and follicle-stimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants // *Fertil. and Steril.* – 1999. – 72, № 3. – P. 513–517.
8. Cortvrindt R., Hu Y., Smits J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture // *Hum. Reprod.* – 1998. – № 13. – P. 1292–1302.
9. Danilovich N., Roy I., Sairam M.R. Ovarian pathology and high incidence of sex cord tumors in follitropin

- receptor knockout (FORKO) mice // *Endocrinology*. – 2009. – **142**, № 8. – P. 3673–3684.
10. Erickson G.F., Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors // *Fertil. and Steril.* – 2001. – № 76. – P. 943–949.
 11. Hirshfield A.N. Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats // *Biol. Reprod.* – 1992. – № 47. – 466–472.
 12. Hirshfield A.N., DeSanti A.M. Patterns of ovarian cell proliferation in the rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum // *Biol. Reprod.* – 1995. – № 53. – 1208–1221.
 13. Kumar T.R., Wang Y., Lu N., Matzuk M.M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility // *Nature Genetics*. – 1997. – № 15. – P. 201–204.
 14. Wang Y., Rippstein P.U., Tsang B.K. Role and gonadotrophic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein expression during rat ovarian follicular development in vitro // *Biol. Reprod.* – 2003. – № 68 – P. 610–619.
 15. Nayudu P.L., Osborn S.M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro // *J. Reprod. Fert.* – 1992. – № 95. – P. 349–362.
 16. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results // *Hum. Reprod.* – 1986. – № 1. – P. 81–87.

*Ін-т проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків;
Харків. нац. ун-т ім. В.Н. Каразіна
E-mail: vvkiroshka@mail.ru; tischenko k.h.@mail.ru*

*Матеріал надійшов до
редакції 11.09.2009*

ОГЛЯДИ

УДК 612.825.8:616.89-008.46+577.352.4

О.П. Костюк, Т.Ю. Король, С.В. Король, С.В. Романенко, В.О. Пінченко,
П.Г. Костюк

Зміна кальцієвої сигналізації як один з механізмів патогенезу хвороби Альцгеймера та діабетичної полінейропатії

В огляді описується вплив пептиду β -амілоїду на функціональну активність внутрішньоклітинних і плазмалемних кальційрегулювальних структур нейронів культури гіпокампа щурів: мітохондрій і потенціалкерованих кальцієвих каналів відповідно. Проведено порівняльний аналіз значення плазмалемальних структур для перебігу таких нейродегенеративних захворювань, як діабетична полінейропатія та хвороба Альцгеймера.

Ключові слова: мітохондрія, хвороба Альцгеймера, діабетична полінейропатія, нейродегенеративні захворювання, нейрони, гіпокамп, амілоїд, плазматичні кальцієві канали, кальцій.

ВСТУП

Іони кальцію мають велике значення для функціонування клітин взагалі і нейронів зокрема. Вони відіграють важливу роль в опосередкуванні таких процесів, як екзоцитоз, синаптична передача, транскрипція генів, синаптична пластичність і багато інших. Концентрація кальцію всередині клітини змінюється завдяки функціонуванню не тільки різноманітних мембранних каналів, але й внутрішньоклітинних кальційрегулювальних структур (ендоплазматичного ретикулума, мітохондрій) і кальційзалежних АТФаз. Концентрація кальцію всередині клітини підтримується на низькому рівні внаслідок функціонування вищезгаданих структур і становить у середньому 100 нм [1]. Дослідження останніх десяти років дають підґрунтя вважати, що мітохондрії беруть безпосередню участь у регуляції вмісту внутрішньоклітинного кальцію не тільки у

фізіологічних умовах, але і при різних патологічних станах [32].

Відома ціла низка нейродегенеративних хвороб, які супроводжуються змінами кальцієвої сигналізації, серед яких є хвороба Альцгеймера (ХА) та діабетична полінейропатія. Основними нейропатологічними характеристиками ХА є наявність у мозку хворих характерних нейрофібрилярних філаментів (утворених з патологічно видозміненого τ -білка, що входить до складу цитоскелета), сенільних бляшок, основним структурним компонентом яких є β -амілоїд ($A\beta$), а також вираженою дегенерацією нейронів переважно в ділянці гіпокампа та базальних ядер Мейнарта [2, 37]. Процеси нейродегенерації, асоційовані з ХА, залучають складну систему клітинних і молекулярних взаємодій, включаючи компоненти збуджувальної відповіді, зміну виділення нейротрансмітерів, ексайтотоксичне та окисне пошкодження, що призводить до мета-

© О.П. Костюк, Т.Ю. Король, С.В. Король, С.В. Романенко, В.О. Пінченко, П.Г. Костюк

болічних порушень, патологічних відкладень білка, цитоскелетних аномалій і зміну синаптичної пластичності (наприклад, співвідношення процесів довготривалої потенціації та довготривалої депресії з перевагою на останню).

A β являє собою пептид розміром 42 амінокислотних залишків [16, 25], який продукується при розщепленні доволі великого мембранного білка – білка-попередника амілоїду (від англ. amyloid precursor protein – APP). Точні функції як APP, так і A β невідомі, але найбільш імовірним є те, що вони беруть безпосередню участь у синаптогенезі. В організмі людини в умовах як норми, так і патології була виявлена велика кількість різновидів цього пептиду, котрі відрізняються між собою довжиною амінокислотного ланцюга. Експериментально було показано, що при ХА збільшується концентрація довших молекул амілоїдів, а саме молекул з 42 амінокислотними залишками (A β_{1-42}) [10]. Останній наявний у надлишку в мозку, може проявляти нейротоксичні властивості: викликати продукування великої кількості вільних радикалів, збільшувати число активних форм кисню, призводити до пошкодження дендритів нервових клітин, індукувати апоптоз і некроз нейронів, порушувати кальцієвий гомеостаз, зокрема, через збільшення вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо (наприклад, ендоплазматичного ретикулума) [20], а також через канали, сформовані самим A β [17]. Бласс та Гібсон були одними з перших, хто запропонував ідею того, що ХА обов'язково супроводжується порушенням енергетичного метаболізму нейрона [12].

В основі діабетичної полінейропатії лежать сильно виражена гіперглікемія, порушення гліколізу, оксидативний стрес, що призводить до продукування вільних радикалів і порушення функції кальцій-регулювальних структур.

Таким чином, дуже важливим науковим питанням є визначення зміни у функціо-

нуванні потенціалкерованих кальцієвих каналів плазматичної мембрани та їх електрофізіологічних характеристик і кальційзахоплювальної функції мітохондрій у культивованих нейронах гіпокампа щурів за умов 24-годинної інкубації з A β_{1-42} , а також провести порівняння з другим видом нейродегенеративного захворювання – діабетичною полінейропатією.

Проведені нами вимірювання цитоплазматичного базального вмісту Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) у культивованих нейронах гіпокампа після 24-годинної інкубації їх з A β_{1-42} показало, що в стані спокою цей показник був достовірно підвищеним: середній рівень [Ca²⁺]_i в контрольних умовах становив 71,7 нмоль/л \pm 5,4 нмоль/л, а після інкубації з A β_{1-42} він був приблизно вдвічі більшим: 153,4 нмоль/л \pm 11,5 нмоль/л (P<0,05). Таке саме підвищення базального вмісту кальцію було показане на культурі кортикальних нейронів [31]. Однією з причин збільшення його концентрації, можливо, міг бути вхід Ca²⁺ з позаклітинного середовища через канали, сформовані самим A β_{1-42} . Адже в експериментах *in vitro* було встановлено, що A β_{1-40} може формувати кальційпроникні пори в ліпідних бішарах [4]. Також Kawahara та Kuroda показали, що A β_{1-40} формує катіонселективні «канали» в мембранах клітин клітинної лінії GT1-7 з провідністю 50–500 пСм. Активність цих каналів пригнічувалась додаванням 250 мкмоль/л цинку в базовий розчин, в той час як о-фенантролін (хелатор цинку) відновлював її [17]. Подібні результати були одержані також на кортикальних нейронах щурів при використанні A β_{25-35} за допомогою методу patch-clamp у конфігурації perforated patch-clamp. В останньому випадку A β_{25-35} у концентрації понад 10 нмоль/л призводить до виникнення повільного вхідного струму [11]. При цукровому діабеті відповідного підвищення вмісту базального кальцію не спостерігалось.

При дослідженні впливу мітохондрій на амплітуду та кінетику кальцієвих сигналів

ми використовували позаклітинну аплікацію СССР – протонофора, що у концентрації 1–10 мкмоль/л викликає руйнування протонного градієнта на внутрішній мембрані мітохондрій та блокує роботу уніпортера, що в свою чергу призводить до порушення акумулювання ними цитозольного кальцію та підвищення його концентрації у цитоплазмі. Після деполяризації мембрани клітини гіперкалієвим розчином у контрольних умовах амплітуда кальцієвого транзйєнта становила $508 \text{ нмоль/л} \pm 30 \text{ нмоль/л}$ ($n = 15$). При деполяризації ж контрольних клітин гіперкалієвим розчином за наявності СССР (10 мкмоль/л) додатково підвищувався $[\text{Ca}^{2+}]_i$, амплітуда якого достовірно перевищувала (на $23\% \pm 3\%$) величину кальцієвого транзйєнта без СССР, сягаючи значення $625 \text{ нмоль/л} \pm 39 \text{ нмоль/л}$ ($P < 0,05$, $n = 15$). Крім того, уповільнювалася фаза спаду транзйєнта, особливо протягом перших кількох десятків секунд. Це вказує на те, що мітохондрії певною мірою обмежують амплітуду кальцієвого транзйєнта, загальмовуючи його початкову фазу. Швидше за все, концентрація Ca^{2+} у мітохондріях зростає під час фази наростання кальцієвого транзйєнта. Це також може свідчити про наявність певного зв'язку між активністю мітохондрій та функціонуванням каналів плазматичної мембрани.

Ми встановили, що після інкубації нейронів культури гіпокампа з $\text{A}\beta_{1-42}$ змінювалася кінетика кальцієвих сигналів, викликаних прикладанням СССР, розчиненого в гіперкалієвому розчині, порівняно з відповідними значеннями при застосуванні гіперкалієвого розчину без СССР. При зіставленні амплітуд кальцієвих транзйєнтів достовірних змін не спостерігалось на відміну від контрольних показників: при аплікації гіперкалієвого розчину вона становила $644 \text{ нмоль/л} \pm 62 \text{ нмоль/л}$, а при прикладанні гіперкалієвого розчину з СССР – $697 \text{ нмоль/л} \pm 66 \text{ нмоль/л}$ ($n = 9$). Разом з тим відбувалося збільшення півширин

кальцієвих транзйєнтів, що вказує на порушення кальційакумулюючої функції мітохондрій. Така зміна може бути зумовлена, зокрема, зниженням мітохондріального мембранного потенціалу та порушенням функції кальцієвого уніпортера.

Наші результати зіставлені з даними досліджень, які були проведені на фібробластах пацієнтів з ХА, де також було показано зниження захоплення кальцію мітохондріями та збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [14]. Пригнічення мітохондріального метаболізму може бути зумовлене порушенням транспорту глюкози. В експериментах на культивованих нейронах кортекса та гіпокампа при застосуванні $\text{A}\beta$ було показано залежне від його концентрації порушення транспорту ^3H -дезоксиглюкози. Зниження транспорту глюкози в нейронах призводило до зменшення вмісту АТФ [24].

Також можна привести результати наших подальших досліджень, які стосувалися вивчення змін електрофізіологічних характеристик потенціалкерованих кальцієвих каналів. Після інкубації клітин культури гіпокампа з $\text{A}\beta_{1-42}$ вольт-амперні характеристики кальцієвих каналів зазнавали значних змін: амплітуда струмів через потенціалкеровані кальцієві канали достовірно збільшувалась. Усереднене максимальне значення густини струмів у контрольних умовах становило $j_{\text{HVA контр}} = -5,0 \text{ пА/пФ} \pm 0,7 \text{ пА/пФ}$ ($n=6$) при мембранному потенціалі $V_m \approx -5 \text{ мВ}$; після впливу $\text{A}\beta_{1-42}$ густина струму через високопорогові кальцієві канали становила $j_{\text{HVA A}\beta} = -8,5 \text{ пА/пФ} \approx 1,0 \text{ пА/пФ}$ ($P < 0,05$, $n=12$) при мембранному потенціалі $V_m \approx -15 \text{ мВ}$. Таким чином, інкубація нейронів культури гіпокампа з $\text{A}\beta_{1-42}$ призводила до збільшення амплітуди струму через потенціалкеровані кальцієві канали і до зміщення їх вольт-амперної характеристики у бік негативних значень мембранного потенціалу. Наші результати збігаються з експериментальними даними декількох дослідницьких груп, які за допомогою методу фіксації потенціалу

продемонстрували здатність $A\beta$ збільшувати кальцієвий струм у нейронах [8, 30] та клітинній лінії N1E [9]. Було висунуто припущення, що в цьому задіяні потенціалкеровані кальцієві канали L- та N-типу. Лі та співавт. [21] показали, що $A\beta$ також підсилює барієвий струм через кальцієві канали. На культурі нейронів спінальних гангліїв було продемонстровано, що $A\beta_{25-35}$ підсилює кальцієвий струм, причому високопороговий струм після інкубації зазнавав більших змін, ніж низькопороговий [13].

У разі накладання кривих стаціонарної активації та інактивації можна отримати зону їх перекривання, в якій струм ще не повністю інактивований, але при цьому може бути частково активованим. Ця властивість призводить до того, що у вузькому діапазоні потенціалів через кальцієві канали може проходити незначний стаціонарний струм, так званий „window”-струм. На рис. 1 показано криві стаціонарної активації та інактивації в контрольних умовах та після інкубації культури з $A\beta_{1-42}$. Точка α відповідає максимуму „window”-струму в нейронах культури гіпокампа у контрольних умовах. Після впливу $A\beta_{1-42}$ видно, що максимальне значення „window”-струму збільшується і зміщується в бік більш негативних значень мембранного потенціалу (рис. 1, точка δ).

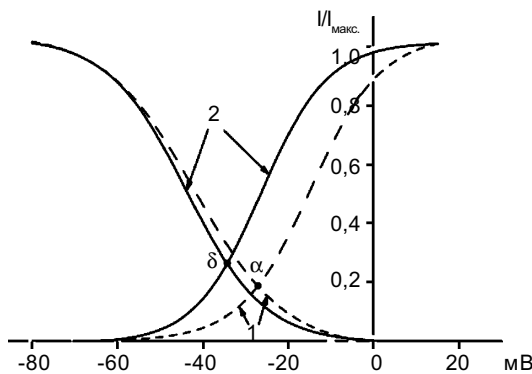


Рис. 1. Криві стаціонарної активації та інактивації інтегрального кальцієвого струму через потенціалкеровані кальцієві канали в контрольних умовах (1) і після інкубації з $A\beta_{1-42}$ (2)

Іншими словами, описане явище може бути однією з причин підвищення внутрішньоклітинного вмісту кальцію в стані спокою клітини, а також може призводити до збільшення збудливості нейронів після їх інкубації з $A\beta_{1-42}$.

При цукровому діабеті навпаки найбільших змін зазнавали лише струми через потенціалкеровані кальцієві канали T-типу (рис. 2).

При цукровому діабеті з концентрацію зовнішньоклітинного кальцію 5 ммоль/л щільність кальцієвих струмів у контрольних умовах становила $83,6 \pm 8,9$ та $32,9$ пА/пФ $\pm 5,3$ пА/пФ, у тварин з діабетом ці показники становили $69,1 \pm 19,7$ та $13,3$ пА/пФ \pm пА/пФ відповідно ($P < 0,005$).

Особливий інтерес становить група каналів TRPC6, оскільки експериментально було показано зміну їх функціональної активності при ХА [27]. Нині уже показана наявність групи TRP каналів не лише на дорсальних гангліях, а й у головному мозку. Ні відміну від них TRPV1 значно менше досліджені при цій патології. Ця група каналів переважно експресується на периферичних C та A γ сенсорних волокнах та активуються підвищенням температури, протонами, арахідоніл допаміном, анадамідом та ліпоксигеназними метаболітами.

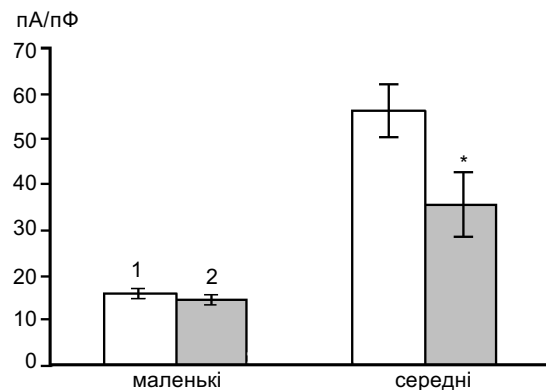


Рис. 2. Порівняння щільності низькопорогових кальцієвих струмів у нейронах малого ($d=28-30$ мкм, $C=22-26$ пФ) і середнього розміру ($d=33-35$ мкм, $C=44-52$ пФ) у контрольній групі (1) і в групі тварин з модельованим діабетом (2)

літами [34]. Сенситизація TRPV1 каналів відбувається за допомогою фосфорилування, яке зумовлене активністю G-білокзв'язаних рецепторів до таких різноманітних ендогенних факторів як простагландіни, брадикінін, глутамат, серотонін, гістамін і нервовим фактором росту [26]. Вони є катіоннеселективними каналами, хоча деякі представники переважно проникні для кальцію [7].

Нарешті, цей тип каналів чутливий до зміни трансмембранного потенціалу. Їх активація, крім всіх вищезазначених факторів, відбувається потенціалзалежним способом при значній деполяризації. Зміни температури призводять до поступових змишень потенціалзалежної активації, що в совою чергу, спричинює виникнення вхідного струму через TRPV1-канали вже при фізіологічних значеннях [36].

Як відомо, TRPV1-канали значно експресовані в гіпокампі, особливо в зоні CA1 [23] та відіграють неабияку роль у таких процесах, як зміна чутливості до рН, модуляція виділення глутамату. Крім того показано, що процес гіперлокомоції, зумовлений цією хворобою, супроводжується зниженням чутливості до капсаїцину в пірамідальних клітинах зони CA1 та посиленням процесу довготривалої депресії відносно процесу довготривалої потенціації, а також змінами електроенцефалограми [29]. Один з запропонованих механізмів цих явищ полягає у тому, що відмічений при ХА блок CB1-рецепторів може викликати активацію TRPV1-каналів за рахунок речовин ендогенного походження (наприклад, анандаміду, який підсилює десенситизацію цих каналів) [35].

До групи цих хвороб відноситься також таке хронічне ускладнення цукрового діабету, як діабетична полінейропатія. Вона характеризується наступними симптомами: гіпералгезією, яка на пізніх стадіях розвитку полінейропатії змінюється на гіпоалгезію; зміною температурних показників та

реакцій на тактильні та хімічні подразнення як в спінальних гангліях, так і в центральній нервовій системі.

Загальна характеристика TRPV1-каналів у фізіологічних процесах збігається в центральній та периферичній нервовій системі [5]. Саме цей факт чітко вказує на їх можливий внесок у розвиток приблизно однакових симптомів як при діабетичній полінейропатії, так і при ХА. Однією зі спільних рис ХА та діабетичної нейропатії є підвищення експресії вищезгаданих каналів [3, 28]. Показано також зміну процесу сенситизації каналів (внаслідок активації РКС (від англ. protein kinase C) та РКА (від англ. protein kinase A)), особливо в умовах підвищення концентрації простагландинів і брадикініну [6, 15]. Не виключено також, як і при ХА, зміна TRPV1-чутливості до таких ендогенних агентів як, наприклад, брадикініну, простагландинів, анандаміду та інших [18, 34], хоча досі не з'ясовано у якому напрямку (підсилення чи зменшення чутливості до цих ендогенних агентів). Проте на відміну від діабетичної нейропатії при ХА відбувається переважно підсилення процесів десенситизації каналів. Особливе значення має зміна чутливості нейронів первинних дорзальних гангліїв (малих і середніх) та пірамідальних клітин гіпокампа до нейтрофічного фактора росту, який серед інших причин призводить до нейродегенеративних змін у першому та другому випадках [3]. При діабетичній нейропатії, як і при ХА також спостерігаються зміни енцефалограми і дегенерація аксонів.

В умовах полінейропатії відмічаються фази гіпо- і гіпералгезії. В їх основі лежить зміна активності TRPV1-каналів. Основою зміни активності TRPV1-каналів буде різниця у процесах сенситизації та десенситизації каналів і, можливо, відмінності у впливі ендогенних лігандів та змінами у транз'єнтному підвищенні $[Ca^{2+}]_i$ (слід зазначити, що всі вищезазначені фактори

модулюють процес надходження кальцію через TRPV1-канали та, відповідно, його накопичення в клітині).

У зв'язку з вищезазначеними питаннями нами було проведено дослідження капсаїцинозумовлених змін $[Ca^{2+}]_i$ у контрольних умовах та в умовах полінейропатії при стрептозотиніндукованому цукровому діабеті.

Порівняння значень амплітуд, тривалості та тривалості на рівні половини амплітуди (півширини) капсаїциноіндукованих кальцієвих транзєнтів у первинних сенсорних нейронах щурів в контрольних умовах із відповідними кальцієвими транзєнтами у щурів з стрептозотиніндукованим діабетом, що виявляли наявність полінейропатії [33], показує зменшення їх амплітуди на 13 %, та збільшення тривалості на 2,4 %, та півширини – на 19,3% відповідно (рис.3).

Отже, базальний вміст кальцію у тварин з діабетичною нейропатією не змінюється на відміну від його показників при клітинній моделі ХА [19]. Тобто готовність пірамідальних клітин до розвитку апоптозу значно вища, ніж у нейронах первинних дорсальних гангліїв при діабетичній нейропатії у гіпоалгезичній фазі, яка настає на більш пізніх стадіях діабету.

Хоча ми не проводили аналогічних досліджень на пірамідальних клітинах гіпокампа, на підставі вищепредставлених літературних даних можна припустити, що зміни параметрів кальцієвих тразєнтів (тривалість, напівширина) у тварин з цукровим діабетом можуть приблизно збігатися з такими у разі клітинної моделі ХА.

Цей висновок певною мірою підтверджується тим, що у тварин з діабетом також відмічається зміни потенціалкеро-ваних каналів (переважно високопорогових) [22], як і при клітинній моделі ХА, але дещо у різних ракурсах. Якщо при ХА чітко показана зміна високопорогових кальцієвих каналів і стоїть під питанням зміна функціонування низькопорогових каналів [19], то при діабетичній нейропатії кальцієві канали Т-типу суттєво змінюються. Крім того, процес інактивації потенціалкеро-ваних кальцієвих каналів не змінюється так значно при діабетичній полінейропатії, як при ХА. Таким чином, хоча в обох випадках відмічається зміна характеристик вольт-амперних кривих потенціалкеро-ваних кальцієвих каналів, але вона носить різний характер. Ці порушення можуть свідчити про суттєву різницю між амплітудами кальцієвих струмів, мембранного потен-

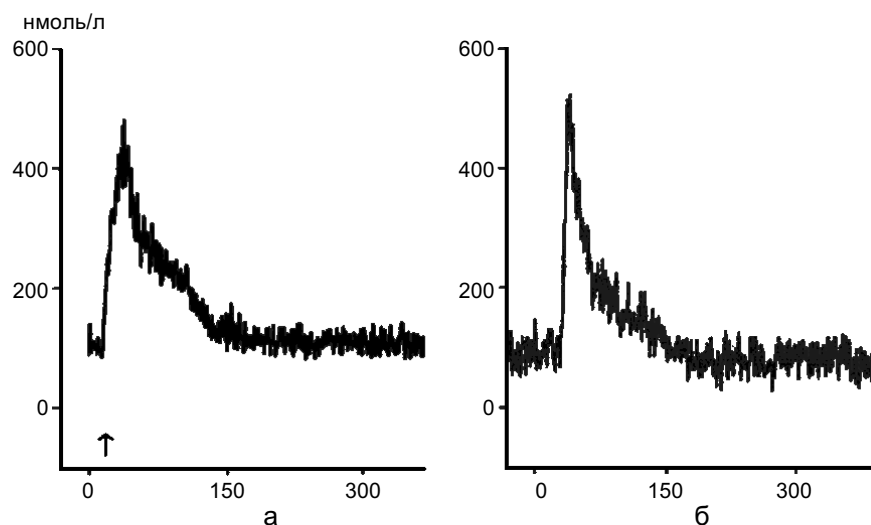


Рис. 3. Приклади капсаїцинозумовлених кальцієвих транзєнтів у нейронах дорсальних гангліїв щурів в контрольних умовах (а) та при експериментальному стрептозотиніндукованому цукровому діабеті (б)

ціалу або про зміну структури поротворювальних білків кальцієвих каналів при цих захворюваннях.

З іншого боку, за даними літератури відмічено практично ідентичні зміни функціонування рецепторкерованих NMDA-каналів. Як при ХА, так і при діабетичній полінейропатії спостерігається порушення виділення глутамату (в бік збільшення). В зв'язку з цим є доцільним застосування блокаторів NMDA-каналів, оскільки на певному етапі розвитку цих хвороб такі зміни у виділенні нейротрансмітера можуть призвести до апоптозу нейронів.

Таким чином, приведені факти вказують на те, що патологічні зміни у нейронах як при ХА, так і при діабетичній полінейропатії можуть зумовлюватись негативними впливами на структури плазматичної мембрани, відповідальні за проникнення іонів кальцію всередину клітини з зовнішнього середовища, так і порушення мітохондріального метаболізму. Отже, у патогенезі нейродегенеративних захворювань можна знайти спільні риси, проте їх наявність ще не може бути ознакою суцільних спільних ланок у механізмах розвитку цих патологічних станів.

**Е.П. Костюк, Т.Ю. Король, С.В. Король,
С.В. Романенко, В.О. Пинченко, П.Г. Костюк**

ИЗМЕНЕНИЕ Кальциевой СИГНАЛИЗАЦИИ КАК ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ПОЛИНЕЙРОПАТИИ

В обзоре описывается влияние пептида β -амилоида на функциональную активность внутриклеточных и плазмалемных кальцийрегулирующих структур нейронов культуры гиппокампа крыс: митохондрий и потенциал-управляемых кальциевых каналов плазматической мембраны соответственно. Проведено сравнительный анализ изменения плазматических структур таких нейродегенеративных заболеваниях, как болезнь Альцгеймера и диабетическая полинейропатия.

Ключевые слова: митохондрия, болезнь Альцгеймера, диабетическая полинейропатия, нейродегенеративные заболевания, гиппокамп, амилоид, кальциевые каналы плазматической мембраны, кальций.

**E.P. Kostyuk, T.Yu. Korol, S.V. Korol, C. Romanenko,
V.O. Pinchenko, P.G. Kostyuk**

ALTERATION OF CALCIUM SIGNALING AS ONE OF THE PATHOGENESIS MECHANISMS OF SUCH NEURODEGENERATIVE DISEASES AS ALZHEIMER'S DISEASE AND DIABETIC POLYNEUROPATHY.

This review is devoted to the action of amyloid- β peptide on the functional activity of intracellular and plasmalemmal calcium-regulated structures in cultured hippocampal neurons: mitochondria and voltage-gated calcium channels. A comparative analysis of relative changes of plasmalemmal structures in such neurodegenerative diseases as Alzheimer's illness and diabetic neuropathy has been made.

Key words: mitochondrion, Alzheimer's disease, diabetic neuropathy, neurodegenerative disease, neurons, hippocampus, plasmalemmal calcium channels, calcium.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С., Мирошніченко М.С., Шуба М.Ф. Біофізика. – К.: Обереги, 2008. – 544 с.
2. Яхно Н.Н., Преображенская И.С. Болезнь Альцгеймера: патогенез, клиника, лечение // Рус. мед. журн. – 2002. – **10**. – Р. 1143–1146.
3. Anand U., Otto W.R., Casula M.A., Day N.C., Davis J.B., Bountra C., Birch R., Anand P. The effect of neurotrophic factors on morphology, TRPV1 expression and capsaicin responses of cultured human DRG sensory neurons // *Neurosci. Lett.* – 2006. – **399**. – Р. 51–56.
4. Arispe N., Rojas E., Pollard H.B. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – **90**. – Р. 567–571.
5. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway // *Nature.* – 1997. – **389**. – Р. 816–824.
6. Cesare P., McNaughton P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – **93**. – Р. 15435–15439.
7. Clapham D.E. TRP channels as cellular sensors // *Nature.* – 2003. – **426**. – Р. 517–524.
8. Cook D.G., Li X., Cherry S.D., Cantrell A.R. Presenilin 1 deficiency alters the activity of voltage-gated Ca^{2+} channels in cultured cortical neurons // *J. Neurophysiol.* – 2005. – **94**. – Р. 4421–4429.
9. Davidson R.M., Shajenko L., Donta T.S. Amyloid beta-peptide (A β) potentiates a nimodipine-sensitive L-type barium conductance in N1E-115 neuroblastoma

- cells // *Brain Res.* – 1994. – **643**. – P. 324–327.
10. Hooper N.M. Alzheimer's disease: methods and protocols.: Humana press Inc, 2002.
 11. Furukawa K., Abe Y., Akaike N. Amyloid beta protein-induced irreversible current in rat cortical neurones // *Neuroreport.* – 1994. – **5**. – P. 2016–2018.
 12. Gibson G.E., Sheu K.F., Blass J.P. Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease // *J. Neural Transm.* – 1998. – **105**. – P. 855–870.
 13. He L.M., Chen L.Y., Lou X.L., Qu A.L., Zhou Z., Xu T. Evaluation of beta-amyloid peptide 25-35 on calcium homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons // *Brain Res.* – 2002. – **939**. – P. 65–75.
 14. Hirai K., Aliev G., Nunomura A., Fujioka H., Russell R.L., Atwood C.S., Johnson A.B., Kress Y., Vinters H.V., Tabaton M., Shimohama S., Cash A.D., Siedlak S.L., Harris P.L., Jones P.K., Petersen R.B., Perry G., Smith M.A. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease // *J. Neurosci.* – 2001. – **21**. – P. 3017–3023.
 15. Hu H.J., Bhawe G., Gereau R.W. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia // *J. Neurosci.* – 2002. – **22**. – P. 7444–7452.
 16. Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor // *Nature.* – 1987. – **325**. – P. 733–736.
 17. Kawahara M., Kuroda Y. Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis // *Brain Res. Bull.* – 2000. – **53**. – P. 389–397.
 18. Kim B.M., Lee S.H., Shim W.S., Oh U. Histamine-induced Ca²⁺ influx via the PLA(2)/lipoyxygenase/TRPV1 pathway in rat sensory neurons // *Neurosci. Lett.* – 2004. – **361**. – P. 159–162.
 19. Korol' T.I., Kostyuk O.P., Kostyuk P.H. Effect of beta-amyloid protein on calcium channels in plasma membranes of cultured hippocampal neurons // *Fiziol. Zh.* – 2009. – **55**. – P. 10–16.
 20. Leissring M.A., Paul B.A., Parker I., Cotman C.W., LaFerla F.M. Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling in *Xenopus* oocytes // *J. Neurochem.* – 1999. – **72**. – P. 1061–1068.
 21. Li W.Y., Butler J.P., Hale J.E., McClure D.B., Little S.P., Czilli D.L., Simmons L.K. Suppression of an amyloid beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein // *Neuroscience.* – 2000. – **95**. – P. 1–4.
 22. Lopshire J.C., Nicol G.D. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies // *J. Neurosci.* – 1998. – **18**. – P. 6081–6092.
 23. Marinelli S., Vaughan C.W., Christie M.J., Connor M. Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro // *J. Physiol.* – 2002. – **543**. – P. 531–540.
 24. Mark R.J., Pang Z., Geddes J.W., Uchida K., Mattson M.P. Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation // *J. Neurosci.* – 1997. – **17**. – P. 1046–1054.
 25. Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., McDonald B.L., Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – **82**. – P. 4245–4249.
 26. Moriyama T., Higashi T., Togashi K., Iida T., Segi E., Sugimoto Y., Tominaga T., Narumiya S., Tominaga M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins // *Mol. Pain.* – 2005. – **1**. – P. 3.
 27. Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters J.A. Transient receptor potential cation channels in disease // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**. – P. 165–217.
 28. Pabbidi R.M., Yu S.Q., Peng S., Khardori R., Pauza M.E., Premkumar L.S. Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity // *Mol. Pain.* – 2008. – **4**. – P. 9.
 29. Pegorini S., Braidia D., Verzoni C., Guerini-Rocco C., Consalez G.G., Croci L., Sala M. Capsaicin exhibits neuroprotective effects in a model of transient global cerebral ischemia in Mongolian gerbils // *Brit. J. Pharmacol.* – 2005. – **144**. – P. 727–735.
 30. Ramsden M., Henderson Z., Pearson H.A. Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility status // *Brain Res.* – 2002. – **956**. – P. 254–261.
 31. Resende R., Pereira C., Agostinho P., Vieira A.P., Malva J.O., Oliveira C.R. Susceptibility of hippocampal neurons to Abeta peptide toxicity is associated with perturbation of Ca²⁺ homeostasis // *Ibid.* – 2007. – **1143**. – P. 11–21.
 32. Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP3-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria // *Science.* – 1993. – **262**. – P. 744–747.
 33. Romanenko S.V., Kostyuk E.P., Kostyuk P.G. Specificity of gabapentin action in different populations of dorsal root ganglion neurons of rats with streptozotocin-induced diabetes // *Neurophysiology.* – 2009. – **41**. – P. 119–130.
 34. van der S.M., Di M., V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – **271**. – P. 1827–1834.
 35. Veldhuis W.B., van der S.M., Wadman M.W., van Z.G.,

- Maccarrone M., Fezza F., Veldink G.A., Vliegenthart J.F., Bar P.R., Nicolay K., Di M., V. Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases // *J.Neurosci.* – 2003. – **23**. – P. 4127–4133.
36. Voets T., Droogmans G., Wissenbach U., Janssens A., Flockerzi V., Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels // *Nature.* – 2004. – **430**. – P. 748–754.
37. Webster S., Bradt B., Rogers J., Cooper N. Aggregation state-dependent activation of the classical complement pathway by the amyloid beta peptide // *J.Neurochem.* – 1997. – **69**. – P. 388–398.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail ekostyuk@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 29.06.2010

ПАМ'ЯТНІ ДАТИ

О.О. Лук'янець

Пам'яті академіка П.Г. Костюка



10 травня 2010 р. не стало видатного всесвітньовідомого українського вченого-фізіолога, академіка НАН України Платона Григоровича Костюка. Звістка про смерть Платона Григоровича швидко облетіла наукові кола світу і до Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, в якому він 44 роки був беззмінним директором, почали надходити численні листи, в яких відчувався справжній біль про непоправну втрату для світової фізіологічної науки. Крім офіційних співчуттів державних діячів і установ (Президента, Прем'єр-міністра, Голови Верховної Ради України, наукових товариств тощо), прийшло багато десятків листів від наукового співтовариства. Можна навести слова члена-кореспондента РАН Євгенія Нікольського, члена бюро

© О.О. Лук'янець

відділення біологічних наук РАН, заступника голови Президії Казанського наукового центру РАН: «Звістка про кончину Платона Григоровича відгукнулася справжнім болем. Дивно, але незважаючи на те, що всі ми розуміли, що Платон Григорович знаходиться у поважному віці і бачили, що в останній час він помітно здав, звістка про його смерть застала зненацька. Як йдеться, голова розуміє, а серце не вірить. На жаль, приходять думки, що з відходом Платона Григоровича закінчилась ціла епоха – епоха в якій інтелект, професіоналізм, порядність, інтелігентність були основними характеристиками вченого».

У минулому році Платону Григоровичу виповнилося 85 років, більше шістьдесяти з них він присвятив своїй улюбленій науці – фізіології, і продовжував плідно та віддано працювати аж до самої смерті, залишаючись флагманом та гордістю вітчизняної науки. За цитуванням у світовій літературі Платон Григорович займає перше місце серед усіх українських учених-біологів (загальний індекс цитування становить 6360) та має найбільшу кількість публікацій серед українських вчених згідно з міжнародною системою оцінки SCOPUS [1]. Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, яким керував Платон Григорович, займає друге місце у рейтингу установ Національної академії наук України (згідно з міжнародною системою оцінки SCOPUS, цитування робіт співробітників Інституту становить 2034 публікацій, 10126 цитувань та індекс Гірша становить 44, [2]), поступаючись тільки Інституту теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова НАН

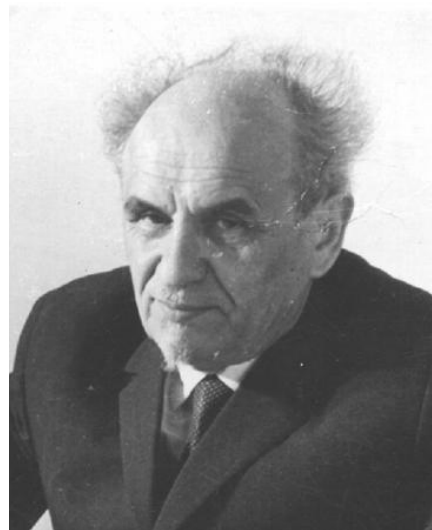
України. У цьому сенсі Інститут фізіології має найкращі показники серед інститутів біологічного профілю та значно випереджає інститути фізико-математичного та хімічного профілю, які, як правило, мають високі показники цитування. Як же вдалося академіку Платону Костюку досягти таких високих наукових та адміністративних здобутків?

Платон Григорович вважав, що три постаті в його житті відіграли визначальну роль у становленні його як особистості і вченого та яких він називав своїми вчителями. Це його батько – академік АПН СРСР Григорій Силович Костюк, його перший науковий керівник академік АН УРСР Данило Семенович Воронцов та австралійський вчений, лауреат Нобелівської премії професор Джон Екклс, в лабораторії якого довелося працювати молодому Платону. Я не буду детально перераховувати біографічні віхи та досягнення Платона Григоровича, оскільки вони детально описані ним самим у біографічній книзі «Над океаном часу» [13], а також повторюються або доповнюються в інших публікаціях та джерелах [3–6, 15, 20, 24–26], а зупинюсь на його становленні як ученого, а також наведу деякі цитати із листів-співчуттів, які самі по собі характеризують Платона Григоровича та відношення до його особистості світового наукового товариства.

Платон Григорович завжди дуже тепло розповідав про свого батька, Григорія Силовича, який пройшов свій шлях від сільського вчителя до академіка. Григорій Силович Костюк (1899–1982) – відомий український психолог, педагог, засновник української психологічної школи, фахівець з дитячої та педагогічної психології, дійсний член АПН СРСР (з 1966 р.), керівник лабораторії психології Українського науково-дослідного інституту психології УРСР і керівник Київської лабораторії розвитку мислення школярів Інституту

загальної та педагогічної психології АПН СРСР (1972–1982), заслужений діяч науки УРСР. Він з 1945 р. домігся створення Науково-дослідного інституту психології Наркомосвіти (згодом до 1992 р. підпорядкований Міністерству освіти УРСР, а з 1992 р. – Академії педагогічних наук України), який очолював з 1945 по 1972 р. Інститут психології став центром теоретико-методологічних і прикладних досліджень психологічних проблем мислення та інтелектуальних здібностей, керівництва психічним розвитком особистості. В 1995 р. Інституту присвоєно ім'я видатного українського вченого-психолога, академіка Григорія Силовича Костюка.

Так склалася доля, що Платон Григорович був зі своїм батьком у складні воєнні роки в евакуації, Сталінграді, коли мати із малим братом залишилися в окупованому Києві. В післявоєнні роки батько допомагав молодому Платону в його науковому становленні. Григорій Силович був розробником концептуальних положень проблеми особистості. За словами Платона Григоровича, основна наукова ідея Григорія Силовича полягала у такому вихованні людини, щоб виявити та підкреслити



Григорій Силович Костюк, засновник і перший директор Інституту психології УРСР

найбільші її здібності та таланти, що не збігалося із загальноприйнятою в ті часи концепцією про абсолютну рівність здібностей людей. Використовуючи свої професійні знання в дитячій психології, він намагався розвинути й у своїх дітей саме ті здібності, які б сприяли найбільшому успіху у їх житті. Можна сказати, що наукові доробки Григорія Силевича підтвердилися практикою, обидва його сини досягли визначних успіхів у своєму житті та кар'єрі. Так, його молодший син Олександр Григорович Костюк (1933–2000) відомий своїми науковими працями в галузі кінознавства, музикознавства, психології й естетики музики, як і старший брат, став академіком НАН України та очолював Інститут мистецтвознавства, фольклористики та етнології ім. М.Т. Рильського НАН України з 1988 р. до своєї смерті.

За словами Платона Григоровича, його батько був дуже приємною, доброю та надзвичайною людиною. Чудові якості батька стали також притаманними й для його сина – скромність, безкорисливість, доброта в поєднанні з непохитною вірністю громадянському та науковому обов'язку, які і здобули Платону Григоровичу загальну глибоку повагу. Ось як про нього пишуть іноземні колеги: «Сумно, насилу усвідомлено і непоправно. Для мене Платон Григорович був науковим батьком. Його відданість науці, працездатність, широта бачення проблем, організаційний талант, самодисципліна, турбота про оточуючих, м'якість, мудрість – ці та інші чудові якості були, є і будуть дороговказом у моєму житті, також, як і в житті багатьох учених, та й не лише науковців. Любов і глибока повага до нього в моєму серці і в душі назавжди» (проф. П'єтр Брежестовський, Середземноморський інститут нейробіології, Франція). «Звістка про смерть Платона заповнила мене сумом. Я його знав протягом десятиліть, і я завжди буду пам'ятати його як великого вченого і

людину надзвичайної доброти. Він був справжнім джентльменом» (проф. Ернесто Карафолі, Університет Падови, Італія).

За іронією долі один з останніх відеозаписів з Платоном Григоровичем (грудень 2009 р.) був присвячений його батьку. Відеозапис був знятий з нагоди 110-ї річниці від дня народження Григорія Силевича, якій були приурочені Всеукраїнська науково-практична конференція «Теоретико-методологічні та прикладні аспекти психології особистості» та II Всеукраїнський психологічний конгрес. Платон Григорович у кінці своєї розповіді сказав, що саме батько сприяв розвитку його здібностей як вченого, і пам'ять про нього завжди зберігається в його душі.

Свою наукову діяльність Платон Григорович розпочав ще будучи студентом біологічного факультету Київського національного університету під керівництвом видатного вченого в галузі електрофізіології, професора (пізніше академіка АН УРСР) Данила Семеновича Воронцова (1886–1965). Данило Семенович закінчив Могилевську гімназію і Петербурзький університет, був учнем видатного російського фізіолога Н.Є. Введенського. Також Воронцов був засновником і першим завідувачем (1922–1930) кафедри нормальної фізіології Смоленського університету. З 1930 р. завідувач кафедри фізіології фізико-математичного факультету Казанського університету, а в 1935–1945 рр. – кафедри фізіології людини Київського медичного інституту. У 1945 він створив відділ загальної фізіології в Інституті фізіології Київського університету, а в 1956 р. – лабораторію електрофізіології в Інституті фізіології АН УРСР. Д.С. Воронцов – один із основоположників вітчизняної електрофізіології, який здійснив фундаментальні дослідження з електрофізіології серця, скелетних м'язів, нервів, спинного та головного мозку. Ще у студентські роки Д.С. Воронцов поставив перед собою

завдання вивчити властивості та природу збудження у нерві і присвятив цьому свою наукову кар'єру. Одним із основних напрямків наукових досліджень Д.С. Воронцова була мембранна теорія походження біоелектричних явищ. Зокрема, вперше у світі Воронцовим було виявлено, що основне фізіологічне явище – потенціал дії – супроводжується слідовими коливаннями електричної активності. За короткий час у повоєнні роки в Києві він разом із співробітниками виготовив оригінальне навчальне обладнання і придбав сучасні на той час наукові прилади. Це дало змогу на високому рівні проводити навчальний процес і вести інтенсивну наукову роботу, що і приваблювало Платона Григоровича до електрофізіологічних досліджень.

Випускню дипломну роботу, пов'язану з аспектами електрофізіології, Платон Григорович захистив у 1946 р. Тоді ще молодий дослідник Платон Костюк займався спочатку вивченням нервової клітини, її реакції на подразник, який викликав збудження або гальмування, на зв'язок між клітинами. Як розповідав Платон Григорович, в ті часи була дуже бідна база приладів на кафедрі, і Воронцов подавав власний приклад уміння створювати необхідне електрофізіологічне обладнання своїми руками. Платон Григорович згодом успадковує такий підхід у своєму подальшому науковому житті – він буде сприяти розробці новаторських методик, обладнання, підходів. Пізніше, в 70-ті роки, він перепрофілює дослідно-конструкторське виробництво при Інституті фізіології, яке за його участю почне випускати прилади 23 найменувань для електрофізіологічних досліджень та в якому вперше у Радянському Союзі буде створений електрофізіологічний комплекс, який відповідав світовим стандартам того часу [23].

У той же час Костюк П.Г. отримував другу освіту в медінституті, на запитання: «Як ви суміщали працю науковим співробітником у лабораторії Данила Семеновича

і навчання в Київському медичному інституті – як Вам це вдавалося?» – відповів: «Силою молодості й пристрасті»[8]. Платон Григорович у віці 25 років захистив кандидатську дисертацію на тему «Адаптація нерва до поступово наростаючого електричного струму» (1949) та у цьому самому році отримав диплом лікаря. З 1951 р. починається його педагогічна діяльність на кафедрі фізіології тварин та людини Київського національного університету. В кінці грудня 2009 р. він прийняв останній в своєму житті екзамен у студентів радіофізичного факультету Київського університету та Київського відділення МФТІ. Платон Григорович відповідально відносився до викладання і йому дуже подобалося читати лекції, та він надзвичайно тепло ставився до студентів. Він неодноразово мені казав, що читання лекцій приносить йому справжнє задоволення, навіть будучи в літах, інколи погано себе почувавши, він все одно йшов на лекції, які завжди були яскравими, цікавими та зрозумілими. Ось як про його лекції пише сербський вчений в своєму листі співчуття: «Я дуже приголомшений і засмучений чути такі погані новини. Професор Платон Костюк був наш великий друг і колега, великий вчений і педагог. Він був людиною, яка протягом багатьох років виховала покоління нейрофізіологів. Він відвідував нашу країну кілька разів, останній раз у 2005 р. під час з'їзду у Військово-медичній академії в Белграді. Кожен був радий зустрітися з ним і вислухати його натхненні лекції, він дійсно був легендою в нейрофізіологічній науці. Від імені Сербського фізіологічного товариства і себе особисто висловлюю глибоке співчуття у зв'язку зі смертю дуже поважного академіка Платона Костюка. Це втрата не тільки для Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, а й для України, країн колишнього Радянського Союзу і міжнародного фізіологічного співтовариства. Я сподіваюсь, що Інсти-

тут фізіології ім. О.О. Богомольця переживе таку безповоротну втрату і буде слідувати баченням, місії і духу великої людини Платона і залишиться на позиції одного з кращих фізіологічних інститутів у світі» (проф. Драган Джурич, Президент Сербської фізіологічної асамблеї товариств, директор Інституту медичної фізіології, Белградський університет, Республіка Сербія).

У 32 роки Платон Григорович захищає докторську дисертацію «Центральні процеси в найпростішій рефлекторній дузі» (1956) і стає професором кафедри, а після переходу Воронцова Д.С. в Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР, завідувачем лабораторії Інституту фізіології Київського університету. У 1956 р. Д.С. Воронцов організував і очолив лабораторію електрофізіології в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР, де Д.С. Воронцовим та співробітниками виконано низку досліджень з вивчення фізичного електротону у нервах і м'язах. Зокрема була дана характеристика електротону при різній силі, тривалості і напрямкові поляризуючого струму та різному функціональному стані нерва, вивчено вплив на розвиток електротону різних фармакологічних препаратів, у тому числі інгібіторів обміну речовин. У результаті плідних методичних розробок Воронцовим було створено ґрунтовне керівництво по загальній електрофізіології [21]. Таким чином, можна вважати, що саме Д.С. Воронцов проклав шлях своєму учню Платону Григоровичу в галузь досліджень електрофізіології, яка на той час була маловідомою.

Самостійну роботу Платон Григорович розпочав у 1958 р. уже в Інституті фізіології ім.

О.О. Богомольця, де він очолив лабораторію загальної фізіології і згодом написав свою першу книгу «Мікроелектродна техніка» (1960 р.), яка стала початком його наукового майбутнього. Як писав Платон Григорович, «впровадження мікроелектродної техніки в нейрофізіологію – це мій своєрідний «космічний політ»» [13]. Платон Григорович – наполегливий експериментатор. Він неодноразово розповідав, як власноруч виготовляв у ті роки скляні мікроелектроди, розігрівачи скляні трубки і руками розтягував їх для виготовлення електродів для внутрішньоклітинної реєстрації потенціалів дії, оскільки тоді не було спеціального обладнання або мікроманіпуляторів. Більш того, цей «фізико-хімічний» напрям досліджень у фізіології багато хто із відомих вчених того часу вважав помилковим. Він першим серед дослідників-фізіологів СРСР використав внутрішньоклітинні електроди й отримав точні відомості про тривалість, синаптичну затримку, а також перебіг поодинокого збуджувального та гальмівного впливів. Цю роботу було надзвичайно високо оцінено науковим співтовариством.



П.М. Серков, Д.С. Воронцов, П.Г. Костюк. В Інституті фізіології тварин Київського університету, Київ, 1950

Перші внутрішньоклітинні мікроелектродні дослідження були проведені американськими вченими Лінгом і Джерардом на фібрилах м'язів жаби в 1946 р. [19], а на клітинах центральної нервової системи в 1951 р. в лабораторії австралійського нейрофізіолога – Джона Екклса [7]. Платон Григорович на міжнародній конференції доповідав про свої електрофізіологічні дослідження, в яких застосовувалася мікроелектродна техніка. До нього підійшов Джон Екклс, який був здивований досягненнями молодого радянського вченого, спитав – де ви навчилися цій методиці? На що Платон Костюк відповів – «я сам навчився». Професор Екклс запросив Платона Григоровича до себе в лабораторію, де проводилися найсучасніші на той час мікроелектродні дослідження.

Сер Джон Керью Екклс, австралійський нейрофізіолог, який отримав у 1963 р. Нобелівську премію з фізіології і медицини «За відкриття, що стосуються іонних механізмів, які беруть участь в збудженні і гальмуванні у периферичних і центральних ділянках мембрани нервових клітин». Основні дослідження Екклса, які були початі в Оксфордському Університеті, були пов'язані із синаптичною передачею в центральній, периферичній нервовій системі, гладеньких і серцевих м'язах. У своїх дослідженнях він використовував новітню на той час техніку в електрофізіології – підсилювачі та катодні осцилографи. Джон Екклс розділив Нобелівську премію із всесвітньо відомими фізіологами Ендрю Філдінг Хакслі і Аланом Ллойд Ходжкіном, котрі є основоположниками теорії іонної провідності, на якій базуються сучасні уявлення про генерацію нервового імпульсу. В 1952 р. вони описали модель, що пояснює іонні механізми, які ініціюють і розповсюджують потенціали дії в гігантських аксонах кальмара [14]. Ходжкін і Хакслі вперше висловили гіпотезу про наявність у мембрані іонних каналів.

У 1960–1961 рр. у Канберрі (Австралія) спільно з професором Джоном Екклсом Платон Григорович вивчав природу гальмування та його значення в рефлекторній діяльності мозку. Працюючи у Екклса, Платон Григорович опублікував три роботи в Фізіологічному журналі Великобританії: «Центральні шляхи, відповідальні за деполаризацію первинних аферентних волокон» [10], «Пресинаптичне гальмування центральних дій згиначів рефлекторних аферентів» [11] та «Вплив електричної поляризації спинного мозку на центральні аферентні волокна та їх збудливу синаптичну дію» [12]. Цікаво, що в своїй Нобелівській лекції «Іонні механізми постсинаптичного інгібування» [9] Джон Екклс використав один із



Лауреат Нобелівської премії, вчитель П.Г.Костюка сер Джон Екклс (John Carew Eccles) в своїй лабораторії

рисунків статті Костюка П.Г., яку було опубліковано Платоном Григоровичем разом із японським професором М. Іто в міжнародному журналі «Nature» [16]. Перебування Платона Григоровича в лабораторії Джона Екклса, як він сам говорив, сповнило його новими ідеями, методиками, свободою наукової думки і демократичними відносинами в колективі. Ці свої здобутки Платон Григорович пронесе через усю свою наукову діяльність і буде керуватися ними до кінця життя.

Подальша наукова кар'єра Платона Григоровича дуже стрімко розвивалася, відбулося його становлення як всесвітньо відомого науковця, організатора науки та чудового адміністратора. Він дуже ефективно працював на посаді директора Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України з 1966 р. до своєї смерті. Одним із найвизначніших досягнень П.Г. Костюка та його учнів (О.О. Кришталь та В.І. Підоплічко) було розроблення та впровадження методу внутрішньоклітинного діалізу або перфузії [17, 18], за який, на думку багатьох учених, вони повинні були отримати Нобелівську премію. Але їх випередили німецькі вчені – Ервін Неєр та Берт Сакман, які мали на той час переваги в електротехнічному обладнанні і отримали в 1991 р. Нобелівську премію за розробку методики для вимірювання змін потенціалу, викликаних поодинокими іонними каналами в клітинній мембрані (метод patch-clamp). Після смерті Платона Григоровича професор Ервін Неєр напише: «Платон був видатним ученим, якого високо цінували колеги і друзі. Його смерть завершує собою унікальний період фізіології, в якій кількісні підходи і здатність проникати в суть механізмів були основним пріоритетом. Ми повинні докласти зусиль для підтримання цієї спадщини, яка завжди буде пов'язана із Платоном Г. Костюком» (лауреат Нобелівської Премії, Інститут Макса Планка Біофізичної хімії, Геттінген, Німеччина).

Мені довелося працювати в лабораторії Ервіна Неєра, і можу сказати, що він дуже поважав Платона Григоровича, і ці сказані їм слова дійсно виходять із його душі.

За роки роботи Костюком П.Г. була створена всесвітньовідома школа нейрофізіологів, серед яких є два академіки (О.О. Кришталь та М.С. Веселовський) та велика кількість всесвітньо відомих вчених. Серед здобутків школи – ціла низка наукових відкриттів світового значення. Сотні нейрофізіологів, яким пощастило свого часу вчитися в аспірантурі і здійснювати дослідження під безпосереднім керівництвом П.Г. Костюка, на все життя зберегли пам'ять про нього як про прекрасного вихователя, людину чуйну, тактовну і разом з тим вимогливу і принципову. Один із його численних учнів, Юрій Усачев, який тепер працює в США, в складні для Інституту часи після розпаду СРСР надіслав на адресу Інституту передплачений ним журнал «Нейрон» пише: «Це неймовірно сумні новини і величезна втрата для наукової спільноти. Моя наукова кар'єра була би неможливою без Платона Григоровича, і я впевнений, що це стосується і сотні його колишніх студентів. Він так багато важив для багатьох з нас!» (Юрій Усачев, Університет штату Айова, США). Дійсно, Платоном Григоровичем Костюком була створена наукова школа, яку знали не тільки в країнах колишнього Радянського Союзу, а й далеко за його межами. Професор Норіо Акайке із університету Кумамото, Японія пише: «Я глибоко засмучений почувши про раптову смерть видатного вченого світу професора Платона Костюка. Прийміть мої щирі співчуття у цій сумній події. Я добре уявляю, яке це велике горе для всіх вас в Інституті Богомольця. Він також був і моїм великим наставником, який показав мені, яка цікава наука. Я ніколи не забуду його доброту й увагу». Серед учнів Платона Григоровича були не тільки співробітники Інституту фізіології, а

й вчені із інших країн світу, які приїздили до Інституту фізіології та навчалися новим методикам і отримували нові знання. Професор Мераб Цагарелі із Інституту фізіології ім. І.С. Беріташвілі (Тбілісі, Грузія) у своєму листі пише: «З глибокою скорботою дізналися ми про кончину Платона Григоровича, неординарного і талановитого вченого і організатора науки, чий праці зробили величезний внесок у сучасну фізіологію. Без перебільшення можна сказати, що за останні 40 років він був лідером, провідним ученим у центральній і східній Європі, включаючи Радянський Союз. Він залишив школу світового значення в галузі клітинної фізіології, яка завжди буде пишатися своїм основоположником. Прийміть, будь ласка, щирі співчуття від Інституту фізіології ім. І.С. Беріташвілі і особисто від мене. Відхід з життя Платона Григоровича, вченого світового масштабу, втрата не тільки для України, але і для всього міжнародного співтовариства сучасної нейронауки». Професор Тамаш Фройнд, директор Інституту експериментальної медицини (Будапешт, Угорщина) пише: «Ви повідомили мені сумну новину про Платона. Він дійсно був основною фігурою в галузі нейронаук і іконою в фізіології нашого регіону. Ми обов'язково повинні зберегти його в наших найкращих спогадах на десятиліття вперед».

Платон Григорович також був фундаментом багатьох наукових організацій та установ, однією з них є кафедра ЮНЕСКО при Інституті фізіології. Ми отримали листа із цієї організації з приводу смерті Платона Григоровича - «З глибокою скорботою і жалем я дізнався, що академік Платон Григорович Костюк пішов. Це величезна втрата для Інституту, яким він так блискуче керував протягом багатьох років, для Української академії наук, для нейрофізіології, так і для всього світового наукового співтовариства. Тут, в ЮНЕСКО, ми будемо особливо сумувати про втрату цього

виняткового вченого, оскільки Платон Григорович був одним із дуже небагатьох наукових керівників з регіону Східної Європи, які були удостоєні мати «Наукову кафедру ЮНЕСКО», на знак визнання його видатних досягнень у авангарді нейрофізіології. Визначна особистість, талановитий дослідник, далекоглядний лідер, і в той же час скромна людина. Тим, хто благословенні знати його особисто, буде не вистачати його назавжди» (Професор Мацей Налеч, Директор Відділу фундаментальних і інженерних наук ЮНЕСКО).

Хочеться завершити коротку розповідь про Платона Григоровича Костюка словами американського вченого Мартіна Морада із Джорджаунського Університету (США) «Я не можу уявити собі світ без нього, без його любові до науки, до досконалості, до краси і мистецтва. Він любив науку і присвятив їй всю свою кар'єру, щоб зробити першокласний науковий рівень Інституту в Києві, а також підготувати багатьох вчених вищого класу. Він досяг більш ніж хто-небудь із нас очікував» .

Коротка біографічна довідка :

Костюк Платон Григорович (20 серпня 1924 р., Київ – 10 травня 2010 р., Київ). Фізіолог і біофізик, організатор науки, педагог, громадський діяч. Академік Національної академії наук України (1969) та Академії медичних наук України (1994), академік РАН (1974), Європейської Академії (Academia Europaea) (1989), член Німецької академії Природознавства «Леопольдіна» (1966), АН Чехословаччини (1990), Угорської АН (1990). Заслужений діяч науки і техніки України (2004).

Закінчив Київський університет ім. Т. Г. Шевченка (1946) та Київський медичний інститут ім. О. О. Богомольця (1949).

Був завідувачем заснованого (1958) ним відділу загальної фізіології нервової системи Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, директор цього самого

Інституту (з 1966 р.); засновник і завідувач (з 1982 р.) навчальної базової кафедри молекулярної фізіології і мембранної біофізики Київського відділення Московського фізико-технічного інституту, котра працює в Інституті фізіології. Засновник і директор Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України (з 1992 р.), засновник і керівник міжнародної кафедри ЮНЕСКО молекулярної та клітинної фізіології, яка відкрита у червні 2000 р. при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця; був засновником і президентом Фонду фундаментальних досліджень України (2001). Академік-секретар Відділення фізіології АН СРСР (1975–1988), член Президії АН СРСР (тепер РАН, 1975–1990), віце-президент НАН України (1993–1999), член Президії НАН України (1999–2004), член президії АМН України, з 2005–2010 рр. – радник Президії НАН України. Був віце-президентом Міжнародної організації з дослідження мозку (IBRO), був головою Українського фізіологічного товариства (яке тепер носить його ім'я) та Товариства з нейронаук України, а також головою фізіологічних товариств країн СНД (2007–2010).

Напрямок наукових досліджень П.Г. Костюка – нейрофізіологія, молекулярна біологія та клітинна біофізика. Він створив школу дослідників у галузях нейрофізіології, клітинної та молекулярної фізіології, біофізики. Вперше в світовій науці розробив методику внутрішньоклітинного діалізу соми нервової клітини та застосував її для дослідження мембранних і молекулярних механізмів цієї клітини. Вперше в СРСР застосував мікроелектродну техніку для дослідження структурно-функціональної організації нервових центрів, біофізичних і молекулярних механізмів збудження та гальмування в нервових клітинах. Зробив вагомий внесок у розкриття гомеостазу іонів кальцію в нервових клітинах та його порушень при специфічних формах мозкової патології:

гіпоксії/ішемії, цукровому діабеті, фенілкетонурії, хворобі Альцгеймера, епілепсії.

Автор понад 1050 наукових статей і 16 книг, з яких 12 монографій і 4 підручники. Під його керівництвом захищено 28 докторських і 97 кандидатських дисертацій. Багато десятиріч вів велику педагогічну діяльність. Викладав студентам Київського відділення МФТІ, радіофізичного факультету Київського університету ім. Тараса Шевченка, КПІ, Києво-Могилянської академії. Автор популярного підручника «Фізіологія центральної нервової системи», редактор і співавтор підручника «Біофізика». Був постійним учасником і організатором міжнародних наукових форумів. Головний редактор науково-теоретичного журналу Президії НАН України «Доповіді Національної академії наук України» та засновник міжнародних журналів «Нейрофізіологія» та «Neuroscience», член редколегії «Фізіологічного журналу», член редакційних рад низки часописів, серед яких «Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія», «Український неврологічний журнал» тощо.

Лауреат Державних премій УРСР та України в галузі науки і техніки (1976, 1992, 2003), Державної премії СРСР в галузі науки і техніки за 1983 р. і низки іменних премій: премія ім. І. П. Павлова АН СРСР (1960), премія ім. І. М. Сеченова АН СРСР (1977), премія ім. О.О.Богомольця АН УРСР (1987), премія ім. Луїджі Гальвані, США (1992).

Депутат Верховної Ради УРСР ІХ, Х та ХІ скликань; на сесії Верховної Ради України ХІ скликання був обраний Головою Верховної Ради УРСР.

За видатні досягнення у розвитку фізіологічної науки, вагомий внесок у підготовку висококваліфікованих наукових кадрів, активну громадську діяльність П.Г. Костюк нагороджений 2 орденами Трудового Червоного прапора (1967, 1974), 2 орденами Леніна (1981, 1984), званням Героя Соціалістичної Праці (1984), Дипло-

мом Президента України за значний особистий внесок у розвиток нейробіологічної науки та створення національної школи з нейробіології (1993); орденом «За заслуги» III ступеня (1993), орденом князя Ярослава Мудрого V ступеня (1998), Золотою медаллю № 2 ім. В.І. Вернадського НАН України (2005). За вагомий внесок в інтернаціональну науку нагороджений високою міжнародною нагородою — Світовою Медаллю Свободи, США (2006). Нагороджений золотою медаллю для України, США (2007), присвоєно звання Герой України (2007), нагороджений медаллю Леонарда Ейлера Європейської Академії природничих наук, ГанOVER (2009). Удостоєний звання «Почесний доктор Київського національного університету ім. Тараса Шевченка» (2009). Нагороджений золотою медаллю імені І.М. Сеченова РАН (2009) та іншими нагородами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Брежестовский П. Миссионер в науке // Троицкий вариант. – Москва. – 2010, № 54. – С. 8.
- Галковская Т. Академик Платон Костюк: У меня есть собственное государство // Зеркало Недели, К., 2004. – № 33(508). – С. 21–27.
- Галковская, Т. Платон Костюк в научном мире звучит как пароль // Там само. – 2009, № 33(761). – С. 5–11.
- Виленский Ю., Шевко А. Бой идет не ради славы, а ради жизни // День, Киев. – 2004, № 146.
- Завірюха, Л. Проникнення у святе святих в ім'я здоров'я й творчості людини // Демократична Україна, К., 2008, № 38.
- Костюк П.Г. Над океаном времени / К.: Наук. думка, 2005. – Р. 1–204.
- Осипчук, И. В конце 1950-х моего отца выпустили из СССР поработать в Австралии у будущего лауреата Нобелевской премии Джона Экклса. Папу сопровождал «товарищ в штатском», не знавший английского языка // Факты, К., 2010, № 91(3102). – С. 5.
- Рейтинг науковців України за показниками наукометричної бази даних Scopus станом на 01.06.2010 / http://www.nbu.gov.ua/institutions/rating_sci.html
- Рейтинг установ Національної академії наук України за показниками наукометричної бази даних Scopus станом на 05.10.2009 // http://www.nbu.gov.ua/institutions/rating_nan.html
- Сарач В.Ф., Мойбенко О.О., Ткаченко М.М. Платон Григорович Костюк – вчений, організатор науки, державний діяч, особистість // Фізіол. журн. – 2009. – 55. – Р. 5–9.
- Серков Ф.Н. Даниил Семёнович Воронцов / К.: Наук. думка, 1986. – Р. 3–21.
- Серков Ф.Н. Даниил Семенович Воронцов (1886–1965) // Нейрофизиология. – 1995. – 27. – Р. 238–239.
- Сорокина З.А., Вихрева Л.А. Платон Григорьевич Костюк / К.: Наук. думка, 1986. – 1–79.
- Трахтенберг И. Академик Костюк о жизни и науке. Прощальное эссе // Зеркало Недели, К., 2010, № 20(800). – С. 11.
- Трахтенберг І. «Океан» академіка Платона Костюка // Весн. Нац. АН України, К., 2008, № 8.
- Brock L.G., Coombs J.S., Eccles J.C. The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode // J.Physiol. – 1952. – 117. – Р. 431–460.
- Eccles, J. C. The ionic mechanism of postsynaptic inhibition (Nobel Lecture) // http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1963/eccles-lecture.pdf.
- Eccles J.C., Kostyuk P.G., SCHMIDT R.F. Central pathways responsible for depolarization of primary afferent fibres // J.Physiol. – 1962. – 161. – Р. 237–257.
- Eccles J.C., Kostyuk P.G., SCHMIDT R.F. Presynaptic inhibition of the central actions of flexor reflex afferents // J.Physiol. – 1962. – 161. – Р. 258–281.
- Eccles J.C., Kostyuk P.G., SCHMIDT R.F. The effect of electric polarization of the spinal cord on central afferent fibres and on their excitatory synaptic action // J.Physiol. – 1962. – 162. – Р. 138–150.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo // J.Physiol. – 1952. – 116. – Р. 424–448.
- Ito M., Kostyuk P.G., Oshima T. Further study on anion permeability of inhibitory post-synaptic membrane of cat motoneurons // J.Physiol. – 1962. – 164. – Р. 150–156.
- Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells // Nature. – 1975. – 257. – Р. 691–693.
- Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. Asymmetrical displacement currents in nerve cell membrane and effect of internal fluoride // Nature. – 1977. – 267. – Р. 70–72.
- Ling G., Gerard R.W. The normal membrane potential of frog sartorius fibers // J.Cell. Physiol. – 1949. – 34. – Р. 383–396.
- Shuba M.F. Platon G. Kostyuk (on his 75th Birthday) // Neurophysiology. – 1999. – 31. – Р. 150–152.

In-t фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

CONTENTS

O.O.Krishtal, V.F.Sagach, A.M. Shevko. World - wide fame of the science and pride of the Ukrainian people – Platon Grigorovich Kostyuk	3
Kostyuk P.G. Ion calcium in cell nucleus	10
A. V. Savrasova, I. V. Lushnikova, E. V. Isaeva, G. G. Skibo, D. S. Isaev, P.G. Kostyuk. The effect of neuraminidase blocker on gabazine-induced seizures in rat hippocampus	14
S. V. Chorna, V. E. Dosenko, N. A. Strutynska, G. L. Vavilova, V. F. Sagach. Increased expression of voltage-dependent anion channel and adenine nucleotide translocase and the sensitivity of Ca ²⁺ -induced mitochondrial permeability transition opening pore in old rat heart	19
M. S. Shipshina, N. S. Veselovsky. Characteristics of sensory neurotransmission in co-culture of both the rat dorsal root ganglion and the rat dorsal horn spinal cord neurons	26
V. O. Kyrychenko, V. S. Nagibin, L. V. Tumanovska, V. E. Dosenko, V. K. Rybalchenko, O. O. Moibenko. Effects of ubiquitin gene silencing in anoxia-rexygenation of neonatal cardiomyocytes	37
M. N. Tkachenko, A. V. Kotsjuruba, O. V. Bazilyuk, I. V. Gorot, V. F. Sagach. Changes in vascular reactivity and reactive forms of oxygen during permanent stay in the alienation Chernobyl zone	47
R. B. Strutynskiy. The vasodilatatory effects of flocalin, a fluorine-containing K _{ATP} channel opener	59
Y. V. Lebed, V. E. Dosenko, G. G. Skibo. Expression of proteasome subunits PSMB5 and PSMB9 mRNA in hippocampal neurons: link with apoptosis and necrosis	66
O. V. Akopova, A. V. Kotsiuruba, O. N. Kharlamova, Yu. P. Korkach, V. F. Sagach. The role of mitochondria in the NO-dependent regulation of Na ⁺ , K ⁺ -ATPase activity in rat aorta	76
O. V. Vlasenko, O. V. Dovgan', V. A. Maisky, A. I. Pilyavskii, A. V. Maznychenko. Laminar distribution of the active rat spinal neurons activated during the feeding-related stereotyped movements	86
T. Voznesenskaya I, T. Bryzgina, V. Sukhina, N. Makogon, I. Alexeyeva. the influence of an inhibitor of NF-κB activation curcumin on the oogenesis and follicular cell death in immune ovarian failure in mice	96
T. M. Falalyeyeva, V. M. Kukharsky, T. V. Beregovala. The influence of long-term monosodium glutamate feeding on structure and functional state of stomach and body weight in rats	102
O. A. Grinchenko, P. I. Yanchuk. The pathways of taurine influences on gastric secretion	111
V. V. Kiroshka, J. O. Tischenko. The effect of initial hormonal status of recipient animals for morphological state and endocrine function of ovarian tissue transplant	121
REVIEW	
E. P. Kostyuk, T. Yu. Korol, S. V. Korol, C. Romanenko, V. O. Pinchenko, P.G. Kostyuk. Alteration of calcium signaling as one of the pathogenesis mechanisms of such neudegenerative diseases as Alzheimer's disease and diabetic polyneuropathy	130
MEMORIALS	
E. A. Lukyanetz. In memory of academician P. G. Kostyuk	139

