

Фізіологічний журнал

ТОМ 57 № 1 2011

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Кунцєцов К.І., Маслов В.Ю., Федулова С.А., Веселовський М.С.</i> Кальцієві сигнали, викликані тонічною імпульсацією гангліозних клітин сітківки ока щура	3
<i>Бондаренко О.І., Сагач В.Ф.</i> Інгібітор мітохондріального Na^+ - Ca^{2+} -обмінника CGP37157 деполаризує ендотеліальні клітини і викликає осциляції мембранного потенціалу	9
<i>Isaeva E.V., Isaev D.S.</i> Anaesthetic and postanesthetic effect of isoflurane on the multiple-unit activity of the immature rat hippocampus	17
<i>Янчук П.І., Приходько Т.П., Пасічніченко О.М., Терехов А.А., Цибенко В.О.</i> Механізми скоротливої дії ацетилхоліну на печінкові вени	21
<i>Донскої Б.В., Чернишов В.П., Осипчук Д.В.</i> Імунофенотипова характеристика двох функціонально різних субпопуляцій натуральних кілерних клітин периферичної крові людини	29
<i>Барінова М.Е., Сльський В.М., Барінов Е.Ф., Сулаєва О.М.</i> Функціональна активність моноцитів і механізми внутрішньоклітинної регуляції індукцйбельної NO-синтази в динаміці ранового процесу	36
<i>Богдановська Н.В., Коцюрuba А.В., Маліков М.В.</i> Особливості обміну агініну й синтезу оксиду азоту у юнаків при адаптації до фізичних навантажень у тренувальному та змагальному періодах	45
<i>Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Неццет О.П., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О.</i> Вплив лікарської форми флокаліну на перебіг ішемії-реперфузії міокарда	55
<i>Цирюк О.І.</i> Шляхи корекції негативного впливу тривалої гіпергастринемії на секрецію соляної кислоти в шлунку	66
<i>Шупрович А.А., Гуріна Н.М., Корпачева-Зінич О.В.</i> Порушення обміну сечової кислоти у щурів з експериментальним інсулінорезистентним синдромом, індукованим фруктозою	72

<i>Гура О.В., Багацька О.В., Лиманський Ю.П.</i> Анальгезія, викликана сумісною дією корвітину і опромінення точки акупунктури мікрохвилями, при соматичному болю у мишей різних генотипів	82
<i>Макаренко М.В., Лизогуб В.С., Кожемяко Т.В., Черненко Н.П.</i> Вікові особливості швидкості центральної обробки інформації у осіб з різним рівнем функціональної рухливості нервових процесів	88
<i>Шеверьова В.М.</i> Вплив хронічного емоційного стресу на поведінку в тесті «відкритого поля» щурів із різним рівнем рухової активності	94
ПАМ'ЯТНІ ДАТИ	
Пам'яті Ірини Миколаївни Алексєєвої	106

К.І. Кузнєцов, В.Ю. Маслов, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

Кальцієві сигнали, викликані тонічною імпульсацією гангліозних клітин сітківки ока щура

На ізольованому препараті сітківки ока щура в конфігурації “ціла клітина” зареєстровано кальцієві сигнали, викликані тонічною імпульсацією гангліозних клітин сітківки (ГКС), та досліджено модульовальний вплив на ці сигнали Kv3-калієвих каналів. Деполяризація ГКС імпульсами струму тривалістю 500 мс призводила до тонічної генерації потенціалів дії (ПД) і розвитку кальцієвих сигналів, амплітуда яких лінійно залежала від середньої частоти ПД, відповідне значення кутового коефіцієнта становило $1,4 \text{ с}\cdot\text{нмоль/л} \pm 0,2 \text{ с}\cdot\text{нмоль/л}$ ($n = 5$). Постійна часу спаду кальцієвих сигналів була $6,8 \text{ с} \pm 1,4 \text{ с}$ ($n = 5$). При аплікації 500 мкмоль/л тетраетиламонію, який у цій концентрації блокує калієві канали Kv3.1/Kv3.2, реєстрували зменшення частоти генерації та збільшення ширини ПД, а також зменшення амплітуди слідової гіперполяризації. Кутовий коефіцієнт залежності амплітуди кальцієвого сигналу від середньої частоти генерації ПД за наявності блокатора зросло до $2,1 \text{ с}\cdot\text{нмоль/л} \pm 0,3 \text{ с}\cdot\text{нмоль/л}$ ($n = 5$). Постійна часу спаду сигналу достовірно не змінилася ($8,9 \text{ с} \pm 1,6 \text{ с}$; $n = 5$). Таким чином, потенціалкервані калієві канали типу Kv3.1/Kv3.2, які відіграють ключову роль у забезпеченні високочастотної тонічної імпульсації ГКС, також модулюють відповідні кальцієві сигнали та запобігають значному збільшенню внутрішньоклітинної концентрації кальцію та його можливій цитотоксичній дії.

Ключові слова: гангліозні клітини сітківки, тонічна імпульсація, кальцієві сигнали, Kv3-калієві канали.

ВСТУП

Гангліозні клітини сітківки (ГКС) ока є кінцевими вихідними нейронами, що передають імпульсацію від зорових рецепторів у центральну нервову систему. Однією з їх властивостей є здатність до високочастотної генерації потенціалів дії (ПД). Імпульсація при відносно тривалій (500 мс) деполяризації більшості ГКС є тонічною, при цьому ПД генеруються з достатньо високою частотою, середнє значення якої може перевищувати 100 с^{-1} [4, 8]. При розвитку ПД і відповідній деполяризації клітинної мембрани активуються високопорогові потенціалкервані кальцієві канали, що призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Слід відзначити, що

кальцієва сигналізація ГКС на цілому препараті сітківки залишається практично недослідженою, у літературі нам відома лише одна праця [7], в якій було проведено реєстрацію змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію на недисоційованих клітинах. При дослідженні кальцієвих сигналів традиційно основну увагу приділяють внутрішньоклітинним і мембранним механізмам, що регулюють концентрацію кальцію (кальцієві депо, кальційіндукований викид кальцію, кальцієві АТФази тощо), тоді як роль потенціалкерваних каналів у формуванні кальцієвого сигналу залишається дослідженою недостатньо.

Ключову роль у забезпеченні високочастотної генерації як у центральних нейро-

нах [9], так і у ГКС [4] відіграють калієві канали типу Kv3.1/Kv3.2, активація яких забезпечує швидку реполяризацію мембрани та відповідно виникнення короткотривалого (близько 1 мс) ПД.

Детальні дані про роль потенціалкеро-ваних каналів, що забезпечують генерацію тонічної імпульсації та модуляцію викли-каних нею кальцієвих сигналів, є важливими як для фундаментальної нейрофізіології, так і для розробки нових підходів у терапії захворювань органів зору.

Мета нашої роботи – дослідження мо-дулювального впливу потенціалкеро-ваних каналів на характеристики кальціє-вих сигналів, викликаних імпульсацією ГКС ока щура.

МЕТОДИКА

Препарування сітківки ока щура та елек-трофізіологічна реєстрація сигналів від ГКС принципово не відрізнялася від описаної в літературі [7, 8]. Щурів лінії Вістар віком 4–6 тиж афіксували за допомогою CO₂ з наступною декапітацією відповідно до правил роботи з дослідними тваринами в установах Національної академії наук України. Препарат сітківки приколювали голками діаметром 25 мкм до дна експе-риментальної камери, вкритої інертним покриттям Sylgard, через яку зі швидкістю близько 1 мл/хв пропускали фізіологічний розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, Нерес – 10, глюкоза – 12; рН 7,4. Блокатор потен-ціалкеро-ваних калієвих каналів тетраетил-амоній (ТЕА) додавали у проточний фізіоло-гічний розчин. Досліди проводили при кімнатній температурі (22°C). Реєстрацію потенціалів у конфігурації “ціла клітина” в режимі фіксації струму проводили з вико-ристанням внутрішньоклітинного розчину такого складу (ммоль/л): глюконат калію – 100, KCl – 50, MgCl₂ – 5, EGTA – 0,2, Нерес – 20, Na-АТФ – 3, Na-АДФ – 3, Na-

ГТФ – 0,5, кальційчутливий барвник Indo-1 (пентакалієва сіль) – 0,1, рН 7,4. Потенціал спокою клітин підтримували на рівні 70 мВ. ГКС активували деполяризувальними імпульсами струму тривалістю 500 мс та амплітудою до 300 пА з інкрементом 5–20 пА. Інтервали між стимулами зазвичай становили 60 с, цього було достатньо для відновлення базової внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Для ГКС у контролі та за наявності блокатора калієвих каналів визначали максимальне значення середньої частоти генерації ПД і показники окремого ПД (поріг, амплітуда, ширина на половині висоти та амплітуда слідової гіперполяризації) за допомогою програм-ного пакета Clampfit 9.0 («Axon Instru-ments»), США)

Зміни концентрації іонів кальцію у нейронах реєстрували з використанням флуоресцентного кальційчутливого барв-ника Indo-1 за допомогою спектрофото-метричної установки («Carin Research Ltd», Велика Британія). У режимі епіфлюо-ресценції світло від ксенонової лампи пропускали через фільтр (360 нм), флюо-ресцентний сигнал від об'єкта за допо-могою системи дихроїчних дзеркал та оптичних фільтрів (408 та 480 нм) розді-ляли на два окремі потоки та реєстрували двома фотоелектронними помножувачами, сигнали від яких подавали на вхід спеціаль-ного підсилювача та при подальшому аналізі визначали їх відношення (R), значення якого відповідає певній концент-рації іонів кальцію [5]. Відповідність значень цього відношення та концентрацій кальцію було визначено експериментально у окремій серії калібрувальних дослідів з використанням внутрішньоклітинних роз-чинів з різною концентрацією кальцію. У цих дослідях було визначено значення R, які відповідають мінімальній (R_{min}) та максимальній (R_{max}) внутрішньоклітинним концентраціям кальцію, а також ефективне значення константи дисоціації барвника

(K_d). Відповідні значення становили: 0,58 (R_{min}), 4,4 (R_{max}) та 1,44 мкмоль/л (K_d). З отриманих у досліді значень R внутрішньоклітинну концентрацію кальцію визначали за наступною формулою: $[Ca] = K_d \cdot (R_{min} - R) / (R - R_{max})$ [5].

У роботі було використано хімічні речовини виробництва «Sigma» (США) та кальційчутливий флуоресцентний барвник Indo-1 (пентакалієва сіль) виробництва «Molecular Probes» (США).

Результати досліджень представлені у вигляді: середнє значення \pm стандартна похибка середнього, об'єм вибірки (n). Достовірність різниці середніх встановлювали з використанням парного тесту t Стьюдента ($P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пасивні електричні властивості, тонічна імпульсація ГКС і показники окремого ПД. Середнє значення потенціалу спокою у ГКС ока щура становило -56 мВ \pm 1 мВ ($n = 11$),

що збігається з даними, отриманим у попередніх дослідженнях [4, 7, 8, 10]. Вхідний опір ($0,8$ ГОм \pm $0,15$ ГОм, діапазон значень $0,4$ – $1,4$ ГОм, $n = 11$), постійна часу мембрани (20 мс \pm 3 мс, діапазон значень 9 – 42 мс, $n = 11$) та ємність клітини (30 пФ \pm 4 пФ, діапазон значень 11 – 50 пФ, $n = 11$) значно відрізнялися для різних клітин. Цей факт узгоджується з літературними даними, отриманими на морфологічно різних ГКС [8] і свідчить про те, що у наших досліді реєстрація проводилася від різних типів ГКС.

При деполяризації ГКС спостерігалася тонічна генерація ПД (рис. 1), середня частота якої при збільшенні амплітуди деполяризуючого імпульсу зростала, сягала певного стаціонарного рівня, а при наступному збільшенні деполяризації генерація ПД припинялася. Максимальній середній частоті становила 60 с⁻¹ \pm 13 с⁻¹ ($n=10$). Показники окремого ПД були: поріг -47 мВ \pm 1 мВ, амплітуда 87 мВ \pm 1 мВ, ширина на половині висоти $1,1$ мс \pm $0,04$ мс, амплітуда гіперполяризації -17 мВ \pm 1 мВ.

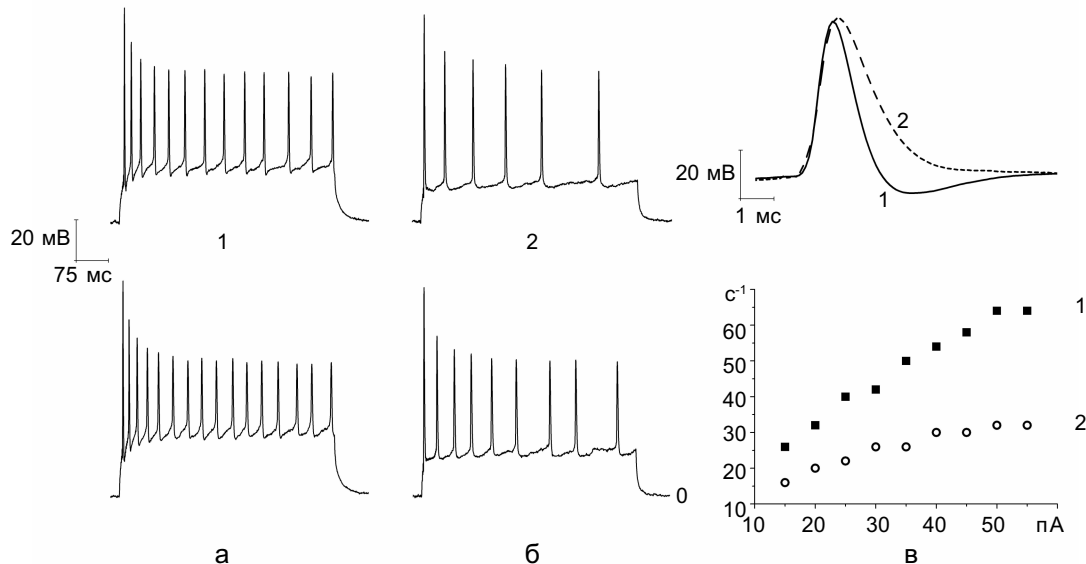


Рис. 1. Дія тетраетиламонію (ТЕА) на тонічну імпульсацію та форму окремого потенціалу дії (ПД) гангліозних клітин сітківки (ГКС) ока щура. Серії ПД, викликані деполяризацією мембрани ГКС, амплітуда деполяризуючих імпульсів 30 пА (верхній ряд) та 50 пА (нижній ряд), у контролі (а) та після аплікації 500 мкмоль/л ТЕА (б); в (верхня панель) – форма окремого ПД у контролі (1) та після аплікації 500 мкмоль/л ТЕА (2); в (нижня панель) – залежність середньої частоти генерації ПД від амплітуди деполяризуючого імпульсу у контролі (1) та після аплікації 500 мкмоль/л ТЕА (2)

Дія ТЕА на частоту імпульсації ГКС та параметри окремого ПД. З літературних даних відомо, що ключову роль у забезпеченні височастотної імпульсації як центральних нейронів [9], так і ГКС [4] відіграють потенціалкервані калієві канали типу $Kv3.1/Kv3.2$. Для них характерною є чутливість до відносно низьких концентрацій ТЕА, значення IC_{50} становить 100–200 мкмоль/л [6]. Аплікація блокатора потенціалкерваних калієвих каналів ТЕА (500 мкмоль/л) суттєво зменшувала частоту генерації ПД у всіх 10 протестованих клітинах (див. рис. 1,б,в). При цьому максимальна частота ПД достовірно зменшувалася до середнього значення $29 \text{ c}^{-1} \pm 7 \text{ c}^{-1}$ ($P < 0,05$, $n = 10$). Також після аплікації блокатора достовірно змінювалися середні значення показників окремого ПД (див. рис. 1,в): ширина на половині висоти ($1,8 \text{ мс} \pm 0,1 \text{ мс}$, $P < 0,05$, $n = 10$) та амплітуда гіперполяризації ($-6 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$, $P < 0,05$, $n = 10$). При цьому значення порога та амплітуди ПД достовірно не змінювались, а ширина ПД збільшувалася внаслідок

уповільнення фази реполяризації.

Таким чином, у ГКС ока щура потенціалкервані калієві канали типу $Kv3.1/Kv3.2$ є основними каналами, що забезпечують височастотну тонічну імпульсацію.

Кальцієві сигнали, викликані імпульсацією ГКС, та їх модуляція потенціалкерваними калієвими каналами. При використанні внутрішньоклітинного розчину з додаванням кальційчутливого флуоресцентного барвника Indo-1 після утворення конфігурації “ціла клітина” спостерігали зростання інтенсивності флуоресценції, яке протягом 5–10 хв сягало стаціонарного рівня, при цьому значення R відповідало середній концентрації кальцію $114 \text{ нмоль/л} \pm 18 \text{ нмоль/л}$ ($n = 5$).

У разі деполяризації ГКС, яка призводила до генерації ПД, підвищувалася внутрішньоклітинна концентрація кальцію, яка експоненційно зменшувалася після припинення імпульсації (рис. 2). Постійна часу спаду кальцієвого сигналу становила $6,8 \text{ с} \pm 1,4 \text{ с}$ ($n = 5$). Залежність амплітуди

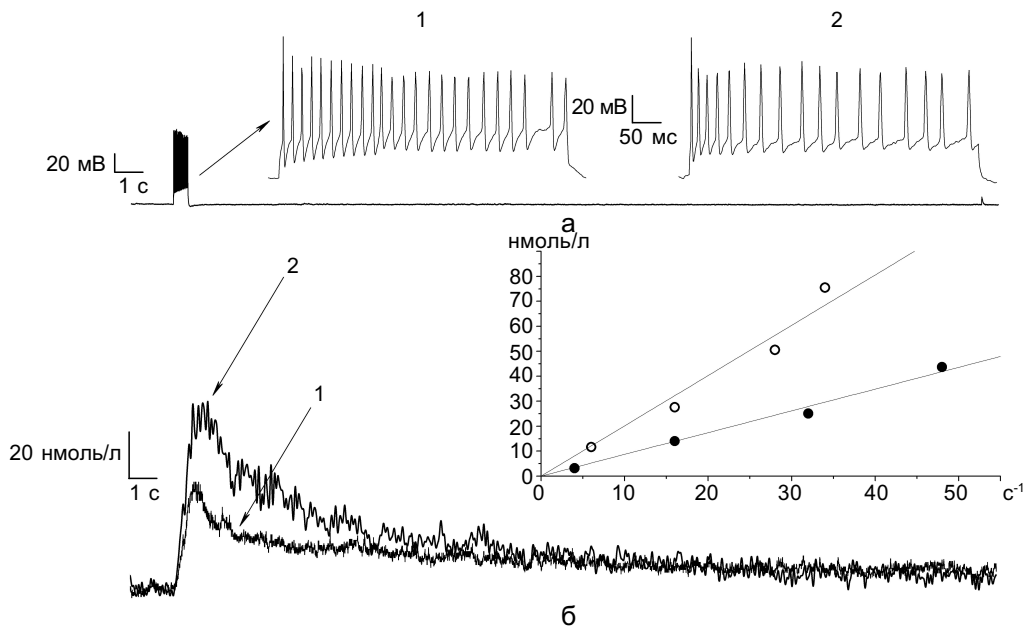


Рис. 2. Дія тетраетиламонію (ТЕА) на кальцієві сигнали, викликані тонічною імпульсацією гангліозних клітин сітківки (ГКС) ока щура. Серії потенціалів дії (ПД) (а), викликані деполяризацією мембрани ГКС, у контролі (1) та після аплікації 500 мкмоль/л ТЕА (2) та відповідні кальцієві сигнали (б), на вставці – залежність амплітуди кальцієвого сигналу від середньої частоти генерації ПД у контролі (1) та після аплікації 500 мкмоль/л ТЕА (2)

кальцієвого сигналу від середньої частоти ПД достатньо добре апроксимувалася лінійною функцією (див. рис. 2,б), відповідний кутовий коефіцієнт був $1,4 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л} \pm 0,2 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л}$ ($n = 5$). Лінійна залежність амплітуди кальцієвого сигналу від частоти генерації ПД може свідчити про відсутність за цих умов ефектів, пов'язаних з кальційіндукованим виходом кальцію з внутрішньоклітинних депо.

Слід також відзначити, що у ГКС ока щура достатньо високочастотна імпульсація призводить до відносно невеликих змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Цей факт зумовлений, вірогідно, саме генерацією ГКС короткотривалих ПД, а не високою буферною ємністю клітин до іонів кальцію [7]. Для перевірки цього припущення нами було досліджено модулювальний вплив ТЕА на показники кальцієвих сигналів. Після аплікації блокатора спостерігали описані вище зміни імпульсації ГКС та параметрів окремого ПД, а також збільшення амплітуди кальцієвих сигналів. Постійна часу спаду сигналу достовірно не змінювалася: значення становило $8,9 \text{ с} \pm 1,6 \text{ с}$ ($n = 5$; рис. 2,б). Кутовий коефіцієнт залежності амплітуди кальцієвого сигналу від середньої частоти генерації ПД за наявності блокатора становив $2,1 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л} \pm 0,3 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л}$. При цьому відношення коефіцієнта за наявності блокатора до контрольного (1,5), було близьке до значення відповідного відношення ширини ПД (1,6).

Таким чином, потенціалкеровані калієві канали типу $Kv3.1/Kv3.2$, які забезпечують високочастотну генерацію ПД у ГКС, водночас модулюють відповідні кальцієві сигнали та запобігають значному зростанню внутрішньоклітинної концентрації кальцію та його можливій цитотоксичній дії при високочастотній імпульсації цих клітин. Підтверджують таке припущення дані клінічних досліджень, у яких було доведено позитивний нейропротекторний вплив застосування блокаторів потенціалкерованих кальцієвих каналів на функціональні

показники зору у хворих на глаукому та діабетичну ретинопатію [1].

Отримані нами результати також свідчать, що побічною дією речовин, що які впливають безпосередньо на кальцієві канали, може бути опосередкований вплив на амплітуду кальцієвих сигналів. Цей факт слід враховувати при розробці нових фармакологічних препаратів і терапевтичних підходів. Так, приміром, з літературних даних відомо, що на калієві канали впливає холіноміметик пілокарпін [2], який використовується при лікуванні глаукоми [3].

К.И. Кузнецов, В.Ю. Маслов, С.А. Федулова, Н.С. Веселовский

КАЛЬЦИЕВЫЕ СИГНАЛЫ, ВЫЗВАННЫЕ ТОНИЧЕСКОЙ ИМПУЛЬСАЦИЕЙ ГАНГЛИОЗНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ ГЛАЗА КРЫСЫ

На изолированном препарате сетчатки глаза крысы в конфигурации «целая клетка» зарегистрированы кальциевые сигналы, вызванные тонической импульсацией ганглиозных клеток сетчатки (ГКС), и исследовано модулирующее влияние на данные сигналы калиевых каналов типа $Kv3$. Деполяризация ГКС импульсами тока длительностью 500 мс приводила к тонической генерации потенциалов действия (ПД) и развитию кальциевых сигналов, амплитуда которых линейно зависела от средней частоты генерации ПД, соответствующее среднее значение углового коэффициента составило $1,4 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л} \pm 0,2 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л}$ ($n = 5$), а среднее значение постоянной времени спада кальциевых сигналов – $6,8 \text{ с} \pm 1,4 \text{ с}$ ($n = 5$). При аплікації 500 мкмоль/л тетраэтиламмония, который в данной концентрации блокирует калиевые каналы $Kv3.1/Kv3.2$, регистрировали снижение частоты генерации и увеличение длительности ПД, а также уменьшение амплитуды следовой гиперполяризации. Значение углового коэффициента зависимости амплитуды кальциевого сигнала от средней частоты генерации ПД в присутствии блокатора составило $2,1 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л} \pm 0,3 \text{ с} \cdot \text{нмоль/л}$. Постоянная времени спада сигналов достоверно не изменилась и составила $(8,9 \text{ с} \pm 1,6 \text{ с}; n = 5)$. Таким образом, потенциал-зависимые калиевые каналы типа $Kv3.1/Kv3.2$, которые выполняют ключевую роль в обеспечении высокочастотной тонической импульсации ГКС, также модулируют соответствующие кальциевые сигналы и предохраняют данные клетки от значительного повышения концентрации внутриклеточного кальция и его возможного цитотоксического действия.

Ключевые слова: ганглиозные клетки сетчатки, тоническая импульсация, кальциевые каналы, $Kv3$ -калиевые каналы.

**K.I. Kuznetsov, V.Yu. Maslov, S.A. Fedulova,
N.S. Veselovsky**

CALCIUM SIGNALS INDUCED BY TONIC FIRING IN THE RAT EYE RETINAL GANGLION CELLS

On rat retinal preparation in whole-cell mode retinal ganglion cells (RGC) tonic firing induced calcium signals were recorded and their modulation by Kv3 potassium channels was studied. RGC depolarization with 500 ms current steps caused tonic action potentials (AP) generation and development of calcium signals which amplitude depended quite linearly on mean AP frequency with mean slope 1.4 ± 0.2 s·nmol/l ($n = 5$). The calcium signals mean tau of decay value was 6.8 ± 1.4 s ($n = 5$). After application of tetraethylammonium (500 mM), which in such concentration blocks Kv3.1/Kv3.2 potassium channels, a decrease in firing frequency, an increase of AP width and a decrease of afterhyperpolarization amplitude were observed. In the presence of the blocker the calcium signal amplitude vs mean AP frequency dependency slope mean value increased to 2.1 ± 0.3 s·nmol/l. The calcium signals tau of decay not changed significantly, the mean value was 8.9 ± 1.6 s ($n = 5$). Thus, voltage-dependent Kv3.1/Kv3.2 potassium channels, which play a key role in tonic firing pattern generation in RGC, also modulate appropriate calcium signals and prevent the cells from significant intracellular calcium increasing and its possible cytotoxic action.

Keywords: retinal ganglion cells, tonic firing, calcium signals, Kv3 potassium channels.

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

International Center Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Веселовская З.Ф., Веселовская Н.Н. Сравнительная эффективность норваска и амлодипина по результатам динамических изменений объективных показателей функционального состояния макулярной зоны

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;
Міжнар. центр молек. фізіології НАН України, Київ
E-mail: masl@biph.kiev.ua*

сетчатки у больных с открытоугольной глаукомой и непролиферативной диабетической ретинопатией без диабетического макулярного отека // Наук. вісн. нац. мед. ун-ту ім. О.О.Богомольця. Актуальні питання глаукоми і нейроофтальмології. – 2009. – 20 (спец. випуск). – С. 41–44.

2. Лук'янець О.О., Яворський В.А. Дія пілокарпіну на акомодативні властивості ізольованих фазних нейронів гіпокампа шура // Фізіол. журн. – 1999. – 45, № 4. – С. 35–40.
3. Cheung W., Guo L., Cordeiro M.F. Neuroprotection in glaucoma: drug-based approaches // Optom. Vis. Sci. – 2008. – 85, №6. – P. 406–416.
4. Henne J, Jeserich G Maturation of spiking activity in trout retinal ganglion cells coincides with upregulation of Kv3.1- and BK-related potassium channels // J. Neurosci. Res. – 75, №1. – P. 44–54.
5. Grienkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // J.Biol.Chemistry. – 2005. – 260, №6. – P. 3440–3450.
6. Gutman G.A., Chandy K.G., Grissmer S., Lazdunski M., McKinnon D., Pardo L.A., Robertson G.A., Rudy B., Sanguinetti M.C., Stuhmer W., Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels // Pharmacol. Rev. – 2005. – 57, №4. – P. 473–508.
7. Mann M., Haq W., Zabel T., Guenter E., Zrenner E., Ladewig T. Age-dependent changes in the regulation mechanisms for intracellular calcium ions in ganglion cells of the mouse retina // Eur. J. Neurosci. – 2005. – 22, № 11. – P. 2735–2743
8. O'Brien B.J., Isayama T., Richardson R., Berson, D.M. Intrinsic physiological properties of cat retinal ganglion cells // J.Physiol. – 2002. – 538, № 3. – P. 787–802.
9. Rudy B., McBain C.J. Kv3 channels: voltage-gated K^{+} channels designed for high-frequency repetitive firing // Trends Neurosci. – 2001. – 24, № 9. – P. 517–526.
10. Wang, G. Y., Robinson, D. W., Chalupa, L. M. Calcium-activated potassium conductances in retinal ganglion cells of the ferret // J.Neurophysiol. – 1998. – 79, №1. – P. 151–158.

Матеріал надійшов до редакції 24.02.2010

О.І. Бондаренко, В.Ф. Сагач

Інгібітор мітохондріального $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника CGP37157 деполяризує ендотеліальні клітини та викликає осциляції мембранного потенціалу

Досліджено вплив інгібіторів мітохондріального $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника CGP37157 та відкриття мітохондріальної пори циклоспорину А на мембранний потенціал та електричні реакції інтактних ендотеліальних клітин аорти щурів, а також культивованих ендотеліальних клітин лінії Ea.hy926. Циклоспорин А не змінював мембранний потенціал в умовах спокою, а також гіперполяризацію у відповідь на дію ацетилхоліну та гістаміну. Показано, що CGP37157 спричинює деполяризацію мембран нестимульованих ендотеліальних клітин, а також пригнічує пролонговану гіперполяризацію у відповідь на дію ацетилхоліну та гістаміну. За наявності CGP37157 за транзйентною гіперполяризацією спостерігається деполяризація з осциляціями мембранного потенціалу великої амплітуди. Остання не спостерігалась у безкальцієвому середовищі. Результати роботи вказують на модульовальний вплив CGP37157 на мембранний потенціал ендотеліальних клітин в умовах спокою і їх електричні реакції на ендотелійзалежні вазодилататори. Можливий механізм дії CGP37157 обговорюється.

Ключові слова: ендотеліальні клітини, мітохондріальний $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінник CGP37157, електричні реакції.

ВСТУП

Підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в ендотеліальних клітинах відіграє вирішальну роль у регуляції ендотелієм судинного тонуусу. Стійке підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ забезпечується завдяки надходженню Ca^{2+} ззовні через кальційпровідні канали, а також за специфічних умов $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінником. Ємнісний кальцієвий вхід вважається одним з головних механізмів надходження Ca^{2+} через плазматичну мембрану незбудливих клітин. Ключовим сигнальним моментом його активації, як добре відомо, є вивільнення Ca^{2+} із ендоплазматичного ретикулула, що активує специфічні депокеровані канали, які можуть бути як високо-селективні для Ca^{2+} , так і такі, що здатні проводити інші катіони, насамперед Na^+ [2].

Незважаючи на те, що в ендотеліальних клітинах відсутні потенціалкервані каль-

цієві канали, які є головним шляхом надходження Ca^{2+} у збудливі клітини, зміни мембранного потенціалу мають велике значення у регуляції надходження Ca^{2+} в ендотелій, змінюючи електрохімічний градієнт для Ca^{2+} [13]. Відомо також, що надходження Ca^{2+} через депокеровані канали ефективно контролюється мембранним потенціалом. Так, під час ремпових зсувів мембранного потенціалу ендотеліальних клітин аорти мишей вхідний струм через депокеровані канали при потенціалі -25 мВ майже в 3 рази менший, ніж при потенціалі -75 мВ [9], і повністю зникає в ділянці позитивних значень. Тому дослідження модуляції мембранного потенціалу є дуже важливим для розуміння можливості та механізмів надходження Ca^{2+} в ендотелій через депокеровані канали за тих чи інших умов.

Протягом останніх років у літературі з'явилося чимало даних, які свідчать про

© О.І. Бондаренко, В.Ф. Сагач

те, що в регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу клітин активну участь беруть мітохондрії [7, 8, 11]. Ця їх роль забезпечується завдяки захопленню Ca^{2+} головним чином через мітохондріальний уніпортер, акумуляції, та його вивільненню з мітохондрій в основному через Na^+ - Ca^{2+} -обмінник, а за умов значного навантаження кальцієм – через мітохондріальну пору [4]. Важливо, що мітохондріальний Na^+ - Ca^{2+} -обмінник, як і плазмолемальний, може оперувати і як в прямому, так і реверсному напрямку, тобто транспортувати Ca^{2+} в мітохондрії.

Відомо, що головна функція мітохондрій – продукція АТФ – тісно пов'язана із підвищенням в них вмісту Ca^{2+} і, таким чином, з регуляцією внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу. Вважається, що під час активації депокерованого надходження Ca^{2+} в клітини мітохондрії попереджують кальційзалежну інактивацію кальційпровідних каналів завдяки захопленню Ca^{2+} в субплазмолемальній зоні і подальшому його вивільненню до ендоплазматичного ретикула [3, 10]. Для дослідження ролі мітохондрій у регуляції кальцієвого гомеостазу різних типів клітин, у тому числі ендотеліальних, інгібітори мітохондріального транспорту Ca^{2+} , в переважній більшості протонифори та інгібітори респіраторного ланцюга, досить широко застосовуються в кальциметричних експериментах [3, 4, 6, 10–12]. Проте в більшості досліджень вплив цих агентів на мембранний потенціал, який безпосередньо регулює надходження Ca^{2+} в ендотеліальні клітини не враховується. В попередній праці [1] ми показали, що агенти, котрі деполяризують мітохондрії і, таким чином, пригнічують захоплення Ca^{2+} мітохондріями, протонифор СССР та інгібітор комплексу I електронно-транспортного ланцюга ротенон пригнічують пролонговану гіперполяризацію ендотеліальних клітин ізольованої аорти щура у відповідь на ацетилхолін. Оскільки міто-

хондріальний Na^+ - Ca^{2+} -обмінник, а також мітохондріальна пора є головним шляхом вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій, мета цієї роботи полягала у дослідженні впливу мембранопроникного інгібітора мітохондріального Na^+ - Ca^{2+} -обмінника CGP37157, а також блокатора мітохондріальної пори циклоспорину А на мембранний потенціал та електричні відповіді інтактних і культивованих ендотеліальних клітин.

МЕТОДИКА

Досліджували ендотеліальні клітини *in situ* аорти щурів віком 3–4 міс. Для відокремлення можливого впливу судинних гладеньком'язових клітин в ізольованих сегментах аорти на електричні реакції ендотеліальних клітин, частина експериментів була проведена на лінії клітин EA.hy926, які походять від ендотеліальних клітин пупкової артерії людини. Грудну частину аорти ізольовали, нарізали на сегменти довжиною 3–4 мм, їх розрізали вздовж і закріплювали в камері об'ємом близько 100 мкл, яку суперфузували розчином такого складу (ммоль/л): NaCl – 145, KCl – 5, MgCl_2 – 1,2, CaCl_2 – 2,5, глюкоза – 10, HEPES – 10 зі швидкістю 1 мл/хв. Мембранний потенціал реєстрували за допомогою методу patch-clamp у режимі фіксації струму та відводили безпосередньо від ендотеліального шару судинної смужки.

Лінію ендотеліальних клітин EA.hy926 вирощували у культуральному середовищі Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM) з додаванням 10 % телячої сироватки та 5 мг/л глюкози. Експерименти проводили через 2–3 доби після посадки клітин на покрівне скло у чашці Петрі на електрично зв'язаних ендотеліальних клітинах. Про наявність електричних зв'язків свідчили близькі контакти між клітинами, а також низький вхідний опір ($62 \text{ мОм} \pm 10 \text{ мОм}$, $n = 12$). В ізольованих клітинах цей показник становив декілька гігаом. Покрівне скло з

клітинами переносили в експериментальну камеру об'ємом близько 200 мкл, яку су-перфузували розчином, склад якого наведе-но вище.

Експерименти проводили при 22–24 °С. Patch-піпетки заповнювали таким розчином (ммоль/л): КСІ – 140, NaCl – 10, HEPES – 10, до якого додавали ністатин (200–300 мкг/мл). Мембранний потенціал реєстрували за допомогою підсилювача Axopatch 200В («Molecular Devices», США).

В роботі застосовували реагенти: гістамін (10 мкмоль/л; «Sigma», США), ацетилхолін (2 мкмоль/л; «Sigma», США), CGP37157 (20 мкмоль/л; «Tocris», Великобританія), бутилбензогідроксін (BHQ), (10 мкмоль/л; «Sigma», США). Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microcal Origin.

РЕЗУЛЬТАТИ

Середнє значення мембранного потенціалу ендотеліальних клітин аорти щурів стано-вило – 42,6 мВ ± 2,1 мВ (n=5). Аплікація ацетилхоліну (2 мкмоль/л) викликала стійку гіперполяризацію мембран ендотеліальних клітин з амплітудою 21,4 мВ ± 2,7 мВ (n=5). Додавання у перфузуючий розчин 20 мкмоль/л CGP37157 під час фази плато гіперполяризації пригнічувало амплітуду гіперполяризації на 8,2 мВ ± 2,7 мВ (n=5; рис. 1).

Для вилучення можливого впливу судин-них гладеньком'язових клітин у мембранній

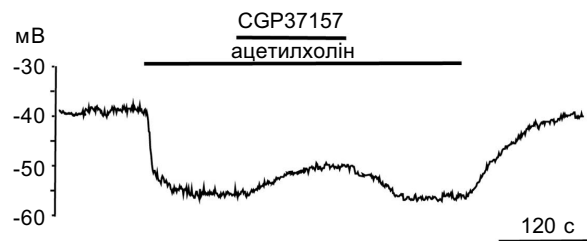


Рис. 1. Вплив інгібітора мітохондріального Na^+ - Ca^{2+} -обмінника CGP37157 на ацетилхолініндуковану гіперполяризацію клітин інтактного ендотелію аорти щурів

деполяризації клітин ендотелію у препараті ізольованої аорти було досліджено дію CGP37157 на мембранний потенціал та електричні відповіді культивованих ендотеліальних клітин. Дія CGP37157 призводила до деполяризації клітин з середньою амплітудою 6,3 мВ ± 2,4 мВ (n=6; рис. 2,а).

Оскільки вирощені в культурному сере-довищі ендотеліальні клітини не здатні генерувати електричні реакції у відповідь на дію ацетилхоліну [16], в експериментах на клітинах лінії Ea.hy926 як ендотелій-залежний агоніст застосовувався гістамін. Додавання у розчин 10 мкмоль/л гістаміну на 6–8-й хвилині дії CGP37157 призводило

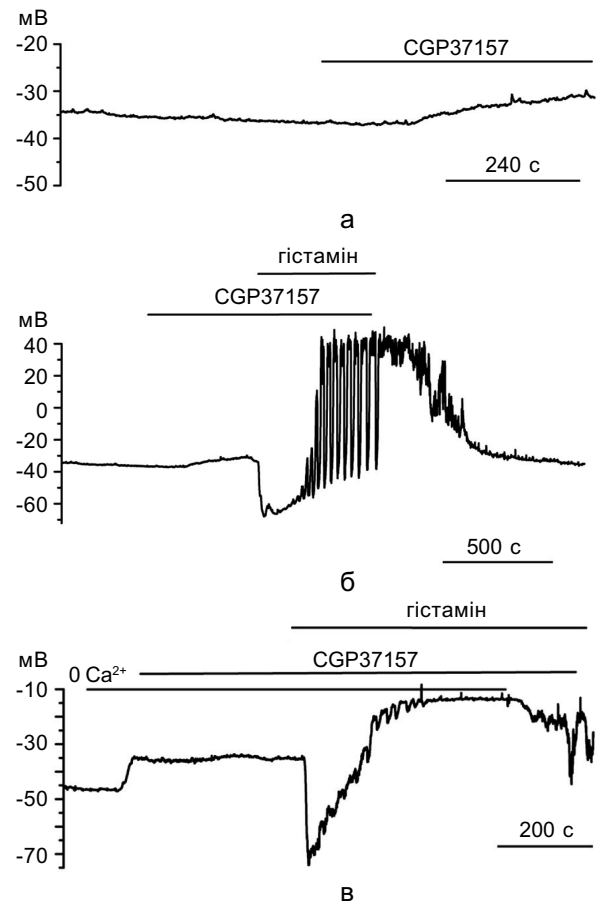


Рис. 2. Залежність впливу інгібітора мітохондріального Na^+ - Ca^{2+} -обмінника CGP37157 на мембранний потенціал і перебіг гістамініндукованої гіперполяризації культивованих ендотеліальних клітин від зовнішньоклітинного кальцію: а – CGP37157, б – CGP37157 і гістамін, в – GP37157 і гістамін у безкальцієвому середовищі

до транзійтної гіперполяризації мембрани ендотеліальних клітин, за якою спостерігалася деполаризація, і мембранний потенціал навіть сягав позитивних значень (у 4 з 7 відведень). На висхідній фазі деполаризації виникали осциляції мембранного потенціалу, амплітуда яких сягала 20–80 мВ (див. рис. 2,б). Відмивання гістаміну та CGP37157 припинювало осциляції і повертало значення мембранного потенціалу до початкового рівня.

Для дослідження залежності осциляцій від зовнішньоклітинного Ca^{2+} , наступна серія експериментів була проведена у безкальцієвому розчині. Суперфузія клітин таким розчином (з додаванням 1 ммоль/л EGTA) призводила до деполаризації ендотеліальних клітин, амплітуда якої становила $11,6 \text{ мВ} \pm 2,3 \text{ мВ}$ ($n=5$). Додавання CGP37157 за таких умов не спричинювало подальшої деполаризації мембрани ендотеліальних клітин. Наступне додавання гістаміну за наявності CGP37157 викликало транзійтну гіперполяризацію, що переходила у деполаризацію, проте не таку потужну, як за наявності зовнішньоклітинного Ca^{2+} . Більше того, у безкальцієвому розчині осциляції мембранного потенціалу за наявності CGP37157 і гістаміну були відсутні, що вказує на кальційзалежність деполаризації та осциляцій (див. рис. 2,в). Подальше додавання Ca^{2+} не призводило до швидкої гіперполяризації ендотеліальних клітин ($n=4$), тоді як у контрольних експериментах (без блокатора мітохондріального Na^+ - Ca^{2+} -обмінника в розчині) спостерігалася потужна і швидка гіперполяризація, що віддзеркалює надходження Ca^{2+} в ендотелій.

Надалі CGP37157 додавали під час фази плато гістамініндукованої мембранної гіперполяризації культивованих ендотеліальних клітин. Це призводило, як і в експериментах на інтактних смужках аорти, до суттєвого пригнічення гіперполяризації, причому ступінь такого пригнічен-

ня в різних експериментах варіював від часткового, амплітудою близько 10 мВ (~30% пригнічення, $n=4$) до повного ($n=3$, рис. 3,а,б). Пригнічення гіперполяризації могло переходити у потужну деполаризацію ($n=5$), яка також супроводжувалась осциляціями мембранного потенціалу (див. рис. 3,в). Цей ефект був зворотним і відмив CGP37157 відновлював подальший перебіг гіперполяризації.

Оскільки наведені вище результати свідчать про те, що блокатор мітохондріального Na^+ - Ca^{2+} -обмінника CGP37157 за наявності гістаміну і Ca^{2+} здатний генерувати потужну деполаризацію мембрани ендотеліальних клітин з осциляціями мембранного потенціалу великої амплітуди,

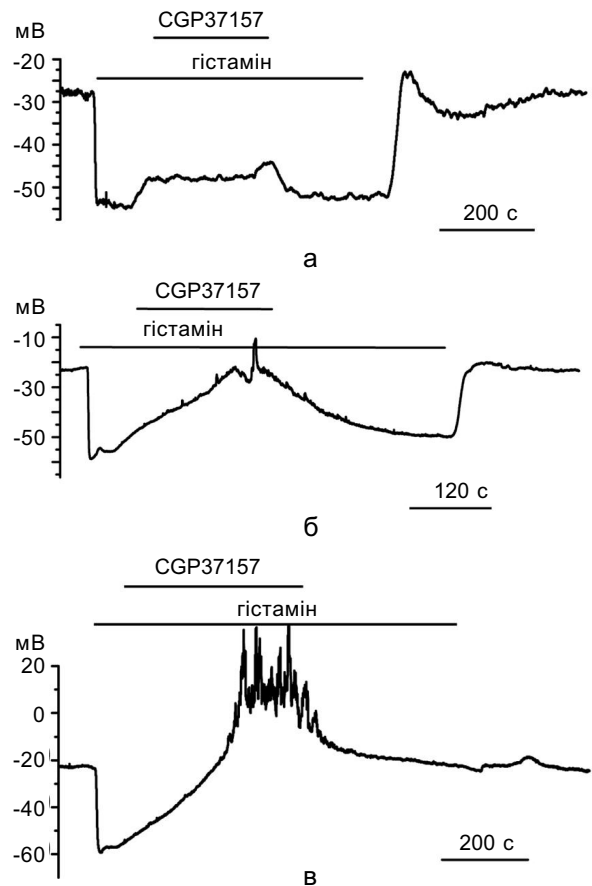


Рис. 3. CGP37157 пригнічує гістамініндуковану гіперполяризацію (а, б – частково та повністю відповідно) та викликає осциляції мембранного потенціалу (в) при даванні під час фази плато

в наступних експериментах для виявлення, чи цей ефект специфічний для гістаміну, замість нього застосовували блокатор Ca^{2+} -АТФази ендоплазматичного ретикула ВНҚ. Додавання у сеферфузуючий розчин CGP37157 за наявності ВНҚ ефективно пригнічувало гіперполяризацію (рис. 4) і призводило до потужної деполяризації з осциляціями мембранного потенціалу.

В експериментах з дослідження ролі мітохондріальної пори в модуляції електричних реакцій ендотеліальних клітин показано наступне. Блокатор мітохондріальної пори циклоспорин А (1 мкмоль/л) не змінював мембранний потенціал інтактних ендотеліальних клітин аорти щурів ($n=6$), а також культивованих ендотеліальних клітин в умовах спокою ($n=4$). Додавання циклоспорину не впливало на перебіг гіперполяризації інтактних ендотеліальних клітин у відповідь на дію ацетилхоліну ($n=4$), а також культиваних ендотеліальних клітин у відповідь на дію гістаміну ($n=4$).

ОБГОВОРЕННЯ

У роботі досліджено вплив селективних інгібіторів мітохондріального Na^+ - Ca^{2+} -обмінника CGP37157 і мітохондріальної пори циклоспорину А на мембранний потенціал та електричні відповіді культи-

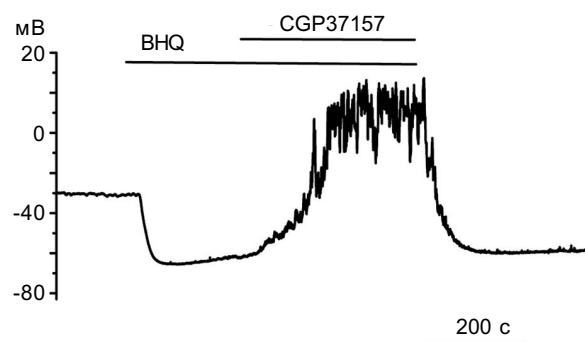


Рис. 4. Вплив CGP37157 на гіперполяризацію ендотеліальних клітин, викликану пригніченням Ca^{2+} -АТФази ендоплазматичного ретикула бутилбензогідрохіноном (ВНҚ)

вованих та інтактних ендотеліальних клітин *in situ* під час дії ендотелійзалежних вазодилаторів гістаміну та ацетилхоліну. Циклоспорин А не впливав на мембранний потенціал, в той час як CGP3718 викликав деполяризацію ендотеліальних клітин. Вилучення Ca^{2+} з зовнішньоклітинного розчину мало деполяризувальний ефект, проте CGP37157-індукована деполяризація не спостерігалась у безкальцієвому середовищі. Оскільки одним із механізмів деполяризації мембрани ендотеліальних клітин у безкальцієвому середовищі може бути пригнічення базального надходження кальцію в ендотелій і, як наслідок, пригнічення базальної активності кальційзалежних калієвих каналів, кальційзалежна деполяризація мембрани ендотеліальних клітин під впливом CGP37157, що спостерігалась під час експериментів, може свідчити про пригнічення базального надходження Ca^{2+} в ендотеліоцити. Чи є такий ефект неспецифічною дією CGP37157 або наслідком пригнічення мітохондріального Na^+ - Ca^{2+} -обмінника, який за нормальних умов вивільнює Ca^{2+} з мітохондрій [5], наразі невідомо. Даних літератури щодо безпосереднього CGP37157-індукованого пригнічення надходження Ca^{2+} в клітини ендотелію в умовах спокою немає.

Якщо така деполяризація плазмолемі під впливом цього інгібітора є наслідком селективного пригнічення мітохондріального Na^+ - Ca^{2+} -обмінника, то деполяризувальний ефект CGP37157 можна пояснити тим, що частина мітохондрій, котра знаходиться в безпосередній близькості до плазмолемі, вивільнює Ca^{2+} в її напрямку, підвищуючи локальну концентрацію Ca^{2+} . Це призводить до підвищення базальної активності кальційзалежних калієвих каналів, що сприяє надходженню Ca^{2+} в ендотелій за електрохімічним градієнтом. Блокування за таким сценарієм трансмітохондріального переміщення Ca^{2+} за допо-

могою CGP37157 спричинює зменшення базального надходження Ca^{2+} в ендотелій, що проявляється в деполяризації клітин і відсутності ефекту CGP37157 у безкальцієвому розчині.

Також показано, що CGP37118 ефективно пригнічує гіперполяризацію ендотеліальних клітин, викликану дією різних за хімічною структурою ендотеліалезалежних дилататорів: ацетилхоліном та гістаміном. Це вказує на те, що ефект CGP37118 не є специфічним для стимуляції гістамінових чи мускаринових рецепторів. Оскільки стимуляція обох типів рецепторів призводить до підвищення внутрішньоклітинного вмісту інозитолтрифосфату (IP_3) застосовувався також інгібітор Ca^{2+} -АТФази ендоплазматичного ретикулу ВНQ, додавання якого спричинювало пасивне, IP_3 -незалежне вивільнення Ca^{2+} .

Пригнічувальний ефект CGP37157 на мембранну гіперполяризацію спостерігався як в експериментах на інтактному ендотелії ізольованих смужок аорти, так і на культивованих ендотеліальних клітинах. Це свідчить про те, що такий ефект не пов'язаний із дією такого агента на гладеньком'язові клітини. Очевидно, пригнічення гіперполяризації ендотеліальних клітин під впливом CGP37157 віддзеркалює пригнічення надходження Ca^{2+} в ендотеліоцити.

Досить несподіваним виявилось спостереження, що додавання CGP37157 у розчин під час фази плато гіперполяризації чи перед додаванням гістаміну призводило не тільки до пригнічення гіперполяризації, але й до генерації потужної деполяризації з осциляціями мембранного потенціалу досить великої амплітуди. Хоча цей феномен нелегко пояснити, є очевидним, що такі осциляції мембранного потенціалу можуть віддзеркалювати зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Для міркувань щодо можливого механізму такої потужної деполяризації слід нагадати, що мітохондрії безпосередньо контактують з ендоплазматичним ретикуломом і, з одного

боку, забезпечують його кальцієм, а з іншого – захоплюють Ca^{2+} , що вивільнюється з нього під час стимуляції IP_3 -чутливих рецепторів чи пригнічення Ca^{2+} -АТФази ретикулума. Блокування мітохондріального $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника порушує цей процес, і мітохондрії більш не здатні захоплювати Ca^{2+} , що вивільнюється з ендоплазматичного ретикулума. Це, очевидно, призводить до значного підвищення локальної концентрації Ca^{2+} внаслідок його вивільнення і мембранної деполяризації з осциляціями мембранного потенціалу, які можуть віддзеркалювати осциляторний патерн вивільнення Ca^{2+} з депо. Як відомо, при значному (10 мкмоль/л і вище) підвищенні вмісту Ca^{2+} активність кальційзалежних калієвих каналів великої провідності пригнічується [15], що супроводжується тривалими інтервалами неактивності, тому масивне вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума за умов нездатності мітохондрій захоплювати Ca^{2+} може призводити до деполяризації мембрани клітин внаслідок накопичення позитивного заряду. Очевидно, цим можна пояснити деполяризацію мембрани клітин ендотелію під час дії гістаміну за умов блокування мітохондріального $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника.

Результати роботи переконливо свідчать про регуляторну роль мітохондрій у регуляції базального та стимульованого надходження кальцію в ендотелій і вперше демонструють комплексний вплив інгібітора мітохондріального $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника CGP37157 на електричні властивості ендотеліальних клітин, а також відсутність ефекту блокади мітохондріальної пори циклоспорином А на електричні реакції ендотеліальних клітин. Останнє, очевидно, пояснюється тим, що мітохондріальна пора, на відміну від мітохондріального $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника, не бере участі в регуляції вмісту субплазмолемального Ca^{2+} ендотеліальних клітин під час дії вазодилататорів ацетилхоліну та гістаміну.

А.И. Бондаренко, В.Ф. Сагач

**ИНГИБИТОР МИТОХОНДРИАЛЬНОГО
NA⁺-CA²⁺-ОБМЕННИКА CGP37157
ДЕПОЛЯРИЗИРУЕТ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ
КЛЕТКИ И ВЫЗЫВАЕТ ОСЦИЛЛЯЦИИ
МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА**

Исследовано влияние ингибиторов митохондриального Na⁺-Ca²⁺-обменника CGP37157 и открытия митохондриальной поры циклоспорина А на мембранный потенциал и электрические реакции интактных эндотелиальных клеток аорты крысы, а также культивируемых эндотелиальных клеток линии Ea.hy926. Циклоспорин А не изменял мембранный потенциал в условиях покоя и гиперполяризацию при действии ацетилхолина и гистамина. Показано, что CGP37157 вызывает деполаризацию мембран нестимулированных эндотелиальных клеток, а также угнетает пролонгированную гиперполяризацию в ответ на действие ацетилхолина и гистамина. В присутствии CGP37157 за транзистентной гиперполяризацией следовала деполаризация, на восходящей фазе которой наблюдались осцилляции мембранного потенциала большой амплитуды, отсутствовавшие в бескальциевой среде. Результаты работы свидетельствуют о модулирующем влиянии CGP37157 на мембранный потенциал и электрические реакции эндотелиальных клеток. Возможный механизм действия CGP37157 обсуждается.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, митохондриальный Na⁺-Ca²⁺-обменник CGP37157, электрические реакции.

A.I. Bondarenko, V.F. Sagach

**AN INHIBITOR OF MITOCHONDRIAL
NA⁺-CA²⁺-EXCHANGER CGP37157
PRODUCES ENDOTHELIAL CELL
DEPOLARIZATION WITH MEMBRANE
POTENTIAL OSCILLATIONS**

We explored the effect of inhibitor of mitochondrial Na⁺-Ca²⁺-exchanger CGP37157 and the effect of mitochondria permeability transition pore inhibitor, cyclosporine A, on the membrane potential and electrical responses to endothelium-dependent dilators in intact endothelial cells from excised rat aorta and EA.hy 926 endothelial cells. Cyclosporin A did not affect the resting membrane potential and hyperpolarization to acetylcholine and histamine in intact and cultured cells. In contrast, CGP37157 (20 μM) evoked membrane depolarization in unstimulated cells and suppressed the sustained component of hyperpolarization to acetylcholine and histamine both in intact and cultured endothelial cells, respectively. This was accompanied by a pronounced depolarization with membrane potential oscillations, which were not observed in the absence of Ca²⁺. We conclude that CGP37157 modulates endothelial membrane potential at rest and electrical responses to endothelium-dependent dilators. Possible mechanisms ac-

companying the CGP37157 action are discussed.

Key words: endothelial cells, mitochondrial Na⁺-Ca²⁺-exchanger, CGP37157, electrical responses.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бондаренко О.И., Сагач В.Ф. Участь мітохондрій в регуляції мембранної гіперполяризації ендотеліальних клітин при дії ацетилхоліну // Фізіол. журн. – 2006 – **52**, № 5. – P.6–11.
2. Albert A.P. Large W.A. Store-operated Ca²⁺ permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells // Cell Calcium. – 2003. – **33**. – P.345–356.
3. Arnaudeau S., Kelley W.L., Jr Walsh J.V., Demareux N., Mitochondria recycle Ca²⁺ to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions // J. Biol.Chem. –2001. – **276**. – P.29430–29439.
4. Barbock D.F., Herrington J., Park Y-B., Hille B (1997). Mitochondria participation in the intracellular Ca²⁺ network // J. Cell Biol. – **136**. – P.833–843.
5. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition // Physiol. Rev. – 1999. – **79**. – P.1127–1155.
6. Caputo C., Bolanos P. Effect of mitochondria poisoning by FCCP on Ca²⁺ signaling in mouse skeletal muscle fibers // Pflug. Arch. – 2008. – **455**(4). – P.733–43.
7. Davidson. Duchon Endothelial mitochondria. Contributing to vascular function and disease // Circulst. Res. – 2007. – **100**. – P.1128–1141.
8. Duszynski J., Koziel R., Brutkowski W., Szczepanowska J., Zablocki. The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry // Biochim et Biophys Acta. – 2006. – **1757**. – P.380–387.
9. Freichel M., Suh S.H., Pfeifer A., Schweig U. Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4-/-mice // Nature Cell Biol. – 2001. – **3**. – P.121–127.
10. Malli R., Frieden M., Osibow K., Zoratti C., Mayer M., Demareux N., Graier W. F. Sustained Ca²⁺ transfer across mitochondria is Essential for mitochondrial Ca²⁺ buffering, store-operated Ca²⁺ entry, and Ca²⁺ store refilling // J. Biol Chem. – 2003. – **278**. – P.44769–44779.
11. Malli R., Frieden M., Trenker M., Graier W. F. The role of mitochondria for Ca²⁺ refilling of the endoplasmic reticulum // Ibid. – 2005. – **280**. – 12114–12122.
12. Maruyama K, Ohta T, Ito S. Involvement of mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchange in intracellular Ca²⁺ increase induced by ATP in PC12 cells // Brain Res. – 2004. – **1013**(1). – P.40–50.
13. Niluis B., Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium // Physiol. Rev. – 2001. – **81**. – P.415–459.

14. Putney J.W., Broad L.M., Braun F. – J. Mechanisms of capacitative calcium entry // J. Cell. Sci. – 2001. – **114**. – P.2223–2229.
15. Rothberg B. S., Bello R. A., Song L., Magleby K. L. High Ca^{2+} concentrations induce a low activity mode and reveal Ca^{2+} -independent long shut intervals in BK channels from rat muscle // J.Physiol. – 1996. – **493** (Pt 3). – 673–689.
16. Tracey W.R., Peach M.J. Differential muscarinic receptor mRNA expression by freshly isolated and cultured bovine endothelial cells // Circulat Res. – 1992. – **70**. – 234–240.

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: abond01@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 01.11.2009

E.V. Isaeva, D.S. Isaev

Anaesthetic and postanaesthetic effect of isoflurane on the multiple-unit activity of the immature rat hippocampus

We investigated anesthetic and postanaesthetic effect of isoflurane on the multi-unit activity (MUA) in the CA3 region of immature rat hippocampus. MUA amplitude did not significantly change during application of isoflurane. On the other hand MUA frequency significantly decreased during the anesthesia. After isoflurane discontinuation two phases of MUA frequency recovery were observed: initial rapid increase followed by a slower recovery to the control level. Comparison of recovering period of the receptor mediated systems and spontaneous field activity from isoflurane anesthesia is discussed.

Key words: isoflurane, multiple-unit activity, rat, hippocampus.

INTRODUCTION

Isoflurane is a volatile anesthetic which induces and maintains general anesthesia by depression of the central nervous system. Isoflurane is widely used in clinical practice in children and adult patients; however the precise mechanism of the action of this anesthetic is not clear. In spite of that fact that general anesthetics result in loss of consciousness, structures such the medial septum and hippocampus remain active during the general anesthesia. It has been proposed that these forebrain structures participate in maintaining awareness and movements during general anesthesia [11]. In our previous report we showed that isoflurane effectively stop seizures induced by intrahippocampal injection of high potassium/low magnesium contained artificial cerebrospinal fluid (ACSF) in immature rats [6]. The goal of the present study is to characterize spontaneous field activity in the rat hippocampus during isoflurane anaesthesia and in postanaesthetic transition period.

METHODS

Acute hippocampal slices were prepared from

Sprague-Dawley rats aged postnatal (P) days 8-15 as previously described [8]. Briefly, hippocampal slices (500 μ m) were cut using a Leica VT 1000S vibroslicer (Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Germany). For recordings, slices were transferred to a chamber mounted on an Olympus BX51WI (Japan) microscope with an X40 water-immersion objective and infrared, differential interference contrast optics. The slices were continuously superfused with oxygenated (95 % O₂-5% CO₂) ACSF consisted of the following composition: 125 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂, 24 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, and 11 mM glucose at a rate of 2-4 ml/min at 30-32°C. Extracellular field potential recordings were obtained from CA3 pyramidal cell layer. Field potential recordings were made using borosilicate glass capillaries filled with ACSF and two-channel AC differential amplifier (A-M Systems, Carlsborg, WA). Pipette resistance ranged from 1-3 M Ω . All recordings were digitized (10 kHz) online with an analogue-to-digital converter Digidata 1322A (Axon Instruments, Union City, CA) and analyzed us-

© E.V. Isaeva, D.S. Isaev

ing Clampfit (Axon Instruments, Foster City, USA) and Origin 7.0 (Microcal Software, Northampton, MA) software. Application of isoflurane was made using isoflurane vaporizer (Isotec 3, Ohmeda Medical System, Herts, UK). To minimize loss and binding of isoflurane, application was made using polytetrafluoroethylene tubes.

RESULTS AND DISCUSSION

In the extracellular recording, MUA reflects the action potentials from 10-100 neurons located in the vicinity of the recording electrode. Spike amplitudes ranged 50-150 μV from the noise level, suggesting that electrodes detected discharges from multiple neurons. MUA was always apparent in extracellular records from the CA3 pyramidal cell layer (Fig. 1). The average inter-event interval of detected spikes in control condition was 88.3 ± 20.3 ms ($n=12$). Following the application of 1.5 minimum alveolar concentration (MAC) of isoflurane the inter-event interval of spikes greatly increased consistent with a general sedative action of the anesthetic agent (Fig. 1 and 2A). We did not find a significant difference in maximal amplitude of spikes recorded from slices in control and isoflurane exposed conditions ($p=0.96$, Mann-Whitney test, Fig. 2B). After isoflurane discontinuation two phases of spike frequency recovery were observed: initial rapid recovery (2 min) followed by a slower recovery (near 50 min). Only in 4 slices out of 12 the frequency of spikes reached

their control level after 10-20 minutes of washout. In the rest 8 slices MUA frequency rapidly and greatly increased comparatively to the control MUA frequency. The MUA frequency was still significantly increased comparatively to control conditions thirty minutes after isoflurane washout ($p<0.05$, Mann-Whitney test, Fig. 2A). The amplitude of MUA was not altered by discontinuation of isoflurane exposure.

Recording of MUA reflects the spontaneous activity of large number of neurons in the vicinity of the extracellular electrode. This activity of a neuronal network may depend on afferent signaling or being result from processes intrinsic to the network. In vitro studies suggest that many brain areas, including CA3 pyramidal cell layer, may generate discharges in the absence of external inputs (Cohen and Miles, 2000). Both intrinsic cellular properties and synaptic connections within the network could contribute to MUA activity. There is general agreement that GABA_A receptors are an important target for isoflurane [1, 2, 9, 10]. On the other hand, many studies show the excitatory synaptic system as a potential target of general anesthetics including isoflurane [12, 14, 17]. Also non-receptor mediated action of isoflurane was shown in neocortical and hippocampal neurons [3, 5].

In our previous report we show that application of isoflurane significantly increased the tonic conductance, decreased the amplitude and frequency, and prolonged the decay of spontaneous inhibitory postsynaptic

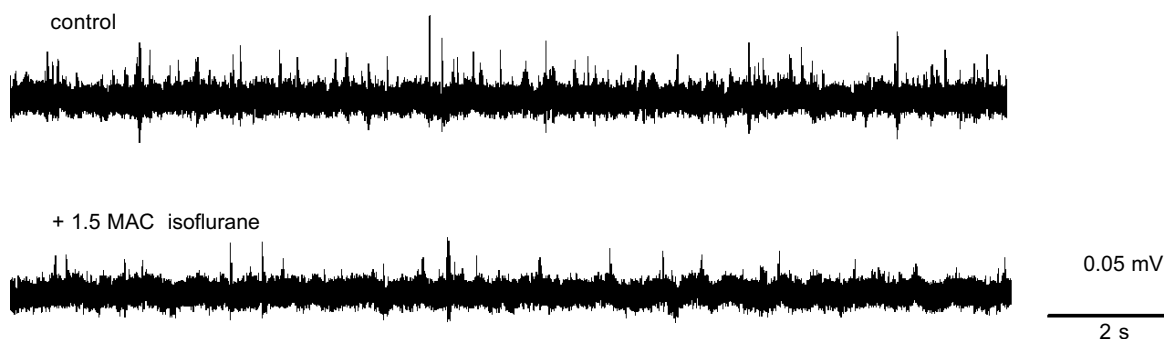


Fig. 1 Isoflurane decreases the hippocampal spontaneous firing activity. Extracellular recordings were made from hippocampal CA3 pyramidal layer of P11 rat before (upper panel) and during (lower panel) exposure to isoflurane

currents (sIPSC) recorded from hippocampal pyramidal neurons [6]. Also isoflurane reduced the amplitude and charge transfer of nonNMDA mediated spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC). Decreasing of the MUA frequency during isoflurane anesthesia can be accounted at least in part on its effect on synaptic transmission.

Previous report demonstrates that recovering from isoflurane was different for inhibitory and excitatory neuronal activity recorded in hippocampal fraction [7]. Parameters of nonNMDA sEPSCs completely recovered to control conditions after 10 min of washout from isoflurane. Nishikawa and MacIver [13] using the same concentration of isoflurane as in the present study showed that fEPSPs mediated by postsynaptic NMDA receptors are

more sensitive to clinically relevant concentrations of isoflurane than non-NMDA receptor mediated responses, and full recovery of nonNMDA and NMDA fEPSPs occurred during 30 minutes of washout from isoflurane. We conclude that the increasing of the frequency of multi-unit activity during isoflurane washout could not depend on the recovery of the excitatory synaptic transmission.

Washout of inhibitory synaptic transmission from isoflurane anesthesia is substantially slower than the recovery of the excitatory synaptic transmission [8]. Activation of GABA mediated Cl⁻ channels results in intracellular accumulation of chloride and depression of inhibition. We suggest that increasing Cl⁻ intracellular concentration due to the increasing of opening time of GABA mediated Cl⁻ channels can explain at least in part increasing of MUA frequency during washout of isoflurane. Another possible explanation of prolonged recovery of MUA from anesthesia could be account for prolonged recovering period of non-receptor systems from anesthesia [16].

Recovery from general anesthesia is complex process and can take from minutes to hours depending on anesthetic agent. From clinical studies emergence time from discontinuation of isoflurane anesthesia to command response, and orientation were quite fast (12 ± 0.5 min), however complete recovery from isoflurane anesthesia takes hours [15]. The present study adds further insight into understanding cellular mechanisms of recovery from inhalation anesthetic agents.

Supported by NATO Science Program.

О.В. Ісаєва, Д.С. Ісаєв

АНЕСТЕЗІЙНИЙ ТА ПОСТАНЕСТЕЗІЙНИЙ ЕФЕКТ ІЗОФЛЮРАНА НА ЕЛЕКТРИЧНУ АКТИВНІСТЬ НЕЙРОНІВ У ГІПОКАМПІ МОЛОДИХ ЩУРІВ

Ми досліджували анестезійний та постанестезійний вплив ізофлюрану на електричну активність нейронів (ЕАН) у ділянці гіпокампа СА3 молодих щурів. Ізофлюран істотно не змінював амплітуду ЕАН, з іншого боку, частота ЕАН

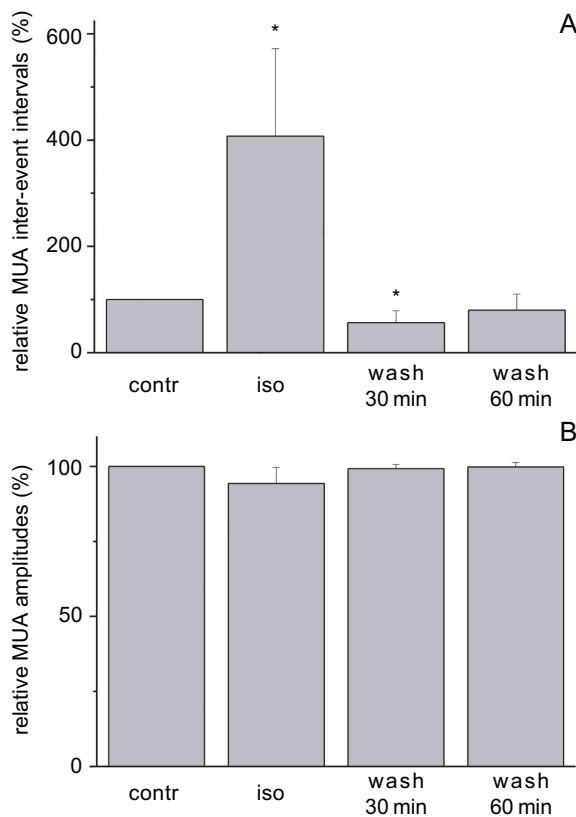


Fig.2 Effect of isoflurane on different characteristics of MUA activity. (A, B) Summary plots show the effect of 1.5 MAC of isoflurane on inter-event interval and amplitude of MUA. All values are Means \pm SEM

значно знизилася. Після припинення аплікації ізофлюрану спостерігали дві фази відновлення частоти ЕАН: по-перше, швидке зростання, а потім повільне зниження до контрольного рівня. Порівняння відновлення рецепторної системи і активності нервової мережі після дії ізофлюрану обговорюється.

Ключові слова: ізофлюран, електрична активність нейронів, гіпокамп, шур.

Е.В. Исаева, Д.С. Исаев

**АНЕСТЕТИЧЕСКИЙ И
ПОСТ-АНЕСТЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ
ИЗОФЛЮРАНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ
АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ В ГИППОКАМПЕ
МОЛОДЫХ КРЫС**

Мы исследовали анестетический и постанестетический эффект изофлюрана на электрическую активность нейронов (ЭАН) в области гиппокампа СА3 молодых крыс. Изофлюран существенно не изменял амплитуду ЭАН, в то же время частота ЭАН значительно снизилась. После прекращения аплікации изофлюрана наблюдалось две фазы восстановления частоты ЭАН: быстрое увеличение вначале, с последующим медленным снижением до контрольного уровня. Сравнение действия изофлюрана на синаптическую активность и на общую активность нервной сети обсуждается.

Ключевые слова: изофлюран, электрическая активность нейронов, гиппокамп, крыс.

REFERENCES

1. Antkowiak B. Different actions of general anesthetics on the firing patterns of neocortical neurons mediated by the GABA(A) receptor // *Anesthesiology*. – 1999. – **91**. – P.500–511.
2. Banks M.I., Pearce R.A. Dual actions of volatile anesthetics on GABA(A) IPSCs: dissociation of blocking and prolonging effects // *Ibid.* – 1999. – **90**. – P.120–34.
3. Berg-Johnsen J., Langmoen I. A. Mechanisms concerned in the direct effect of isoflurane on rat hippocampal and human neocortical neurons // *Brain Res.* – 1990. – **507**. – P. 28–34.
4. Cohen I., Miles R. Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges in in vitro hippocampus // *J. Physiol.* – 2000. – **524**(2). – P.485–502.

5. el-Beheiry H., Puil E. Postsynaptic depression induced by isoflurane and althesin in neocortical neurons // *Exp. Brain Res.* – 1989. – **75**. – P.361–368.
6. Isaeva E. V. Effects of isoflurane on hippocampal seizures at immature rats in vivo // *Фізіол. журн.* – 2008. – **54**(5). – P.40–45.
7. Isaeva E., Isaev D., Holmes G. L. Anesthetic and postanesthetic effects of isoflurane on neuronal activity in the rat hippocampus // *Neurophysiology*. – 2007. – **39**. – P.325–326.
8. Isaeva E., Isaev D., Khazipov R., Holmes G.L. Selective impairment of GABAergic synaptic transmission in the flurothyl model of neonatal seizures // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – **23**(6). – P.1559–1566.
9. Jones M.V., Brooks P.A., Harrison N.L. Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl⁻ currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics // *J. Physiol.* – 1992. – **449**. – P.279–293.
10. Jones M.V., Harrison N.L. Effect of volatile anesthetics on the kinetics of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons // *J. Neurophysiol.* – 1993. – **70**(4). – P.1339–1349.
11. Ma J., Shen B., Stewart L.S. The septohippocampal system participates in general anesthesia // *J. Neurosci.* – 2002. – **22**. – P.1–6.
12. MacIver M.B., Mikulec A.A., Amagasu S.M., Monroe F.A. Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions // *Anesthesiology*. – 1996. – **85**. – P.823–34.
13. Nishikawa K., MacIver M.B. Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA receptors is more sensitive to isoflurane than are non-NMDA receptor-mediated responses // *Ibid.* – 2000. – **92**(1). – P.228–236.
14. Ouanounou A., Carlen P.L., El-Beheiry H. Enhanced isoflurane suppression of excitatory synaptic transmission in the aged rat hippocampus // *Brit. J. Pharmacol.* – 1998. – **124**. – P.1075–1082.
15. Philip B.K., Kallar S.K., Bogetz M.S. A multicenter comparison of maintenance and recovery with sevoflurane or isoflurane for adult ambulatory anesthesia. The Sevoflurane Multicenter Ambulatory Group // *Anesth. Analg.* – 1996. – **83**(2). – P.314–319.
16. Ries C.R., Puil E. Mechanism of anesthesia revealed by shunting actions of isoflurane on thalamocortical neurons // *J. Neurophysiol.* – 1999. – **81**(4). – P.1795–1801.
17. Wakasugi M., Hirota K., Roth S.H., Ito Y. The effects of general anesthetics on excitatory and inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus in vitro // *Anesth. Analg.* – 1999. – **88**. – P. 676–680.

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

E-mail: olena.isaeva@biph.kiev.ua

Received 22.09.2010

П.І. Янчук, Т.П. Приходько, О.М. Пасічніченко, А.А. Терехов, В.О. Цибенко

Механізми скоротливої дії ацетилхоліну на печінкові вени

У гострих дослідях ацетилхолін звужує венозні судини печінки наркотизованих щурів, викликаючи мобілізацію крові із органа, і розширює сфінктери печінкових вен на виході з печінки, сприяючи посиленню відтоку депонованої в печінці крові. Констрикторні реакції емнісних судин печінки на дію ацетилхоліну реалізуються через активацію М-холінорецепторів ендотеліоцитів з подальшим залученням посередника, ймовірно, норадреналіну, який активує α -адренорецептори на гладеньком'язових клітинах цих судин. Розслаблення сфінктерів печінкових вен здійснюється завдяки виділенню в стінках судин під впливом ацетилхоліну посередника, можливо, адреналіну, який у свою чергу активує β -адренорецептори на гладеньком'язових клітинах печінкової вени. Очевидно, що до останніх реакцій частково залучений і монооксид азоту.

Ключові слова: ацетилхолін, печінкові вени, скоротливі реакції, М-холінорецептори, α - і β -адренорецептори.

ВСТУП

Раніше нами було показано, що судинозвужувальна дія ацетилхоліну у ворітному руслі печінки реалізується частково через Н-холінорецептори, локалізовані на мембрані ендотеліоцитів ворітних судин печінки або на адренергічних нейронах у стінках цих судин [1]. Вказані клітини, на нашу думку, синтезують і виділяють якісь посередники, у тому числі норадреналін, котрі, діючи на м'язовий шар ворітної вени, призводять до її звуження. Нами було також виявлене зменшення кровонаповнення печінки (КНП) у відповідь на внутрішньопортальне введення ацетилхоліну [4]. Відомо, що за зміни КНП відповідають емнісні судини органа, до яких насамперед відносяться власне печінкові вени, а також певною мірою синусоїди печінки, діаметр яких перевищує такий звичайних капілярів у декілька разів. Завдяки цьому та великій сумарній кількості, синусоїди здатні вміщувати в собі істотну частку депонованої в печінці крові. У разі необхідності кров, що міститься у

емнісних судинах печінки може бути спрямована до системного кровоносного русла [7].

Метою нашої роботи було дослідити скоротливу дію ацетилхоліну на емнісні судини печінки, зокрема на печінкові вени, та з'ясувати її механізми.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені за умов гострого експерименту *in vivo* на 18 наркотизованих щурах (уретан – 1 г/кг, внутрішньоочеревино), а також *in vitro* на ізольованих препаратах печінкових вен. Тиск крові в сонній артерії та ворітній вені реєстрували електроманометром ЕМТ-31, зміни КНП – реографічним методом у нашій модифікації [2] за допомогою реографа РГ-4-01. Усі показники записували на реєстраторі Н071.6М.

У дослідях *in vitro* за допомогою двохканального реєструвального пристрою, що складався з 2 механотронів 6МХ1С, підси-

лювача постійного струму, осцилографа С1-64А та реєстратора НЗ38 одночасно записували скорочення гладеньких м'язів ізольованих повздовжніх смужок різних ділянок печінкової вени щура, які закріплювали в плексигласовій камері та перфузували підігрітим ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) розчином Тіроде. Досліджувані речовини вводили в перфузат, що омивав препарати зі швидкістю 2–3 мл/хв.

У дослідженнях використовували препарати, які вводили у ворітну вену в дозах: ацетилхолін (ФО “Мосмедпрепараты”, Москва) – 1 мкг/кг, норадреналін (ВАТ “Здоров’я”, Харків) – 5 мкг/кг, атропін (“Воронежский химфармзавод”, Росія) – 1 мг/кг; фентоламін (“Гугужес пирмойи”, Литва) – 2 мг/кг. У дослідах *in vitro* застосовували також такі препарати: піроксан ($1,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) і атенолол ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; ВАТ “Здоров’я”, Харків) та тубокурарин ($2 \cdot 10^{-6}$ моль/л; “Sigma”, США).

Для перевірки розподілу на нормальність було використано W-тест Шапіро–Уїлксона, тест Левена, перевірку ексцесу та асимет-

рії. Ймовірність похибки першого роду $\alpha > 0,05$. Оскільки отримані нами результати досліджень виявилися нормально розподіленими ми розраховували середнє значення (M) і похибку середнього ($\pm m$). Порівняння вибірок проводилося за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вихідні значення досліджуваних показників кровообігу у тварин *in vivo* становили: системний артеріальний тиск (САТ) – 105,5 мм рт.ст. $\pm 6,11$ мм рт.ст., тиск у ворітній вені (Твв) – 6,3 мм рт.ст. $\pm 0,24$ мм рт.ст., КНП – ($0,22 \pm 0,024$) мл/г маси органа. Внутрішньопортальне введення ацетилхоліну викликало підвищення Твв на 23,5% ($P < 0,001$) та зменшення САТ на 39,5% ($P < 0,001$) і КНП на 21,7% ($P < 0,05$; рис. 1,а). Це свідчить про вазоконстрикторний вплив ацетилхоліну на ворітні та печінкові вени і підтверджує загальновідомий факт розширення артеріальних судин.

Внутрішньопортальне введення М-хо-

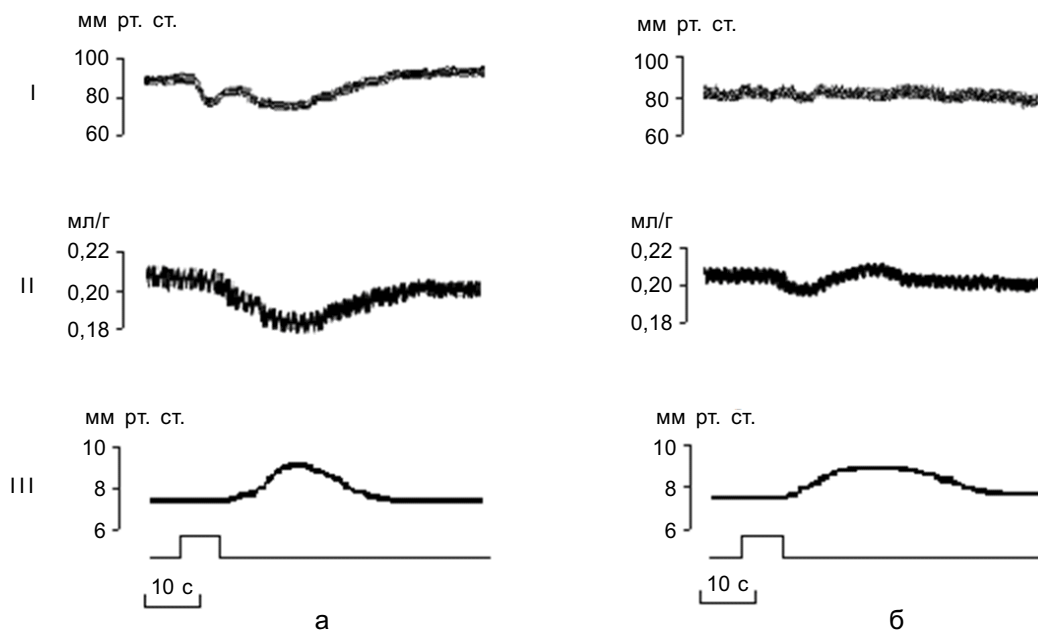


Рис. 1. Зміни системного артеріального тиску (I), кровонаповнення печінки (II) та тиску у ворітній вені (III) у відповідь на введення ацетилхоліну (1 мкг / кг) до (а) і під час (б) блокади М-холінорецепторів атропіном (1 мг/кг). Відмітка внизу – введення препарату

лінолітика атропіну практично не впливало на перебіг пресорних реакцій ворітних судин у відповідь на дію ацетилхоліну, але істотно пригнічувало при цьому зміни САТ, а реакції КНП майже повністю усувало. Причому після незначного (і до того ж невірогідного) зменшення КНП спостерігалось навіть невелике його збільшення (див. рис.1,б).

Відсутність блокади атропіном реакції підвищення Твв підтверджує наші попередні дослідження [4] та вказує на наявність опосередкованого шляху реалізації звужувальної дії ацетилхоліну на порталні судини печінки. Разом з тим повне усунення атропіном реакцій КНП є підтвердженням того, що на внутрішньопечінкові ємнісні судини ацетилхолін діє, активуючи саме мускаринові холінорецептори.

Крім описаних вище змін печінкової гемодинаміки, нашу увагу, як і раніше, привернули часові характеристики цих реакцій, особливо їхні латентні періоди. Виявилось що, латентний період реакцій КНП ($11,2 \text{ с} \pm 2,5 \text{ с}$) був майже таким, як і змін Твв ($12,1 \text{ с} \pm 2,0 \text{ с}$) і втричі тривалішим за латентний період реакцій САТ ($4,0 \text{ с} \pm 0,3 \text{ с}$). Це вказує на те, що до реакцій КНП на дію ацетилхоліну, так само, як і до змін Твв, можуть бути також залучені посередники.

Як уже зазначалося нами раніше, однією із гіпотез, яка пояснює можливий механізм вазоконстриктивної дії ацетилхоліну у системі ворітної вени є виділення норадреналіну як посередника, який, активуючи α -адренорецептори гладеньком'язових клітин (ГМК) ворітної вени, викликає її звуження. На разі ми досліджували зміни КНП, зумовлені дією ацетилхоліну, за умов блокади α -адренорецепторів фентоламіном. Повторне введення ацетилхоліну у ворітне русло на фоні дії фентоламіну викликало депресорні реакції САТ, амплітуда яких була майже такою, як і до блокади α -адренорецепторів, та практично не впливало на Твв і КНП (таблиця). Такі реакції свідчать про те, що фентоламін пригнічує судинозвужувальні реакції ворітних і печінкових вен, викликані дією ацетилхоліну.

Щоб пересвідчитись у тому, що α -адренорецептори печінкових вен заблоковані, ми порівнювали реакції КНП на введення норадреналіну до і під час блокади фентоламіном. Введення норадреналіну викликало зменшення КНП на $36,5 \%$ ($P < 0,01$) до та майже не змінювало його під час дії фентоламіну.

Під депонуючою функцією будь-якого органа, в тому числі й печінки, вважають

Реакції системного артеріального тиску, тиску у ворітній вені та кровонаповнення печінки у відповідь на внутрішньопортальне введення ацетилхоліну (1мкг / кг) до (контроль) і під час блокади α -адренорецепторів фентоламіном (2 мг/кг)

Показники	Контроль			Під час дії фентоламіну		
	Вихідний рівень	Максимум реакції	%	Вихідний рівень	Максимум реакції	%
Системний артеріальний тиск, мм рт. ст.	108,9±6,9	64,0±3,8 ($P < 0,001$) n=10	58,8±2,2	92,2±6,2	55,6±3,3 ($P < 0,01$) n=10	60,30±2,1
Тиск у ворітній вені, мм рт. ст.	6,7±0,19	8,0±0,4 ($P < 0,01$) n=12	121,5±3,3	5,9±0,3	6,1±0,2 ($P > 0,05$) n=12	103,4±1,5
Кровонаповнення печінки, мл/100 г	22,2±2,4	17,1±0,4 ($P < 0,05$) n=12	77,2±1,1	22,2±2,4	21,7±0,26 ($P > 0,05$) n=12	97,7±0,9

здатність зберігати великі об'єми крові, тоді як зворотною функцією є мобілізація крові – викид її із депо до системного кровоносного русла. Тому можна уявити собі, що є певні ділянки венозних судин, які здатні до інтенсивного звуження, чим і сприяють виштовхуванню із судин депонованої в них крові. До цього часу остаточно не з'ясовано, які саме судини печінки і якою мірою беруть участь у депонуванні крові органом під впливом різних чинників. Більшість дослідників вважає, що до реалізації цієї функції залучені ворітні вени та печінкові вени, а також синусоїди. Особлива увага звертається на печінкові вени, які чинять малий опір току крові та незначно фіксуються оточуючими тканинами, що полегшує їхнє пасивно-еластичне розширення і накопичення в них значних об'ємів крові.

Деякі автори вважають, що істотну роль у формуванні печінкової гемодинаміки відіграють її синусоїди [11]. Однак на перший погляд, важко уявити, яким чином вони змінюють свій просвіт, адже у їхньому складі відсутні м'язові волокна. Вважається, що такі судинорухові реакції відбуваються завдяки скоротливій активності зірчастих клітин. Як відомо, крім ендотеліальних клітин до складу синусоїдної стінки входять зірчасті ретикулоендотеліоцити, клітини Купфера та ямочні клітини. До зірчастих ретикулоендотеліоцитів відносять клітини Іто, перицити та ліпоцити печінки [9]. Саме клітини Іто мають важливе значення у регуляції діаметра синусоїдів. Вони розташовані навколо останніх і містять у своєму складі скоротливий білок десмін та α -актин гладеньких м'язів. Тому вплив на ці клітини вазоактивних речовин призводить до їхнього скорочення або розслаблення. Завдяки особливостям свого розташування, клітини Іто, скорочуючись, стискають синусоїди і, навпаки, розслаблюючись, збільшують їх просвіт [9]. Окрім того, просвіт синусоїдів регулюється також сфінктерами та клітинами Купфера. Останні

здатні синтезувати оксид азоту, який діє на судини і змінює їх діаметр [8]. Роль пресинусоїдних сфінктерів можуть відігравати ворітні венули, які здатні змінювати свій діаметр, тим самим регулюючи надходження крові у синусоїди.

Результати наших досліджень свідчать про те, що реакції мобілізації крові із печінки у відповідь на дію ацетилхоліну здійснюються, швидше за все, за участю печінкових вен і, можливо, синусоїдів, але без залучення внутрішньопечінкових ворітних вен. Такого висновку ми дійшли на підставі того, що зменшення КНП, зумовлене впливом ацетилхоліну, усувається атропіном, тоді як підвищення тиску у ворітній вені атропін не блокує. Відомо, що зміни тиску у ворітній вені залежать, насамперед від тонуусу внутрішньопечінкових ворітних судин. Якби останні брали участь у зменшенні КНП на дію ацетилхоліну, то ці реакції усувалися б атропіном лише частково, а не повністю, як це спостерігалось у наших дослідах.

Отже, отримане нами зменшення КНП у відповідь на введення ацетилхоліну, в першу чергу спричинене звуженням істинно емнісних судин: печінкових венул і вен малого і середнього діаметра, а також може бути результатом як звуження пресинусоїдних сфінктерів, так і скорочення клітин Іто, які ініціюють зменшення просвіту печінкових синусоїдів. Усунення змін КНП на дію ацетилхоліну атропіном і фентоламіном вказує на те, що здійснюються ці вазоконстрикторні ефекти, ймовірно, через активацію М-холінорецепторів ендотеліоцитів з подальшим залученням посередника, зокрема норадреналіну, який активує α -адренорецептори на ГМК емнісних судин.

Цікавим питанням є з'ясування ролі печінкових вен, які знаходяться на виході з печінки, у регуляції її кровообігу. У дослідах на собаках виявлено, що печінкові вени містять сфінктерні ділянки із смугастої м'язової тканини, і розташовані ці сфінктери

за 1–2 см від місця їх впадання у задню порожнисту вену [5]. Говориться про те, що сфінктери печінкових вен здатні регулювати відтік крові з печінки [5, 12]. Однак мало відомостей щодо дії ацетилхоліну на печінкові вени. Так, Holroyde та співавт. [6] вказують на те, що дія ацетилхоліну викликає звуження ізольованого сегмента печінкової вени коня. Тоді як Rothe і співавт. [10] вважають, що він діє переважно на ворітні судини, а печінкові вени до нього нечутливі.

Зважаючи на вищесказане, ми вирішили з'ясувати, яким чином ацетилхолін діє на ізольовані сегменти печінкових вен великого (в середньому 1,6 мм) і середнього (в середньому 0,8 мм) діаметра. Тобто на сфінктерну ділянку печінкової вени, яка у щурів розташована на відстані 0,5 см від місця злиття її з задньою порожнистою веною, та на позасфінктерну її ділянку, що знаходиться на відстані 0,5–1 см від попередньої зони, у місці галуження печінкової вени на судини меншого діаметра.

У 26 ізольованих препаратів печінкових вен, які відносились до її позасфінктерної ділянки, ми реєстрували фазні спонтанні скорочення (0,2–0,5 мН) і періодичні тонічні хвилі (до 2 мН). Під час перфузії печінкових вен розчином ацетилхоліну у концентрації $1\text{--}10^{-5}$ моль/л реєстрували тонічне їх скорочення з амплітудою $3,1 \text{ мН} \pm 0,67 \text{ мН}$, що на 55 % ($P < 0,05$) було більше від вихідного рівня.

Реакція 30 препаратів сфінктерної ділянки печінкових вен відрізнялася від попередньої групи відсутністю фазної та тонічної спонтанної активності гладеньких м'язів і напрямком вазоактивних реакцій, на дію ацетилхоліну. Препарати цієї групи відповідали розслабленням із амплітудою $1,5 \text{ мН} \pm 0,58 \text{ мН}$ ($P < 0,05$).

Слід відмітити, що 10-хвилинна перфузія препарату печінкових вен призводила до зменшення констрикторних реакцій, викликаних ацетилхоліном на 52 % і становила $1,5 \text{ мН} \pm 0,71 \text{ мН}$ ($P < 0,05$; рис. 2). Таким чином, пригнічення констрикторних реакцій позасфінктерних ділянок печінкових вен на дію ацетилхоліну на фоні дії піроксану свідчить про те, що реалізація судинозвужувального ефекту ацетилхоліну у цій частині печінкового русла, принаймні частково, здійснюється активацією α -адренорецепторів цих судин. Отримані результати *in vitro* чітко підтверджують такі *in vivo* стосовно участі α -адренорецепторів емнісних судин у реалізації констрикторних реакцій останніх на дію ацетилхоліну.

Відомо, що ацетилхолін як класичний вазодилататор діє через М-холінорецептори ендотеліоцитів. У зв'язку з цим ми вирі-

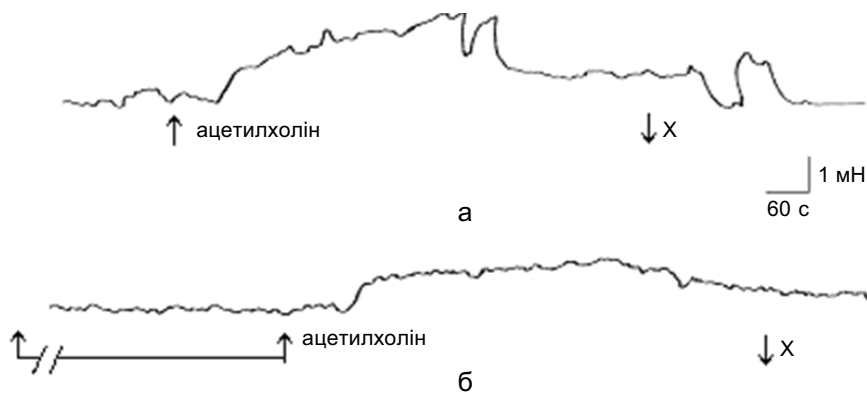


Рис. 2. Вплив блокатора α -адренорецепторів піроксану на амплітуду скоротливих реакцій гладеньких м'язів ізольованого препарату позасфінктерної ділянки печінкової вени щура, викликаних дією ацетилхоліну: а – ацетилхолін ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л), б – піроксан ($1,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л). X – відмивання. На рисунку подано фрагменти одного досліду. Для усіх записів калібрування однакове

шили перевірити, чи справедливий такий механізм дії ацетилхоліну щодо сфінктерної ділянки печінкової вени. Так, 20-хвилинна перфузія такого судинного препарату розчином з атропіном у концентрації $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л не викликала вірогідних змін вазодилаторних реакцій печінкових вен, зумовлених дією ацетилхоліну ($1,2 \text{ мН} \pm 0,45 \text{ мН}$). Це свідчить про те, що ацетилхолін реалізує свій судинорозширювальний вплив не через М-холінорецептори.

Іншим можливим механізмом вазодилаторної дії ацетилхоліну на печінкові вени може бути участь у цих реакціях Н-холінорецепторів. Однак Н-холінолітик тубокурарин також не виявив блокувального ефекту на реакції тонічного розслаблення печінкових вен, викликані дією ацетилхоліну. Так, під час 20-хвилинної перфузії препаратів печінкової вени тубокурарином вазоактивні її реакції під впливом ацетилхоліну вірогідно не відрізнялися від контролю ($1,4 \text{ мН} \pm 0,55 \text{ мН}$).

Отже, ні нікотинові, ні мускаринові холінорецептори, як свідчать отримані нами результати, не опосередковують реакції тонічного розслаблення сфінктерних ділянок печінкових вен.

Відомо, що у внутрішньопечінкових судинах наявні β -адренорецептори [3]. До того ж, тривалі латентні періоди вазоактивної дії ацетилхоліну на ємнісні судини печінки вказують на можливість синтезу

якогось посередника, що діє на них. У зв'язку з цим ми зробили припущення, що вплив ацетилхоліну на печінкові вени може бути опосередкований виділенням адреналіну, який, діючи на β -адренорецептори ГМК цих судин, викликає їхнє розслаблення.

У серії експериментів на 12 препаратах сфінктерних ділянок печінкових вен нами було досліджено вплив блокатора β -адренорецепторів атенололу на їхні реакції, викликані дією ацетилхоліну. У контрольних дослідах ацетилхолін ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) зумовлював тривале тонічне розслаблення печінкової вени з амплітудою $1,5 \text{ мН} \pm 0,58 \text{ мН}$ ($P < 0,05$; рис.3). Протягом 20-хвилинної перфузії печінкової вени розчином з атенололом судинорухові реакції на дію ацетилхоліну блокувалися на 80 % і становили $0,3 \text{ мН} \pm 0,09 \text{ мН}$ ($P < 0,05$), після відмивання вони поверталися до контрольних значень.

Як свідчать результати наших експериментів, проведених *in vitro*, ізольовані сегменти печінкових вен (не сфінктерна частина) під впливом ацетилхоліну скорочуються. Реалізуються такі реакції, принаймні частково, за участю посередника, ймовірно, норадреналіну, через активацію α -адренорецепторів цих судин. Разом з тим дія ацетилхоліну зумовлює розслаблення ізольованих сегментів сфінктерної ділянки печінкової вени без участі М- чи Н-холінорецепторів, стимулюючи виділення посередника, можливо, адреналіну, який у

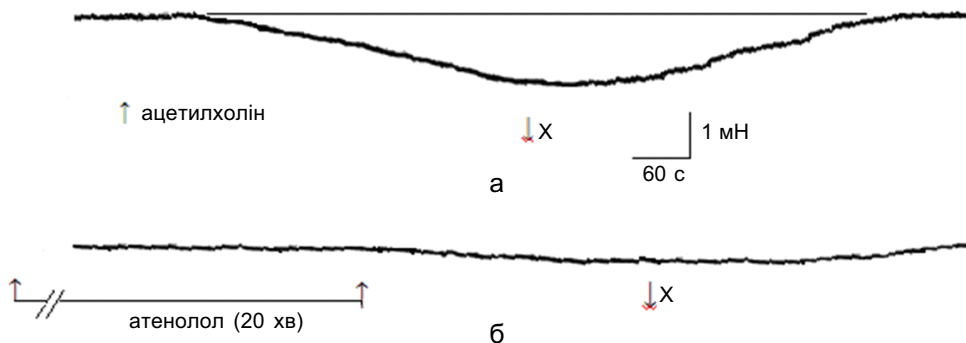


Рис. 3. Вплив блокатора β_1 -адренорецепторів атенололу на амплітуду індукованого ацетилхоліном розслаблення гладеньких м'язів сфінктерної ділянки печінкової вени щура: а – ацетилхолін ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л), б – атенолол ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л). X – відмивання. На рисунку подано фрагменти одного досліду. Для обох записів калібрування однакове

свою чергу активує β-адренорецептори ГМК цієї судини. Цілком ймовірно, що до останніх реакцій частково залучений і монооксид азоту, який, як відомо, в артеріальних судинах організму опосередковує їхнє розширення на дію ацетилхоліну.

Таким чином, ацетилхолін спричиняє звуження венозних судин печінки, зумовлюючи мобілізацію крові з органа та розширює сфінктери печінкових вен, сприяючи посиленню відтоку депонованої в печінці крові. Це до певної міри, збільшує об'єм циркулюючої крові, що є корисним у разі захисних реакцій організму.

**П.І.Янчук, Т.П.Приходько,
О.М.Пасичниченко, А.А.Терехов,
В.А.Цыбенко**

МЕХАНИЗМЫ СОКРАТИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА НА ПЕЧЕНОЧНЫЕ ВЕНЫ

В острых опытах у наркотизированных крыс ацетилхолин суживает венозные сосуды печени, вызывая мобилизацию крови из органа, и расширяет сфинктеры печеночных вен на выходе из печени, способствуя усилению оттока депонированной в печени крови. Констрикторные реакции емкостных сосудов печени на действие ацетилхолина реализуются путем активации М-холинорецепторов эндотелиоцитов с последующим вовлечением посредника, вероятно, норадреналина, который активировывает α-адренорецепторы на гладкомышечных клетках емкостных сосудов. Расслабление сфинктеров печеночных вен осуществляется также благодаря выделению в стенках сосудов под воздействием ацетилхолина посредника, возможно, адреналина, который в свою очередь активировывает β-адренорецепторы гладкомышечных клеток печеночных вен. Вполне возможно, что в последние реакции частично вовлечен и монооксид азота.

Ключевые слова: ацетилхолин, печеночные вены, сократительные реакции, М-холинорецепторы, α- и β-адренорецепторы.

**P.I. Yanchuk, T.P. Prikhodko,
O.M. Pasichnichenko, A.A. Terekhov,
V.O. Tsybenko**

MECHANISMS OF CONTRACTILE ACTION OF ACETYLCHOLINE ON HEPATIC VEINS

In acute experiments on anesthetized rats, acetylcholine (Ach) constricts hepatic venous vessels, causing blood mobilization

from the liver, and dilates the sphincters of hepatic veins at the exit from this organ, contributing to the intensification of the outflow of blood deposited in the liver. Vasoconstrictor reactions of capacitive vessels of the liver to Ach are realized through M-cholinoreceptors on endotheliocytes with further involvement of messenger, possibly noradrenaline, which activates α-adrenoreceptors on smooth muscle cells (SMC) of capacitive vessels. Dilatation of Hv sphincters is carried out due to Ach-induced release of messenger in the vessel wall, probably adrenaline, which in turn activates β-adrenoreceptors on SMC of the Hv. It is possible, that in such reaction partially involved NO.

Key words: acetylcholine, hepatic veins, contractile reactions, M-cholinoreceptors, α- and β-adrenoreceptors.

Taras Shevchenko National University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Цибенко В.А., Янчук П.И., Пасичниченко О.М., Комаренко В.И. Исследование вазоконстрикторного эффекта ацетилхолина в венозных сосудах печени // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2006. – **143**, № 3. – С.258–261.
2. Цибенко В.А., Янчук П.И., Симоненко П.Н. Применение импедансной плетизмографии для изучения депонирующей функции печени в остром опыте. // Физиол. журн. – 1984. – **30**, №6. – С.756–758.
3. Янчук П.И., Дубилей Т.А., Цибенко В.А. Влияние катехоламинов на кровообращение в печени // Биол. науки. – 1990. - № 10. – С.97–104.
4. Янчук П.І., Пасічніченко О.М., Комаренко В.І., Приходько Т.П., Цибенко В.О. З'ясування механізмів звужувальної дії ацетилхоліну на ворітну вену та її внутрішньопечінкові гілки // Фізіол. журн. – 2006. – **52**, №5. – С.23–28.
5. Aharinejad S., Nourani M., Egerbasher E.K., Larson A., Miksovsky P.B., Firbas R.S., McCuskey S.C., Marcs Jr. Sphincters of canine hepatic sublobular veins respond to endothelin-1 and 3 // J. Anatomy and Embryol. – 2004. – **196**. – P.299–309.
6. Holroyde M.C., Eyre P. Reactivity of isolated bovine mesenteric and hepatic veins to vasoactive agents and specific antigen // Eur. J. Pharmacol. – 1975. – **30**. – P.36–42.
7. Lutt W.W. The 1995 Ciba-Geigy Award Lecture. Intrinsic regulation of hepatic blood flow // Can. J. Physiol. and Pharmacol. – 1996. – **74**, №3. – P.223–233.
8. Lutt W.W., Macedo M.P. Nitric oxide and the hepatic circulation // Nitric oxide and the regulation of the peripheral circulation. – 2000. – P.243–258.
9. McCuskey R.S. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids // Liver. – 2000. – **20**. – P.13–17.
10. Rothe C.F., Maass-Moreno R. Hepatic venular resistance responses to norepinephrine, isoproterenol, adenosine, histamine and acetylcholine in rabbits //

- Amer. J. Physiol. – 1998. – **247**. – P.H777–H785.
11. Shibamoto T., Narushima M., Ling Y.O., Shimo T., Tsuchida H., Kurata Y. Different hepatic vascular response to noradrenaline and histamine between uinea pig and rats // Acta. Physiol. Scand. – 2004. – **180**. – P.255–263.
12. Tchirikov M., Hubbard G.B., Hobe J., Nathanielsz P.W. Strictures: evidence for mechanisms to redistribute hepatic and ductus venous blood flows in nonhuman primate fetuses // Amer. J. Obstet. – 2005. – **192**. – P.1146–1152.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка

Матеріал надійшов до редакції 17.05.2010

Б.В. Донской, В.П. Чернишов, Д.В. Осипчук

Імунофенотипова характеристика двох функціонально різних субпопуляцій натуральних кілерних клітин периферичної крові людини

У соматично здорових жінок вивчали імунофенотипові властивості натуральних кілерних клітин (НК) периферичної крові після їх стимуляції за допомогою чутливої клітинної лінії K562 (лінія еритромієлолейкозу людини, клітини якої не експресують молекулу гістосумісності – МНС I і є високочутливими мішенями для НК). Спостерігали підвищення рівня експресії маркерів CD (від англ. cluster of differentiation – маркери клітинної поверхні лейкоцитів): CD69 (ранній маркер активації), HLA DR (молекула головного комплексу гістосумісності II типу), CD95 (FAS-протеїн) та зниження рівня експресії CD62L (молекула адгезії). НК, які експресували CD69 після активації, було не більше ніж 60 % (50,0%±1,7%). Їхнє число не змінювалося при зниженні співвідношення ефектор–мішень і подовженні часу інкубації. Показано, що рівень експресії CD69, на відміну від інших маркерів, на активованих НК корелює з рівнем цитотоксичності НК. Також виявлено, що здатність до активації під дією стимуляції клітинної лінії K562, пов'язана зі втратою молекул адгезії CD62L на поверхні клітин. Здатність до активації мають лише НК з низькою цільністю або відсутністю експресії CD62L. Ми показали, що інкубація з чутливою клітинною лінією K562 підвищує рівень експресії CD69 на більшій частині популяції НК, чисельність CD69⁺-клітин, які експресують CD69 достовірно корелює з цитотоксичністю НК.

Ключові слова: натуральні кілерні клітини, активаційні маркери, цитотоксичність натуральних кілерних клітин.

ВСТУП

Натуральні кілерні клітини (НК), або великі гранулярні лімфоцити, становлять приблизно 10–15 % від усіх лімфоцитів периферичної крові. Поверхневими маркерами цих клітин є CD16 (рецептор до Fc-фрагмента імуноглобулінів) та CD56. НК здатні лізувати клітини-мішені без попередньої сенсibiliзації, володіють антитілозалежною цитотоксичною активністю та є цитокіновими продуцентами [5, 14]. НК – найбільш еволюційно давня лімфоцитарна субпопуляція та зв'язувальна ланка між антигенспецифічним і вродженим імунними механізмами захисту [15]. Цитотоксична активність НК регулюється за допомогою великої кількості активаційних рецепторів:

© Б.В. Донской, В.П. Чернишов, Д.В. Осипчук

KIR2DS1,158b,KIR2DS2 (суперродина імуноглобулінів), NKG2D (суперродина лектинів С-типу), TLR2,TLR3,TLR5 (TOLL-подібні рецептори) та інгібіторних рецепторів, які також можуть бути CD158a, KIR2DL2, KIR2DL3 (суперродина імуноглобулінів), CD94/NKG2 (суперродина лектинів С-типу) [2, 3, 6, 8, 9, 13].

Головними функціями НК вважається знищення вірусінфікованих клітин на початкових етапах інфекції та елімінавання пухлинних клітин, пригнічуючи таким чином канцерогенез [4]. НК можуть бути активовані такими стимулами, як контакт з дендритними клітинами, клітинами, які не експресують на поверхні МНС-I (пухлинні клітини, клітини, інфіковані вірусом),

зв'язуванням з імунокомплексами, а також під впливом інтерлейкінів (ІЛ): ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-12, ІЛ-15, ІЛ-18, ІЛ-21. НК у стані активації характеризуються збільшенням рівня експресії маркера – CD69 та підвищеною цитотоксичністю [1, 4, 7, 10].

Мета нашої роботи – вивчення взаємозв'язку експресії поверхневих маркерів і цитотоксичної активності НК периферичної крові людини.

МЕТОДИКА

Досліджували гепаринізовану кров 130 соматично здорових жінок віком від 25 до 45 років, що проходили обстеження в лабораторії імунології ДУ "Інститут педіатрії, акушерства і гінекології АМН України". Всі жінки були проінформовані про проведення дослідження та дали згоду.

Приготування мішеней. Як мішень використовували лінію K562 (суспензійна культура клітин еритромієлолейкозу людини). Клітини культивували у середовищі RPMI-1640, яке вміщувало 10 % ембріональної телячої сироватки. За добу до постановки НК-тесту, клітини розводили 1/1 свіжим середовищем для забезпечення логарифмічної фази росту. Для тесту клітини відмивали та доводили до концентрації $5 \cdot 10^6$ /мл і мітили живі клітини вітальним маркером CFDA (карбокси-2,7-дихлорофлуоресцеїн діацетат, при гідролізі внутрішньоклітинними естеразами формує карбоксифлуоресцеїн діацетат, який здатний до флуоресценції). Через 30 хв мічені клітини тричі відмивали DPBS – фізіологічним розчином, забуференим фосфатом Дульбекко («Sigma», США).

Виділення мононуклеарів периферичної крові (МПК). 4 мл гепаринізованої периферичної крові розводили 8 мл DPBS і розділяли на градієнті щільності Histopaque™-1077 («Sigma», США) 30 хв при 400 g. МПК тричі відмивали DPBS, підраховували у камері Горяєва та доводили до концент-

рації $3 \cdot 10^6$ /мл у середовищі RPMI, яке вміщувало 20 % бичачої сироватки.

НК-тест. Мононуклеари крові інкубували з міченою клітинною лінією K562 у співвідношеннях 20/1, 10/1, 5/1 та 4 год у CO₂-інкубаторі ("Revco", Швейцарія). Потім додавали 10 мкл (5 мг/мл) розчину йодиду пропідіуму та інкубували 20 хв при +4 °C. Аналізували на приладі FACSCan ("Becton Dickinson", США), (клітини-мішені, мічені CFDA, мали зелену, а пермобілізовані мертві клітини (PI⁺) червону флуоресценцію). Рівень спонтанного лізису клітин-мішеней (без додавання мононуклеарів) становив не більше ніж 5%.

Визначення експресії поверхневих маркерів на МПК. До 200 мкл гепаринізованої крові додавали $2 \cdot 10^5$ клітин K562 і 2 мл RPMI-1640. Після інкубації 20 год центрифугували (5 хв 1500 хв^{-1}), відбирали супернатант та мітили клітини моноклональними антитілами. У досліді використовували моноклональні антитіла ("Becton Dickinson", США), специфічні до поверхневих маркерів: HLA-DR-FITC, CD62L-FITC, CD4-PE, CD8-PE, CD3-PE, CD69-FITC, CD69-PE, CD56-PECy5, CD158-FITC, CD95-FITC. Після 40 хв еритроцити лізували Lysing Solution ("Becton Dickinson", США) та відмивали Cell Wash ("Becton Dickinson", США). Аналіз 20000 лімфоцитів проводили на приладі FACSCan ("Becton Dickinson", США). Визначали експресію поверхневих маркерів CD56, CD62L, CD69, HLA-DR, CD158, CD95 на популяціях НК (CD16⁺CD56⁺CD3⁻), CD3, CD4, CD8, CD69 на популяціях Т-лімфоцитів (CD3⁺CD4⁺CD8⁻ та CD3⁺CD4⁻CD8⁺) та CD56, CD3, CD69, CD62L на популяції натуральних кілерних Т-клітин (НКТ) (CD8⁺CD56⁺CD3⁺). В окремому досліді кров інкубували з лінією K562 у різних співвідношеннях та у різний проміжок часу або стимулювали клітини активатором протеїнкінази С 4β-форбол 12β-міристанат 13-ацетат (ФМА).

Результати досліджень піддавали варіа-

ційно-статистичній обробці за Стьюдентом з використанням програмного пакета Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інкубація крові з чутливою клітинною лінією K562 підвищувала експресію активаційних маркерів на НК. Експресія раннього маркера активації CD69 збільшувалася з $8,83 \pm 0,08$ до $50,0\% \pm 1,7\%$, експресія пізнього маркера активації CD95 – на 22 % від вихідного значення і сягала $61,7\% \pm 1,7\%$, також на 27 % збільшувалась експресія HLA DR і становила $22,2\% \pm 0,6\%$. При цьому експресія молекули адгезії CD62L знижувалася на 50 % від початкового рівня. Поверхневий рівень таких маркерів, як CD158a (активаційний рецептор) та CD94 (інгібіторний рецептор) залишилася незмінною після активації (таблиця, рис. 1).

Навіть після додавання ФМА, який є тотальним стимулятором активації, рівень експресії рецептора активації CD158a на поверхні клітин не змінювався. Натомість достовірно підвищувалася експресія пізнього маркера активації CD95, молекули гітосумісності II класу HLA DR та раннього маркера активації CD69 після додавання ФМА. Рівень експресії CD69 та HLA DR у деяких випадках сягав 100 %. Експресія НК CD62L при активації ФМА на поверхні клітин майже зникла, і в деяких випадках сягала нуля (рис. 1,а).

Максимальна експресія CD69 на поверхні НК сягала вже на 6–10-й годині інкубації. Кількість НК, які експресували CD69 на піку активації, становила не більше ніж 60 % ($50\% \pm 1,7\%$), після чого виходила на плато (рис. 2,а). При продовженні часу інкубації відсотковий вміст клітин CD69⁺ не збільшувався. Також при зниженні співвідношення кількості ефектор-мішень, відсотковий вміст НК, які експресували CD69, не збільшувався (див. рис. 2,б). Подібна крива насичення спостерігалась і при інкубації

Вплив інкубації мононуклеарів периферичної крові з клітинною лінією K562 на експресію поверхневих маркерів (M±m, n=130).

Популяції досліджуваних клітин	CD69		CD94		HLA-DR		CD158		CD95		CD62L	
	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації з мішенню K562
Натуральні кілерні клітини	8,83±0,08	47,8±0,13*	67,6±1,6	71,6±1	17,5±0,5	22,2±0,6*	29,1±3,3	30,3±2,8	50,5±2,7	61,7±1,7*	34±0,9	17,5±0,4*
Натуральні кілерні Т-клітини	10,2±0,1	17,3±0,1*	43,8±2,3	42,6±1,4	30±0,7	32,5±0,8	12,8±1,6	13,1±1,7	91,5±0,9	89,9±0,9	35±0,7	33,7±0,7
Цитотоксичні Т-лімфоцити CD8 ⁺	7,1±0,1	11,8±0,1	10,5±0,6	9,6±0,4	30,2±0,6	31,2±0,6	1,63±0,4	1,27±0,4	56,9±1,4	55,8±1,4	55,8±0,6	56,8±0,5
Т-лімфоцити CD4 ⁺	3,5±0,1	4,4±0,1*	0,6±0,1	0,5±0,1	6±0,2	6,4±0,2	1±0,3	0,2±0,03	46,3±1,7	47,8±1,1	77,8±0,5	75,2±0,4

*P<0,05 порівняно з контролем.

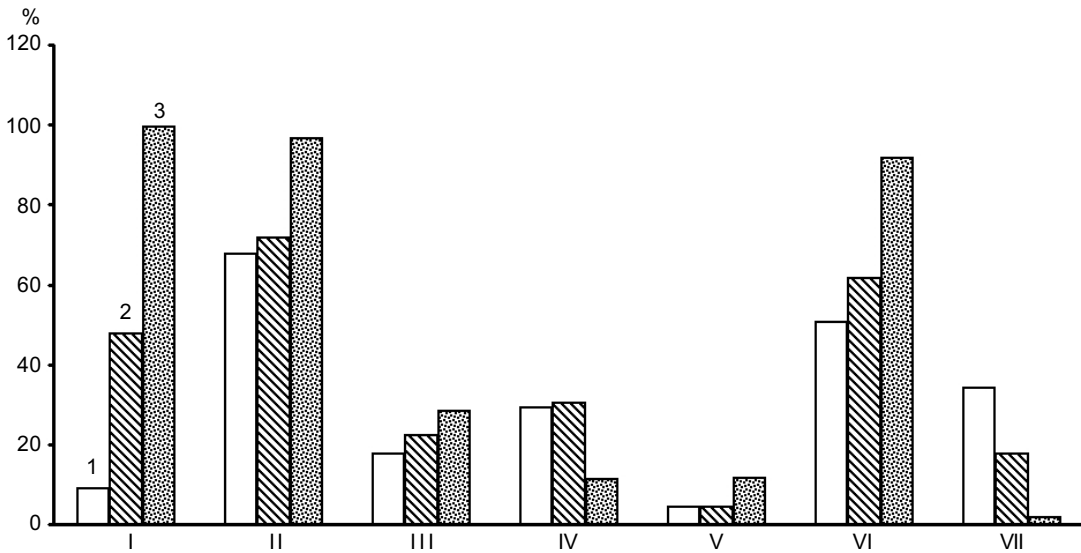


Рис. 1. Зміни експресії поверхневих маркерів на натуральних кілерних клітинах до (1), після активації чутливою лінією K562 (2) та ФМА(3): I – CD69, II – CD94, III – HLA DR, IV – CD158a, V – CD27, VI – CD95, VII – CD62L

виділених МПК з чутливою лінією K562.

Отримані результати ілюструють наявність функціонального пулу НК, здатного до активації при стимуляції лінією K562, і який становить у середньому 50 % від усієї популяції. З іншого боку, досить велика частка НК, що циркулюють у периферичній

крові, не розпізнає цей сигнал і не активується при взаємодії з чутливою клітинною лінією K562.

Спонтанна експресія (без додавання клітинної лінії K562) активаційних маркерів CD69, HLA DR, CD95 на поверхні НК, не корелювала з НК-цитотоксичність. Експре-

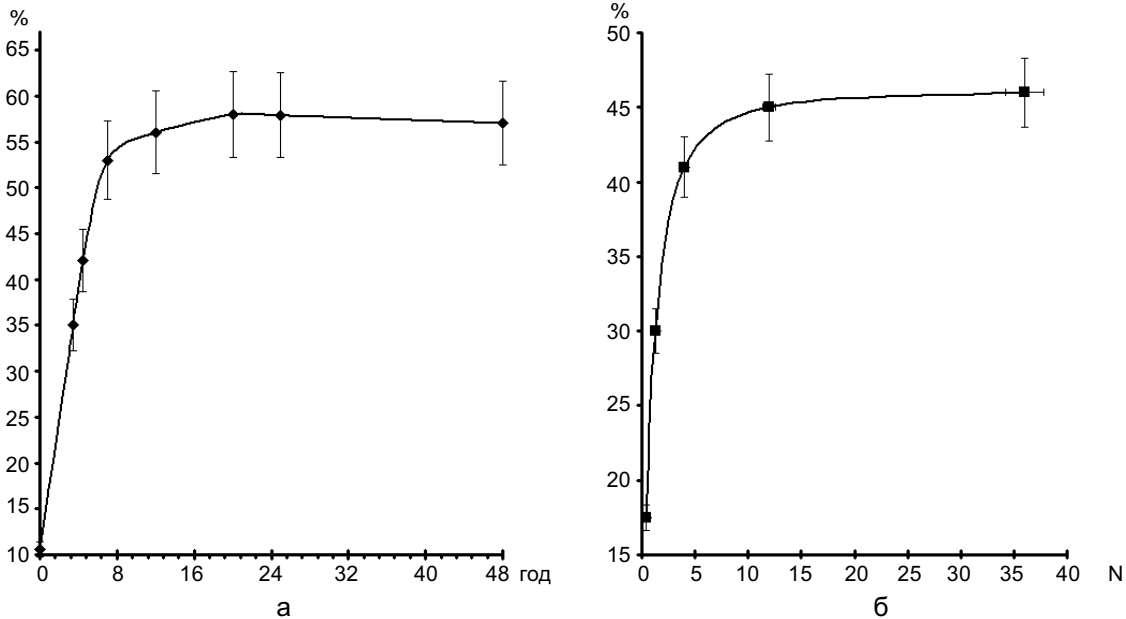


Рис. 2. Залежність експресії раннього маркера активації CD69 на натуральних кілерних клітинах від тривалості стимуляції чутливою лінією K562 (а) та від співвідношення кількості ефектор-мішень (K562/НК, б)

сія HLA DR і CD95 після стимуляції чутливою мішенню також не була пов'язана з НК-цитотоксичністю. Проте відсотковий вміст клітин, що набули CD69⁺-фенотипу після стимуляції клітинною лінією K562, корелював з рівнем НК-цитотоксичності ($P < 0,05$, $r = 0,6$). При розподіленні зразків на групи з підвищеною та нормальною НК-цитотоксичністю, з'ясувалося, що експресія маркера активації CD69 після стимуляції у групі з підвищеною НК-активністю була вищою порівняно зі зразками, що мали нормальну НК-цитотоксичність ($P < 0,05$). Це свідчить про те, що зміни експресії CD69, прямо пов'язані з функціональною цитотоксичною активністю НК.

CD62L експресована на НК, забезпечує адгезію до ендотелію та міграцію НК до вторинних лімфоїдних органів [12, 14]. Нами було виявлено, що здатність до активації під впливом стимуляції клітин K562, пов'язана з експресією CD62L на поверхні НК (рис. 3). Здатність до активації мають лише НК, з низькою щільністю або відсутністю експресії CD62L на поверхні. Експресія CD69 на НК після активації обернено

пропорційно залежить від такої CD62L. Можливо, НК, які мають високу щільність експресії CD62L та низьку – CD69, спрямовані на міграцію у вторинні лімфоїдні органи, або мають іншу функцію і тому не відповідають активацією на інкубування з чутливою клітинною лінією.

Важливо відмітити, що при інкубації лімфоцитів з високочутливими клітинами-мішенями для НК (лінія K562), підвищувалася експресія активаційних маркерів і знижувалася – інгібіторних рецепторів також на популяції НК Т-клітин (НКТ), і майже не змінювалася на Т-лімфоцитах (CD3⁺CD4⁺ та CD3⁺CD8⁺). Різні за онтогенетичним походженням популяції НК (CD16⁺CD56⁺CD3⁻) і НКТ-клітин (CD8⁺CD56⁺CD3⁺) демонструють функціональну «конвергенцію» (схожість) щодо антиген-неспецифічної активації (див. таблицю).

Стимуляція НК чутливою лінією K562, активує їх до лізису клітин-мішеней і призводить до появи на поверхні маркера CD69. Експресія CD69 на НК, після стимуляції з'являється лише на певній їх субпопуляції, розмір цього пулу асоційований та

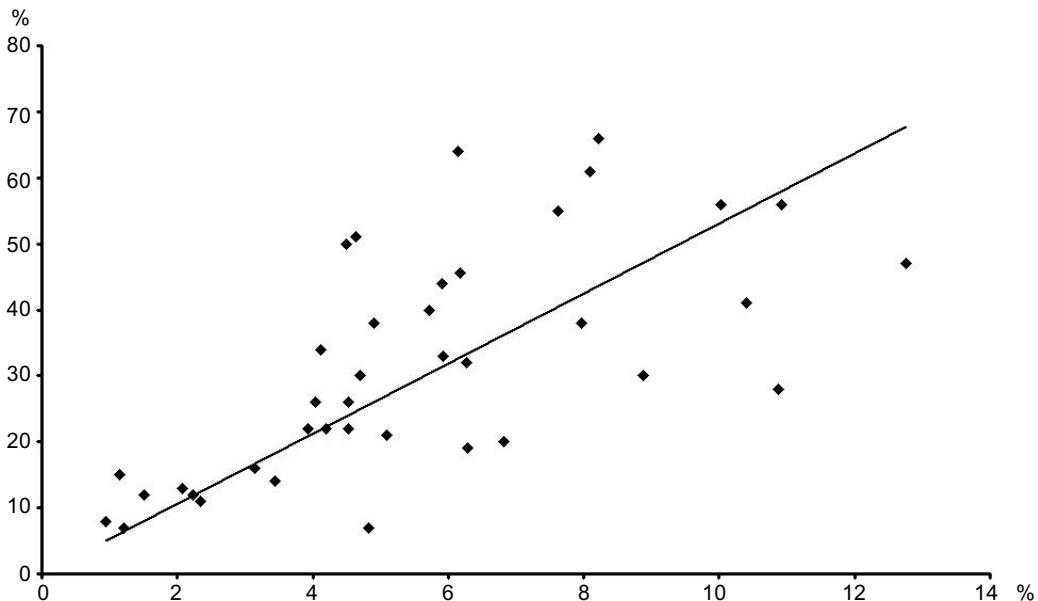


Рис. 3. Кореляції відсотка лізису клітин-мішеней при співвідношенні 20:1 і відсотка натуральних кілерних клітин (НК), які експресують ранній маркер активації CD69 після активації

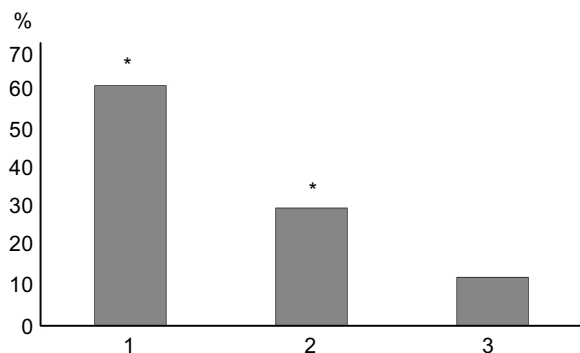


Рис. 4. Експресія раннього активаційного маркера CD69 на натуральних кілерних клітинах, які не експресують молекули адгезії CD62L (1), з низькою і високою щільністю (2, 3 відповідно) після активації чутливою клітинною лінією K562. *P<0,05 порівняно з контролем

взаємно корелює з цитотоксичною активністю НК. Фенотип НК, в якому клітини здатні до активації після взаємодії з лінією K562 характеризується високою щільністю експресії CD69 та низькою або відсутністю експресії CD62L.

У нашій роботі вперше продемонстровано складну функціонально-популяційну структуру НК периферичної крові людини. Можливим механізмом активності цих клітин є наявність функціональних популяцій, спеціалізованих до виконання конкретних фізіологічних функцій.

ВИСНОВКИ

1. Популяції НК і НКТ-клітин демонструють функціональну «конвергенцію» щодо антигеннеспецифічної активації.

2. Експресія раннього активаційного маркера CD69 внаслідок активації виділяє функціональну популяцію НК, що певним чином репрезентує функціональний статус популяції та достовірно корелює з їх цитотоксичністю.

3. Популяція НК, що здатна до активації внаслідок стимуляції клітинної лінії K562, характеризується низькою щільністю або відсутністю експресії молекули адгезії CD62L на поверхні клітин.

Б.В. Донской, В.П. Чернишов, Д.В. Осипчук

ИММУНОФЕНОТИПОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

У соматически здоровых женщин изучали иммунофенотипические свойства натуральных киллерных клеток (НК) периферической крови после их стимуляции с помощью клеточной линии K562 (линия эритромиелолейкоза человека, клетки которой не экспрессируют молекулу гистосовместимости – МНС I и являются высокочувствительными мишенями для НК-клеток). Наблюдали повышение уровня экспрессии маркеров CD (от англ. cluster of differentiation – маркеры клеточной поверхности лейкоцитов): CD69 (ранний маркер активации), HLA DR (молекула главного комплекса гистосовместимости II типа), CD95 (FAS-протеин) и снижение уровня экспрессии CD62L (молекула адгезии). НК, которые экспрессировали CD69, после активации было не больше 60 % (50,0%±1,7%). Их число не изменялось при снижении соотношения эффектор – мишень и удлинении времени инкубации. Показано, что уровень экспрессии CD69, в отличие от других маркеров, на активированных НК (после стимуляции клеточной линии K562) коррелирует с уровнем цитотоксичности НК. Также обнаружено, что способность к активации под воздействием стимуляции линией K562 связана с утратой CD62L на поверхности клеток. Способность к активации имеют лишь НК с низкой плотностью или отсутствием экспрессии молекул адгезии CD62L. Мы показали, что инкубация с клеточной линией K562 повышает уровень экспрессии CD69 на большей части популяции НК, численность CL69⁺-клеток, которые экспрессируют CD69, коррелирует с цитотоксичностью НК.

Ключевые слова: натуральные киллерные клетки, активационные маркеры, цитотоксичность натуральных киллерных клеток.

B.V. Donskoy, V.P. Chernyshov, D.V. Osypchuk

THE IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF TWO FUNCTIONALLY DIFFERENT NK CELL'S SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL HUMAN BLOOD

NK cell cytotoxicity and immunophenotypic characteristics of activated natural killer (NK) cells after co-incubation with K562 target cells in women were investigated. An increase in CD69, HLADR, CD95 expression on target-activated NK cells was demonstrated. Conversely, CD62L expression in NK cells after activation was decreased. The results showed that only a part of NK cells after incubation with K562, be-

came CD69 positive. Moreover, even after lowering of "effector - target" ratio and extensions of time of stimulation, the amount of CD69+NK cells did not exceed 60% (50%±1.7%). Expression of CD69, CD95 and HLADR on NK cells before co-incubation didn't correlate with NK cytotoxicity. However, size of population of activated CD69+ NK cells (after stimulation) was correlated with NK cytotoxicity. We also found that the activation capacity after cocultivation with K562 cells is related to loss in CD62L on NK cell's surface. Only CD62L^{neg} and less CD62L^{low}NK cells had the ability to be activated with K562. In conclusion, we demonstrated that incubation with K562 target cells enhanced the expression of CD69 on the major part of NK cell population and the size of CD69+NK cell population is strongly correlated with NK cytotoxicity. Key words: natural killer cells, markers of activation, NK cell's cytotoxicity.

Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of AMS of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Benlahrech F., Donaghy H., Rozis G., Goodier M., Klavinskis L., Gotch F., Patterson S. Human NK cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon γ Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways//Sensors. – 2009. – **6**. – P.386–403.
2. Chalifour A., Jeannin P., Gauchat J-F., Blaecke A., Malissard M., N'Guyen T., Thieblemont N., Delneste Y. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers β -defensin production //Blood. – 2004. – **104**, №6. – P.1778–1783.
3. Caligiuri M.A. Human natural killer cells//Ibid. – 2008. – **112**, №3. – P.461–469.
4. Yun C.H., Lundgren A., Azem J., Sloling A., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Lundin B.S. Natural killer cells and Helicobacter pylori infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production// Infect.Immun. – 2005. – **73**, №3. – P.1428–1490.
5. Dosiou C., Giudice L.C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives//Endocrine Rev. – 2005. – **26**, №1. – P.44–62.
6. Eriksson M., Meadow S.K., Basu S., Mselle T.F., Wira C.R., Sentman C.L. TLR Mediate IFN- γ production by human uterine NK cells in endometrium// J.Immunol. – 2006. – **176**. – P.6219–6224.
7. Young H.A., Ortaldo J. Cytokines as critical co-stimulatory molecules in modulating immune response of natural killer cells// Cell Res. – 2006. – **16**. – P.16–24.
8. Kogure T., Mantani N., Sakai S., Shimada Y., Tamura J., Terasawa K. Natural killer cytolytic activity is associated with the expression of killer cell immunoglobulin-like receptors on peripheral lymphocytes in human// Med. Inflamm. – 2003. – **12**. – P.117–121.
9. Kumar V., Medhi B. Emerging role of uterine natural killer cells in establishing pregnancy//Iran. J.Immunol. – 2008. – **5**, №2. – P.71–81.
10. Zamai L., Ponti C., Mirandola P., Gobbi G., Papa S., Galeotti., Cocco L., Vitale M. NK cells and cancer// J. Immunol. – 2007. – **178**. – P.4011–4016.
11. Ntrivalas E.I., Kwak-Kim J.Y.H., Gilman-Sachs A., Chung-Bang H., Ng S.C., Beaman K.D., Mantouvalos H.P., Beer A.E. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology//Hum. Reprod. – 2001. – **16**, №5. – P.855–861.
12. Redline R.W. Role of uterine natural killer cells and interferon γ in placental development//J.Exp. Med. – 2000. – **17**, №2. – P.1–4.
13. Farag S.S., Fehniger T.A., Ruggeri L., Caliguri M.A. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect//Blood. – 2002. – **100**, №6. – P.1935–1947.
14. Chen S., Kawashima H., Lowe J.B., Lanier L.L., Fukuda M. Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment// J.Exp.Med. – 2005. – **202**, №12. – P.1679–1689.
15. Sun J.C., Lanier L.L. Natural killer cells remember: An evolutionary bridge between innate and adaptive immunity?// Eur. J. Immunol. – 2009. – №39. – P.2059–2064.
16. Warren H.S., Campbell A.J., Waldron J.C., Lanier L.L. Biphasic response expressing both activating and inhibitory killer Ig-like//Intern.Immunol. – 2001. – **13**, №8. – P.1043–1052.

*ДУ «Ін-т педіатрії акушерства і гінекології АМН України», Київ
E-mail: boris_donskoy@ukr.net*

Матеріал надійшов до редакції 19.01.2010

М.Е. Барінова, В.М. Єльський, Е.Ф. Барінов, О.М. Сулаєва

Функціональна активність моноцитів і механізми внутрішньоклітинної регуляції індукцибельної NO-синтази в динаміці ранового процесу

Вивчали закономірності і механізми регуляції активності індукцибельної NO-синтази (iNOS) в моноцитах-макрофагах у динаміці ранового процесу. Роль внутрішньоклітинних сигнальних систем у модуляції активності iNOS моноцитів периферичної крові 22 хворих з травматичними ранами кінцівок аналізували методом інгібіторного аналізу in vitro. Показано, що з 1-ї до 3-4-ї доби ранового процесу підвищується базальна й стимульована ліпополісахаридом продукція оксиду азоту, активність 5-ліпооксигенази та фосфодіестерази. Активність циклооксигенази та протеїнкінази C зростали через 3 доби, сягали максимуму через 7-10 діб під час формування грануляцій та епітелізації ранової поверхні. Активність протеїнкінази A, що пригнічувала iNOS, зростала з 7-10-ї доби з максимумом через 14 діб, що супроводжувалося активацією аргінази-1. Отже, моніторинг стану різних ланок системи внутрішньоклітинної сигналізації може використовуватися для діагностики й корекції перебігу ранового процесу.
Ключові слова: рановий процес, моноцити-макрофаги, індукцибельна NO-синтаза.

ВСТУП

Характер і виразність запалення, його фазність і результат визначаються комбінацією клітинних елементів, їхнім кількісним відношенням і функціональною активністю [9, 11]. Класичними регуляторами ранового процесу вважаються макрофаги [8, 16]. Останні є продуцентами широкого спектра цитокінів, хемокінів, активних радикалів кисню, бактерицидних білків, модуляторів об'єму та хімічного складу міжклітинної речовини [6, 14]. Значимість цих фактів для з'ясування механізмів аутохронності ранового процесу складно переоцінити, проте до сьогодні не вдалося наблизитися до з'ясування причин і механізмів розвитку хронічних ран і порушення загоєння дефектів шкіри й слизових оболонок [9, 16, 17]. Попередні морфологічні та імуноцитохімічні дослідження ран шкіри викликали низку питань щодо структурно-функціонального стану саме макрофагів, які

контролюють фазність перебігу ранового процесу [3, 11]. Враховуючи недостатню інформативність цитологічних досліджень «відбитків» ранової поверхні з позиції аналізу механізмів забезпечення біологічних ефектів макрофагів, доцільною є оцінка метаболізму клітин-попередників – тобто моноцитів периферичної крові, тим більше, що в них детерміновані шляхи та механізми реалізації сигналів з рецепторів до системних регуляторів [2, 13, 24]. Використаний з цією метою метод інгібіторного аналізу активності клітин in vitro дає змогу змоделювати стан моноцитів-макрофагів у рані. Крім того, такий підхід за умов порушення перебігу ранового процесу (хронічні рани, синдром діабетичної стопи), дає можливість встановити провідні патогенетичні механізми функціональної недостатності моноцитів-макрофагів у кожному окремому випадку, спрогнозувати їх відповідь на модуляцію різних

© М.Е. Барінова, В.М. Єльський, Е.Ф. Барінов, О.М. Сулаєва

сигнальних систем і розробити цілеспрямовані шляхи корекції як функції клітин, так і ранового процесу в цілому [2, 10, 13]. Відомо, що продукція NO внаслідок активації індукцибельної NO-синтази (iNOS) у різних клітинах є провідним механізмом розвитку запалення та наступної репарації рани, а гіперактивність або пригнічення iNOS моноцитів-макрофагів асоційоване з дизрегенерацією ран [2, 15]. Аналіз причинно-наслідкових відносин у зміні активності iNOS ускладнюється широким спектром індукторів ферменту, який включає ліпополісахарид (ЛПС), інтерферон γ , прозапальні цитокіни, комплемент, імуноглобуліни [4, 11, 20]. Відомо, що експресія iNOS стимулюється за умов індукції оксидативного стресу під впливом брадикініну та серотоніну, активації ангіотензинових й адренорецепторів тощо [1, 9]. Однак остаточною відповідь моноцитів-макрофагів на регулятори визначається не тільки їх спектром і чутливістю рецепторів, але й станом сигнальних систем (зокрема, серин-треонінових кіназ, фосфодіестераз), вмістом Ca^{2+} та співвідношенням метаболітів арахідонової кислоти (АК) [6, 23]. Встановлено, що АК та її метаболіти можуть впливати на активність фосфоліпази С [8, 16], аденілатциклази [6], гуанілатциклази [10, 14] та вміст Ca^{2+} [12]. В свою чергу, активація протеїнкінази С (ПкС) індукує вивільнення та метаболізм АК у різних популяціях моноцитів-макрофагів [18, 21]. Важлива роль цАМФ і протеїнкінази А (ПкА) доведена в регуляції проліферації й секреції, скорочення й мембранного транспорту, нейротрансмісії тощо [9, 16]. Було встановлено, що вплив на внутрішньоклітинний вміст цАМФ характерний для деяких гормонів і медіаторів [5, 17]. Слід підкреслити, що сигнальні системи індують різні морфогенетичні процеси під час гоєння рани [16]. Так, судинна реакція на ушкодження та інфільтрація лейкоцитами визначається індукцією метаболізму АК; зокрема, баланс між різними її метаболічними

шляхами детермінує виразність оксидативного стресу, адгезію, міграцію та фагоцитарну активність нейтрофілів і моноцитів-макрофагів [6, 18, 22]. Активацію ПкС за фізіологічних умов пов'язують з інтенсивністю запальної інфільтрації рани моноцитами-макрофагами, процесами ангиогенезу й формування грануляційної тканини, проліферації та міграції кератиноцитів, а за умов патології – з розвитком ангиопатії та порушенням імунологічної реактивності [21]. Продукція компонентів міжклітинної речовини та фібрилогенез спряжені з активацією ПкА, яка контролює функціональну активність фібробластів і опосередковано через ендотеліальну NO-синтазу (eNOS) забезпечує відновлення функціонального стану ендотелію та ангиогенез [9, 17]. Оскільки вазотропні ефекти NO на протеїнкіназу G є цГМФ-залежними, то важливо проаналізувати лімітуючу ланку вмісту циклічних нуклеотидів – активність фосфодіестераз (ФДЕ) [15, 19]. На жаль, у літературі недостатньо фактів щодо відносин перерахованих елементів сигнальних систем з iNOS, яка по суті відображає прозапальну активацію моноцитів-макрофагів [10, 15]. В інтерпретації цього зв'язку також слід враховувати реципрокність взаємин – з одного боку, фазність ранового процесу залежить від функціонального стану макрофагів, а з іншого – фенотип моноцитів при їх трансформації в макрофаги визначається мікрооточенням у самій рані. Останнє детерміноване не тільки ефективністю запально-репаративного процесу, але загальною реакцією організму на ушкодження [2, 3, 12, 13].

Мета нашого дослідження полягала у встановленні деяких закономірностей та механізмів регуляції активності iNOS моноцитів у різні фази ранового процесу.

МЕТОДИКА

Проаналізовано результати перебігу ранового процесу у 22 умовно здорових пацієн-

тів із травмами кінцівок віком від 30 до 48 років. Хворі обстежені при надходженні в стаціонар, через 3–4 доби, 7–10 і 14–18 днів після госпіталізації. Клітини виділяли з периферичної крові методом градієнтного центрифугування (Histopaque, $\rho = 1,077$ г/см³). Моноцити відмивали забуференим ізотонічним розчином NaCl і ресуспендували у безсироваткому культуральному середовищі RPMI-1640 (ICN). Останнє містило 80 мкг/мл гентаміцину, 2 ммоль/л L-глутаміну та 10 ммоль/л NEPES. Прилипи до пластику клітини виділяли після 3 год інкубації в лунковому планшеті («Flow Lab») з використанням CO₂-інкубатора [2]. Супернатант видаляли, лунки промивали два рази безсироватковим середовищем RPMI-1640. Клітини з розрахунку 10⁶ на лунку поміщали в 96-лунковий планшет у 200 мкл середовища RPMI-1640 із зазначеними вище добавками й 5%-ю ембріональною телячою сироваткою [5, 13]. В I серії вивчали концентрацію NO в супернатанті моноцитів за такою схемою: у контрольній (1-й лунці) проводили інкубацію моноцитів без додавання будь-яких модюляторів і ЛПС (вихідний рівень), в 2-й лунці клітини стимулювали ЛПС (0,3 мкг/мл; E.coli фірми «Calbiochem», США) [5]. В 3-тій та 4-тій лунці вводили стимулятор і селективний інгібітор iNOS: L-аргінін – 200 ммоль/л й NG-(1-Immunoethyl)lysine (L-NIL) – 30 ммоль/л відповідно. В 5-тій лунку додавали селективний інгібітор аргінази-1 – L-нормпвалін (5 ммоль/л) [20]. Після інкубації протягом 24 год при 37 °C у атмосфері з 5 % CO₂ аналізували продукцію NO макрофагами за накопиченням у культуральному середовищі нітрит-іонів (NO₂⁻). Для цього 100 мкл культурального середовища переносили в лунку 96-лункового планшета та послідовно додавали 100 мкл 1,5%-го розчину сульфоніламідів в 1 N HCl, потім 100 мкл 0,15%-го розчину N-(1-нафтил)етилендіаміну. Інкубацію проводили 15–30 хв при кімнатній температурі й аналізували оптичну густина при 540–570

нм на СФ-56 [5]. У II серії при дослідженні молекулярних механізмів модуляції iNOS клітини попередньо інкубували 30 хв при 37 °C у атмосфері 5 % CO₂ з інгібіторами різних ланок системи внутрішньоклітинної сигналізації у таких стандартних концентраціях: стауроспорин (інгібітор ПкС) – 500 нмоль/л; Н-89 (інгібітор ПкА) – 20 мкмоль/л, нордигідроуретикова кислота (НГДУК, інгібітор 5-ліпоксигенази) – 10 мкмоль/л, індометацин (неселективний інгібітор циклооксигеназ) – 10 мкм, теофілін (інгібітор ФДЕ) – 5 мкмоль/л [5, 6, 22]. Потім у лунки додавали ЛПС і продовжували інкубацію моноцитів протягом 24 год, після чого досліджували вміст NO за описаним вище протоколом. У контрольну групу були включені 10 практично здорових чоловіків і жінок. Отримані результати обробляли статистично з використанням параметричних і непараметричних критеріїв у програмі MedStat [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Стандартна доза ЛПС (0,3 мкг/мл) *in vitro* збільшувала продукцію NO в супернатанті моноцитів здорових осіб (на 88,2 %, $P < 0,001$) порівняно з вихідним рівнем (таблиця). Додавання L-аргініну продемонструвало дещо менше підвищення синтезу NO (на 59,65 % порівняно з вихідним рівнем; $P < 0,01$), що може бути наслідком функціонування альтернативних шляхів утилізації L-аргініну, наприклад аргінази-1, пригнічення якої дещо підвищувало продукцію нітритів моноцитами. Підтвердженням превалювання активності iNOS над аргіназою-1 в моноцитах здорових осіб були результати використання селективного інгібітора iNOS. Останній пригнічував продукцію NO в 1,83 раза ($P < 0,001$) порівняно з вихідним рівнем. Причому різниця між абсолютними величинами продукції NO при роздільній інкубації моноцитів з L-аргініном і ЛПС (близько 20 %) свідчить про високу чутливість моноцитів до класичного стимулятора їхньої активності – бакте-

ріального ЛПС. Результати інгібіторного аналізу дали змогу оцінити участь та ефекти різних медіаторів і трансдукторів у реалізації впливу ЛПС на експресію іNOS. Визначено, що активація експресії іNOS при інкубації із ЛПС тісно пов'язана з метаболізмом АК. Введення в суспензію клітин інгібіторів 5-ліпооксигенази (5-ЛОГ) і циклооксигенази (ЦОГ) супроводжувалося пригніченням ЛПС-стимульованої продукції NO – на 26,73 (P<0,01) й 20,3 % відповідно (P<0,05). Менш значимим був вплив ПкС і ФДЕ – їх інгібітори зменшували амплітуду ЛПС-стимульованої продукції нітритів на 13,37 і 11,63 % відповідно (P<0,05). Використання інгібітора ПкА продемонструвало негативний механізм регуляції продукції оксиду азоту з боку цАМФ–ПкА – Н89 підвищував вміст нітритів у культуральному середовищі на 8,91 % (P<0,05). Наведені результати дослідження у здорових осіб свідчать про зв'язок ЛПС-стимульованої активності іNOS моноцитів з активацією 5-ЛОГ і ЦОГ, та меншою мірою – із ПкС і ФДЕ.

За умов ранового процесу відзначено активацію системи моноцитів-макрофагів. Так, на момент госпіталізації (через 3–6 год після формування рани) базальна продукція нітритів моноцитами підвищувалася на 35,7 % порівняно з контролем (P<0,01). Цей феномен супроводжувався збільшенням продукції NO, стимульованої L-аргініном і ЛПС на 74,2 та 154,6 % відповідно відносно вихідного рівня (P<0,001). Порівняння ефектів субстрату та стимулятора активності іNOS з такими у здорових осіб виявило зростання амплітуди ефекту на 24,37 і 41,55 % відповідно (P<0,01). Отриманий результат свідчить про підвищення не тільки базальної, але й стимульованої продукції NO моноцитами внаслідок активації іNOS. Цей висновок підтверджувався використанням інгібітора згаданого ферменту, що знижував продукцію NO більше ніж удвічі. Аналіз механізмів реакції іNOS моноцитів на ЛПС показав, що посилення відповіді на бактеріальні стимули опосередковані насамперед активацією метаболізму АК. Амплітуда ефекту

Динаміка і механізми регуляції продукції нітритів моноцитами-макрофагами (нмоль NO₂ · мл⁻¹ · 10⁻⁶ клітин) за умов ранового процесу

Схема досліджу	Контроль	Рановий процес			
		1-ша доба	3-4-та доба	7-10-та доба	14-18-та доба
Базальна продукція (вихідний рівень)	22,55±1,37	30,6±2,11 ^{##}	41,20±3,2 ^{###}	28,9±2,07 [#]	23,7±1,22
Введення					
L-аргініну	36,1±2,21 ^{**}	53,3±3,15 ^{***}	63,4±3,18 ^{***}	42,3±3,11 ^{**}	32,4±2,17 ^{**}
L-NIL	12,35±0,66 ^{***}	14,5±1,26 ^{***}	15,6±0,84 ^{***}	15,0±0,93 ^{***}	13,2±0,79 ^{**}
L-нормпваліну	26,6±2,02 [*]	36,7±2,19 [*]	45,1±2,77	46,1±2,53 ^{***}	30,6±2,28 ^{**}
Стимулювання					
ліпополісахаридом	40,42,24 ^{***}	77,6±4,82 ^{***}	96,4±5,65 ^{***}	48,3±2,71 ^{***}	39,2±2,84 ^{***}
зі стауроспорином	35±1,71 [•]	65,1±3,41 [•]	71,4±3,64 ^{••}	29,2±2,0 ^{•••}	33,4±2,22 [•]
зі нордигідроуретиковою кислотою	29,6±1,89 ^{••}	46,2±2,60 ^{••}	46,22,81 ^{•••}	37,1±2,68 ^{••}	31,1±3,0 ^{••}
з індометацином	32,2±2,0 ^{••}	53,2±2,91 ^{••}	61,3±3,96 ^{•••}	27,0±1,42 ^{•••}	29,3±1,48 ^{••}
з Н-89	44,1±1,24 [•]	81,3±3,88 [•]	100,1±5,7 [•]	55,2±2,26 ^{••}	47,2±2,91 ^{••}
з теофіліном	35,7±1,9 [•]	59,1±3,02 ^{••}	62,33,31 ^{•••}	43,3±3,13 [•]	36,1±2,45 [•]

*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 порівняно з вихідним рівнем;

•P<0,05, ••P<0,01, •••P<0,001 порівняно зі значеннями ліпополісахаридстимульованої продукції;

#P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 порівняно з контролем.

інгібітора 5-ЛОГ виявилася практично в 1,5 раза вищою ($P < 0,01$), ніж у здорових осіб. При інкубації із НГДУК продукція NO зменшувалася на 40,72 % ($P < 0,01$), тоді як інгібітор ЦОГ знижував ЛПС-стимульовану продукцію нітритів моноцитами на 31,44 % ($P < 0,01$). Використання інгібітора ФДЕ призводило до зменшення продукції NO на 23,07 % ($P < 0,05$), тоді як стауроспорин пригнічував ЛПС-стимульовану продукцію нітритів лише на 16,24 % ($P < 0,05$). На цьому тлі практично нівелювався ефект інгібітора ПкА. Таким чином, ЛПС-стимульована продукція NO проявлялася наступною закономірністю активації ферментних систем та їх впливом на iNOS – \uparrow 5-ЛОГ $>$ \uparrow ЦОГ-2 $>$ \uparrow ФДЕ $>$ \uparrow ПкС $>$ \downarrow ПкА.

Через 3–4 доби ранового процесу базальна продукція нітритів моноцитами сягала максимального рівня, підвищуючись на 34,64 ($P < 0,01$) і 82,71 % ($P < 0,001$) порівняно з попереднім строком і контролем відповідно. Цей феномен був пов'язаний з активацією iNOS – інгібітор ферменту знижував продукцію NO в 2,46 раза ($P < 0,01$) щодо вихідного рівня, тоді як інгібітор аргінази-1 мало впливав на продукцію нітритів моноцитами. При збереженні амплітуди стимулювального ефекту L-аргініну на рівні, близькому до контрольного, ефект ЛПС був вищим від значень у здорових осіб на 30,74 % ($P < 0,01$). Найбільш значимим механізмом реалізації цього ефекту ЛПС, як і раніше, була активація 5-ЛОГ. Вплив інгібітора даного ферменту збільшився на 28,51 % ($P < 0,01$) порівняно з попереднім терміном, перевищивши контрольне значення практично удвічі ($P < 0,001$). Паралельно відзначалося підвищення амплітуди ефектів інгібіторів ЦОГ і ФДЕ. На тлі низької активності ПкА максимальним виявився приріст активності ПкС (на 62,74 %; $P < 0,01$). Ефект стауроспорину на ЛПС-стимульовану активність iNOS сягав 26,42 %, тим самим перевищував контрольне значення практично

удвічі. У структурі ЛПС-стимульованої відповіді зберігалася описана закономірність співвідношення активності ферментів: 5-ЛОГ $>$ ЦОГ $=$ ФДЕ $>$ ПкС $>$ ПкА.

Однак через 7–10 діб ситуація значно мінялася. Базальна продукція нітритів статистично значуще знизилася, хоча як і раніше перевищувала контрольне значення на 29,16 % ($P < 0,01$). Стимулювальний вплив L-аргініну на продукцію NO був нижчим від контролю, ймовірною причиною цього було збільшення активності аргінази-1. Використання її селективного інгібітора підвищувало продукцію NO на 59,17 % ($P < 0,01$), що перевищувало ефект L-аргініну практично в 1,5 раза ($P < 0,01$). Це свідчить про зміну домінуючого шляху метаболізму згаданої амінокислоти в моноцитах. Цікаво, що зміна метаболізму L-аргініну на продукцію поліамінів супроводжувалася зниженням чутливості моноцитів до інкубації з ЛПС. Так, додавання останнього викликало значно менший ефект на продукцію нітритів порівняно з таким у попередній термін дослідження ($P < 0,01$) та в контролі. Цей факт відображає тимчасове зниження антимікробної резистентності організму в зазначену фазу ранового процесу. При цьому відзначені принципові зміни в структурі внутрішньоклітинної сигналізації моноцитів. Амплітуда інгібіторного ефекту блокатора 5-ЛОГ знижувалася на 56,4 % ($P < 0,01$) порівняно з попереднім строком і була на 14,27 % нижчою від контролю ($P < 0,05$). На відміну від цього, активність ЦОГ продовжувала підвищуватись. Інгібітор згаданого ферменту знижував ЛПС-стимульовану продукцію нітритів на 43,75 %, причому ефект модулятора виявився більш ніж удвічі вищим від такого в контролі ($P < 0,01$). Паралельно підвищувалася активність ПкС, її інгібітор зменшував ЛПС-стимульовану активність iNOS на 39,58 % ($P < 0,01$), що майже удвічі перевищувало контрольне значення. Вплив ПкА зростав, про що свідчить підвищення на 14,5 %

($P < 0,05$) ЛПС-стимульованої продукції нітритів за умов інкубації з Н-89. Це може свідоброжати участь ПкА в зміні базальної та ЛПС-стимульованої продукції NO, а також індукції аргінази-1. Підвищення ефективності функціонування сигнальних шляхів, асоційованих із циклічними нуклеотидами, супроводжувалося зниженням ролі ФДЕ. Ефект інгібітора ФДЕ зменшувався на 70,86 % порівняно з попереднім терміном спостереження ($P < 0,01$). Таким чином, через 7–10 діб ранового процесу знижується базальна продукція NO в супернатанті моноцитів внаслідок пригнічення iNOS й активації аргінази-1. Зменшення ЛПС-стимульованої реакції iNOS було пов'язане з такими змінами в системі сигналізації: \uparrow ЦОГ-2 = \uparrow ПкС $>$ \uparrow ПкА при \downarrow 5-ЛОГ й \downarrow ФДЕ.

Через 14–18 діб ранового процесу базальна продукція нітритів в супернатанті моноцитів поверталася до вихідного рівня. Однак використання модуляторів стану системи внутрішньоклітинної сигналізації дало змогу виявити низку метаболічних особливостей. По-перше, зберігалася висока активність аргінази-1. Хоча амплітуда ефекту інгібітора цього ферменту й знизилася на 55,07 % ($P < 0,01$) порівняно з попереднім терміном дослідження, вона залишалася більше ніж на 70 % вищою від контролю ($P < 0,01$). По-друге, незважаючи на завершення ранового процесу, у всіх пацієнтів зберігалася знижена реакція на введення ЛПС. Цей феномен був пов'язаний із збереженням більш високої щодо контролю активності ЦОГ (на 26,33 %; $P < 0,05$) та підвищенням активності ПкА (в 2,33 раза ($P < 0,001$)).

ОБГОВОРЕННЯ

Представлені результати свідчать про істотну зміну активності iNOS за умов ранового процесу. Відповідь моноцитів-макрофагів вважається важливим захисним механізмом, що забезпечує гіперпродукцію

NO при ушкодженні тканин шкіри. Утворений з NO і O_2^- пероксинітрит є сильним окисником, а у високих концентраціях діє як цитотоксичний та імуногенний агент внаслідок ушкодження ДНК і модуляції активності багатьох ферментів [4, 10, 12, 15]. Це забезпечує потужний бактерицидний ефект, що дає можливість позитивно трактувати підвищення продукції NO та чутливості моноцитів до ЛПС, зареєстроване з 1-ї по 3–4-ту добу ранового процесу. З огляду на те, що бактеріальний ЛПС відноситься до класичних активаторів моноцитів, можна стверджувати, що підвищення ЛПС-стимульованої активності iNOS супроводжується посиленням продукції прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-15, IL-18, фактора некрозу пухлин α і IL-12), хемокинів (CCL15, CCL20, CXCL13, CXCL9, CXCL10 й CXCL11), а також активних радикалів кисню [15]. Однак така реакція забезпечує не тільки елімінацію мікроорганізмів і залучення нейтрофілів у зону ушкодження, але й призводить до вторинної альтерації тканин [8, 11]. Цьому сприяє визначене в роботі підвищення активності 5-ЛОГ і ФДЕ, що традиційно пов'язують зі збільшенням внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} , активацією оксидативного стресу, альтерацією й апоптозом клітин у рані [23]. Варто відмітити одночасність зміни активності iNOS і 5-ЛОГ, яка підвищувалася починаючи з 1-ї доби, і сягала піка на 3–4-ту добу, після чого знижувалася. Цей феномен може свідчити про участь зазначених ферментних систем у реалізації прозапальної й антимікробної функції макрофагів, а також визначає характер взаємин макрофагів з іншими клітинами у фазу гострої запальної відповіді організму на ушкодження.

Слід зазначити, що зниження активності iNOS у фазу формування грануляцій супроводжувалося підвищенням активності аргінази-1 і зниженням ефекту ЛПС. Останнє може свідчити про зміни регуляції

моноцитів-макрофагів внаслідок їхнього переходу із класичного шляху стимуляції на альтернативний. Він реалізується за участю цитокінів (ІЛ-4 і ІЛ-13), імунних комплексів, трансформувального фактора росту і глюкокортикоїдів [19]. Активація аргінази-1, що визначає продукцію регуляторних поліамінів, а також проліну, ймовірно, забезпечує інтенсифікацію фібринолізу при формуванні грануляційної тканини [4, 9, 17]. З цієї позиції динаміка активності iNOS протягом 2-го тижня ранового процесу може бути критерієм прогнозування загоєння дефектів шкіри та слизових оболонок. Формування грануляцій у рані також супроводжувалося зниженням активності 5-ЛОГ і переважною продукцією простаноїдів, що забезпечують вазодилатацію, цитопротекцію, стимуляцію експресії фактора росту судинного ендотелію і ангиогенезу [22]. Серед важливих внутрішньоклітинних механізмів, що контролюють зміни функціональної активності моноцитів-макрофагів, слід відзначити ПкА, що за результатами проведеного інгібіторного аналізу була спряжена з пригніченням продукції нітритів і стимуляцією аргінази-1, наслідком чого може бути підвищення секреторної активності клітин сполучної тканини [14, 18, 20]. Причому стимуляція ПкА у фіналі ранового процесу, разом із підтримкою високої активності ПкС і ЦОГ, може відображати роль зазначених ферментних систем у реалізації процесу ремоделювання сполучної тканини після епітелізації ранової поверхні.

Таким чином, різні фази ранового процесу супроводжуються зміною активності iNOS моноцитів, сполученої з перебуваннями в системі внутрішньоклітинної сигналізації. Протягом 1-ї доби після механічної травми (фаза альтерації та судинної реакції) підвищується базальна й ЛПС-стимульована активність iNOS і 5-ЛОГ, що сягає максимуму через 3–4 доби. Протягом 7–10 діб грануляції та епітелі-

зація ранової поверхні формуються на тлі максимальної активності ЦОГ, ПкС і стимуляції ПкА. Ці зміни супроводжуються зниженням базальної активності iNOS моноцитів й обмеженням їхньої реакції на ЛПС, а також стимуляцією аргінази-1, що конкурує за субстрат з iNOS. Через 14–18 діб сполучна тканина в ділянці рани ремоделювалася на фоні відновлення базальної активності iNOS до контрольного рівня, збереження активності ЦОГ і ПкС, та максимального підвищення ефектів ПкА, що було асоційовано з підтримкою високої активності аргінази-1. Зміни в системі внутрішньоклітинної сигналізації модулюють ефекторну функцію моноцитів-макрофагів, тому їхній аналіз може використовуватися для діагностики й корекції перебігу ранового процесу.

**М. Э. Баринова, В. Н. Ельский,
Э. Ф. Баринов, О. Н. Сулаева**

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ И МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В ДИНАМИКЕ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА

Изучали закономерности и механизмы регуляции активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в моноцитах-макрофагах в динамике раневого процесса. Роль внутриклеточных сигнальных систем в модуляции активности iNOS моноцитов периферической крови 22 пациентов с травматическими ранами конечностей анализировали методом ингибиторного анализа *in vitro*. Показано, что с 1-х по 3–4-е сутки раневого процесса повышается базальная и стимулированная липополисахаридом продукция оксида азота, активность 5-липоксигеназы и фосфодиэстеразы. Активность циклооксигеназы и протеинкиназы С возрастала через 3 сут, достигала максимума через 7–10 сут во время формирования грануляций и эпителизации раневой поверхности. Активность протеинкиназы А, угнетающей iNOS, увеличивалась с 7–10 сут, достигая максимума через 14 сут, что сопровождалось активацией аргиназы-1. Мониторинг разных звеньев системы внутриклеточной сигнализации может использоваться для диагностики и коррекции течения раневого процесса.

Ключевые слова: раневой процесс, моноциты-макрофаги, индуцибельная NO-синтаза.

**M. E. Barinova, V.N. Yelsky, E.F. Barinov,
O.N. Sulayeva**

**FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONOCYTES
AND THE MECHANISMS
AND INTRACELLULAR REGULATION
OF INOS DURING WOUND PROCESS**

To investigate the dynamics and mechanisms of iNOS activity during wound process, the peripheral blood monocytes of 22 patients with acute foot wounds were analyzed. The basal and LPS-stimulated nitrites production was estimated at 1, 3-4, 7-10 and 14-18 days of wound process. iNOS activity and its molecular regulation was estimated by the inhibitory analysis. It was shown that since 1st to 3-4 day of wound process the basal and LPS-stimulated activity of iNOS, PDE and 5-LOX were elevated initially and then decreased. The COX and PkC activities increased after 3 days and reached the maximum level at days 7-10. The activity of PkA, which inhibits iNOS, intensively increased from 7-10th to 14-18th days of healing, and was accompanied by arginase-1 stimulation. Thus monitoring of intracellular signaling system can be used for diagnostics and correction of wound healing.

Key words: wound healing, monocytes-macrophages, iNOS.

M. Gorky Donetsk National Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барінов Е.Ф., Канана Н.М., Барінова М.Е. Взаємозв'язок між активністю iNOS моноцитів та eNOS тромбоцитів в динаміці експериментального цукрового діабету // Архів клініч. і експерим. медицини. – 2008. – 17, № 2. – С. 127–129.
2. Барінова М.Э. iNOS моноцитів крові при заживленні ран у больных с синдромом диабетической стопы // Актуальні пробл. сучасної медицини. – 2009. – 9, Вип. 3. – С. 109–113.
3. Барінова М. Э., Сулаєва О.Н. Гетерогенність реакції макрофагів при заживленні ран нижніх кінцівок у больных сахарним діабетом // Морфологія. – 2009. – Т. III, № 1. – С. 22–27.
4. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Особливості метаболізму L-аргініну в лейкоцитах крові за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2008. – 54, № 1. – С. 63–67.
5. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. Модуляция активности ионных каналов клеток арахидоновой кислотой, продуктами ее метаболизма и другими жирными кислотами // Цитология. – 1995. – 37, № 1–2. – С. 5–65.
6. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И. Механизмы Ca²⁺-сигнализации в перитонеальных макрофагах // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2000. – 86, № 8. – С. 1030–1048.
7. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики. – Донецьк: Видавець Папакіца Є.К., 2006. – 211 с.
8. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление. – М.: Медицина, 1991. – 272 с.
9. Agren M. S., Werthen M. The extracellular matrix in wound healing: a closer look at therapeutics for chronic wounds // Int. J. Lower Extr. Wounds. – 2007. – 6. – P. 82–97.
10. Aguilar D., Skrabanek L. Beyond tissue Info: functional prediction using tissue expression profile similarity searches // Nucleic Acids Res. – 2008. – 36, № 11. – P. 3728–3737.
11. Braiman-Wiksmann L., Solomonik I., Spira R., Tennenbaum T. Invited review: Novel insights into wound healing sequence of events // Toxicol. Pathol. – 2007. – 35. – P. 767–779.
12. Barbato J.E., Zuckerbraun B.S., Overhaus M. Nitric oxide modulates vascular inflammation and intimal hyperplasia in insulin resistance and the metabolic syndrome // Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 2005. – 289. – P. H228–236.
13. Cipollone F., Chiarelli F., Iezzi A. Relationship between reduced BCL-2 expression in circulating mononuclear cells and early nephropathy in type 1 diabetes // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. – 2005. – 18, № 4. – P. 625–635.
14. Connelly L., Jacobs A.J., Palacios-Callender M. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression // J. Biol. Chem. – 2003. – 278. – P. 241–250.
15. Derakhshan B., Hao G., Groos S.S. Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide // Cardiovascular. Res. – 2007. – 75. – P. 210–219.
16. Jarvinen T. A.H., Ruoslahti E. Molecular Changes in the Vasculature of Injured Tissues // Amer. J. Pathol. – 2007. – 171. – P. 702–711.
17. Kampfner H., Pfeilschifter J., Frank S. Expression and activity of arginase isoenzymes during normal and diabetes-impaired skin repair // J. Invest. Dermatol. – 2003. – 121. – P. 1544–1551.
18. Lee S. P., Serezani C. H., Medeiros A. I., Ballinger M. N. Crosstalk between Prostaglandin E2 and leukotriene B4 regulates phagocytosis in alveolar macrophages via combinatorial effects on cyclic AMP // J. Immunol. – 2009. – 182. – P. 530–537.
19. Lowson S.M. Alternatives to nitric oxide // Brit. Med. J. – 2004. – 70. – P. 119–131.
20. Morris S.M. Enzymes of arginine metabolism // J. Nutr. – 2004. – 134. – P. 2743–2747.
21. Meier M., King G.L. Protein kinase C activation and its pharmacological inhibition in vascular disease // Vascular. Med. – 2000. – 5. – P. 173–185.
22. Medow M. S., Taneja I., Stewart J. M. Cyclooxygenase and nitric oxide synthase dependence of cutaneous reactive hyperemia in humans // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol. – 2007. – 293. – P. H425–H432.

23. Radmark O., Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation // J. Lipid Res. – 2009. – **50**. – P. S40–S45.
24. Tchaikovski V., Olieslagers S., Вцhmer F.D. Diabetes

mellitus activates signal transduction pathways resulting in vascular endothelial growth factor resistance of human monocytes // Circulation. – 2009. – **120**, № 2. – P. 150–159.

Донецьк. нац. мед. ун-т ім. М. Горького
E-mail: barinoff@dsmu.edu.ua

Матеріал надійшов до
редакції 07.09.2009

Н.В. Богдановська, А.В. Коцюруба, М.В. Маліков

Особливості обміну аргініну й синтезу оксиду азоту в юнаків при адаптації до фізичних навантажень у тренувальному та змагальному періодах

*Обстежено 29 тренуваних і нетренуваних юнаків віком від 18 до 20 років. Показано, що оптимальний рівень адаптації тренуваного організму до тривалих та інтенсивних фізичних навантажень забезпечується за рахунок активації не тільки конститутивного кальцій-залежного *de novo* синтезу оксиду азоту, але і неокисного аргіназного метаболізму аргініну, за якого утворюється низка важливих низькомолекулярних біорегуляторів і антиоксидантів, у т.ч. сечовина. Значне зниження функціональних можливостей організму тренуваних юнаків наприкінці змагального періоду і, як наслідок, проявлення ознак дезадаптації, корелює зі зростанням окисного кальційнезалежного *de novo* синтезу оксиду азоту і його неокисного синтезу внаслідок реутилізації стабільних циркулюючих метаболітів.*

Ключові слова: оксид азоту, аргінін, фізичні навантаження, адаптація, юнаки.

ВСТУП

Відомо, що оксиду азоту належить важлива роль у пристосуванні організму до фізичних навантажень, зокрема, за рахунок регуляції функціонального стану серцево-судинної системи [1, 5–7]. Дослідженнями низки авторів показані певні перебудови у функціональному стані ендотелію та системи синтезу оксиду азоту у людей під впливом м'язової роботи, які пов'язані насамперед зі збільшенням синтезу NO і, як наслідок, вираженістю вазодилатаційних судинних реакцій [8–12]. Слід відзначити також, що практично в усіх дослідженнях використовувалися виключно дозовані та нетривалі фізичні навантаження.

Раніше нами було показано, що у молодих спортсменок віком від 18 до 20 років, які протягом тривалого часу виконували фізичну роботу великої інтенсивності й обсягу або в режимі тренування чи в обтяженому психологічним стресом режимі змагань виявляються суттєві зміни стану

системи синтезу оксиду азоту їх організму: при переході від тренувального навантаження до такого ж, але в умовах психологічного стресу у дівчат значно зменшувалася інтенсивність окисної деградації аргініну за участю cNOS, а також аргіназного шляху його метаболізму, за яким синтезуються такі важливі низькомолекулярні біорегулятори, як сечовина, поліаміни й ГАМК, і, навпаки, посилювалось окиснення аргініну кальційнезалежною iNOS [2, 3].

Метою роботи було вивчення особливостей змін у системі обміну L-аргініну в т.ч. окисного синтезу оксиду азоту у практично здорових осіб під впливом довготривалих фізичних навантажень значного обсягу та інтенсивності. Важливо було дослідити інтенсивність *de novo* синтезу оксиду азоту – як індукційного, так і конститутивного, інтенсивність реутилізаційного (salvage) його синтезу за рахунок відновлення циркулюючих стабільних метаболітів – нітрату і нітриту, а також

© Н.В. Богдановська, А.В. Коцюруба, М.В. Маліков

інтенсивність неокисної деградації аргініну аргіназою.

МЕТОДИКА

У досліді взяли участь 17 нетренованих студентів-юнаків (контрольна група) та 12 тренуваних юнаків спортсменів-гандболістів (експериментальна група) віком від 18 до 20 років. Юнаки експериментальної групи протягом 11 міс систематично виконували м'язову роботу великого обсягу та інтенсивності. Перші 3 міс – підготовчий період, у рамках якого застосовувалися такі засоби – крос, плавання, естафети на воді, тактична підготовка в аеробному режимі (частота серцевих скорочень – ЧСС=125–155 хв⁻¹), спеціальний біг з елементами гандболу та спеціальні ігри у змішаному анаеробно-аеробному режимі (ЧСС=140–185 хв⁻¹). Загальна кількість годин на цьому етапі становила 293. В наступні 8 міс (змагальний період) тренувальні навантаження (25–30% від обсягу навантажень підготовчого періоду) проводили паралельно зі змаганнями за календарним планом команди.

Під час дослідження у плазмі крові у юнаків обох груп визначали біохімічні показники, які характеризують інтенсивність обміну L-аргініну за двома альтернативними шляхами метаболізму (неокисному аргіназному й окисному NO-синтазному).

Інтенсивність неокисного метаболізму оцінювали, визначаючи активність аргінази й вміст сечовини, що утворюється при роботі цього ферменту. Інтенсивність окисної деградації аргініну, при якій синтезується оксид азоту *de novo* оцінювали за активністю різних ізоферментів NO-синтаз – кальційзалежної конститутивної – cNOS ((визначали сумарну активність ендотеліальної та нейрональної NOS: eNOS + nNOS = cNOS) і кальційнезалежної індукційної (iNOS)), а також за рівнем окисне-

них стабільних метаболітів оксиду азоту – нітрит (NO₂⁻) і нітрат (NO₃⁻)-аніонів.

Оцінювали також інтенсивність реутилізації нітрат-аніонів для ресинтезу оксиду азоту, визначаючи НАДФ-залежну нітратредуктазну активність. Всі вказані показники визначали згідно з описаними раніше методами [2, 3].

Використовуючи первинні експериментальні дані, розраховували також деякі їхні співвідношення, а саме:

1) частку вмісту нітрит-аніона (%NO₂) у сумарному пулі стабільних метаболітів оксиду азоту за формулою:

$$\%NO_2 = [NO_2^-] \cdot 100 / [NO_3^-] + [NO_2^-],$$

де [NO₂⁻], [NO₃⁻] – вміст відповідних сполук у плазмі крові;

2) частку активності iNOS (%iNOS) у сумарній активності NO-синтаз (iNOS + cNOS) за формулою:

%iNOS = активність iNOS · 100 / сумарна активність NOS;

3) співвідношення активностей неокисного та різних шляхів окисного метаболізму аргініну через відношення активностей аргінази, сумарної NOS та різних ізоферментів NOS (активність аргінази / активність NOS, активність аргінази / активність iNOS і активність аргінази / активність cNOS);

4) співвідношення різних шляхів (кальційнезалежного індукційного й кальційзалежного конститутивного) окисного *de novo* і неокисного реутилізаційного шляхів синтезу оксиду азоту, визначаючи співвідношення активностей ферментів цих різних шляхів синтезу оксиду азоту (активність нітратредуктази / активність NOS, активність нітратредуктази / активність iNOS і активність нітратредуктази / активність cNOS).

Розраховували також відносні зміни (D, %) біохімічних показників щодо певного дослідженого періоду або контролю за такою формулою:

$$D = 100 \cdot (X_i - X_n) / X_n,$$

де X_i – кінцеве значення; X_n – вихідне значення показника.

Усі біохімічні показники визначали в збагаченій білокрівцями плазмі крові нетренованих юнаків контрольної групи на початку дослідження, а у тренуваних юнаків експериментальної групи тричі: по закінченні підготовчого періоду, в середині й наприкінці змагального періоду. У процесі підготовчого періоду (3 міс), фізичні навантаження виконували за відсутності факторів психологічного стресу, а в періоді змагань (8 міс) виконували як у тренувальному безстресовому режимі, так і в стресових умовах відповідальних змагань.

Обрана схема визначення вказаних біохімічних показників ґрунтувалася на тому, що ми спробували оцінити зміни активності різних шляхів обміну аргініну й синтезу оксиду азоту наприкінці підготовчого періоду (на піку фізичної форми, досягнутої під час тренувальних занять), в середині змагального (через 7 міс після початку тренувань або через 4 міс після початку змагань) і наприкінці змагального періоду (через 11 міс після початку тренувань або через 8 міс після початку змагань).

Крім зазначених біохімічних показників одночасно в нетренованих юнаків контрольної групи на початку дослідження й у тренуваних юнаків експериментальної

групи по закінченні підготовчого періоду, у середині й наприкінці змагального періоду за допомогою субмаксимального тесту PWC_{170} визначали загальну фізичну працездатність (PWC_{170}) та аеробну продуктивність (МСК) їхнього організму за формулами Карпмана [4]:

$$PWC_{170} = [N_1 + (N_2 - N_1) \cdot (170 - ЧСС_1) / (ЧСС_2 - ЧСС_1)] / МТ,$$

де N_1 – потужність першого навантаження, кгм/хв; N_2 – потужність другого навантаження, кгм/хв; $ЧСС_1$ – частота серцевих скорочень наприкінці першого навантаження, хв⁻¹; $ЧСС_2$ – частота серцевих скорочень наприкінці другого навантаження, хв⁻¹; МТ – маса тіла, кг.

$$МСК = 1,7 \cdot PWC_{170} \cdot МТ + 1240,$$

де PWC_{170} – відносна величина загальної фізичної працездатності, кгм · хв⁻¹ · кг⁻¹;

МТ – маса тіла, кг; 1,7 та 1240 – постійні коефіцієнти.

Усі отримані результати були оброблені стандартними методами математичної статистики з використанням пакета Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У табл. 1 представлені результати попереднього обстеження юнаків контрольної й експериментальної груп. Обстеження

Таблиця 1. Біохімічні та функціональні показники в обстежених нетренованих (контрольна група) і тренуваних (експериментальна група) юнаків (M±m)

Показники	Нетреновані(n=17)	Треновані(n=12)
NO ₂ ⁻ , пмоль · мг ⁻¹ білка	177,1±18,1	323,70±24,70*
NO ₃ ⁻ , нмоль · мг ⁻¹ білка	7,74±0,82	1,67±0,20*
Аргіназа, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	1,21±0,16	2,09±0,25*
Сечовина, нмоль · мг ⁻¹ білка	56,68±5,40	75,80±6,20*
NO-синтаза, пмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка		
конститутивна	40,04±3,24	58,6±7,90*
індуцибельна	14,44±4,08	12,3±2,45
сумарна	54,48±7,48	70,95±9,85
Нітратредуктаза, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	3,17±0,15	3,47±0,41
Загальна фізична працездатність, кгм · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	12,86±0,97	26,64±1,31*
Аеробна продуктивність, мл · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	48,32±1,24	70,24±2,84*

*P<0,05 різниця достовірна стосовно значень у контрольній групі.

останніх було проведено наприкінці періоду підготовки до змагального сезону, на своєрідному «піку» їхньої функціональної підготовленості, що й підтвердили досить високі значення загальної фізичної працездатності PWC_{170} і аеробної продуктивності МСК. У юнаків, які регулярно інтенсивно тренувалися протягом 3 міс, на цьому етапі дослідження вірогідно більш високі, ніж у нетренованих юнаків того самого віку контрольної групи значення практично всіх вивчених біохімічних показників. Це свідчило про значимість досліджених маркерів окисного NO-синтазного й аргіназного обміну аргініну, також як і окисного *de novo* та неокисного реутилізаційного синтезу оксиду азоту для процесу адаптації організму юнаків до тривалих і значних фізичних навантажень. Отримані результати узгоджуються з даними досліджень цілої низки авторів, які показали важливу роль NO у пристосуванні організму до фізичних навантажень [8–12].

Разом з тим аналіз отриманих результатів дав змогу констатувати наявність певної ієрархічної організації системи обміну аргініну й синтезу оксиду азоту в обстежених юнаків експериментальної групи на найбільш високому (максимальному) рівні їхньої функціональної підготовленості. Так, наприкінці підготовчого періоду, при максимальних значеннях PWC_{170} (удвічі вище, ніж у контролі) і МСК (достовірне перевищення контрольних значень МСК майже на 50 %) домінуюча роль у забезпеченні необхідного вмісту оксиду азоту і, як наслідок, максимального рівня функціональних показників організму тренуваних юнаків, повністю адаптованих до виконання тривалих і значних фізичних навантажень, забезпечується досить високою активністю конститутивного *de novo* синтезу оксиду азоту (+46,35 % порівняно з контролем) у поєднанні з високим рівнем активності аргінази (+72,73 %).

Крім того, важливе значення в забез-

печенні оптимальної функціональної підготовленості може мати також внесок оксиду азоту, ресинтезованого із його стабільних метаболітів (вміст нітрит-іонів був на 82,78 % вище, а нітрат-аніонів на 78,44 % нижче, ніж у контролі), хоча вірогідних відмінностей в активності нітратредуктази зафіксовано не було. На користь оптимального стану системи синтезу оксиду азоту в юнаків експериментальної групи на початку підготовчого періоду свідчили і вірогідно більш низькі (на 14,82 %) порівняно з юнаками контрольної групи, значення активності iNOS.

Суттєвим підтвердженням наведеним результатам стали такі порівняльного аналізу різних співвідношень вивчених біохімічних показників. Як видно з рис. 1, для юнаків експериментальної групи були характерні вірогідно більш високі порівняно з контрольною групою співвідношення аргіназа / iNOS (на 102,60 %), частки NO_2 (на 66,59 %), та, навпаки, менші значення частки iNOS (на 34,72 %).

У цілому можна констатувати, що більш виражений у тренуваних юнаків процес *de novo* синтезу оксиду азоту у сполученні з відносно помірним збільшенням реутилізаційного шляху, підвищеною інтенсивністю аргіназного й зниженою активністю кальцій-незалежної iNOS спостерігався на тлі підвищених порівняно з контролем значень їх загальної фізичної працездатності й аеробної продуктивності. Це є переконливим доказом важливої ролі оксиду азоту, синтезованого саме конститутивним, а не індукційним *de novo* шляхом, у забезпеченні адекватного рівня функціональної підготовленості організму.

Ми оцінили також зміни у системі синтезу оксиду азоту на різних етапах тренувальної та змагальної діяльності тренуваних юнаків, тобто в динаміці адаптації до зміни характеру та обсягу зовнішнього впливу на їх організм у вигляді м'язової роботи.

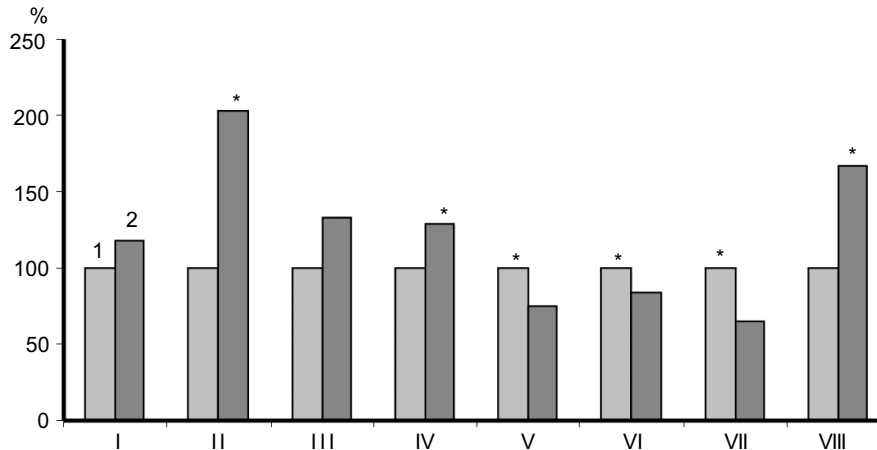


Рис. 1. Співвідношення активностей різних шляхів метаболізму L-аргініну у нетренованих (1) і тренуваних (2) юнаків: I – аргінази / NOS, II – аргінази / iNOS, III – аргінази / eNOS, IV – нітратредуктази / NOS, V – нітратредуктази / iNOS, VI – нітратредуктази / eNOS, VII – частка активності iNOS у сумарній активності NO-синтаз, VIII – частка вмісту нітрит-аніона у сумарному пулі метаболітів оксиду азоту. За 100 % прийнято значення показників, зареєстрованих у групі нетренованих юнаків.

* достовірна різниця порівняно з нетренованими юнаками (P < 0,05)

Як видно з результатів, представлених у табл. 2, при тривалому поєднанні тренувальних і змагальних навантажень у тренуваних юнаків експериментальної групи до середини змагального періоду знижувався рівень їхньої фізичної працездатності й аеробної продуктивності організму, що повністю підтверджує літературні дані з цього питання. У зв'язку із цим істотні зміни, спостерігалися й у системі забезпечення організму оксидом азоту.

Було встановлено, що в умовах тривалої інтенсивної м'язової роботи домінуюча роль у забезпеченні оптимального рівня функціонування системи синтезу оксиду азоту належить вже не лише окисному конститутивному *de novo*, але і неокисному ресинтезу NO із його стабільних метаболітів.

Так, у середині змагального періоду сягнули свого максимуму такі показники плазми крові, як вміст нітрит-аніона (+16,77%),

Таблиця 2. Зміни абсолютних значень біохімічних і функціональних показників у тренуваних юнаків залежно від тривалості дії систематичних фізичних і психологічних навантажень у період змагань (M±m, n = 12–17)

Показники	Вихідний стан	Середина змагального періоду
NO ₂ ⁻ , пмоль · мг ⁻¹ білка	323,70±24,70	378,0±46,9
NO ₃ ⁻ , нмоль · мг ⁻¹ білка	1,67±0,20	1,02±0,13**
Аргіназа, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	2,09±0,25	1,31±0,29*
Сечовина, нмоль · мг ⁻¹ білка	75,80±6,20	57,60±9,60
NO-синтаза, пмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка		
конститутивна	58,6±7,90	71,67±6,42
індуцибельна	12,3±2,45	10,43±1,36
сумарна	70,95±9,85	82,1±2,42
Нітратредуктаза, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	3,47±0,41	7,38±0,87***
Загальна фізична працездатність, кгм · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	26,64±1,31	23,77±0,57
Аеробна продуктивність, мл · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	70,24±2,84	63,61±1,20

*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 різниця достовірна стосовно вихідних значень.

активність cNOS (+22,30 %) і, особливо, активність нітратредуктази (+112,68 %), тоді як, навпаки, свого мінімуму сягнули вміст нітрат-аніону (-38,92 %), активність аргінази (-37,32 %). Не виключено, що зростання активності cNOS зумовлюється саме внаслідок зниження активностей аргінази та iNOS (-15,20 %), що конкурують з cNOS за спільний субстрат – L-аргінін.

В середині змагального періоду серед розрахованих показників максимальні значення мали такі – частка нітрит-аніона в сумарному пулі стабільних метаболітів оксиду азоту (+66,71 % порівняно з вихідними значеннями) та відношень між різними шляхами синтезу оксиду азоту – реутилізаційним і кальційнезалежний *de novo* (нітратредуктаза / iNOS), де приріст становив +150,82 %. Мінімальні значення в цей період були зафіксовані між відношеннями неокисного аргіназного метаболізму аргініну і його окисного кальційзалежного (аргіназа / cNOS – зменшення на 48,73 % порівняно з вихідними значеннями). Найбільше зниження було зареєстровано для частки iNOS у сумарній активності NO-синтаз (на 26,59 %; рис. 2).

Відомо, що закінчення змагального сезону у спортсменів характеризується потужним наростанням природного стомлення організму, зниженням фізичної працездатності та функціональної підготовленості. Відповідно до результатів, представлених у табл. 3, у тренуваних юнаків на заключному етапі дослідження дійсно спостерігалось виражене вірогідне зниження PWC_{170} (на 25,49 % щодо вихідних значень) і МСК (-14,22 %). Разом з тим необхідність продовження змагальної діяльності, виконання фізичних навантажень на необхідному рівні вимагає мобілізації функціональних резервів організму й формування нових фізіологічних механізмів його адекватної адаптації до систематичної м'язової роботи.

Як показали результати нашого дослідження, адаптивні перебудови в системі синтезу оксиду азоту на етапі граничного й навіть надпорогового зовнішнього впливу знайшли своє відбиття в зміні ієрархії її окремих компонентів. При обстеженні юнаків експериментальної групи наприкінці змагального періоду (див. табл. 3) ми встановили значні зміни в інтенсивностях

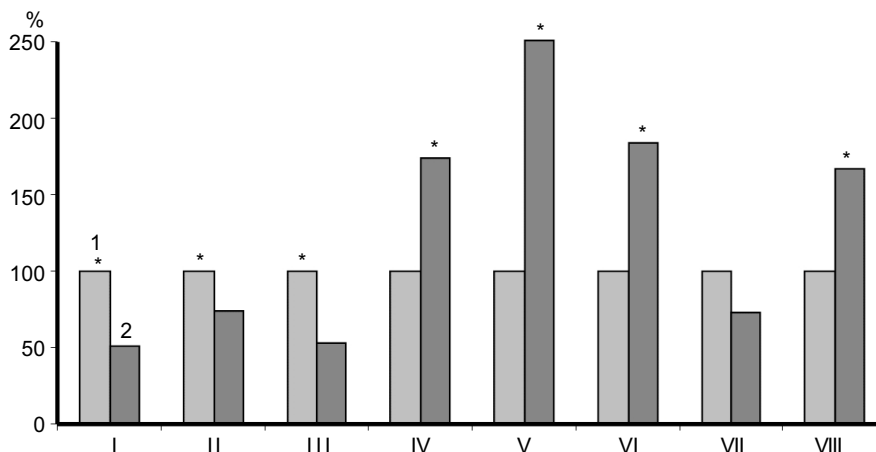


Рис. 2. Зміна співвідношення активностей різних шляхів метаболізму L-аргініну у тренуваних юнаків на початку (1) та в середині (2) змагального періоду: I – аргінази / активність NOS, II – аргінази / iNOS, III – аргінази / eNOS, IV – нітратредуктази / NOS, V – нітратредуктази / iNOS, VI – нітратредуктази / eNOS, VII – частка активності iNOS у сумарній активності NO-синтаз, VIII – частка вмісту нітрит-аніона в сумарному пулі метаболітів оксиду азоту. За 100 % прийнято значення показників, зареєстрованих на початку змагального періоду.

* достовірна різниця порівняно з початком змагального періоду ($P < 0,05$)

Таблиця 3. Зміни абсолютних значень біохімічних і функціональних показників у тренуваних юнаків залежно від тривалості дії систематичних фізичних і психологічних навантажень в період змагання (M±m, n = 12-17)

Показники	Вихідний стан	Наприкінці змагального періоду
NO ₂ ⁻ , пмоль · мг ⁻¹ білка	323,70±24,70	299,2 ± 16,0**
NO ₃ ⁻ , нмоль · мг ⁻¹ білка	1,67±0,20	1,33 ± 0,05**
Аргіназа, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	2,09±0,25	1,89 ± 0,06
Сечовина, нмоль · мг ⁻¹ білка	75,80±6,20	65,80 ± 2,70
NO-синтаза, пмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка		
конститутивна	58,6±7,90	37,65±3,00**
індуцибельна	12,3±2,45	20,20±1,30**
сумарна	70,95±9,85	57,85±8,03
Нітратредуктаза, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	3,47±0,41	4,80±0,45**
Загальна фізична працездатність, кгм · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	26,64±1,31	19,85±0,61*
Аеробна продуктивність, мл · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	70,24±2,84	60,25±1,92**

окисного de novo та неокисного реутилізаційного синтезу оксиду азоту. В цей час основна роль у забезпеченні синтезу оксиду азоту належала вже його кальційнезалежному синтезу de novo (достовірно підвищення активності iNOS у порівнянні з вихідними значеннями була 64,23 %). При цьому кальційзалежний de novo синтез NO реципрокно знижувався (-35,76 %).

Зміни розрахункових показників (див. рис. 3) також показали, що в кінці змагаль-

ного періоду в умовах дії значних об'ємів фізичних і психологічних навантажень у тренуваних юнаків спостерігалось значне підвищення частки iNOS в сумарній активності ізоферментів iNOS (на 101,73 % в порівнянні з вихідними значеннями) і неістотне зниження співвідношення нітратредуктаза/iNOS (на 15,77 %) і, навпаки, значне збільшення співвідношення нітратредуктаза/cNOS (на 115,32 %), тоді як відношення нітратредуктаза / сумарна

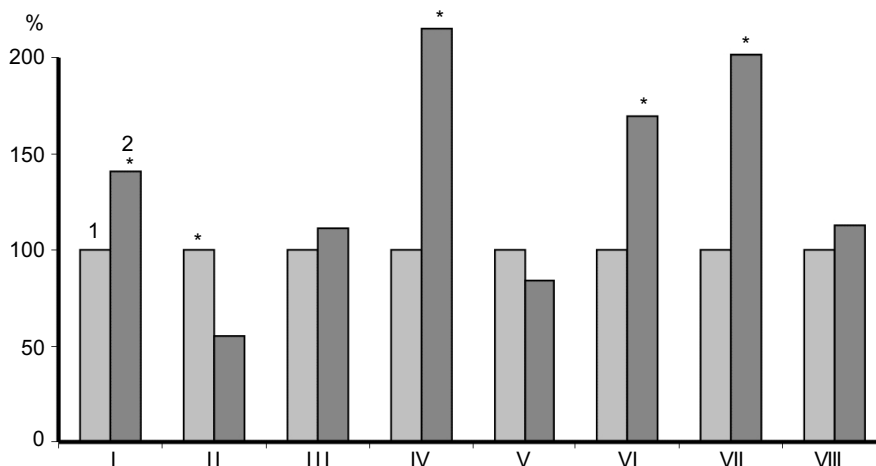


Рис. 3. Зміна співвідношення активностей різних шляхів метаболізму L-аргініну у тренуваних юнаків на початку (1) та наприкінці (2) змагального періоду: I – аргінази / активність NOS, II – аргінази / iNOS, III – аргінази / eNOS, IV – нітратредуктази / NOS, V – нітратредуктази / iNOS, VI – нітратредуктази / eNOS, VII – частка активності iNOS у сумарній активності NO-синтаз, VIII – частка вмісту нітрит-аніона в сумарному пулі метаболітів оксиду азоту. За 100 % прийнято значення показників, зареєстрованих на початку змагального періоду.

* достовірна різниця порівняно з початком змагального періоду (P < 0,05)

NOS (+69,64 %) і аргіназа/cNOS (40,77 %) змінювалися значно меншою мірою.

Таким чином, результати проведеного дослідження дали змогу виявити деякі істотні особливості в організації системи синтезу оксиду азоту в юнаків 18–20 років у процесі їх тривалої тренувальної та змагальної діяльності. Показано, що перехід від відносно сприятливих умов підготовчого періоду до екстремальних умов змагань супроводжувався зміною значення основних шляхів забезпечення їхнього організму оксидом азоту – від домінуючої ролі окисного конститутивного *de novo* синтезу NO із L-аргініну та неокисного аргіназного метаболізму останнього з утворенням проміжних низькомолекулярних біорегуляторів і антиоксидантів (сечовина, поліаміни, ГАМК) до превалювання окисного кальційнезалежного індукцйбельного синтезу оксиду азоту *de novo* та його неокисного реутилізаційного синтезу. Отже, можна припустити парадоксальну можливість участі неокисного аргіназного шляху деградації аргініну (аргінін + H₂O → сечовина + орнітин → путресцин → ГАМК → ГМК → NO, або аргінін + H₂O → сечовина + орнітин → глутамат → ГАМК → гуанідинмасляна кислота (ГМК) → NO), а не тільки його окисної NO-синтазної деградації (аргінін + H₂O → цитрулін + NO) у підтримці високих рівнів синтезу оксиду азоту, що підтверджується високим вмістом нітрит-аніона в плазмі крові тренуваних юнаків. Це, мабуть, є необхідною та важливою умовою їхньої ефективної адаптації до виконання більших обсягів тренувальних навантажень протягом тривалого часу. Вочевидь, висока активність аргінази в тренуваних юнаків може забезпечувати утворення додаткового оксиду азоту при окисненні ГМК різними ізоферментами NOS поряд із класичним окисненням аргініну. Крім того аргіназний метаболізм L-аргініну може послідовно забезпечувати організм антиоксидантом і регулятором синтезу NO – сечовиною, регулятором

проліферації й антиоксидантом путресцином, регулятором мітохондріальної пори і гальмівного нейромедіатора ЦНС ГАМК, що також дуже важливо для адаптації до інтенсивних і тривалих фізичних навантажень у тренувальному періоді за відсутності факторів психологічного стресу. Протягом змагального періоду, коли дія цих факторів підсилюється, інтенсивність неокисного обміну аргініну поступово зводиться до рівня нетренованих юнаків, тобто з біохімічної точки зору наприкінці змагального періоду спостерігається практично повна дезадаптація організму за показниками неокисного обміну аргініну.

Матеріали роботи, на нашу думку, є не тільки доказом важливої ролі для процесів адаптації до тривалих фізичних навантажень великого обсягу й тривалості як окисного, так і неокисного метаболізму аргініну, але також і важливої ролі як окисного *de novo* (конститутивного кальційзалежного й кальційнезалежного індукцйбельного) і неокисного реутилізаційного шляхів синтезу оксиду азоту, що є істотним доповненням до наявних відомостей з цього питання.

ВИСНОВКИ

1. Наприкінці тренувальних занять у підготовчий період для юнаків, які систематично виконують м'язову роботу, характерні високі рівні як окисного метаболізму L-аргініну кальційзалежними конститутивними NO-синтазами (синтез оксиду азоту і цитруліну), так і неокисного аргіназного метаболізму L-аргініну (синтез орнітину та сечовини). Адаптації організму до тривалих і значних фізичних навантажень відповідає висока частка вмісту нітрит-аніона в сумарному пулі циркулюючих у плазмі крові стабільних метаболітів оксиду азоту.

2. Збільшення ступеня несприятливого впливу на організм інтенсивних тренувальних (фізичних) і змагальних (як фізичних, так і психологічних) навантажень

супроводжується вираженими адаптивними змінами в ієрархії окисного конститутивного (зниження) і індукційного (зростання) *de novo* синтезу оксиду азоту, а також неокисного реутилізаційного синтезу оксиду азоту (підвищення) і неокисної деградації L-аргініну (зниження).

3. Деадаптація організму юнаків наприкінці змагального періоду супроводжується значним зростанням активності окисного кальційнезалежного синтезу NO та, меншою мірою, посиленням його неокисного синтезу за рахунок реутилізації циркулюючих стабільних окиснених метаболітів.

**Н.В. Богдановская, А.В. Коцюруба,
Н.В. Маликов**

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА АРГИНИНА И СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА У ЮНОШЕЙ ПРИ АДАПТАЦИИ К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ В ТРЕНИРОВОЧНОМ И СОРЕВНОВАТЕЛЬНОМ ПЕРИОДАХ

Проведено обстеження 29 тренерованих і нетренованих юношей в віці від 18 до 20 років. Доказано, що оптимальний рівень адаптації їх організму до тривалого і інтенсивного фізичного навантаження забезпечується за рахунок активації не тільки конститутивного кальційзалежного *de novo* синтезу оксиду азоту, але і неокислювального аргіназного метаболізму останнього, при якому утворюється декілька важливих низкомолекулярних біорегуляторів і антиоксидантів, зокрема мочевина. Значне зниження функціональних можливостей організму тренерованих юношей в кінці змагального періоду і, як наслідок, проявлення ознак деадаптації, корелює з активацією як окислювального кальційнезалежного *de novo* синтезу оксиду азоту, так і його неокислювального синтезу за рахунок реутилізації стабільних циркулюючих метаболітів. Ключові слова: оксид азоту, аргінін, фізичне навантаження, адаптація, юноші.

**N.V. Bogdanovskaya, A.V. Kotsuruba,
N.V. Malikov**

THE ARGININE EXCHANGE AND NITRIC OXIDE SYNTHESIS IN YOUTHS UNDER ADAPTATION TO PHYSICAL STRESS IN TRAINING AND COMPETITIVE PERIODS

A survey of 29 trained and untrained youths in the age of 18-20 years was carried out. It is shown that the optimal level of

adaptation of the body to prolonged and intensive physical activity is provided by multi-dominance nonoxidizing arginine metabolism and its oxidative metabolism by constitutively calcium dependent NO-synthase (eNOS and nNOS). Nonoxidizing arginine metabolism results in formation of several important low-molecular bioregulators and antioxidants (urea, polyamines, GABA). Significant reduction of functionality of the trained body at the end of the competitive period and consequently disadaptation correlates with Ca^{2+} -independent NO synthesis which does not compensate the organism needs in NO.

Keywords: nitric oxide, arginine, physical stress, adaptation, youths.

Zaporozhye State University;

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Базілюк О.В., Коцюруба А.В., Степаненко Л.Г., Таланов С.О., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Вікові особливості змін системи оксиду азоту в аорті та плазмі за умов адаптації до фізичних навантажень // Фізіол. журн. – 2010. – **56**, №1. – С. 3–12.
2. Богдановська Н.В., Святодух Г.М., Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Маликов М.В. Синтез оксиду азоту у період довгострокової адаптації до інтенсивної м'язової роботи у спортсменок // Там само. – 2009. – **55**, №3. – С. 94–99.
3. Богдановская Н.В., Святодух А.Н., Маликов Н.В. Оценка роли сосудистого эндотелия в обеспечении физической подготовленности девушек-волейболисток на этапе интенсивной соревновательной деятельности // Вісн. Запорізьк. нац. ун-ту. Біол. науки. – 2008. – №1. – С. 40–43.
4. Карпман В.Л. Тестирование в спортивной медицине. – М.: ФиС, 1988. – 208 с.
5. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М., Соловйов А.І., Базілюк О.В., Жукова А.В., Ткаченко М.М., Марченко С.М. Роль ендотелію та біологічно активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу і діяльності серця // Фізіол. журн. – 1997. – **43**, №1–2. – С. 3–18.
6. Мойбенко А.А., Павлюченко В.Б., Даценко В.В., Майский В.А. Роль оксиду азоту в механізмах формування рефлексорних вазомоторних реакцій // Успехи фізіол. наук. – 2005. – № 4. – С. 3–14.
7. Сагач В.Ф. Роль оксиду азоту в регуляції кровообігу. – В кн.: Пурины и монооксид азота. Регуляторная функция в организме. – Минск: Технопринт, 2003. – С. 110–113.
8. Bowles D.K., Woodman C.R., Laughlin M.H. Coronary smooth muscle and endothelial adaptations to exercise training // Exer. Sport Sci. Rev. – 2000. – P. 57–62.
9. Clarkson P., Montgomery H., Mullen M. Exercise training enhances endothelial function in young men // J.

- Amer. Coll Cardiol. – 1999. – **33**. – P. 1379–1385.
10. Green D., Maiorana A., Driscoll G., Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans // J. Physiol. – 2004. – **561**(1). – P. 1–25.
11. Lambert R., Wolf A., Gielen S., Linke A., Hofer J., Erbs S., Schene N., Schuler G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease // New Engl. J. Med. – 2000. – P. 454–460.
12. Kingwell B.A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease // FASEB J. – 2000. – **14**. – P. 1685–1690.

Запорізьк. ун-т ;

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

E-mail: toliko49@urk.net

Матеріал надійшов до редакції 04.09. 2009

Р.Б. Струтинський, Р.А. Ровенець, О.П. Нещерет, Л.В. Тумановська,
Т.М. Бойчук, Б.В. Джуран, О.О. Мойбенко

Вплив лікарської форми флокаліну на перебіг ішемії–реперфузії міокарда

У досліджах на анестезованих собаках з відтворенням експериментальної ішемії (90 хв) та реперфузії (180 хв) показано кардіопротекторний вплив фармакологічного прекодиціювання, викликаного введенням лікарської форми (таблетки) фторвмісного активатора аденозинтрифосфат (АТФ)-чутливих калієвих ($K_{\text{АТФ}}$) каналів – флокаліну за допомогою зонда в середину шлунка. Вибрана доза 2,2 мг/кг за умов фізіологічної норми мала мінімальний вплив на показники кардіогемодинаміки. Проведене дослідження дало змогу визначити зміну цих показників під час розвитку захисного антиішемічного механізму фармакологічного прекодиціювання та окреслити основні кардіопротекторні реакції, пов'язані зі змінами в кардіогемодинаміці при ішемії–реперфузії міокарда. З нашої точки зору, до позитивних впливів флокаліну, що можуть сприяти його кардіопротекторним ефектам, можна віднести попередження реперфузійного підвищення загальнопереферичного опору та опору коронарних судин серця, а також помірне зниження артеріального тиску, що послаблює навантаження на уражене серце і сприяє збереженню серцевого викиду в перші години ішемії. Позитивним можна також вважати відносно збереження показників скоротливої активності міокарда в період реперфузії. Одним із найвагоміших показників розвитку захисного механізму фармакологічного прекодиціювання при передішемічному введенні лікарської форми флокаліну є зменшення розміру некротичної ділянки міокарда, а, отже, зони інфаркту, в експериментах з ішемією–реперфузією міокарда порівняно з контролем на $42,53\% \pm 2,91\%$.

Ключові слова: $K_{\text{АТФ}}$ -канали, флокалін, лікарська форма, ішемія–реперфузія, кардіогемодинаміка, інфаркт міокарда.

ВСТУП

Відомо, що активація аденозинтрифосфат (АТФ)-чутливих калієвих каналів ($K_{\text{АТФ}}$) каналів є однією з головних ланок ендогенного захисту серця при гіпоксії та ішемії міокарда [8, 27]. У механізмах захисту беруть участь $K_{\text{АТФ}}$ -канали сарколемальної та внутрішньої мітохондріальної мембран кардіоміоцитів, судинних гладеньком'язових та ендотеліальних клітин [4, 8]. Відкриття $K_{\text{АТФ}}$ -каналів плазматичної мембрани спричинює її гіперполяризацію та пригнічення входу в цитоплазму іонів кальцію [13, 19]. Це першочергово впливає на показники кардіогемодинаміки та за-

побігає значним пошкодженням міокарда під час ішемії та реперфузії. Активація цих каналів у судинних гладеньком'язових та ендотеліальних клітинах призводить до їх розширення і запобігає розвитку реперфузійних констрикторних реакцій в коронарних судинах [5]. Активація каналів плазматичної мембрани кардіоміоцитів зменшує витрати енергоресурсів (зокрема, АТФ, що якраз дуже важливо при ішемії) [18], зменшує реперфузійні порушення ритму серця [5, 6, 9], попереджує контрактуру міофібрил [8, 9], що може призвести до некротичного враження міокарда, гальмує метаболічні процеси в клітині і відповідно зменшує її потреби в кисні. Пригнічення

© Р.Б. Струтинський, Р.А. Ровенець, О.П. Нещерет, Л.В. Тумановська, О.О. Мойбенко

активності катаболітичних ферментів (фосфоліпази A_2 , ліпоксигенази та інших). Це з одного боку, може попереджати деградацію фосфоліпідів мембран (мембраностабілізувальна дія), з другого – зменшувати утворення патогенних в умовах ішемії міокарда ейкозаноїдів, зокрема лейкотриєнів [2]. Активація каналів внутрішньої мембрани мітохондрій призводить до її деполаризації, зменшення надходження Ca^{2+} в матрикс мітохондрій, його залуження та помірне набухання, що сприяє збереженню енергоресурсів (АТФ) [16, 23] і запобігає їх перенавантаженню кальцієм, внаслідок чого попереджується відкриття транспортної пори, апоптоз, некроз та пригнічення вільнорадикальних процесів [15, 17, 20, 22]

Як виявилось, відкривати K_{ATP} -канали можливо і за допомогою активаторів цих каналів, що спричиняє розвиток потужних кардіопротекторних реакцій (передішемічне введення активаторів може імітувати феномен ішемічного прекондиціонування та отримало назву фармакологічного [24]) і зменшення патологічних проявів при гострому порушенні коронарного кровообігу [21]. Разом з цим використання активаторів цих каналів в клініці може викликати певні ускладнення, зокрема, порушення ритму серця, пригнічення продукції інсуліну і досить сильну гіпотензію [14]. Це стимулювало розробку нових, більш специфічних і менш токсичних активаторів K_{ATP} -каналів, зокрема фторвмісних [12, 25, 26]. В результаті досліджень нами було встановлено, що одним із найбільш перспективних нових фармакологічних активаторів K_{ATP} -каналів за своєю кардіопротекторною та спазмолітичною дією [1, 2], незначним впливом на вміст глюкози [10] та нешкідливістю [1, 7, 12] є флокалін.

Метою нашої роботи було дослідження кардіопротекторних ефектів лікарської форми (таблетки) нового вітчизняного фторвмісного активатора K_{ATP} -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран флокаліну в експериментах *in vivo* на анастезованих собаках.

МЕТОДИКА

В роботі використовували метод ретроградної катетеризації лівої коронарної артерії, що дає змогу відтворювати ішемію–реперфузію без розтину грудної порожнини і зі збереженням спонтанного дихання. Перевагами цього методу є попередження травмування грудної клітки і перикарда та виникнення подразнення рефлексогенних зон серця з наступною зміною нервово-рефлекторних реакцій, а також гуморальних зсувів і збереження від'ємного тиску в грудній порожнині та попередження охолодження серця, що сприяє збереженню венозного повернення, кінцево-діастолічного об'єму та серцевого викиду.

Досліди виконували на безпородних 28 собаках масою від 15 до 24 кг, під хлоралозо-уретановим наркозом (0,07 та 0,7 г/кг, внутрішньовенно). Собаку фіксували на операційному столі та препарували обидві стегнові артерії, праву плечову артерію, сонні артерії та яремні вени з двох боків. Після введення гепарину (500 од/кг) крізь стегнові артерії катетеризували черевний відділ аорти та через ліву сонну артерію – лівий шлуночок серця, для реєстрації артеріального тиску та тиску в лівому шлуночку (К3, рис.1) відповідно. Через праву сонну артерію вводили тонкостінний нікелевий катетер (К1, див. рис.1), дистальна частина якого була відповідним чином вигнута, довжина катетера 25 см, зовнішній діаметр трубки 3 мм і внутрішній – 2,8 мм. Катетер ретроградно вводили у висхідний відділ аорти і до аортальних клапанів, де після повороту він міг бути просунутий у гирло лівої коронарної артерії. В цьому катетері знаходилася тефлонова жилка діаметром 0,8 – 1 мм з потовщенням на кінці, діаметр якого був на 0,2 мм більшим за внутрішній діаметр металевого катетера. Зовнішній кінець останнього був сполучений через трійник з манометром, що давало змогу реєструвати тиск у коронарному руслі. Потрапляння металевого

катетера в одну з гілок лівої коронарної артерії призводило до різкого зниження тиску. Після чого внутрішня тефлонова жилка просувалася вперед на 1 см, і розпочинали перфузію коронарної судини власною кров'ю тварини із плечової артерії через перфузійну помпу (ПП) з постійним об'ємом. Контроль адекватності кровотоку здійснювали за електрокардіограмою (ЕКГ), (положення 1, див. рис.1).

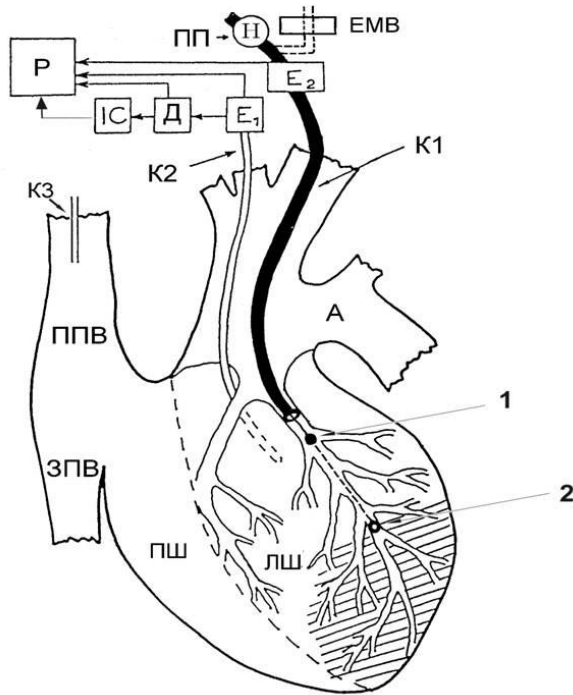


Рис. 1. Схема експерименту з катетеризацією, перфузією та емболізацією огинаючої гілки лівої коронарної артерії та реєстрацією показників кардіодинаміки. Дослід з моделюванням ішемії–реперфузії міокарда у тварин без розтину грудної порожнини.

А – аорта, ППВ, ЗПВ – передня та задня порожнисті вени, ПШ – правий шлуночок, ЛШ – лівий шлуночок, ПП – перфузійна помпа зі сталим об'ємом, ЕМВ – електромагнітний витратомір, К1 – металевий катетер для катетеризації та перфузії огинаючої гілки лівої коронарної артерії, К2 – катетер для вимірювання тиску в порожнині лівого шлуночка, К3 – катетер для внутрішньовенної інфузії препаратів, Е₁, Е₂ – електроманометри, Д – диференціатор, ІС – прилад для реєстрації індексу скоротливості, Р – реєструючий прилад. 1 – штучний ембол у вихідній позиції, 2 – штучний ембол у позиції оклюзії гілки коронарної артерії. Заштрихована ділянка – зона ішемії міокарда

Подальше просування внутрішньої жилки з obturatorом заклинювало дистальний відділ судини (положення 2, див. рис.1) і ішемії ділянки міокарда, що кровопостачалася через obtуровану судину (заштрихована зона). Через декілька секунд після заклинювання розвивалися характерні ЕКГ-ознаки ішемії, а саме зміщення сегмента ST від ізолінії, збільшення амплітуди зубця Т (I відведення). Реперфузії досягали підтягуванням тефлонової жилки до вихідного рівня. Положення ембола перевіряли також по закінченні експерименту і розтину грудної порожнини собаки і перикарда. Жилку вводили на таку саму довжину, що і під час експерименту, і в місці знаходження ембола накладали лігатуру навколо судини.

Реєстрували гемодинамічні показники за допомогою полікардіографа “Mingograph-82”, фірми “Siemens-Elema” (Швеція). Запис ЕКГ здійснювали у I та III стандартних відведеннях. Системний артеріальний тиск (САТ) вимірювали манометром через катетер у черевному відділі аорти, який був введений через праву стегнову артерію. Хвилинний об'єм крові визначали методом термодилуції [3]. Скоротливу функцію лівого шлуночка оцінювали за змінами першої похідної внутрішньошлуночкового тиску та індексу скоротливості міокарда $(dp/dt_{max})/p$ за допомогою спеціалізованого обчислювального пристрою “Індекс” – поударно, “on line”.

Після закінчення дослідження планіметрично визначали площу інфаркту міокарда та площу “ризик”. Останню виявляли забарвленням інтактних ділянок міокарда за допомогою введення 80–100 мл 1%-го розчину метиленового синього в аорту безпосередньо після вилучення серця з грудної порожнини при затягнутому турнікеті в місці оклюзії коронарної артерії. Виділений лівий шлуночок розрізали перпендикулярно його осі на блоки товщиною 0,5 см. Неповшкоджений міокард забарвлювали у темносиній колір, а зона “ризик” залишалася незабарвленою. Після вимірювання площі

зони “ризик” зразки фарбували нітросинім тетразолієм, який виявляє сумарну активність дегідрогеназ, при цьому некротичні ділянки залишалися незабарвленими.

Усього провели дві серії експериментів – контрольну (n=12) і дослідну (n=16). У контрольній серії визначали показники при регіональній ішемії міокарда (90 хв) та наступній реперфузії (180 хв), у дослідній проводили таку саму ішемію–реперфузію на тлі внутрішньошлункового введення (за допомогою зонда) таблетки флокаліну в дозі 2,2 мг/кг за 60 хв до початку ішемії.

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

У попередніх працях на ізольованих, перфузованих за Лангендорфом серцях морських свинок і щурів *in vitro* та собаках

in vivo виявлено, що субстанція нового вітчизняного фтормісного активатора $K_{ATФ}$ -каналів – флокаліну має чіткі дозозалежні вазодилататорні та кардіопротекторні якості: При цьому кардіопротекторні дози активаторів $K_{ATФ}$ -каналів (< 100 мкмоль/л *in vitro* та $< 0,1$ мг/кг маси тіла *in vivo*) практично не впливають на показники гемодинаміки [1, 5]. Досліджуючи кардіопротекторні ефекти нової лікарської форми (таблетки) флокаліну, ми застосовували дозу 2,2 мг/кг, яка при внутрішньошлунковому введенні за умов фізіологічної норми мала мінімальний вплив на показники кардіогемодинаміки (див. таблицю). Слід зауважити, що її використання в експериментах з ішемією–реперфузією міокарда в попередніх роботах в вищих дозах, зокрема 3,3 мг/кг, спричиняло суттєве зниження САТ та деякою мірою інші показники кардіогемодинаміки, проте зменшення некротичної ділянки міокарда (зони інфаркту міокарда) в експериментах з внутрішньошлунковим введенням лікарської форми флокаліну в дозах 2,2 і 3,3 мг/кг практично не відрізня-

Зміна показників гемодинаміки у анестезованих собак протягом 1 год після інтрашлункового введення лікарської форми (таблетки) флокаліну в дозі 2,2 мг/кг ($M \pm m$, n=16)

Показник	Вихідний рівень	Час від введення флокаліну, хв			
		15	30	45	60
Коронарний перфузійний тиск, мм рт.ст	182,02±11,3	176,38±11,9*	176,14±13,94	177,5±14,77	172,13±11,39*
Системний артеріальний тиск, мм рт.ст	145,06±7,04	139,2±6,6	133,6±7,06	134,9±6,6	132,13±6,39*
Тиск у лівому шлуночку, мм рт.ст	172,87±7,38	167,01±6,08	163,07±7,17	161,65±6,75	158,68±7,86*
Перша похідна тиску у лівому шлуночку (dP/dt_{max}), мм рт.ст/с	2714,2±176	2673,6±147	2538,7±161,3	2502,6±182	2466,4±177
Перша похідна тиску у лівому шлуночку (dP/dt_{min}), мм рт.ст/с	2331,6±134	2265,9±147,2	2156,9±133,8	2152,6±129	2184,6±157,9
Індекс скоротливості міокарда, $л/с^{-1} \cdot м^2$	42,58±2,58	41,66±2,67	41,03±2,93	41,03±2,95	39,55±2,56
Хвилинний об’єм крові, л/хв	1,81±0,34	-	1,68±0,44	-	1,84±0,47
Загальний периферичний опір судин, $Н \cdot с \cdot см^{-5}$	5405±648	-	5349±472	-	5079±548
Частота серцевих скорочень, $хв^{-1}$	177±9,55	175±7,84	169±8,15	169,5±7,09	169,5±7,58

* $P < 0,05$ порівняно з вихідними значеннями.

лося між собою [11]. Таким чином, для запуску антиішемічної реакції організму та відтворення кардіопротекторного феномену фармакологічного прекодиціювання, використання лікарської форми флокаліну в дозах, що перевищують 2,2 мг/кг, слід вважати недоцільним.

Як свідчать результати експерименту (див. таблицю), при внутрішньошлунковому введенні таблетки флокаліну достовірно відрізняються від вихідного рівня тільки такі показники гемодинаміки (на 60-й хвилині після введення флокаліну), як перфузійний тиск в коронарних судинах (зменшується на $5,43\% \pm 2,23\%$, $P < 0,05$, $n=16$), САТ (зменшується на $8,91\% \pm 3,44\%$, $P < 0,05$, $n=16$) та тиск у лівому шлуночку (зменшується на $8,21\% \pm 3,50\%$, $P < 0,05$, $n=16$). Водночас незначно знижується практично всі показники кардіогемодинаміки. Разом з цим слід відмітити, що якщо зниження опору у судинах та частоти серцевих скорочень (ЧСС) є наслідком гіперполяризації плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин судин і кардіоміоцитів відповідно, то незначне зниження показників скоротливої активності міокарда відповідає припущенню щодо одного з можливих механізмів розвитку кардіопротекції при активації K_{ATP} -каналів за гіпоксичних умов – пригнічення метаболічних процесів в кардіоміоцитах, оптимізації роботи серця та зменшення використання енергетичного потенціалу міокарда (знижується використання АТФ і, відповідно, його збереження) внаслідок зменшення входу кальцію в цитоплазму клітини, що є захисним механізмом у відповідь на зменшення притоку кисню та енергоресурсів при гіпоксії і може частково запобігати значним пошкодженням міокарда під час ішемії [7, 8].

Аналіз результатів кардіогемодинаміки під час відтворення експериментальної гострої ішемії–реперфузії (контрольні експерименти) показав, що ішемія прак-

тично не впливає на перфузійний тиск у коронарних судинах і загальний периферичний опір. Незначно зменшуються такі показники, як САТ, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} , а також ЧСС. Дещо сильнішого зниження зазнає тиск у лівому шлуночку – на $14,37\% \pm 1,23\%$ (90 хв ішемії, $P < 0,05$, $n=12$) та особливо хвилинний об'єм крові – на $28,63\% \pm 3,44\%$ (60 хв ішемії, $P < 0,05$, $n=12$).

Під час реперфузії тиск у коронарних судинах і загальнопериферичний опір судин значно збільшуються, особливо на 2-гу і 3-тю годину реперфузії. Продовжує дещо зменшуватися тиск у лівому шлуночку, скоротлива функція міокарда та хвилинний об'єм крові. Практично незмінними залишаються САТ та ЧСС.

Виявлено, що такі показники, як САТ, систолічний тиск у порожнині лівого шлуночка, dP/dt_{min} і ЧСС практично не відрізняються в експериментах з попереднім введенням флокаліну та в контролі (ішемії–реперфузії без флокаліну). Щодо інших показників кардіогемодинаміки (перфузійний тиск в коронарних судинах і загальний периферичний опір, хвилинний об'єм крові та такі показники скоротливої активності міокарда, як швидкість скорочення (dP/dt_{max}) та серцевий індекс), то флокалін запобігає їх значним змінам при ішемії–реперфузії. Слід відмітити відсутність вазоконстрикції коронарних судин під час реперфузії ішемізованого серця при попередньому введенні флокаліну (рис. 2,а). Варто зауважити, що коронарний перфузійний тиск під час реперфузії в експериментах з попереднім введенням флокаліну навпаки, є дещо зменшеним, а під кінець ішемії та реперфузії практично не відрізняється від вихідного рівня ($181,75$ мм рт.ст. $\pm 17,41$ мм рт.ст.) та становить у середньому $181,43 \pm 25,86$ і $182,22$ мм рт.ст. $\pm 15,15$ мм рт.ст. ($n=8$) відповідно. Тоді як у контрольній групі коронарний перфузійний тиск під час реперфузії значно зростав і на кінець реперфузії збільшувався

на $18,99\% \pm 7,57\%$ ($P < 0,05$, $n=12$).

Слід відмітити, що якщо в контрольних експериментах, починаючи з 30-ї хвилини ішемії починає підвищуватися такий важливий показник, як загальний периферичний опір судин, то активація K_{ATP} -каналів за допомогою флокаліну суттєво пригнічує цей процес. Загальний периферичний опір

судин в експериментах з флокаліном є зниженим порівняно з контрольними значеннями практично під час усього експерименту та особливо реперфузії (рис. 2,б), що зменшує навантаження на ішемізоване серце і, таким чином, запобігає більш глобальним пошкодженням міокарда під час ішемії та реперфузії.

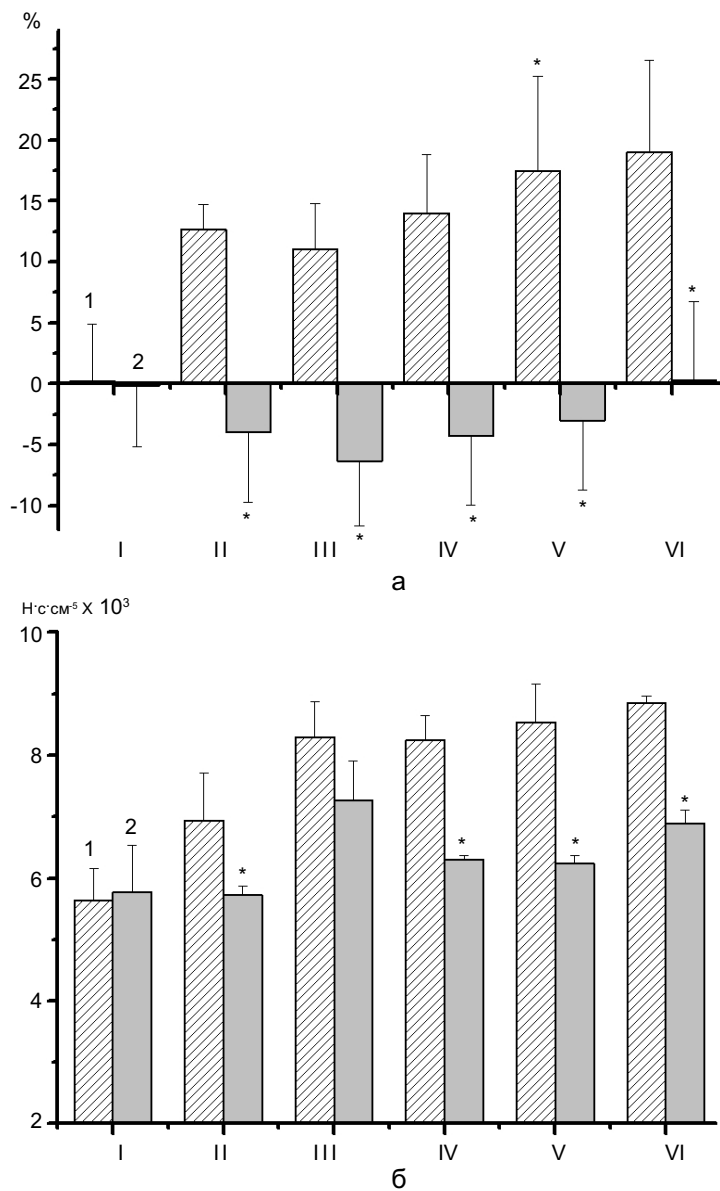


Рис. 2. Вплив флокаліну на перфузійний тиск у коронарних судинах (а) та на загальний периферичний опір судин (б) за умов експериментальної ішемії-реперфузії міокарда у контрольній групі (1) та після введення флокаліну (2): I – 90 хв ішемії (для рис.а) та вихідний рівень (для рис. б), II-VI –10, 30, 60, 120 та 180 хв відповідно реперфузії. * $P < 0,05$ відносно контролю

Встановлено, що оклюзія коронарної артерії призводить до прогресивного зниження хвилинного об'єму крові, який зменшується під час ішемії та продовжує знижуватися під час реперфузії, та є зменшеним на 60-й хвилині ішемії та 180-й хвилині реперфузії на $28,64 \pm 4,80$ ($P < 0,05$, $n=12$) та $44,72\% \pm 6,21\%$ ($P < 0,05$, $n=12$) відповідно. В експериментах з попереднім введенням флокаліну протягом усього експерименту він є дещо збільшеним, ніж в контролі та значно кращим був на 60-й хвилині ішемії та впродовж 1-ї та 2-ї години реперфузії (рис. 3). Дещо менших змін зазнають і такі показники скоротливої активності міокарда, як dP/dt_{\max} та індекс скорочення міокарда (рис. 4 а, б).

Розрахунок величин ішемічного ураження серця показує, що після експериментальної гострої ішемії–реперфузії у собак відношення площі зони некрозу до площі зони ризику становить у середньому $27,25\% \pm 1,80\%$ ($P < 0,05$, $n=7$), а площі зони некрозу відносно площі лівого шлуночка $11,05\% \pm 0,72\%$ ($P < 0,05$, $n=7$; рис. 5). В експериментах з доішемічним введенням лікарської

форми флокаліну виявилось, що відношення площі зони некрозу до площі зони ризику становить у середньому $21,26\% \pm 2,07\%$ ($P < 0,05$, $n=5$), тобто зменшується на $21,98\% \pm 1,69\%$. Вірогідно зменшується і відношення площі зони некрозу до площі лівого шлуночка ($6,35\% \pm 0,73\%$; $P < 0,05$, $n=5$; рис. 5), а, отже, у порівнянні з контрольними значеннями (11,05 %), розмір некротичної ділянки серця (зони інфаркту міокарда) при дії флокаліну зменшується на $42,53\% \pm 2,91\%$.

Таким чином, проведене дослідження впливу флокаліну на зміни показників кардіогемодинаміки під час ішемії та реперфузії ішемізованого міокарда продемонстрували певні особливості розвитку ішемічно-реперфузійного синдрому у анестезованих собак *in vivo* в умовах фармакологічного прекодиціювання, що було викликано за допомогою стимуляції активності K_{ATP} -каналів при інтрашлуночковому введенні лікарської форми (таблетки) флокаліну в дозі 2,2 мг/кг. З нашої точки зору, до позитивних впливів флокаліну, що можуть сприяти його кардіопротекторним

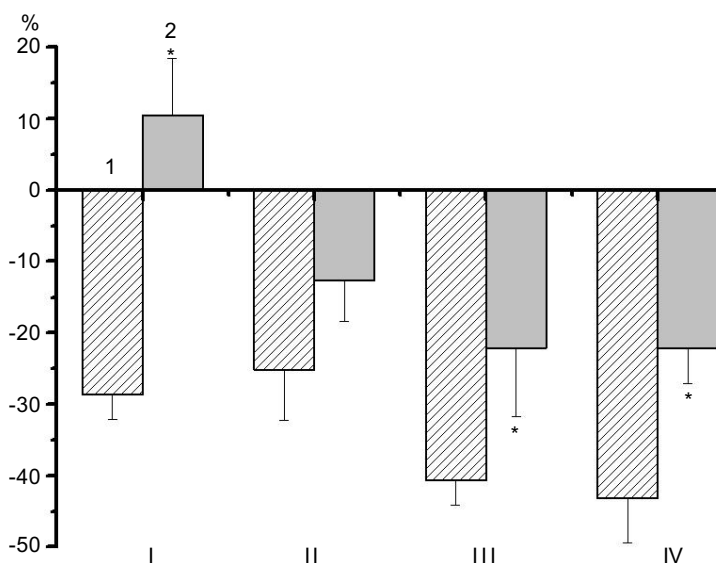


Рис. 3. Вплив флокаліну на хвилинний об'єм крові за умов експериментальної ішемії–реперфузії міокарда у контрольній групі (1) та введення флокаліну (2): I – 60 хв ішемії, II–IV – 10, 60 та 120 хв відповідно реперфузії.

* $P < 0,05$ відносно контролю

ефектам, можна віднести помірне зниження артеріального тиску, що послаблює навантаження на уражене серце і сприяє збереженню серцевого викиду в перші години ішемії, та попередження реперфузійного підвищення загальнопериферичного опору та опору коронарних судин серця. А також віднести відносно збереження показників скоротливості міокарда в період реперфузії.

Одним із найвагоміших показників розвитку захисного механізму фармакологічного preconditionування при передішемічному введенні лікарської форми флокаліну є зменшення розміру некротичної ділянки, а, отже, зони інфаркту міокарда після ішемії–реперфузії порівняно з контролем на $42,53\% \pm 2,91\%$.

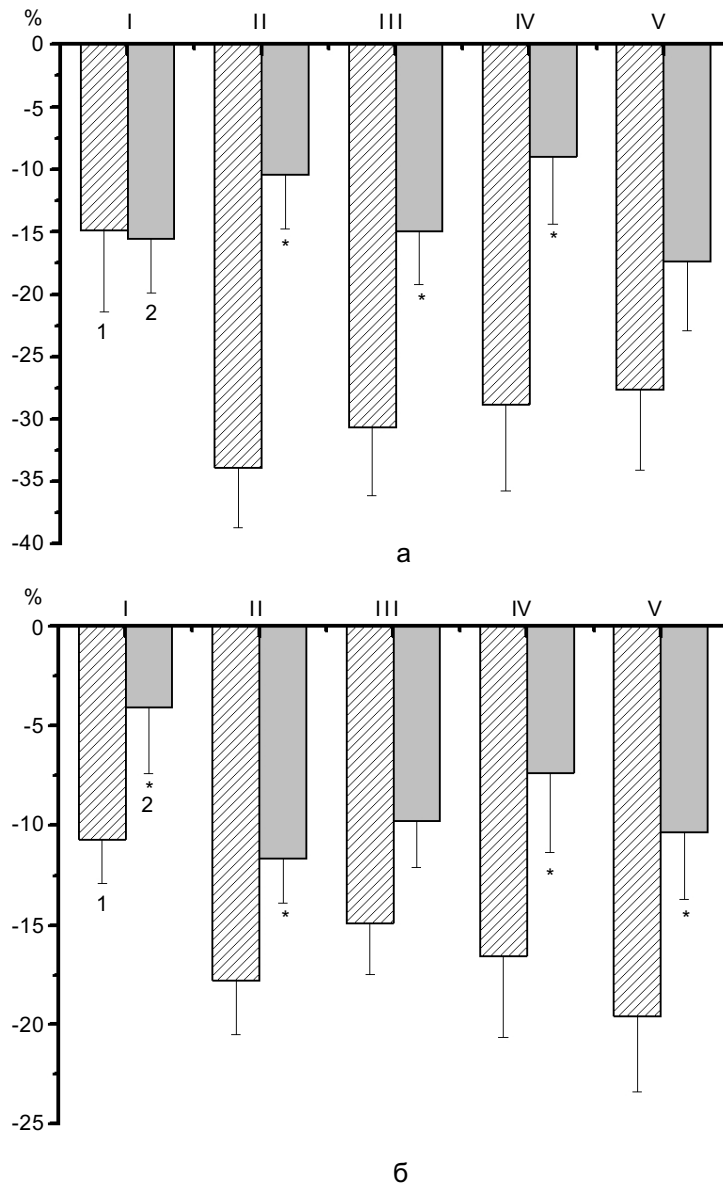


Рис. 4. Вплив флокаліну на швидкість скорочення (dP/dt_{max}) міокарда (а) та серцевий індекс (б) за умов експериментальної ішемії–реперфузії у контрольній групі (1) та введення флокаліну (2): I – 10 хв реперфузії (для рис.а) та 60 хв ішемії (для рис.б), II–V – 30, 60, 120 та 180 хв відповідно реперфузії. * $P < 0,05$ відносно контролю

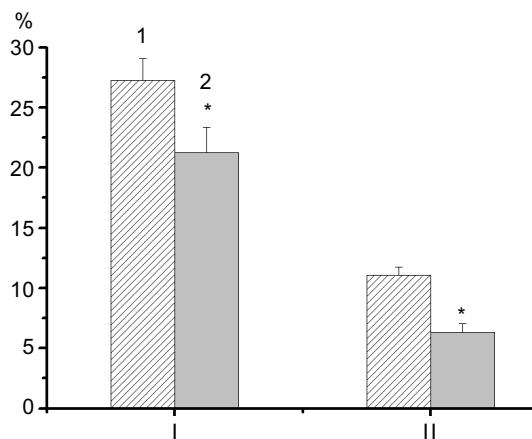


Рис. 5. Дія флокаліну на розміри зон уражень серця після ішемії-реперфузії міокарда у собак *in vivo* у контрольній групі (1) та введення флокаліну (2): I – зона некрозу/зона ризику, II – зона некрозу/площа лівого шлуночка. * $P < 0,05$ відносно контролю

Р.Б. Струтинский, Р.А. Ровенец, А.П. Нещерет, Л.В. Тумановская, Т.Н. Бойчук, Б.В. Джуран, А.А. Мойбенко

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ФЛОКАЛИНА НА ПРОЦЕСС ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА

В экспериментах на анестезированных собаках с воспроизведением экспериментальной ишемии (90 мин) и реперфузии (180 мин) показано кардиопротекторное влияние фармакологического preconditioning вызванного внутрижелудочным введением (с помощью зонда) лекарственной формы (таблетки) нового фторсодержащего активатора АТФ-чувствительных калиевых каналов флокалина, в дозе 2,2 мг/кг, которая в условиях физиологической нормы минимально влияла на показатели кардиогемодинамики. Проведенное исследование разрешило определить изменения этих показателей во время развития защитного антиишемического механизма фармакологического preconditioning, вызванного лекарственной формой флокалина, и охарактеризовать основные кардиопротекторные механизмы, связанные с изменениями кардиогемодинамики в динамике ишемии-реперфузии миокарда. С нашей точки зрения, к положительным влияниям флокалина, которые могут содействовать его кардиопротекторным эффектам, можно отнести предотвращение реперфузионного повышения общего периферического сопротивления и сопротивления коронарных сосудов сердца, и умеренное снижение артериального давления, которое ослабляет нагрузку на пораженное сердце и содействует сохранению сердечного выброса в первые часы ишемии. А также, относительно сохранение показателей сократимости миокарда в период реперфузии. Одним из важнейших показателей развития

защитного механизма фармакологического preconditioning при доишемическом введении лекарственной формы флокалина является уменьшение размера некротического участка миокарда, и, таким образом, области инфаркта, в экспериментах с ишемией-реперфузией миокарда по сравнению с контролем на $42,53\% \pm 2,91\%$.
Ключевые слова: K_{ATP} -каналы, флокалин, лекарственная форма, ишемия-реперфузия, кардиогемодинамика, инфаркт миокарда.

R.B. Strutynskiy, R.A. Rovenets, A.P. Neshcheret, L.V. Tumanovska, T.M. Boichuk, B.V. Dzhuran, A.A. Moibenko

INFLUENCE OF MEDICAL FORM OF FLOCALIN ON MOTION OF ISHEMIA-REPERFUSION OF MYOCARDIUM

In experiments on anesthetized dogs with modeling of experimental ischemia (90min) and reperfusion (180min), the cardioprotective influence of the pharmacological preconditioning caused by intragastric (with a help of catheter) introduction of medicinal form (tablets) of new fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels floccalin was shown. Floccalin was introduced in a dose 2,2mg/kg, which in the conditions of physiological norm has a minimum influence on the parameters of cardiohemodynamic. The conducted research allowed to define the changes of these parameters during development of antiischemic protective effect of pharmacological preconditioning, caused by the medicinal form of floccalin, and describes basic cardioprotective mechanisms, related to the changes of cardiohemodynamic in the dynamics of ischemia-reperfusion of myocardium. In our opinion, to positive influences of floccalin, which are possibly related to cardioprotective action, it is possible to add the prevention of an increase of general peripheral resistance, resistance of coronal vessels of heart, and relative preservation of myocardium contractility in the period of reperfusion. Also these positive effects can be explained by moderate decrease of blood pressure that decreases the loading on the damaged heart and allows to preserve cardiac emission in the first period of ischemia. One of the major indexes of development of protective mechanism of pharmacological preconditioning caused by preischemic introduction of medicinal form of floccalin is the diminishing of infarct size of myocardium in experiments with ischemia-reperfusion of myocardium on $42,53\% \pm 2,91\%$ versus control experiments.

Key words: K_{ATP} channels, floccalin, medicinal form, ischemia-reperfusion, cardiohemodynamic, infarct of myocardium

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 АТФ-залежних калієвих каналів Флокалін // Наука та інновації. – 2006. – 2, №4. – С.114–119.
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. Морозов М.А. Медицинская помощь при неотложных состояниях. – Учеб. пособие. – СПб: Дидактика, 1995. – 215 с.
 4. Струтинський Р.Б. Дослідження впливу нових активаторів АТФ-залежних калієвих каналів на функції серця та вазомоторні реакції в нормальних та патологічних умовах. – Автореф. дис. ...біол. наук. – 2002. – 20 с.
 5. Струтинський Р.Б., Нешерет 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 // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №5. – С.9–16.
 6. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М., Юзьків М.Я., Квочіна Л.І., Шиш А.М. Дослідження кардіопротекторних ефектів нового фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів // Там само. – 2001. – 47, №2. – С.16–23.
 7. Струтинський Р., Мохорт М., Ягупольський Л., Мойбенко О. Флокалін - новий вітчизняний кардіопротектор // Вісн. фармакології та фармації. – 2010. – №3. – С.44–56.
 8. Струтинський Р.Б., Пивовар С.Н., Мойбенко А.А. 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 / Под ред. А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко, А.Н. Пархоменко. – К.: Наук. думка, 2008. – С. 206–252.
 9. 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 // Фізіол. журн. – 2008. – 54, №6. – С.15–23.
 10. Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Нешерет О.П. Вплив екзогенної активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів на вуглеводний обмін анестезованих собак за фізіологічних умов та при ішемії–реперфузії міокарда // Там само. – 2010. – 56, № 6. – С.38–47.
 11. Струтинський Р.Б., Французова С.Б., Ровенець Р.А., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Флокалін - новий вітчизняний кардіопротектор // V Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю «Сучасні проблеми патофізіології: від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів», 17–19 вересня 2008 р., Запоріжжя // Патологія. – 2008. – 5, №3. – С. 22.
 12. Клебанов Б.М., І.І.Малетіна, Л.М.Ягупольський та ін. Пат. 17071А Україна, МПК⁶ А 61 К 31/03. N-(1,2,2-триметилпропіл)-N''-ціано-N'-арилгуанідини з фторвмісними замісниками в ароматичному ядрі, які проявляють гіпотензивну та кардіотропічну дію - № 95041977; Заяв. 26.04.95; Опубл. 31.10.97. – Промислова власність. – 1997. – №5. – С. 3.1.76.
 13. Alekseev A.E., Hodgson D.M., Karger A.B., Park S., Zingman L.V., Terzic F. 2005 ATP-sensitive K^+ channel channel/enzyme multimer: Metabolic gating in the heart // J. Molec. and Cell Cardiol. – 2005. – 38. – P.895–905.
 14. Bhatnagar A., Bolli R. Modulation of K^+ channels to protect the ischemic myocardium: Clinical implications // Exp. Clin. Cardiol. – 1999. – 4, №1. – P.20–22.
 15. Costa A.D., Quinlan C.L., Andrukhiy A., West I.C., Jaburek M., Garlid K.D. The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol. – 2006. – 290(1). – P.406–415.
 16. Dzeja P.P., Bast P., Ozcan C., Valverde A., Holmuhamedov E.L., Wylen D.G.L.V., Terzic A. Targeting nucleotide-requiring enzymes: implications for diazoxide-induced cardioprotection // Ibid. – 2003. – 284, № 4. – P. 1048–1056.
 17. Garlid KD and Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K^+ O'Rourke cycle // Biochim. and Biophys. Acta. – 2003. – 1606. – P. 23–41.
 18. Gross G.J., Fryer R.M. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning // Circulat. Res. – 1999. – 84, №9. – P.973–979.
 19. Hanley PJ, Daut J. K^+ (ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K^+ (ATP) channels and an overview of alternative mechanisms // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2005. – 1. – P.17–50.
 20. Holmuhamedov E.L., Jovanovic S., Dzeja P.P., Jovanovic A., Terzic A. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels modulate cardiac mitochondrial function // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol. – 1998. – 275. – P. 1567–1576.
 21. Jahandir A., Terzic A. K_{ATP} channel therapeutics at the bedside // J. Mol. and Cellular Cardiol. – 2005. – 39. – P. 99–112.
 22. O'Rourke B. Myocardial K_{ATP} channels in preconditioning // Circulat. Res. – 2000. – 87. – P. 845–855.
 23. Teshima Y., Akao M., Li R.A., Chong T.H., Baumgartner W.A., Johnston M.V., Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress // Stroke. – 2003. – 34, № 7. – P. 1796–802.
 24. Wakahara N., Katoh H, Yaguchi Y, Uehara A, Satoh H,

- Terada H, Fujise Y, Hayashi H, Difference in the cardioprotective mechanisms between Ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts // *Circulat. J.* – 2004. – **68**. – P.156–162.
25. Yagupolskii L.M., Maletina I.I., Klebanov B.M. Fluorine-containing cardiovascular drugs R. Filler et al. *Organofluorine compounds in medicinal chemistry and biomedical applications.*- Amsterdam-London- New York-Tokyo: Elsevier Science Publishers B.V., 1993. – P. 73–99.
26. Yagupolskii L.M., Maletina I.I., Petko K.I.. New fluorine-containing hypotensive preparations (Rev.) // *J. Fluor. Chem.* – 2001. – **109**. – P. 87–94.
27. Yao Z., Caverio I., Gross G. J. Activation of cardiac K^{ATP} channels: an endogenous protective mechanism during repetitive ischemia // *Amer. J. Physiol.* – **264**. – (Heart. *Circulat. Physiol.* 33). – 1993, №2. – P.H495–H504.

In-m фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: strus@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 23.03.2010

О.І. Цирюк

Шляхи корекції негативного впливу тривалої гіпергастринемії на секрецію соляної кислоти в шлунку

Досліджено вплив тривалого пригнічення секреції соляної кислоти в шлунку щурів за допомогою блокатора H^+ , K^+ -АТФази омепразолу на концентрацію гастрину в крові та базальну шлункову секрецію, а також проведено експериментальний аналіз можливих засобів профілактики структурно-функціональних змін у слизовій оболонці шлунка, викликаних гіпергастринемією. Показано, що після 28-добового введення омепразолу концентрація гастрину в крові підвищується на 189,3 %, а дебіт базальної секреції кислоти – на 173,9–283,7 %. Зроблено висновок, що зростання секреції соляної кислоти є наслідком розвитку гіперплазії парієтальних клітин, зумовленої трофічною дією гастрину. Також встановлено, що агоністи ядерних рецепторів активаторів проліферації пероксисом типу γ піоглітазон і меланін є ефективними хемопревентивними засобами порушень у секреторній функції шлунка як показника морфологічних змін.

Ключові слова: шлункова секреція соляної кислоти, омепразол, гастрин, рецептори активаторів проліферації пероксисом γ .

ВСТУП

Накопичений клінічний досвід свідчить, що при лікуванні гастродуоденальних ерозій і виразок різного генезу найбільш ефективними є блокатори протонної помпи [2, 8] при нетривалому їх прийомі (7–14 діб). Проте при лікуванні хронічної гастроєзофагально рефлюксної хвороби блокатори протонної помпи призначають тривало [2, 6, 21]. Довгочасний прийом цих препаратів пригнічує секрецію соляної кислоти в шлунку, чим викликає гіпергастринемію, внаслідок чого у хворих розвивається гіперплазія слизової оболонки шлунка, а пізніше – явища атрофічного гастриту [6]. На експериментальних тваринах було показано, що довготривале пригнічення кислотності шлункового соку омепразолом викликає рак шлунка [23, 26]. Jensen [18] подав власний унікальний досвід лікування хворих з гастриномією. Він показав, що гіпергастри-

немія викликає порушення росту ентеро-хромафіноподібних клітин, включаючи неоплазію. Цей стан може розвиватися у людей з гіпоацидністю шлункового соку та ахілією. Нині доведено, що до групи ризику розвитку раку шлунка належать люди з гіпоацидністю шлункового соку та насамперед ахілією, у яких атрофічні та неопластичні зміни слизової оболонки зумовлені трофічною дією гастрину [11, 13]. У зв'язку з відсутністю засобів профілактики структурно-функціональних змін у шлунку на тлі тривалого прийому антисекреторних препаратів та у людей, що належать до групи ризику, актуальним є пошук засобів профілактики трофічної дії гастрину.

Метою нашої роботи – дослідити вплив проглуміду, піоглітазону та меланіну на базальну секрецію кислоти шлунком щурів за умов одночасного їх введення з блокатором H^+ , K^+ -АТФази омепразолом і визначити при цьому концентрацію гастрину.

© О.І. Цирюк

МЕТОДИКА

Проведено 3 серії досліджень 28-добової гіпергастринемії на 66 білих нелінійних щурах-самцях масою 180–220 г з дотриманням етичних принципів, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики, а також міжнародних угод і національного законодавства у цій галузі [7].

У першій серії вивчали вплив блокатора холецистокінінгастрінових рецепторів ССК₁ та ССК₂ проглуміду на шлункову секрецію в умовах гіпергастринемії, викликаній введенням омепразолу. Схема експериментів була такою: 1-ша група – щури, яким вводили по 0,2 мл води для ін'єкцій (контроль); 2-га група – щури, яким вводили омепразол (“Sigma Chemical Co, St. Louis”, США) в дозі 14 мг/кг внутрішньоочеревинно один раз на добу, який розчиняли у 0,2 мл води для ін'єкцій; 3-тя група – щури, яким одночасно з омепразолом вводили проглумід (10 мг/кг, внутрішньоочеревинно).

У другій серії дослідів вивчали вплив агоніста ядерних рецепторів активаторів проліферації пероксисом типу γ (PPAR γ) піоглітазону [20] на шлункову секрецію, в умовах гіпергастринемії. Схема експерименту була така, як у першій серії за винятком щурів 3-ї групи, яким одночасно з омепразолом вводили піоглітазон (30 мг/кг, per os).

У третій серії досліджень вивчали вплив меланіну, який за даними літератури [22], є агоністом рецепторів PPAR γ , на шлункову секрецію в умовах гіпергастринемії. Продуктом меланіну, використаного в наших дослідженнях, є чорні дріжджі *Nadsoniella nigra* штам X-1, висіяні зі зразків вертикальних скель о. Галіндез (Українська антарктична станція “Академік Вернадський”) та надані нам Національним антарктичним науковим центром України, згідно з договором №07ДФ036-08. Схема дослідів була така, як у першій і другій серіях за винятком 3-ї групи, яким одно-

часно з омепразолом вводили меланін (0,1 мг/кг, per os).

Через добу після останнього введення досліджуваних речовин або води проводили гострий дослід, у якому визначали базальну секрецію кислоти. Шлункову секрецію вивчали у щурів методом перфузії ізольованого шлунка за Гхошем і Шільдом [16], наркотизованих уретаном (1,1 г/кг; внутрішньоочеревинно; “Sigma Chemical Co, St. Louis”, США). У зібраних 10-хвилинних пробах електротитриметрично визначали загальну кислотність перфузату за допомогою іономіра ЭВ-74 [4] з використанням 0,01 N розчину гідроокису натрію. Кількість NaOH, яким титрували перфузат у 10-хвилинній пробі, збігалася з дебітом соляної кислоти, що виділялася в шлунку за цей період часу. Далі обчислювали дебіт кислоти, що виділилася впродовж досліду (120 хв) у мікромолях. Після завершення експерименту робили забір крові для визначення концентрації гастрину в плазмі крові радіоімунологічним методом із використанням аналітичного набору фірми “MP Biomedicals, LLC” (США).

Одержані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W-тесту Шапіро–Вілка. Оскільки наші результати виявилися нормально розподілені, порівняння вибірок проводили за допомогою критерію t Ст'юдента для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M), стандартне відхилення (SD) [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами встановлено, що через добу після введення щурам омепразолу концентрація гастрину в плазмі крові підвищувалася до $170,7 \text{ пг/мл} \pm 90,7 \text{ пг/мл}$ ($P < 0,05$) порівняно з $59,0 \text{ пг/мл} \pm 35,05 \text{ пг/мл}$ у контролі (рис.1). У першій серії досліджень у щурів через добу після введення омепразолу дебіт кислоти базальної шлункової секреції підвищувався на 173,9 %, ($P < 0,001$; рис.2)

відносно контролю. Це, як показано нами раніше [9], є наслідком розвитку гіперплазії ентерохромафіноподібних і парієтальних клітин у відповідь на гіпергастринемію, викликану тривалим пригніченням секреції соляної кислоти омепразолом. Аналогічні дані отримані іншими дослідниками при тривалому введенні шурам омепразолу [14, 17]. Підвищення базальної шлункової секреції було підтвержене клінічними спостереженнями у людей з гіпергастринемією, яка не була наслідком прийому омепразолу, а виникала при синдромі Золінгера–Еллісона та при перніціозній анемії та атрофічних гастритах [17, 29]. Зроблено припущення, що карциноїдні пухлини в шлунку розвиваються внаслідок прогресуючих гастринстимульованих процесів: від зростаючої гіперплазії ентерохромафіноподібних клітин до дисплазії та формування карциноїду [25].

Уперше було показано, що проглумід, неселективний блокатор холецистокінін-гастринових рецепторів $ССК_1$ та $ССК_2$ типів, блокує трофічну дію екзогенного гастрину. Зроблено припущення, що трофічний ефект гастрину, як і його секретостиму-

лювальна дія, опосередковуються холецистокінінгастриновими рецепторами. Проте в літературі немає даних про функціональні зміни в секреторній функції шлунка на тлі тривалої гіпергастринемії за умов блокади холецистокінінгастринових рецепторів. У зв'язку з цим, ми вивчали вплив проглуміду на базальну секрецію кислоти в шлунку щурів на тлі гіпергастринемії, викликаній омепразолом.

Через добу після тривалого одночасного введення шурам проглуміду та омепразолу дебіт базальної секреції кислоти становив на 48,5 % ($P < 0,05$) менше у порівнянні зі значеннями у щурів після введення лише омепразолу. При цьому не було статистично значущої різниці між результатами, одержаними у контролі, та результатами, отриманими на щурах після 28-добового одночасного введення проглуміду та омепразолу, що свідчить про відсутність помітних змін маси парієтальних клітин, незважаючи на те, що гіпергастринемія зберігалася (див. рис.1). На користь цього висновку свідчать дані проведених нами раніше досліджень, у яких показана відсутність гістологічних змін у слизовій оболонці

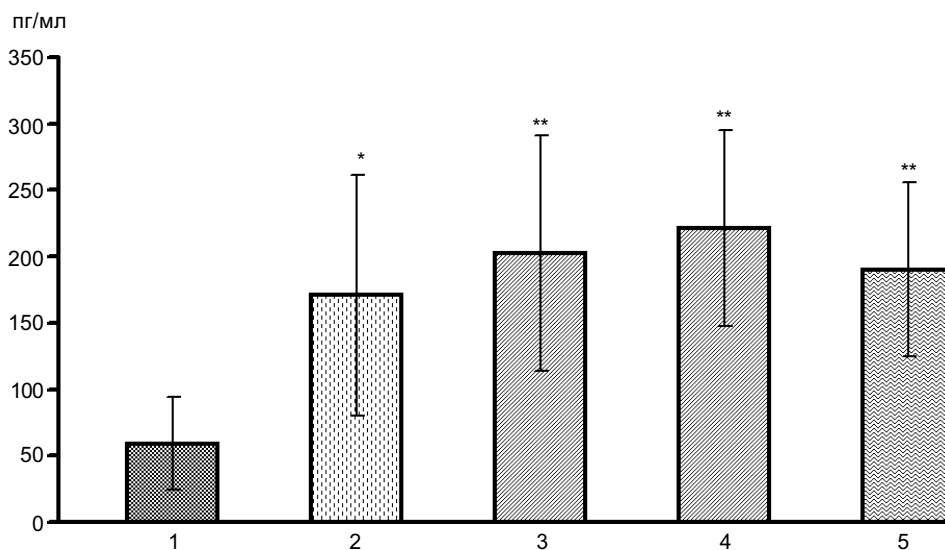


Рис. 1. Концентрація гастрину в плазмі крові: 1 – контроль, 2 – омепразол, 3 – омепразол і проглумід, 4 – омепразол і піоглітазон, 5 – омепразол і меланін.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ порівняно з контролем

шлунку щурів за умов 28-добового введення омепразолу та проглуміду [1]. Одночасне введення цих препаратів запобігало розвитку гіперплазії в слизовій оболонці товстого кишечника, яка виникала при введенні лише омепразолу [5].

Таким чином, здається доцільним людям із гіпергастринемією різного генезу (знижена кислотність шлункового соку, ахілія, синдром Золінгера–Еллісона, атрофічні гастрити), призначати проглумід для запобігання трофічної дії гастрину, тобто для профілактики гіперплазії клітин слизової оболонки шлунка. Проте слід нагадати про деякі аспекти фізіологічної дії гастрину та холецистокініну. Гастрин є потужним стимулятором виділення жовчі [12]. Ця стимуляція в основному пов'язана з активацією скорочень гладеньких м'язів жовчного міхура. Та головна роль у стимуляції моторики жовчного міхура належить холецистокініну [27], який секретується слизовою оболонкою дванадцятипалої кишки при попаданні в неї хімуса, що містить жири. Тому ми можемо зробити висновок, що, поперше, тривала блокада холецистокінін-

гастринових рецепторів, безумовно, призводитиме до порушення секреції жовчі та її виведення з жовчного міхура, що в свою чергу сприятиме розвитку застійних явищ у жовчному міхурі, виникненню холециститу та інших патологічних станів гепатобіліарної системи, а також порушенню процесу травлення. По-друге, можна рекомендувати приймати проглумід лише короткими курсами для запобігання трофічної дії гастрину.

Подальші наші дослідження були спрямовані на вивчення впливу речовин, що викликають клітинну диференціацію та апоптоз, на секрецію соляної кислоти в шлунку як показника структурно-функціональної цілісності парієтальних клітин. Однією з таких речовин є піоглітазон, ліганд до ядерних рецепторів PPAR γ , які належать до активованих лігандами внутрішньоклітинних транскрипційних факторів [20].

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що введення омепразолу призводило до підвищення базальної секреції кислоти на 283,7 % ($P < 0,001$; див. рис. 2). Одночасне введення піоглітазону з

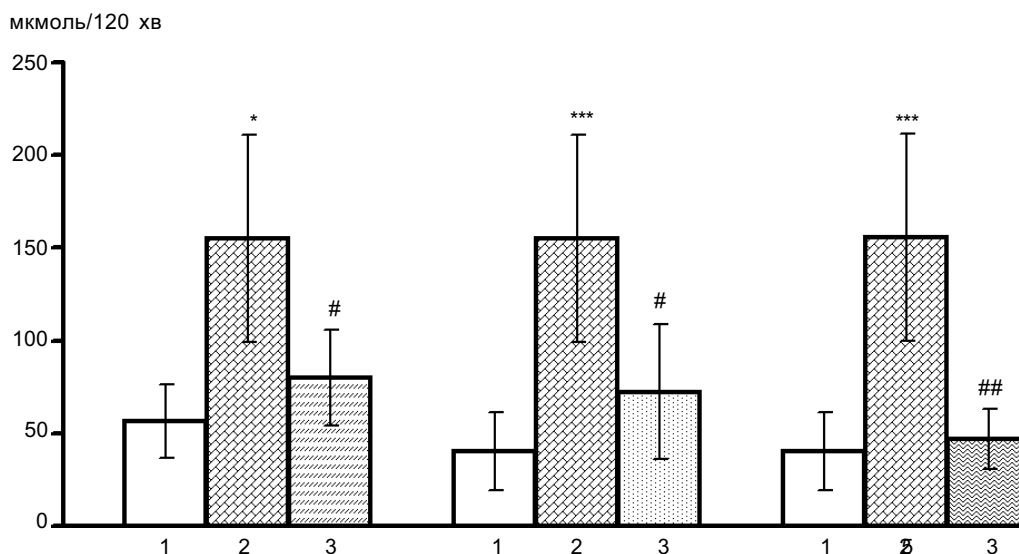


Рис. 2. Базальна шлункова секреція кислоти у щурів після 28-добового ізолюваного та комбінованого введення омепразолу (14 мг/кг): 1 – контроль, 2 – омепразол, 3 – омепразол та проглумід (10 мг/кг), 4 – мепразол і глітазон (30 мг/кг, per os), 5 – омепразол та меланін (0,1 мг/кг, per os).

* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ порівняно з контролем (група 1), # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ порівняно з омепразолом (група 2)

омепразолом протягом експерименту викликало збільшення дебіту кислоти на 79 %, але цей ефект був менший у 3,6 раза порівняно з введенням лише одного омепразолу. Оскільки секреція кислоти в шлунку залежить від маси парієтальних клітин, ми дійшли висновку, що за умов одночасного введення піоглітазону та омепразолу явище гіперплазії було менш вираженим або відсутнім.

Іншими агоністами PPAR γ є природні полімери фенольних сполук (поліфеноли), до яких належать меланіни [22]. Нашими попередніми дослідженнями було показано, що блокатор PPAR γ GW9662 усуває захисну дію меланіну, продуцентом якого є чорні дріжджі *Nadsoniella nigra* штам X-1, на утворення виразок та масивних крововиливів у слизовій оболонці шлунка у щурів, підданих дії стресу, а це свідчить про те, що цитопротективні властивості меланіну зумовлені стимуляцією PPAR γ [10].

Отримані нами результати показали, що після введення омепразолу секреція соляної кислоти збільшувалася на 283,7 % (P<0,001) порівняно з контролем (див. рис. 2). Після одночасного введення омепразолу та меланіну дебіт базальної секреції соляної кислоти статистично значущо не відрізнявся від цього показника в контролі (див. рис. 2).

Таким чином, гіпергастринемія, викликана 28-добовим введенням омепразолу, призводить до суттєвого підвищення базальної секреції соляної кислоти в шлунку, що, очевидно, є наслідком розвитку гіперплазії парієтальних клітин, спричиненої трофічною дією гастрину; одночасне застосування омепразолу з агоністами PPAR γ піоглітазоном або меланіном не спричинює розвиток гіперсекреції соляної кислоти в шлунку, що вказує на запобігання трофічної дії гастрину на слизову оболонку шлунка.

Отже, агоністи PPAR γ є перспективними та ефективними хемопреventивними засобами функціональних і, ймовірно, структурних змін у слизовій оболонці шлунка, які призводять до раку.

Е.И. Цирюк

ПУТИ КОРРЕКЦИИ ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ВЛИЯНИЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПЕРГАСТРИНЕМии НА СЕКРЕЦИЮ СОЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ЖЕЛУДКЕ

Исследовано влияние длительного угнетения секреции соляной кислоты в желудке крыс при помощи блокатора H⁺, K⁺-АТФазы омепразола на концентрацию гастрин в крови и базальную желудочную секрецию, а также проведен экспериментальный анализ возможных средств профилактики структурно-функциональных изменений в слизистой оболочке желудка, вызванных гипергастринемией. Установлено, что после 28-суточного введения омепразола концентрация гастрин в крови возрастает на 189,3 %, а дебит базальной секреции кислоты – на 173,9–283,7%. Сделан вывод, что возрастание секреции соляной кислоты является результатом развития гиперплазии париетальных клеток, обусловленной трофическим влиянием гастрин. Также показано, что агонисты ядерных рецепторов активаторов пролиферации пероксисом типа γ пиоглитазон и меланин являются эффективными хемопреventивными средствами изменений в секреторной функции желудка как показателя морфологических изменений.

Ключевые слова: желудочная секреция соляной кислоты, омепразол, гастрин, рецепторы активаторов пролиферации пероксисом γ .

O.I. Tsyryuk

THE WAYS OF CORRECTION OF NEGATIVE INFLUENCE OF LONG-TERM HYPERGASTRINEMIA ON GASTRIC ACID SECRETION

We investigated the influence of long-term diminishing of gastric acid secretion in rats by H⁺-K⁺-ATPase omeprazole on the gastrin blood level and the basal gastric acid secretion. We performed an experimental analysis of possible prophylactic drugs of structural and functional changes in gastric mucosa evoked by hypergastrinemia. It was shown that following 28 days of omeprazole injections the blood gastrin level and the output of basal acid secretion increased by 189,3% and 173,9–283,7%, respectively. It was concluded that an augmentation of the output of basal acid secretion results from the development of parietal cells hyperplasia evoked by trophic action of gastrin. We also show here that agonists of nuclear peroxisome proliferator activator receptors pioglytasone and melanin effectively prevent the changes in gastric acid secretion as an index of morphological changes.

Key words: gastric acid secretion, omeprazole, gastrin, peroxisome proliferators activator receptors gamma.

Kyiv National Taras Shevchenko University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Берегова Т.В., Цирюк О.І., Вороніна О.К., Кухарський В.М., Овчарик Т.В. Структурно-функціональні зміни в шлунку, викликані тривалою гіпергастринемією, та пошук методів їх профілактики – В кн.: Тези доп. ІУ Міжнарод. конф. ”Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології”, присвяченої 90-річчю від дня народження П.Г. Богача. – К, 2008. – С. 43–44.
2. Васильев Ю.В. Омепразол в терапии гастроэзофагальной рефлюксной болезни и язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки // Рус. мед. журн. – 2007. – **15**, №4. – С.233–236.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.:Практика,1998. – 459 с.
4. Гройсман С.Д., Губкин В.А., Береговая Т.В. Полуавтоматическая электротитриметрическая установка для титрования желудочного сока // Лаб. дело. – 1988. – № 9. – С. 66–67.
5. Гурленко Т.М., Вороніна О.К., Овчарик Т.В., Берегова Т.В. Вплив блокади ССК/гастринових рецепторів на транспортну функцію ободової кишки в умовах тривалої гіпергастринемії // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2007. – **36**, № 1. – С. 16–21.
6. Ивашкин В.Т., Шептулин А.А. Перспективы применения блокаторов протонного насоса в гастроэнтерологии // Болезни органов пищеварения. – 2001. – **3**, №1. – С.78–84.
7. Покровский В.И. Биомедицинская этика. – М.: Медицина, 1997. – 224 с.
8. Рудь М.В. Сочетанное применение ингибиторов протонного насоса и блокаторов H₂-рецепторов гистамина в терапии язвенной болезни желудка // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. – 2003. – №1. – С.105.
9. Цирюк О.І., Берегова Т.В. Вплив омепразол-викликаної гіпергастринемії на базальну шлункову секрецію у щурів // Вісн. проблем біології і медицини. – 2007. – №3. – С. 38–43.
10. Чижанська Н.В., Берегова Т.В., Цирюк О.І. Про участь оксиду азоту в цитопротективній дії меланіну на слизову оболонку шлунка // Там само. – 2005. – №3. – С. 56–59.
11. Bamba T., Kosugi S., Kanda T., Tsubono T., Sakai Y, Musha N. Multiple carcinoids in the duodenum, pancreas and stomach accompanied with type A gastritis: a case report // Gastroenterology. – 2007. – **13**, №15. – P. 2247–2249.
12. Behar J. Clinical aspects of gallbladder motor function and dysfunction // Curr. Gastroenterol. Rep. – 1999. – **1**, № 2. – P.91–94.
13. Castellote J., Porta F., Badal J.M., Sant F., Valdes V., Libori R. Chronic atrophic gastritis, hypergastrinemia and gastric carcinoid tumor// Rev. Esp. Enferm. Dig. – 1997. – **89**, № 6. – P. 485–487.
14. Cattani D., Roucaayrol A., Launay J., Callebert J. Serum gastrin and agrophil cell hyperplasia relationships in fundic atrophic gastritis. In book: Hakanson, R., Sundler F. The stomach as an endocrine organ. – Amsterdam-London-New York-Tokio: Elsevier. – 1991. – P.425–448.
15. Frucht, H., Maton P. N., Jensen R. T. Use of omeprazole in patients with the Zollinger-Ellison syndrome // Dig. Dis. Sci. – 1991. – **36**. – P. 394–404.
16. Ghosh M.N., Shild H.O. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat // Br. J. Pharmacol. – 1958. – P. 13–14.
17. Havu N. Enterochromaffin-like cell carcinoids of gastric mucosa in rats after life-long inhibition of gastric secretion // Digestion. – 1986. – **35**, №1. – P. 42–55.
18. Jensen R.T. Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas // Basic Clin.Pharmacol.Toxicol. – 2006. – **98**, № 1. – P.419.
19. Jonson L.R., Guhrle P.D. Proglumide inhibition of trophic action of pentagastrin // Amer. Physiol. Society. – 1984. –G. 62–66.
20. Konturek P. C., Brzozowski T., Kania J. Pioglitazone, a specific ligand of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, accelerates gastric ulcer healing in rat // Eur. J. Pharmacol. – 2003. – **472**, № 3. – P.213–220.
21. McColl K. E. Helicobacter pylori infection and long term proton pump inhibitor therapy // Gut. – 2004. – **53**. – P. 57.
22. Plonska P., Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects // Acta Biochim. Pol. – 2006. – **53**, № 3. – P. 429–443.
23. Selway S.A. Potential hazards of long-term acid suppression // Scand. J.Gastroenterol. – 1990. – **178**. – P.85–92.
24. Solcia E., Capella C., Fiocca R, Rindi G. Gastric argyrophil carcinoidosis in patients with Zollinger-Ellison syndrome due to type 1 multiple endocrine neoplasia. A newly recognized association // Amer. J. Surg. Pathol. – 1990. – **14**. – P. 503–513.
25. Solcia E., Rindi G., LaRosa S., Capella C. Morphological, molecular, and prognostic aspects of gastric endocrine tumors // Microsc. Res. Tech. – 2000. – **48**. – P. 339–348.
26. Wormsley K.G. Is chronic long-term inhibition of gastric secretion really dangerous? // Scand. J.Gastroenterol. – 1988. – **146**. – P.166–174.
27. Zheng Q., Chen Y. The effects of cholecystojejunostomy and biliary drainage on biliary motor // J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. – 2002. – **22**, № 2. – P.144–147.

Київ. нац. у-т імені Тараса Шевченка
E-mail: tsyryuk@mail.ru

Матеріал надійшов до
редакції 10.03.2010

А.А. Шупрович, Н.М. Гуріна, О.В. Корпачева-Зінич

Порушення обміну сечової кислоти у щурів з експериментальним інсулінорезистентним синдромом, індукованим фруктозою

Останнім часом вживання харчової фруктози розглядають як один з чинників, які сприяють розвитку ожиріння, інсулінорезистентного синдрому (ІРС) і пов'язаних з ним порушень обміну речовин. Використання 10%-го розчину фруктози з питною водою протягом 8 тиж викликало у щурів стан, який відповідає головним ознакам ІРС: інсулінорезистентність, порушення вуглеводного обміну, збільшення маси тіла, гіпертригліцеридемія, гиперурикемія. У самців усі ознаки ІРС більш виражені, ніж у самиць. Лише у самців зафіксовано підвищення добової екскреції сечової кислоти (СК), що свідчить про її гіперпродукцію. За таких умов експерименту у тварин не спостерігалось порушення ниркової фільтрації, проте відзначено зниження кліренсу СК внаслідок збільшення ниркової реабсорбції уратів відносно креатиніну. На це вказує значне зменшення індексу елімінації уратів, очевидно, викликане гіпоурикозуричним ефектом інсуліну, але не пов'язане зі змінами концентрації тестостерону. Вперше визначено, що під впливом фруктозної дієти у гомогенатах печінки дослідних тварин збільшується активність ферментів катаболізму пуринів – 5'-нуклеотидази і аденозиндезамінази, які каталізують ранні стадії розпаду пуринових нуклеотидів. Активність ферменту реутилізації пуринів гіпоксантин-гуанін-фосфорибозил-трансферази у тварин підвищувалася, що може мати компенсаторне значення за умов посиленого розпаду пуринів.

Ключові слова: сечова кислота, інсулінорезистентний синдром, фруктозна дієта, щури, ферменти деградації пуринів.

ВСТУП

Поширення у сучасному світі ожиріння, інсулінорезистентного синдрому (ІРС) та цукрового діабету (ЦД) 2-го типу все частіше пов'язують з деякими дієтичними компонентами, наприклад, із вживанням фруктози (зокрема у складі сахарози) [17, 25]. У численних клінічних, популяційних та експериментальних дослідженнях виявлено, що використання фруктози, на відміну від інших цукрів, призводить до підвищення маси тіла, розвитку інсулінорезистентності (ІР), порушення вуглеводного та пуринового обміну, а також прояву інших ознак ІРС [8, 12, 18].

Відомо, що фруктоза має специфічні властивості, які відрізняють її від глюкози та можуть бути потенційною причиною

виникнення патологічного метаболічного профілю, асоційованого з підвищенням кількості жиру в організмі та розвитком інших ознак ІРС.

Суттєвою особливістю метаболізму фруктози є здатність підвищувати в сироватці крові концентрацію сечової кислоти (СК) – метаболіта пуринів, який незалежно асоціюється з ІРС. Гіперурикемія часто супроводжує ІРС та ІР, а підвищення рівня урикемії, за деякими даними, передують розвитку ожиріння та гіпертензії [19, 32]. Крім того, велика кількість фруктози може зменшувати ниркову екскрецію СК через посилення продукції лактату – конкурентного інгібітора активного транспорту СК у процесі клубочкової фільтрації та реабсорбції [15].

© А.А. Шупрович, Н.М. Гуріна, О.В. Корпачева-Зінич

Гіпотетичним механізмом підвищення продукції СК після введення фруктози вважають підвищення внутрішньоклітинної концентрації АДФ і АМФ і зниження АТФ внаслідок активного фосфорилування фруктози. Утворення необхідного субстрату для біосинтезу пуринів *de novo* – фосфорибозилпірофосфату (ФРПФ) інгібується гетерогенним пулом 5'-нуклеотидів (АМФ і ГМФ). Зниження сумарної концентрації останніх у цитозолі активує ключові ферменти процесу новоутворення пуринів (синтетази ФРПФ і фосфорибозиламіну). Інший важливий шлях синтезу пуринів – реутилізація пуринових нуклеозидів і основ з продуктів часткової деградації нуклеїнових кислот (шлях зберігання – salvage pathway). Ключовим ферментом цього шляху є гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансфераза (ГГФРТ), а лімітуючим попередником – ФРПФ. Фермент ГГФРТ попереджає незворотне перетворення гіпоксантину, гуаніну та аденіну на СК. Зниження активності ГГФРТ може викликати, з одного боку, збільшення розпаду пуринів з утворенням кінцевого продукту – СК, а з іншого боку – компенсаторне посилення утворення пуринів *de novo*.

Гіперпродукція СК спостерігається при ІРС та ЦД 2-го типу, проявляючись високою екскрецією СК з сечею [2]. Підвищення концентрації СК у крові викликає компенсаторне збільшення екскреції уратів нирками (нерідко в 2–3 рази і більше), але одночасно збільшує ризик ураження нирок внаслідок перевищення порогу розчинності та створення умов для кристалізації уратів. Деякі автори вважають, що розвиток гіперурикемії є наслідком втрати нирками здатності збільшувати виведення СК внаслідок їх уратного ушкодження [3].

Вважають, що гіперурикемія при ІРС є наслідком підвищеного вмісту інсуліну, який відомий як стимулятор ренальної реабсорбції СК [9]. Це підтверджується даними про зниження вмісту СК при застосуванні

інсуліносенситайзерів (тіазолідиндионів), які викликають зниження ІР та інсулінемії у хворих на ЦД [22]. З іншого боку, показано, що зниження рівнів урикемії у людей за допомогою інгібіторів ксантиноксидази (алопуринол) або урикозуричних засобів (бензбромарон) поліпшує інсуліночутливість, а також впливає на інші риси ІРС, зокрема знижує артеріальний тиск, ожиріння, гіпертригліцеридемію [15].

Всі ці дані обґрунтовують новітню концепцію, висунуту Nakagawa і співавт., Xiang і співавт. про можливість патогенетичної ролі СК у розвитку ІР і ІРС [15, 25].

Численні спостереження свідчать про те, що на ефекти фруктози та СК суттєво впливають статеві гормони, що зумовлює статеву різницю у розвитку метаболічних порушень, властивих ІРС. Показано, що у осіб чоловічої статі (у людей і тварин) підвищений ризик проявів ІРС та ССЗ, а особи жіночої статі є більш захищеними від цих наслідків [20, 23].

Виявлено, що тестостерон стимулює експресію у ниркових каналцях мишей і щурів мембранних транспортерів СК, таких, як урат-транспортер-1 та транспортери органічних аніонів, тому самці мають більшу реабсорбцію СК у нирках, ніж самиці [19]. Епідеміологічні дослідження показали, що дієтична фруктоза порушує ліпідний профіль у чоловіків, але не в жінок [6]. А в серії праць на тваринах показані статеві розбіжності впливу фруктозної дієти на вміст інсуліну в плазмі крові та периферичну інсуліночутливість, яка порушувалася лише у самців щурів [10].

Для вивчення механізмів порушення обміну речовин, пов'язаних з ІРС, нині широко використовується моделювання цього стану у гризунів (щурів, мишей, хом'ячків) введенням до їх раціону фруктози, що викликає ІР, порушення глікозотолерантності, гіпертензію, дисліпідемію, гіперурикемію та інші характерні для ІРС порушення [7, 11]. Але механізми, які

зумовлюють статеву різницю у взаємодії метаболізму фруктози, ліпідів, вуглеводів і СК, залишаються поки що не до кінця розкритими.

Метою нашої роботи було вивчення в експерименті на щурах статевих особливостей та механізмів порушення обміну СК залежно від забезпеченості тестостероном на моделі інсулінорезистентного синдрому, індукованого введенням до раціону тварин фруктози.

МЕТОДИКА

Експериментальне дослідження проведено на 47 щурах (23 самця і 24 самиці). Тварини знаходилися на раціоні віварію. Щури дослідної групи (15 самців і 16 самиць), яким моделювали ІРС, отримували 10%-й розчин фруктози з питною водою протягом 8 тиж [26]. Вважають, що застосування 10%-го розчину фруктози, на відміну від класичної високофруктозної дієти (60–70 % фруктози за калорійністю), ближче відповідає картині ІРС у людей та є достатнім для прояву основних метаболічних порушень у експериментальних тварин, а їх прояви не такі важкі. Щури контрольної групи (8 самців і 8 самиць) пили звичайну воду.

Кров для дослідження у тварин брали після 12-годинного голодування з ретробульбарного венозного синусу під легким ефірним наркозом. У всіх щурів до початку дослідження та після нього визначали масу тіла та проводили навантажувальні тести. Оральний глюкозотолерантний тест (оГТТ) проводили за звичайною методикою [1] внутрішньошлунковим введенням 40%-го розчину глюкози (120 мг глюкози на 100 г маси тіла) з визначенням концентрації глюкози в крові глюкозооксидазним методом, до та через 15, 30, 60 і 120 хв після її введення. Інсуліновий тест (ІТ) проводили наступної доби за допомогою внутрішньоочеревинного введення інсуліну швидкої дії

“Хумодар 100” з розрахунку 0,1 мкОд на 100 г маси тіла. Рівень глікемії визначали до та через 30 хв після ін'єкції інсуліну. Результат тесту виражали як відсоток зниження вмісту глюкози в крові відносно вихідного рівня [1]. У сироватці крові, взятої натще, та в сечі тварин, зібраній протягом доби, визначали концентрацію СК (з використанням фосфорно-вольфрамового реактиву) та креатиніну (КР, пікратним методом) за допомогою наборів «Філісіт-Діагностика» (Дніпропетровськ, Україна). Обчислювали добову екскрецію і кліренс СК і КР за вмістом речовин у сироватці крові та в сечі. Індекс елімінації уратів (ІЕУ) розраховували як відношення кліренсів СК і креатиніну та виражали у відсотках. Ця величина характеризує ступінь реабсорбції СК відносно КР, який не підлягає реабсорбції у ниркових канальцях. Про активність ферменту реутилізації пуринів гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансфери (ГГФРТ) судили за відношенням концентрацій СК і КР у сечі [4]. Концентрацію тригліцеридів у сироватці крові визначали ферментативним методом за допомогою набору реагентів «Sentinel» (Італія).

Тварин декапітували з використанням ефірного наркозу. Печінку видаляли, перфузували холодним фізіологічним розчином і готували при охолодженні на льоду 20 % гомогенати, в яких визначали активність ферментів: 5'-НК [21] та аденозиндезамінази (АДА) [5]. Активність 5'-НК визначали за кількістю неорганічного фосфору, який вивільнився при гідролізі субстрату (АМФ) при інкубації з гомогенатом досліджуваної тканини протягом 1 год при 37° С. Вміст фосфору у пробах визначали за методом Lowry і Lopez [4], оптичну густину досліджуваних розчинів та стандартного розчину вимірювали на фотометрі КФК-3 при довжині хвилі 720 нм. Активність ферменту виражали в мікрограмах фосфору за 1 год на 1 мг білка. Активність АДА

визначали за кількістю аміаку, що виділився при дезамінуванні субстрату (аденозину) після інкубації з гомогенатом тканини протягом 15 хв при 37° С. Вміст аміаку визначали фенол-гіпохлоритним методом з використанням калібрувального графіка; оптичну густину забарвлених розчинів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 630 нм. Активність АДА виражали в мікромолях NH₃ за 1 хв на 1 мг білка. Вміст білка в гомогенатах печінки визначали за допомогою методу Lowry [4].

Концентрацію тестостерону в сироватці крові щурів вивчали імунорадіометричним методом за допомогою наборів «Testosteron direct, Immunotech» (Чехія). Вимірювання радіоактивності проб проводили на γ-лічильнику «Beckman» (Німеччина). Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартного пакету аналізу «Excell» з використанням критерію t Стьюдента. Різницю показників та коефіцієнт кореляції вважали достовірними при P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За час експерименту (8 тиж) у тварин як дослідних, так і контрольних груп достовірно збільшувалася маса тіла. У самців дослідної групи – з 185,66±3,58 до 284,67 г ± 7,47 г, у самиць – з 192,19±2,54 до 221,19 г ± 3,12 г. У контрольній групі самців маса зросла з 175,62±3,83 до 235,62 г ± 4,57 г, у самиць – з 178,75±3,50 до 203,12 г ± 2,30 г. Обчислення середньої різниці вихідних та кінцевих показників для кожної тварини (Δ) показало, що приріст маси більш виразний у самців дослідної групи, ніж контрольної (Δ = 99,0±4,97 та 60,0 г ± 5,26 г відповідно, P < 0,05), тобто при вживанні фруктози спостерігається додатковий приріст маси. У самиць немає достовірної різниці між зміною маси тіла в дослідній та контрольній групах (Δ становить 30,0±2,28 і 21,37 г ± 4,748 г у дослідній і контрольній групі відповідно, P>0,05).

Як відомо, розвиток ІР і порушення обміну глюкози є важливими характеристиками ІРС. Для оцінки цих показників використали навантажувальні тести: оГТТ та ІТ, які дають змогу виявити порушення толерантності до глюкози та зміну чутливості організму до інсуліну.

Результати показали, що після 8 тиж вживання 10%-го розчину фруктози з питною водою у всіх щурів дослідних груп достовірно підвищувався рівень глікемії натще, хоча у жодному разі глікемія не сягала рівнів, характерних для ЦД (6,1 ммоль/л). У самців дослідної групи концентрація глюкози підвищилась з 4,23±0,10 до 5,70 ммоль/л ± 0,12 ммоль/л (P<0,001), у самиць – з 4,57±0,09 до 4,95 ммоль/л ± 0,09 ммоль/л (P<0,01), водночас у тварин контрольних груп не спостерігалось достовірних змін глікемії натще (у самців 4,40±0,18 щодо 3,98 ммоль/л ± 0,12 ммоль/л; у самиць 4,31±0,16 щодо 4,11 ммоль/л ± 0,12 ммоль/л, P>0,05). При цьому у самців Δ = -0,47 ммоль/л ± 0,08 ммоль/л, а у самиць Δ = 0,20 ммоль/л ± 0,06 ммоль/л (P<0,001), що вказує на більш виразне порушення обміну глюкози у самців, яке відображає підвищену продукцію глюкози печінкою.

Форма глікемічних кривих (рис. 1) при проведенні оГТТ у тварин дослідних груп набула “діабетичного” характеру: у порівнянні з вихідними результатами, у самців спостерігається зсув кривої вгору та вправо, у самиць – вправо (але не вгору) з максимумом на 30-й хвилині. На 120-й хвилині як у самців, так і у самиць рівень глікемії не повернувся до вихідного значення, як це було в контрольних групах, відображуючи уповільнення елімінації глюкози з крові або зниження глюкозотолерантності.

Результати інсулінового тесту (рис. 2) свідчать про те, що у тварин дослідних груп знизилася чутливість до інсуліну. У самців до початку дослідження концентрація глюкози в крові через 30 хв після введення інсуліну знизилася на 71,44 % ± 1,01 %; через 8 тиж

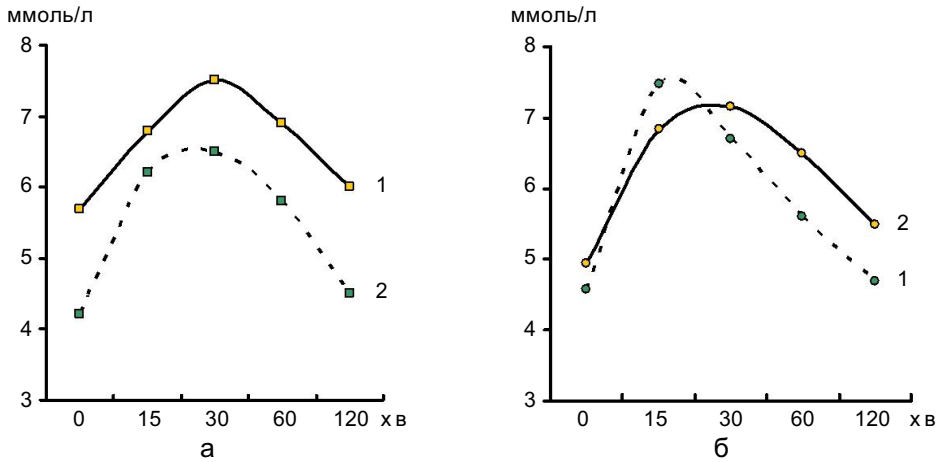


Рис. 1. Глікемічні криві, отримані при проведенні орального глюкозотолерантного тесту у самців (а) та самиць (б) щурів: 1 – вихідні значення, 2 – через 8 тиж вживання 10%-го розчину фруктози

вживання фруктози введення інсуліну призвело до зниження глікемії лише на 58,39 % ± 1,05 %. У самиць результати інсулінового тесту такі: до початку дослідження рівень глікемії знизився на 70,76 % ± 1,80 %, а через 8 тиж – на 61,75 % ± 1,24 % (P<0,05). У тварин контрольної групи відсоток зниження вмісту глюкози до та після дослідження не змінився (P>0,05).

За даними літератури, високофруктозна дієта, за відсутності надлишку ліпідів, не викликає ожиріння, але фруктоза відома як сильний стимулятор ліпогенезу. Гіпертригліцеридемія при ІРС є наслідком збільшення синтезу тригліцеридів з вільних

жирних кислот і може бути стимулятором глюконеогенезу [15]. Слід відмітити, що концентрація ТГ у сироватці крові щурів (рис. 3) після вживання фруктози достовірно підвищилася як у самців (з 0,41±0,02 до 0,53 ммоль/л ± 0,02 ммоль/л, P<0,001), так і у самиць (з 0,35±0,02 до 0,42 ммоль/л ± 0,02 ммоль/л, P<0,01). Вихідні значення концентрації ТГ у самиць нижчі, ніж у самців, а підвищення цього показника більше виражене у самців дослідної групи ($\Delta = -0,12$ ммоль/л ± 0,01 ммоль/л) ніж у самиць ($\Delta = -0,07$ ммоль/л ± 0,01 ммоль/л, P<0,05). У тварин контрольних груп не виявлено зміни концентрації ТГ (P>0,05).

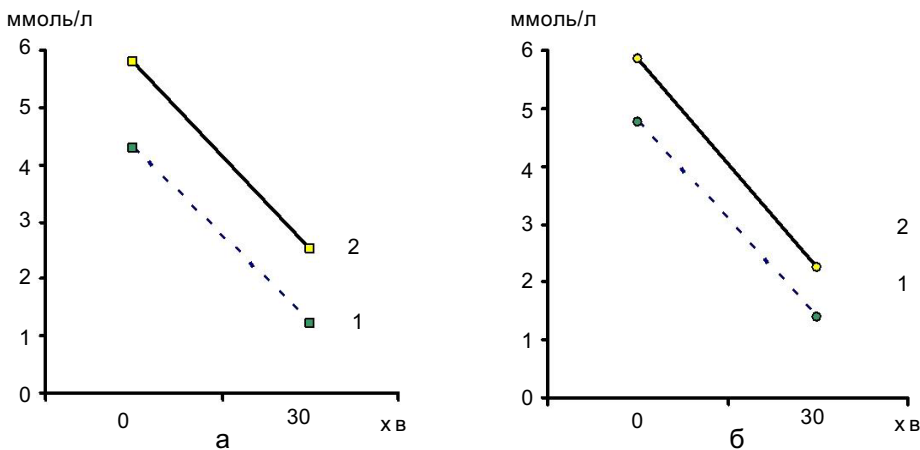


Рис. 2. Результати інсулінового тесту (вміст глюкози в крові до та через 30 хв після внутрішньоочеревинного введення інсуліну у самців (а) та самиць (б) щурів: 1 – вихідні значення, 2 – через 8 тиж вживання 10%-го розчину фруктози

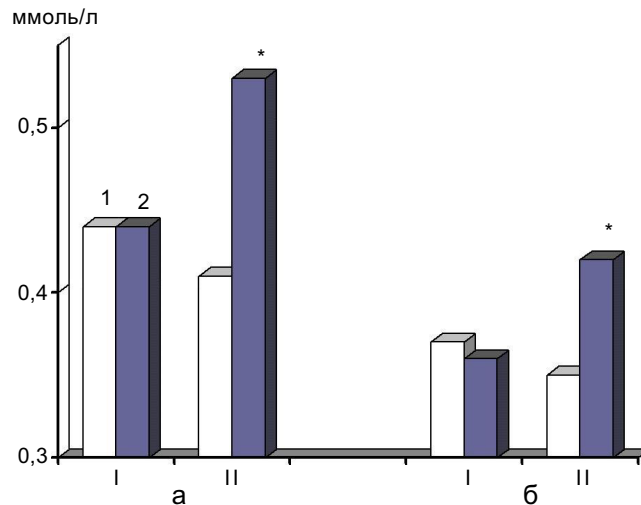


Рис. 3. Концентрація тригліцеридів у сироватці крові самців (а) і самиць (б) щурів контрольної (I) та дослідної (II) груп: 1 – вихідні значення, 2 – через 8 тиж вживання 10%-го розчину фруктози.

* достовірність різниці між початковими та кінцевими показниками

Отримані результати свідчать про розвиток ІРС, підвищення печінкового утворення глюкози та порушення толерантності до неї у тварин під впливом фруктозної дієти, причому у самців ступінь усіх цих зрушень більший, ніж у самиць. Це узгоджується з даними літератури про те, що самиці щурів більше захищені від індукованих фруктозою змін метаболізму та кров'яного тиску [10]. Фруктозна дієта викликала у щурів порушення чутливості до інсуліну, зміни вуглеводного і ліпідного обміну (підвищення вмісту ТГ), тобто отримана експериментальна модель відповідає типовим ознакам ІРС.

Проведення аналізу комплексу показників, що характеризують стан обміну СК (див. таблицю), показало суттєве підвищення її концентрації у сироватці крові тварин дослідних груп: у самців з $116,68 \pm 8,86$ до $187,44$ мкмоль/л $\pm 2,93$ мкмоль/л ($P < 0,001$), у самиць – з $81,83 \pm 4,40$ до $128,46$ мкмоль/л $\pm 5,28$ мкмоль/л ($P < 0,001$). Водночас у тварин контрольної групи не спостерігалось достовірних змін рівнів урикемії (у самців $141,76 \pm 4,97$ щодо $150,29$ ммоль/л $\pm 7,92$ ммоль/л, у самиць $84,78 \pm 2,45$ щодо $92,90$ мкмоль/л $\pm 2,84$ мкмоль/л, $P > 0,05$).

Відомо, що індукований високофрук-

тозною дієтою ІРС характеризується порушеннями структури та функції нирок [13, 22]. Ураження нирок посилюється при високих концентраціях СК у крові та сечі, тому зниження ниркової функції може супроводжувати ознаки ІРС у тварин. Крім того, велика кількість харчової фруктози може зменшувати ниркову екскрецію СК через посилення продукції лактату [15]. Нами виявлено суттєве зниження у дослідних групах тварин кліренсу СК, а також ІЕУ – характеристики ступеня реабсорбції СК відносно КР, який не підлягає реабсорбції у ниркових каналцях. Зниження ІЕУ відповідає посиленню повернення СК з первинного ниркового фільтрату до крові, що може спричинити гіперурикемію. Якщо до початку дослідження зафіксовано середні значення ІЕУ $20,41 \% \pm 1,57 \%$ у самців та $27,05 \% \pm 1,20 \%$ у самиць, то через 8 тиж прийому фруктози ці значення суттєво знизилися та становили $12,56 \pm 1,60$ та $15,46 \% \pm 1,68 \%$ відповідно ($P < 0,001$).

На процеси реабсорбції СК можуть чинити прямий вплив такі гормони, як інсулін та тестостерон [11, 25, 31, 39]. Після фруктозної дієти нами не виявлено достовірних змін концентрації загального тестостерону в сироватці крові тварин у порівнянні

Показники обміну сечової кислоти, ниркової функції та концентрація загального тестостерону в сироватці крові щурів з експериментальним інсулінорезистентним синдромом, індукованим фруктозою (M±m)

Показники	Самці				Самиці			
	дослід (n=15)		контроль (n=8)		дослід (n=16)		контроль (n=8)	
	Вихідні значення	Через 8 тиж	Вихідні значення	Через 8 тиж	Вихідні значення	Через 8 тиж	Вихідні значення	Через 8 тиж
Сечова кислота, мкмоль/л	116,7±8,9	187,4±2,9*	141,8±5,0	150,3±8,0	81,83±4,40	128,5±5,3*	84,8±2,5	92,9±2,8
Креатинін, мкмоль/л	84,3±1,3	97,5±3,1*	89,0±2,1	89,5±2,0	79,7±2,5	99,7±2,3*	72,4±4,8	82,5±3,0
Екскреція сечової кислоти, ммоль/добу	20,12±1,32	24,14±1,2*	27,59±3,33	24,49±2,38	15,10±0,69	14,4±0,9*	13,36±1,9	11,81±1,46
Кліренс сечової кислоти, мл/хв	0,12±0,01	0,08±0,01*	0,13±0,01	0,12±0,01	0,15±0,02	0,07±0,01*	0,11±0,01	0,08±0,01
Кліренс креатиніну, мл/хв	0,61±0,03	0,73±0,05	0,70±0,05	0,70±0,05	0,50±0,03	0,43±0,02	0,47±0,06	0,38±0,02
Індекс елімінації уратів, %	20,41±1,57	12,6±1,6*	18,96±1,09	16,67±0,89	27,05±1,20	15,5±1,7*	25,15±2,0	21,38±2,18
Активність гіпоксантину-анінфосфорибозилтрансферази, од.	0,28±0,01	0,21±0,01*	0,28±0,02	0,27±0,02	0,36±0,02	0,21±0,02*	0,31±0,03	0,26±0,03
Загальний тестостерон, нмоль/л	2,33±0,31	2,55±0,40	2,57±0,74	2,46±0,67	0,13±0,02	0,13±0,02	0,13±0,04	0,13±0,02

* P<0,05 порівняно з вихідними значеннями.

з вихідним значенням гормону ($P>0,05$). Немає також помітної кореляції між вмістом тестостерону, СК у сироватці крові та її екскреції. Отже, у цій моделі ІРС зниження кліренсу СК та ІЕУ не пов'язано зі змінами вмісту тестостерону, що узгоджується з даними Galipeau та Vasudevan [12, 38]. Зважаючи на те, що у дослідних тварин спостерігалась ІР, а також враховуючи дані літератури про розвиток гіперінсулінемії у тварин, які отримують високофруктозну дієту [12, 38], ми маємо підстави припустити, що посилення реабсорбції СК викликано антиурикозуричною дією підвищеного вмісту інсуліну.

З літератури відомо, що до зростання рівня урикемії при споживанні фруктози можуть вносити свою частку метаболічні причини, а саме посилення процесів синтезу в організмі пуринів та їх перетворення на СК, а також зниження реутилізації пуринів, зумовлене недостатністю активності ферменту ГГФРТ [4, 13, 15, 17]. Активність цього ферменту оцінюють за відношенням концентрацій СК і КР у сечі. Зниження виділення СК на одиницю маси КР розглядають як ознаку дефіциту активності ГГФРТ. У людей (в перерахунку на молярні концентрації) нормальні значення цього показника становлять 0,19 – 0,51 ммоль СК на 1 ммоль КР [4].

У щурів з експериментальною гіперурикемією нами виявлено помітне зниження ГГФРТ: у самців з $0,28 \pm 0,01$ до $0,21$ од. $\pm 0,01$ од.; у самиць з $0,36 \pm 0,02$ до $0,21$ од. $\pm 0,02$ од. ($P<0,001$). Це свідчить про посилення процесу реутилізації, що можна розглядати як компенсаторну реакцію на збільшення катаболізму пуринів в організмі для запобігання зниженню пулу необхідних організмові пуринових нуклеотидів. Оскільки відомий прямий взаємозв'язок зниження активності ГГФРТ та активації синтезу пуринів *de novo* [31], можна припустити, що при цій моделі ІРС важливішим чинником посилення новоутворення пуринів є стимуляція фруктозою синтезу попередників

пуринів. Це відрізняє ІРС у щурів від стану, виявленого нами у чоловіків, хворих на ЦД 2-го типу, у яких спостерігалось суттєве зниження активності реутилізації пуринів за цим показником.

Подальший шлях перетворення надлишку пуринів у СК залежить від активності ферментів, які їх катаболізують (АДА, 5'-НК, ксантинооксидази). Показано, що дорослі самці щурів мають вищу активність ксантинооксидази, а також більшу, ніж у самиць, експресію генів транспортерів уратів, завдяки чому у самців підтримується більш високий вміст СК в крові. Як показано в експериментах з кастрацією тварин і введенням статевих гормонів, процеси синтезу нуклеотидів, активність ксантинооксидази та експресія урат-транспортерів знаходяться під впливом тестостерону, а естрогени чинять супресивну дію на активність ксантинооксидази в печінці та стимулюють ниркову екскрецію СК [17, 28].

Але в літературі немає даних щодо впливу високофруктозної дієти на активність ферментів, які беруть участь у деградації пуринів. Проведене нами визначення активності ферментів 5'-НК та АДА в гомогенатах печінки щурів показало, що обидва ферменти проявляють підвищену

активність у тварин після прийому фруктози в порівнянні з показниками в контрольній групі (рис. 4). Як у самиць, так і в самців виявлені зміни статистично достовірні ($P < 0,01$).

Отримані результати вказують на те, що високофруктозна дієта (у вигляді 10%-го розчину фруктози з питною водою) у самців і самиць щурів посилює деградацію пуринових нуклеотидів на ранніх стадіях: гідролітичне відщеплення фосфату від АМФ (5'-НК) та подальше дезамінування аденозину з утворенням інозину та ксантину (АДА). Ці сполуки є субстратами ферменту ксантинооксидази, продуктом дії якого є СК. Діяльність ксантинооксидази супроводжується утворенням активних радикалів кисню, а активність ферменту стимулюється при накопиченні АМФ (що утворюється при розщепленні АТФ, АДФ). У зв'язку з цим можна припустити, що процес деградації пуринів та утворення СК вносить свою частку до індукції важливого патогенетичного фактора при ІРС – оксидативного стресу. Високі концентрації СК також є прооксидантним чинником, отже порушення обміну СК відображує глибокі метаболічні зрушення в організмі, що можуть спричинити низку захворювань, пов'язаних з ІРС.

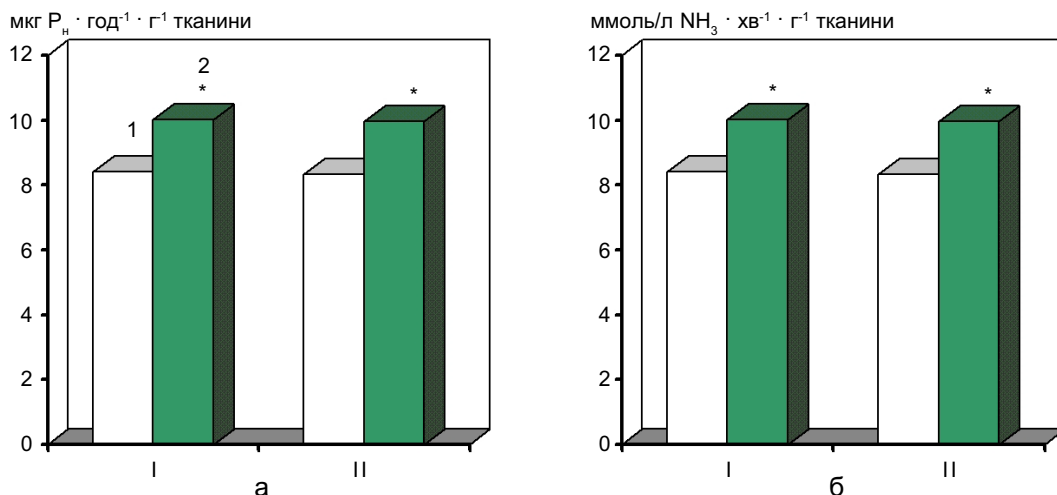


Рис. 4. Активність ферментів 5'-нуклеотидази (а) та аденозиндезамінази (б) в гомогенаті печінки самців (I) і самиць (II) щурів: 1 – тварини контрольної групи, 2 – тварини дослідної групи, які отримували 10%-й розчин фруктози. * достовірність різниці між показниками в дослідній і контрольній групах

У щурів, на відміну від людей, СК є не єдиним кінцевим продуктом катаболізму пуринів. Частина її перетворюється на алантоїн та виводиться з сечею. Але, за даними літератури, у щурів спостерігається аналогія з людьми щодо впливу фруктози на обмін вуглеводів, ліпідів і СК, розвитку ІР, ниркової та ендотеліальної дисфункції тощо. Тому ця модель нині широко використовується для вивчення метаболічних і функціональних зрушень при ІРС.

ВИСНОВКИ

1. Через 8 тиж вживання 10%-го розчину фруктози з питною водою у щурів спостерігається достовірно збільшення маси тіла, рівня глікемії натще (але таке, що не виходить за межі норми), підвищення концентрації тригліцеридів у сироватці крові, порушення толерантності до глюкози і зниження ІР, причому у самців ступінь усіх цих зрушень більший, ніж у самиць.

2. Вживання фруктози викликало значне підвищення концентрації СК у сироватці крові щурів. Збільшення добової екскреції СК, що вказує на її гіперпродукцію, виявлено лише у самців. Суттєве зниження ІЕУ свідчить про посилення каналцевої реабсорбції СК, яке не пов'язано зі змінами концентрації тестостерону.

3. Виявлено підвищення активності ферментів 5'-НК та АДА, які каталізують ранні стадії розпаду пуринових нуклеотидів, а також збільшення активності ферменту реутилізації уратів ГГФРТ у дослідних тварин.

**А.А. Шупрович, Н.М. Гурина,
О.В. Корпачева-Зинич**

НАРУШЕНИЕ ОБМЕНА МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНЫМ СИНДРОМОМ, ИНДУЦИРОВАННЫМ ФРУКТОЗОЙ

В последнее время употребление пищевой фруктозы рассматривается как один из факторов, способствующих развитию ожирения, инсулинорезистентного синдрома

(ИРС) и связанных с ним нарушений обмена веществ. Использование 10%-го раствора фруктозы с питьевой водой в течение 8 нед позволило получить у крыс состояние, соответствующее основным признакам ИРС: наличие инсулинорезистентности, нарушение углеводного обмена, увеличение массы тела, гипертриглицеридемия, гиперурикемия. У самцов все признаки ИРС более выражены, чем у самок. Только у самцов зафиксировано повышение суточной экскреции мочевой кислоты (МК), что свидетельствует о ее гиперпродукции. При данных условиях эксперимента у животных не наблюдалось нарушения почечной фильтрации, но отмечено снижение клиренса МК за счет увеличения почечной реабсорбции уратов по отношению к креатинину. На это указывает значительное уменьшение индекса элиминации уратов, очевидно, вызванное гипоурикозурическим эффектом инсулина, но не связанное с изменениями концентрации тестостерона. Впервые определено, что под влиянием фруктозной диеты в гомогенатах печени опытных животных увеличивается активность ферментов катаболизма пуринов – 5'-нуклеотидазы и аденозиндезаминазы, которые катализуют ранние стадии распада пуриновых нуклеотидов. Активность фермента реутилизации пуринов гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы у животных повышалась, что может иметь компенсаторное значение в условиях усиленного распада пуринов.

Ключевые слова: мочевая кислота, инсулинорезистентный синдром, фруктозная диета, крысы, ферменты деградации пуринов.

**A.A.Shuprovich, N.M.Gurina,
O.V.Korpacheva-Zinych**

DISORDERS OF URIC ACID METABOLISM IN RATS WITH FRUCTOSE-INDUCED EXPERIMENTAL INSULIN RESISTANCE SYNDROME

Consumption of dietary fructose has been recently suggested to be one of the environmental factors contributing to development of obesity and accompanying abnormalities of the insulin resistance syndrome (IRS). IRS was induced in rats by adding 10% fructose to drinking water. Within 8 wk insulin resistance, carbohydrate metabolism disorder, weight gain, hypertriglyceridemia and hyperuricemia were developed. The signs of IRS were more pronounced in male than in female rats. An increase of uric acid (UA) daily excretion was revealed only in males, suggesting a hyperproductoin of UA. There was not significant disorder of kidney filtration, although an increase of UA clearance was revealed due to enhanced kidney urate reabsorbtion which may be connected to the hypouricosuric action of insulin but not the testosterone level changes. It was first revealed an increased activity of enzymes catalyzing early stages of purine catabolism (5'-nucleotidase and adenosindesaminase) in liver homogenate. Activity of enzyme of purine reutilisatoin (hypoxantin-guanine-phosphoribosil transferase) was found increased that may have a compensatory

significance under conditions of increased purine degradation.
Key words: uric acid, insulin resistance syndrome, fructose diet, rats, purine degradation enzymes.

State Institution "V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of National Academy of Medical Sciences", Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена. – 2001. – 528 с.
2. Мадянов И.В., Балаболкин М.И., Марков Д.С., Маркова Т.Н. Основные причины гиперурикемии при сахарном диабете // *Терап. архив.* – 2000, №2. – С. 58–60.
3. Мухин Н.А., Балкаров И.М., Бритов А.Н. Тубулоинтерстициальный нефрит и артериальная гипертония – клиническое и популяционное значение // *Там же.* – 1997. – **69**, № 7. – С. 5–10.
4. Руководство по клинической лабораторной диагностике / Под ред. Меньшикова В.В. – М.: Медицина, 1982. – 576 с.
5. Магарламов А.Г. Аспарагиназная и аденозиндезаминазная активность в ткани печени крыс при различных условиях белкового и безбелкового питания // *Укр. биохим. журн.* – 1980. – **52**, №4. – С. 446–452.
6. Bantle J.P., Ratz S.K., Thomas W., Georgopoulos A. Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects // *Amer. J. Clin. Nutr.* – 2000. – **72**. – P. 1128–1134.
7. Dai S., McNeill J.H. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* – 1995. – **33**. – P. 101–107.
8. Dennison B.A., Rockwell H.L., Baker S.L. Excess fruit juice consumption by preschool-aged children is associated with short stature and obesity // *Pediatrics.* – 1997. – **99**. – P. 15–22.
9. Facchini F., Chen Y.D., Hollenbeck C.B., Reaven G.M. Relationship between resistance to insulin-mediated glucose uptake, urinary uric acid clearance, and plasma uric acid concentration // *JAMA.* – 1991. – **266**. – P. 3008–3011.
10. Galipeau D., Verma S., McNeill J. Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2002. – **283**, №6. – P. H2478–H2484.
11. Hwang I.S., Ho H., Hoffman B.B., Reaven G.M. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats // *Hypertension.* – 1987. – **10**. – P. 512–516.
12. Ludwig D.S., Peterson K.E., Gortmaker S.L. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. – *Lancet.* – 2001. – **357**. – P. 505–508.
13. Masuo K., Kawaguchi H., Mikami H., Ogihara T., Tuck M.L. Serum uric acid and plasma norepinephrine concentrations predict subsequent weight gain and blood pressure elevation // *Hypertension.* – 2003. – **42**. – P. 474–480.
14. Michel R.M., Hawthorne S. N. The site of diphosphoinositol synthesis in rat liver // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1965. – **21**, № 4. – P. 333–338.
15. Nakagawa T., Hanbo Hu, Zharikov S., Tuttle K.R., Short R.A., Glushakova O., Xiaosen Ouyang, Feig D.L., Block E. R., Herrera-Acosta J., Patel J. M., Johnson R. J. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome // *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2006. – **290**. – P. F625–F631.
16. Pizzichini M., Leoncini R., Vannoni D. The influence of testosterone on purine nucleotide metabolism in rat liver // *Life Sci.* – 1995. – **57**. – P. 2127–2135.
17. Sanchez-Lozada L., Tapia E., Jimenez A. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats // *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2006. – **292**. – P. F423–F429.
18. Hare M.B., Manson J.E., Ludwig D.S. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women // *JAMA.* – 2004. – **292**. – P. 927–934.
19. Sekine T., Miyazaki H., Endou H. Molecular physiology of renal organic anion transporters // *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2006. – **290**. – P. F251–F261.
20. Song D., Arikawa E., Galipeau D., Battell M., McNeill J.H. Androgens are necessary for the development of fructose-induced hypertension // *Hypertension.* – 2004. – **43**. – P. 667–672.
21. Stirpe F., Della Corte E., Bonetti E. Fructose-induced hyperuricaemia // *Lancet.* – 1970. – №2. – P. 1310–1311.
22. Tsunoda S., Kamide K., Minami J., Kawano Y. Decreases in serum uric acid by amelioration of insulin resistance in overweight hypertensive patients: effect of a low-energy diet and an insulin-sensitizing agent // *Amer. J. Hypertens.* – 2002. – **15**. – P. 697–701.
23. Vasudevan H., Xiang H., McNeill J.H. Differential regulation of insulin resistance and hypertension by sex hormones in fructose-fed male rats // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2005. – **289**. – P. H1335–H1342.
24. Vizzotto L., Vartemati M., Marinello E., Leoncini R., Pagani R., Pizzichini M. Effect of testosterone on purine metabolism and morphometric parameters in the rat liver // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 1996. – **119**. – P. 123–127.
25. Xiang G., Lu Qi, Qiao N. Intake of added sugar and sugar-sweetened drink and serum uric acid concentration in US men and women // *Hypertension.* – 2007. – **50**. – P. 306–316.

*ДУ «Ін-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», Київ
E-mail: admin@iem.kiev.ua*

Матеріал надійшов до редакції 15.01.2010

О.В. Гура, О.В. Багацька, Ю.П. Лиманський

Анальгезія, викликана сумісною дією корвітину та опромінення точки акупунктури мікрохвилями, при соматичному болю у мишей різних генотипів

Вивчали рівень анальгезії після опромінення точки акупунктури E-36 мікрохвилями низької інтенсивності (30–300 ГГц, щільність потоку потужності $3 \cdot 10^{-9}$ Вт/см²) на тлі введеного корвітину (20 мг/кг) у мишей двох генотипів C57Bl/6j та CBA/CaLac з соматичним болем, який був викликаний формаліновим тестом. Показано, що дія цих двох факторів викликає значну анальгезію, котра, однак, відрізняється за рівнем: 43 % у мишей генотипу C57Bl/6j та 33 % – CBA/CaLac. Інтенсивність анальгезії при сумісній дії мікрохвиль і корвітину перевищує таку, яка виникає при окремому застосуванні цих факторів.

Ключові слова: точка акупунктури, мікрохвиля, корвітин.

ВСТУП

Розробка засобів лікування болю – одна з найактуальніших проблем медицини та фізіології. Пригнічення гострого та хронічного болю, як правило, досягається використанням опіоїдних анальгетиків або нестероїдних протизапальних препаратів, які можуть викликати небажані побічні ефекти. Дані, отримані в дослідженнях на лабораторних тваринах [2, 3, 5, 10, 14], а також лікування пацієнтів з хронічними больовими синдромами [25, 26] показали, що одним з прийомів, який забезпечує послаблення, а в деяких випадках і повне пригнічення відчуття болю, є дія на точку акупунктури (ТА) мікрохвиль низької (нетеплової) інтенсивності.

У досліджах на лабораторних тваринах з'ясовано, що комбіноване використання анальгетичних препаратів і впливу мікрохвиль низької інтенсивності на ТА дає можливість зменшити дози анальгетиків для досягнення значного рівня знеболення. Використання як анальгіну, так і трамадолу в половинній дозі комбіновано з впливом на ТА мікрохвиль призводило до такого само-

го рівня знеболювання, як і застосування цих препаратів у повній дозі [8, 12, 13]. Попередніми дослідженнями показано, що кверцетин (біофлавоноїд – рослинний поліфенол) ефективний антиоксидант [11], викликає суттєвий антиноцицептивний ефект на біль, спричинений термічним і хімічним подразненням [20, 22], а також на вісцеральний [20] і невропатичний біль у мишей з експериментально викликаним діабетом [15].

Результати наших досліджень довели, що як вплив на ТА мікрохвиль низької інтенсивності, так і введення корвітину (розчинний у воді комплекс кверцетину – 50 % з полівінілпіролідом – 50 %) викликають неоднаковий рівень анальгезії у мишей різних генотипів [2, 10, 16] при соматичному болю, викликаному формаліновим тестом.

Мета цієї роботи – вивчити рівень анальгезії при сумісній дії корвітину та мікрохвиль низької інтенсивності на ТА E-36 у мишей різних генотипів в умовах соматичного болю.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 100 дорослих мишах-

самця масою 20–24 г ліній С57В1/6j (n=50) і СВА/СаLас (n=50). Три доби тварин тримали в окремих клітках у віварії, а за добу до експерименту переносили в лабораторну кімнату для звикання. Експерименти проводили з 10-ї до 13-ї години. Біль викликали ін'єкцією 25 мкл 5%-го розчину формаліну (в 0,9%-му розчині NaCl) підшкірно в дорсальну поверхню стопи задньої кінцівки. Формаліновий тест супроводжується двома фазами болю: рання триває від 0 до 10 хв, пізня – до 60 хв і більше [19, 21]. Корвітин (виробництво Борщагівського фармацевтичного заводу, Київ, Україна) вводили внутрішньоочеревинно по 20 мг/кг за 10 хв до ін'єкції формаліну. Зразу після введення формаліну тваринам опромінювали протягом 10 хв ТА Е-36 на лівій задній кінцівці за допомогою апарата «ІХТ-Поріг» («Біополіс», Київ, Україна) зі спектром випромінювання 30–300 ГГц з амплітудною модуляцією низько-частотними сигналами в межах 0,1–100 Гц і щільністю потоку потужності $3 \cdot 10^{-9}$ Вт/см². Тривалість больової поведінкової реакції – вилизування кінцівки, в яку було введено формалін, а також таких невольових поведінкових проявів, як приймання їжі, сон, біг, грумінг реєстрували протягом 60 хв після впливу на ТА мікрохвилями.

Дослідні тварини були розділені на п'ять груп (по 10 мишей у кожній). В I групу ввійшли тварини, яким у кінцівку вводили 25 мкл фізіологічного розчину, II – миші, яким вводили розчин формаліну в кінцівку і протягом 10 хв проводили всі маніпуляції, що супроводжували опромінення, але з виключеним апаратом (контрольна група), III – миші, яким вводили корвітин, потім розчин формаліну та імітували опромінення ТА протягом 10 хв, IV – миші, яким після введення розчину формаліну опромінювали ТА, V – миші, яким вводили корвітин, через 10 хв – розчин формаліну і відразу опромінювали ТА. За допомогою комп'ютерної програми Lady Pain, розробленої в відділі

фізіології стовбура мозку Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, визначали середнє значення тривалості зазначених реакцій кожні послідовні 10 хв і за 60 хв спостереження. Результати обробляли статистично з розрахунком середніх значень тривалості кожного поведінкового прояву в кожній групі (M) та стандартної помилки середнього (m). Розбіжності середніх значень між порівнюваними групами оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента та вважали достовірним при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин II групи підшкірна ін'єкція розчину формаліну в задню кінцівку створювала осередок болю. Це зумовлювало виникнення больової реакції, яка продовжувалася у мишей лінії С57В1/6j і СВА/СаLас – $1225 \pm 109,9$ і $687 \text{ с} \pm 109,5 \text{ с}$ відповідно, що достовірно ($P < 0,05$) більше від тривалості цієї реакції у мишей I групи, яким вводили фізіологічний розчин. Водночас тривалість таких невольових поведінкових проявів, як біг, грумінг, їда і сон достовірно ($P < 0,05$) зменшилась (таблиця). Введення корвітину зменшувало час больової реакції, викликані введенням розчину формаліну у мишей III групи порівняно з II групою (контроль). Так, у мишей лінії С57В1/6j і СВА/СаLас (III група) цей показник був меншим, ніж у контролі на 26,6 і 17,9 % відповідно (див. таблицю). Тривалість таких невольових поведінкових проявів, як біг і сон у мишей лінії С57В1/6j зменшилась, а грумінг – збільшилась, їжа – не змінилась порівняно зі значеннями у тварин II групи. У мишей лінії СВА/СаLас після введення корвітину достовірно збільшилась тривалість таких поведінкових проявів, як біг і їжа ($P < 0,05$), а грумінгу та сну зменшилась (див. таблицю).

Оптомінення мікрохвилями низької інтенсивності ТА Е-36 (IV група) зменшу-

Тривалість (с) поведінкових реакцій у мишей лінії C57Bl/6j та CBA/CaLac (M±m;n=10)

Реакція	Фізіологічний розчин		Формалін, імітація опромінення		Корвітин, формалін, імітація опромінення		Формалін, опромінення точки акупунктури E-36		Корвітин, формалін, опромінення точки акупунктури E-36	
	I група		II група		III група		IV група		V група	
	C57	CBA/CaLac	C57	CBA/CaLac	C57	CBA/CaLac	C57	CBA/CaLac	C57	CBA/CaLac
Біль	49,7±19,2	94,9±48,7	122,5±109,9*	68,7±109,9*	900,3±150,3	564,5±57,3	1123,4±124,7	592±84,4	699,4±93,9***	440,4±68,9***
Біг	468,8±98,9	628,7±181,7	380,8±57,8	267±117,6	295,1±75,6	434,2±81,6	358,8±48,4	251±42,8	299±95,2	420,8±67,3
Грумінг	603,7±89,8	590,8±89,9	38,9±17,2	36,7±12,8	69,8±25,2	16,5±7,8	39,7±11,5	42,9±17,5	78,5±25,4	17,5±9,9
Їда	331,5±94,6	382,3±146,1	5,8±4,6	1,8±1,8	5,7±5,5	25,7±16,4**	6±3,7	0	17,2±10,5	0
Сон	458,8±98,9	450,1±227,5	251,4±128,8	306,3±168,2	235,1±119,8	204,6±92	76,8±67	391,2±91,3	668,3±200,4***	421,2±282,9***

*P<0,05 порівняно з I групою; **P<0,05 порівняно з II групою; ***P<0,05 порівняно з III групою.

вало тривалість больової реакції вилузування кінцівки у мишей ліній C57Bl/6j і CBA/CaLac відносно контролю. У мишей лінії C57Bl/6j цей показник становив 1123,4 с ± 124,7 с, що на 8,3 % менше, а у мишей лінії CBA/CaLac – 592 с ± 84,4 с, що на 13,9% менше, ніж у мишей I групи. Небольові поведінкові прояви після опромінення ТА E-36 змінювалися неоднаково у мишей обох генотипів. Так, тривалість таких проявів, як біг зменшилась, а грумінг – збільшилась у мишей обох генотипів, час їжі збільшився у мишей лінії C57Bl/6j, а у мишей лінії CBA/CaLac зменшився, тривалість сну зменшилась у мишей лінії C57Bl/6j, але збільшилась у мишей лінії CBA/CaLac порівняно з контролем.

Опромінення ТА E-36 на тлі введеного корвітину (V група) достовірно зменшувало тривалість больової реакції у мишей ліній C57Bl/6j та CBA/CaLac. Остання у мишей лінії C57Bl/6j становила 699,4 с ± 93 с, що на 43 % (P< 0,05), а у мишей лінії CBA/CaLac 440,4 с ± 68,9 с, що на 33 % (P< 0,05; див. таблицю) менше, ніж у мишей II групи. Серед невольових поведінкових проявів достовірно збільшилась тривалість сну в обох генотипах мишей відносно значень у тварин II групи. У мишей лінії C57Bl/6j збільшився час реакції грумінг і їжа, зменшився – біг, у тварин лінії CBA/CaLac збільшилась тривалість бігу, зменшилась – грумінгу, а реакція «їжа» не виникала (див. таблицю).

Попередні наші дослідження показали, що корвітин у дозі 20 мг/кг не змінює поведінкові прояви у мишей генотипів C57Bl/6j і CBA/CaLac [10] порівняно з нормою. Анальгетичний ефект корвітину на соматичний біль, викликаний формаліновим тестом, був більш вираженим у мишей генотипу C57Bl/6j, ніж CBA/CaLac [10]. Вплив на ТА мікрохвиль низької інтенсивності викликав більший анальгетичний ефект на соматичний біль у мишей CBA/CaLac, ніж у мишей генотипу C57Bl/6j [2]. Але знеболювальна дія мікрохвиль

у тварин обох генотипів була невелика: 13,9 % у мишей лінії CBA/CaLac і 8,3 % – C57Bl/6j.

Отримані нами результати дії мікрохвиль на ТА Е-36 на тлі введеного корвітину при соматичному болю показали значний анальгетичний ефект у тварин обох генотипів (43 % у мишей лінії C57Bl/6j і 33 % – CBA/CaLac). Це вказує на підсилення анальгетичної дії при сумісному застосуванні корвітину та мікрохвиль низької інтенсивності. Але різний рівень анальгезії при сумісному використанні цих двох факторів у мишей ліній C57Bl/6j і CBA/CaLac залишається. Таку різницю можна пояснити частково генетичними особливостями, які визначають рівень чутливості організму до болю [23]. Миші лінії C57Bl/6j менш чутливі, а CBA/CaLac – більш чутливі до болю, викликаного електричним струмом [23, 24]. Але до болю, викликаного таким хімічним подразником як формалін, більш чутливими були миші лінії C57 [2, 9].

Анальгезія, викликана впливом на ТА мікрохвилями низької інтенсивності здійснюється за участю серотонінергічної і опіоїдної системи мозку [5–7, 17, 18]. Механізм анальгетичної дії корвітину не досліджений. Відомо, що існує значна різниця між показниками функціонування серотонінергічної системи мозку у мишей генотипів C57Bl/6j і CBA/CaLac. Вміст серотоніну в середньому мозку та гіпоталамусі нижчий у мишей лінії CBA/CaLac, ніж лінії C57Bl/6j, хоч активність триптофангідроксилази (ферменту, який бере участь у синтезі серотоніну) в структурах мозку вища у мишей лінії CBA/CaLac [1]. Для з'ясування різниці в анальгетичних ефектах, викликаних сумісною дією корвітину та мікрохвиль у мишей різних генотипів потрібні подальші експериментальні дослідження.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що при сумісній дії корвітину та мікрохвиль низької інтенсивності на ТА

Е-36 досягається значний анальгетичний ефект у мишей генотипів C57Bl/6j (43 %) та CBA/CaLac (33 %) при соматичному болю, викликаному формаліновим тестом.

2. Рівень анальгезії при сумісному використанні корвітину і мікрохвиль на ТА Е-36 перевищує такий, що спостерігається при застосуванні цих двох факторів окремо.

Е.В. Гура, Е.В. Багацька, Ю.П. Лиманський

АНАЛЬГЕЗИЯ, ВЫЗВАННАЯ КОМПЛЕКСНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ОБЛУЧЕНИЯ ТОЧКИ АКУПУНКТУРЫ МИКРОВОЛНАМИ, ПРИ СОМАТИЧЕСКОЙ БОЛИ У МЫШЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ

Исследовали уровень анальгезии при облучении точки акупунктуры Е-36 микроволнами низкой интенсивности (30–300 ГГц, плотность потока мощности $3 \cdot 10^{-9}$ Вт/см²) на фоне введенного корвитина (20 мг/кг) у мышей двух генотипов C57Bl/6J Bl/6j и CBA/CaLac с соматической болью, вызванной формалиновым тестом. Показано, что действие этих двух факторов вызывает значительную анальгезию, которая, однако, отличается по уровню: 43 % у мышей генотипа C57Bl/6J Bl/6j и 33 % у мышей генотипа CBA/CaLac. Интенсивность анальгезии при действии микроволн и корвитина превышает уровень анальгезии, который возникает при отдельном использовании этих факторов.

Ключевые слова: точка акупунктуры, микроволны, корвитин.

E.V.Gura, E.V.Bagatskaya, Yu.P.Limansky

ANALGESIA EVOKED BY COMBINED EFFECT OF CORVITIN AND LOW-INTENSITY MICROWAVES AT MICE WITH DIFFERENT GENETIC STRAINS WITH SOMATIC PAIN

The level of analgesia has been investigated in mice of two genotypes C57Bl/6J Bl/6j and CBA/CaLac with the somatic pain caused by the formalin test after irradiation of acupunctu- re point E-36 by microwaves of low intensity (30-300 GHz, density of a stream of capacity of $3 \cdot 10^{-9}$ Вт/см²) on a back- ground entered corvitin (20 mg / kg). It is shown, that the action of these two factors causes significant analgesia with different levels: 43 % in C57Bl/6J Bl/6j mice and 33 % in CBA/CaLac mice. The intensity of analgesia after action of microwaves and corvitin exceeds the level attained during separate use of these factors.

Key word: acupunctu- re point, microwaves, corvitin.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Августиневич Д.Ф., Липина Г.В., Алексеенко О.В., Амстиславская Т.Г., Кудрявцева Н.Н. Особенности функциональной активности серотонинергической системы мозга в проявлении естественной и патологической тревожности у мышей: влияние генотипа// Журн. высш. нерв. деятельности. – 1998. – **48**, №2. – С.331–341.
2. Багацька О.В., Гура О.В. Дослідження анальгезії, викликані впливом на точку акупунктури мікрохвиль низької інтенсивності, у мишей різних генотипів// Фізіол. журн. – 2004. – **50**. – №2. – С.80–85.
3. Багацкая Е.В., Гура Е.В. Анальгезия, вызванная микроволновым облучением точки акупунктуры при висцеральной боли у мышей: роль серотонинергической системы головного мозга// Нейрофизиология/ Neurophysiology. – 2005. – **37**, №3. – С. 250–257.
4. Багацкая Е.В., Гура Е.В., Лиманский Ю.П. Анальгезия, вызванная микроволновым облучением точки акупунктуры при висцеральной боли у мышей: роль опиоидной системы головного мозга// Там же. – 2008. – **40**, №5/6. – С. 426–437.
5. Гура Е.В., Багацкая Е.В., Лиманский Ю.П. Участие серотонинергической системы в анальгезии, вызванной действием низкоинтенсивных микроволн на противоболевую точку акупунктуры// Там же. – 2002. – **34**, №4. – С.303–308.
6. Гура Е.В., Багацкая Е.В., Лиманский Ю.П. Участие серотонинергической системы в обеспечении анальгезии, вызванной микроволновым облучением акупунктурной точки// Арх. клин. и эксперим. медицины. – 2001. – **10**, №2. – С.145.
7. Гура О.В., Багацька О.В. Участь серотонінергічної системи мозку у больових реакціях, викликаних введенням формаліну у мишей// Фізіол. журн. – 2002. – **48**, №2. – С.22.
8. Гончар О.М., Гура О.В. Фармакологічне та індуковане мікрохвильовим опроміненням пригнічення соматичного болю в умовах формалінового тесту у мишей// Нейрофизиология/ Neurophysiology. – 2006. – **38**, №1. – С. 46–51.
9. Лиманський Ю.П., Багацька О.В., Гура О.В., Несін О.М., Сушко Б.С., Тамарова З.А. Вплив корвітину на соматичний біль у мишей різних генотипів// Фізіол. журн. – 2008. – **54**, №4. – С.37–43.
10. Лиманський Ю.П., Тамарова З.А., Бідков Є.Г., Колбун М.Д. Пригнічення ноцицептивних реакцій у мишей під впливом низкоінтенсивного мікрохвильового опромінення точок акупунктури// Нейрофизиология/ Neurophysiology. – 1998. – **31**. – №4. – С. 318.
11. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008. – 520 с.
12. Несин Е.Н., Гура Е.В. Анальгезия, индуцированная комбинированным применением трамадола и микроволнового облучения при соматической боли у мышей// Нейрофизиология/ Neurophysiology. – 2006. – **38**, №4. – С.314–320.
13. Несін О.М., Гура О.В., Колбун М.Д. Комбіноване застосування фармакологічних анальгетиків та мікрохвильового опромінення точки акупунктури для пригнічення висцерального болю у мишей: роль опіоїдної та серотонінергічної систем мозку// Там само. – 2007. – **39**, №6. – С. 470–478.
14. Чуян Е.Н., Джелдубаева Э.Р. Механизмы антиноцицептивного действия низкоинтенсивного миллиметрового излучения. – Симферополь: ДИАЙПИ, 2006. – 440 с.
15. Anjaeyulu M., Chopra K. Quercetin, a biophlavanoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain// Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat. – 2003 – **27**. – P.1001–1005.
16. Bagatskaya E.V. Involvement of the serotonergic cerebral system in microwave-induced analgesia in mice of different genotypes// Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2006. – **38**, №5/6. – P.424–426.
17. Bagatskaya E.V., Gura E.V., Limansky Yu.P. Connection between analgesia caused by microwave irradiation of acupuncture point and brain serotonergic system. – In: Abstract of Communications 10th World Congress of Pain – San Diego, August 17–19. – 2002. – P.263.
18. Bagatskaya E.V., Gura E.V., Limansky Yu.P., Kolbun N.D. Participation of serotonergic system in analgesia evoked by action of the low-intensive microwaves on acupuncture point. – In: Abstract of European Conference of Pain. Poland. – Warshawa, 2001. – P.151.
19. Dubuisson D., Dennis S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cat/ / Pain. – 1977. – **4** – P.161–174.
20. Gadotti V.M., Schmelting L.O., Machado C, Liz F.H., Filho V.C., Meyere-Silva C., Santos A.R. Antinociceptive action of the extract and the flavonoid quercetin isolated from Bauhinia microstachya leavels // J. Pharm. Pharmacol. – 2005. – **57** – P.1345–1351.
21. Haskaar S., Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain // Pain. – 1987. – **30**. – P.103–104.
22. Kaur R., Singh D., Chopra K. Partisipation of alpha 2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin / / J. Med. Food. – 2005. – **8**. – P.529–532.
23. Mogil J.S., Rest B., Sadowski D., Belknap J.K. Differential genetic mediation of sensitivity to morphine in genetic models of opiate antinociception: influence of nociceptive assay // J. Pharmacol. Exp. Therap. – 1996. – **27**. – P.532–544.
24. Mogil J.S., Richards S.P., OToole L.A., Helms M.L., Mitchell S.R., Belknap J.K. Genetic sensitivity to hot-plate nociception in DBA/2J and C57BL/6J BL/6J inbred mouse strains: Possible sex-specific mediation by

- delta2-opioid receptors // Pain. – 1997. – **70**. – P.267–277.
25. Usichenko T.I., Ivashkivsky O.I., Gzhko V.V. Treatment of rheumatoid arthritis with electromagnetic millimeter waves applied to acupuncture points – a randomized double blind clinical study// Acupunct. Electrother. Res. – 2003. – **28**, № 1–2. – P.11–18.
26. Usichenko T.I., Herget H.F. Treatment of chronic pain with millimetre wave therapy (MWT) in patients with diffuse connective tissue diseases: a pilot case series study// Eur. J. Pain. – 2003. – **7**, № 3. – P.289–294.

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

Матеріал надійшов до редакції 22.01.2010

М.В. Макаренко, В.С. Лизогуб, Т.В. Кожемяко, Н.П. Черненко

Вікові особливості швидкості центральної обробки інформації у осіб з різним рівнем функціональної рухливості нервових процесів

У людей віком від 7 до 20 років вивчали динаміку становлення швидкості центральної обробки інформації (ЦОІ) та її зв'язок з функціональною рухливістю нервових процесів (ФРНП). Виявлено, що у дітей, підлітків та юнаків швидкість ЦОІ та ФРНП поступово підвищувалися та сягали максимального розвитку у 19–20 років. У всіх вікових групах обстежуваних з різним рівнем ФРНП виявлені статистично значимі відмінності швидкості ЦОІ. Особи з високим рівнем ФРНП характеризувалися достовірно вищими значеннями швидкості ЦОІ порівняно з особами з низьким рівнем. Кореляційний аналіз підтвердив ці відмінності. Встановлені загальні вікові закономірності формування ЦОІ і ФРНП, що свідчить на користь генетично детермінованої програми їх розвитку. Існують підстави стверджувати, що швидкість ЦОІ, яка характеризує індивідуальні особливості переробки інформації, може бути використана як індикатор ФРНП та збільшити можливість аналізу експериментального матеріалу.

Ключові слова: швидкість центральної обробки інформації, функціональна рухливість нервових процесів, вікові особливості, індивідуальні особливості переробки інформації.

ВСТУП

Для встановлення індивідуальних психофізіологічних відмінностей поміж людей широко застосовуються методики, котрі спрямовані на визначення високо генетично детермінованих типологічних властивостей вищої нервової діяльності, до яких відносять функціональну рухливість, силу та врівноваженість нервових процесів. У дослідженнях [3, 4, 13] представлені дані динаміки їх формування в онтогенезі. На нашу думку, вагомим параметром оцінки індивідуальних відмінностей за властивостями основних нервових процесів може стати і показник швидкості центральної обробки інформації (ЦОІ), який визначається як різниця часу латентних періодів складних сенсомоторних реакцій вибору двох з трьох подразників (РВ₂₋₃) і прихованого часу простих зорово-моторних

реакцій (ПЗМР). Доведено [7] інформативну цінність часу цього показника та його зв'язок з типологічними властивостями у людей зрілого віку. Але нині все більш очевидним стає той факт, що аналіз будь-якого психофізіологічного процесу не буде повним, якщо він проводиться без урахування вікових особливостей. На сьогодні вікова динаміка швидкості ЦОІ та її зв'язок з властивостями основних нервових процесів, в тому числі і функціональною рухливістю, взагалі не вивчена. Логічно припустити, що в усі вікові періоди між швидкісними характеристиками центральної нервової системи, що визначаються за показниками функціональної рухливості нервових процесів (ФРНП) і швидкістю ЦОІ повинен існувати зв'язок.

Мета нашого дослідження – з'ясувати вікову динаміку швидкості ЦОІ та її зв'язок з ФРНП на різних етапах онтогенезу.

МЕТОДИКА

У 360 обстежуваних дітей віком від 7 до 8 років, підлітків – від 11 до 12 та від 15 до 16 років і юнаків віком від 19 до 20 років визначали: швидкість простих (ПЗМР) і складних (РВ₂₋₃) сенсомоторних реакцій, швидкість ЦОІ та ФРНП. На початку обстеження кожному особу індивідуально ознайомлювали з усім комплексом методик. Дотримувалися таких умов: спочатку визначали час ПЗМР, РВ₂₋₃ та розраховували швидкість ЦОІ, потім переходили до визначення рівня ФРНП.

Дослідження простих і складних зорово-моторних реакцій і ФРНП проводили за методикою Макаренка [6] на апаратному комплексі „Діагност-1”. Показники сенсомоторних реакцій визначали досліджуючи латентні періоди ПЗМР, РВ₂₋₃. Обстежуваним необхідно було якнайшвидше реагувати на появу зображення геометричних фігур: коло, трикутник і квадрат, які з’являлися на екрані приладу (по 10 зображень кожного типу), причому порядок їх пред’явлення був випадковим. Дослідження розпочинали з визначення латентного періоду ПЗМР. Слід було при появі на екрані будь-якого подразника швидко натискати і відпускати праву кнопку виносного пульта. Пред’являлося 30 подразників. Час експозиції становив 0,7 с, а тривалість паузи змінювалася за певною програмою, незалежно від швидкості реакції обстежуваного. Далі досліджували латентний період РВ₂₋₃, при визначенні якого обстежуваний повинен був виконувати завдання обома руками. При появі на екрані приладу геометричної фігури “квадрат” потрібно було якнайшвидше натискати та відпускати праву кнопку правою рукою, при появі “кола” – лівою рукою ліву кнопку, тоді як фігура „трикутник” вважався гальмівним подразником і при його появі не слід натискати жодної з кнопок. Експозиція сигналу, їх кількість була така сама, як і в попередньому тесті.

Кількісну характеристику швидкості ЦОІ визначали за різницею часу латентних періодів складних сенсомоторних реакцій у відповідь на комбінацію світлових подразників (РВ₂₋₃) і прихованого часу ПЗМР.

Рівень ФРНП визначали за результатами переробки складної зорової інформації в режимі „нав’язаного ритму”, котра полягала в диференціюванні позитивних і гальмівних подразників (геометричних фігур, як і у разі з РВ₂₋₃). Кількісним показником його був максимальний темп пред’явлення та переробки сигналів, при якому обстежуваний зробив не більше ніж 5,0–5,5 % помилок. Кількість запропонованих тестів збільшувалася від 30 до 150 подразників за хвилину. Чим вищий був темп переробки інформації, тим вищий і рівень ФРНП.

Отриманий статистичний матеріал обробляли за допомогою комп’ютерної програми Microsoft Excell методами кореляційного аналізу та достовірних різниць середніх значень.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз результатів виявив не лише поступове підвищення ФРНП, але і зменшення швидкості ЦОІ (рис. 1). Дослідження ФРНП виявило, що у обстежуваних різного віку індивідуальний показник цієї властивості знаходився в межах від 50 до 150 подразників за хвилину. Як і слід було очікувати, найнижчим цей показник був у дітей 7–8 років і становив у середньому $68,5 \text{ хв}^{-1} \pm 1,8 \text{ хв}^{-1}$. Надалі в усіх вікових групах спостерігалось поступове підвищення ФРНП аж до максимального її значення $112,5 \text{ хв}^{-1} \pm 1,7 \text{ хв}^{-1}$ у 19–20-річному віці (рис. 2).

Очевидно, що зменшення з віком швидкості ЦОІ та підвищення ФРНП можуть бути пояснені гетерохронним дозріванням різних структур мозку, які забезпечують переробку складного розумового навантаження. Відомо, що у дітей відбуваються

помітні зміни у розвитку прецентральної ділянки кори головного мозку, удосконалюються міжцентральної взаємодії, і в 17–20 років завершується функціональне дозрівання асоціативних зон, що регулюють складну рухову активність, з подальшими спряженими морфологічними та функціональними змінами у нейронних мережах кори головного мозку та удосконаленням нервово-м'язового апарату [7, 9, 11].

Ми не знайшли в літературі відомостей про зв'язок між швидкістю ЦОІ та властивістю функціональної рухливості у осіб різного віку. Кореляційний аналіз виявив зв'язок між цими рядами перемінних у всіх вікових групах. Коефіцієнт кореляції між швидкістю ЦОІ і ФРНП в різні вікові періоди був у межах 0,21–0,41 ($P < 0,05$ –0,001). Так, у дітей 7–8 років він становив

0,29 ($P < 0,01$), у підлітків 11–12 років – 0,41 ($P < 0,001$). У підлітків 15–16 років – 0,21 ($P < 0,05$), у юнаків 19–20 років такий зв'язок сягав 0,33 ($P < 0,01$). Уже ці результати, на нашу думку, є експериментальним доказом того, що швидкість ЦОІ зв'язана з ФРНП. Можна вважати, що у більшості випадків чим вищим був її рівень, тим швидше здійснювалася ЦОІ. І, навпаки, низькі значення швидкості ЦОІ частіше зустрічалися у осіб з низьким рівнем ФРНП. На нашу думку, швидкість ЦОІ – це далеко не просто різниці в часі обробки інформації або окремих мозкових операцій, а результат складної інтегративної діяльності мозку за умов швидкої дискримінації ансамблів збудження [12, 17]. У наших дослідженнях наявність кореляції між ФРНП і кількісними критеріями швидкості ЦОІ у всіх вікових

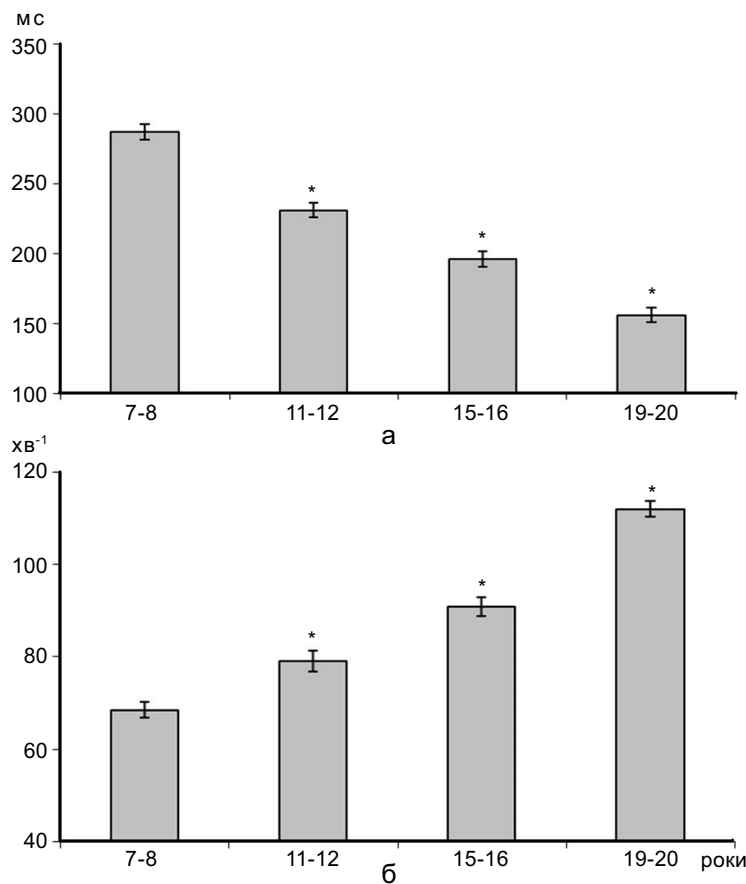


Рис. 1. Вікова динаміка швидкості центральної обробки інформації (а) та рівня функціональної рухливості нервових процесів (б). * $P < 0,05$ між сусідніми віковими періодами

групах свідчить на користь того, що виконання завдання з переробки сенсомоторної інформації з диференціювання позитивних і так званих гальмівних подразників відбувається за умов участі складної аналітико-синтетичної діяльності вищих відділів центральної нервової системи та з відповідним залученням до структурно-функціональної організації мозкової діяльності ФРНП.

Для уточнення результатів кореляції ми провели аналіз достовірності різниць середніх значень швидкості ЦОІ у вікових групах обстежуваних з різним ФРНП. Для цього обстежуваних методом сигмальних відхилень поділили на три групи: з високим, середнім і низьким рівнями ФРНП та порівняли середні значення швидкості ЦОІ.

Результати свідчать про наявність статистично значимих різниць, що спостерігалось у всіх вікових групах (див. рис.2). При цьому у осіб з високим рівнем ФРНП швидкість ЦОІ була достовірно коротшою, ніж у обстежуваних з низьким рівнем цієї властивості ($P < 0,05-0,01$). У групах обстежуваних віком 7–8, 11–12 та 19–20 років достовірні відмінності були між значеннями швидкості ЦОІ у осіб з низьким рівнем ФРНП порівняно з особами з середнім рівнем ($P < 0,05$). А у осіб 15–16 років – поміж груп обстежуваних з високим рівнем

ФРНП порівняно з середнім ($P < 0,05$).

Отже, наявність достовірного кореляційного зв'язку та статистично значимих різниць між значеннями швидкості ЦОІ у вікових групах з різними градаціями ФРНП є експериментальним доказом того, що ці показники пов'язані між собою та мають позитивну вікову динаміку. У результаті інтерпретації отриманих результатів виникає питання: як пояснити такий зв'язок між ФРНП і ЦОІ? Згідно з результатами нашого дослідження, в кожній віковій групі особи з високою функціональною рухливістю швидше обробляли складну інформацію, ніж обстежувані з низьким рівнем досліджуваної типологічної властивості. Тобто, за умов виконання складного розумового навантаження просторово-часова організація мозкової діяльності у осіб з високою ФРНП сягає вищого рівня, ніж у обстежуваних з низькими її градаціями. Це, очевидно, пов'язано із проявом швидкості об'єднання різних функціонально специфічних нервових мереж в одну систему, узгодження часових характеристик окремих нейронів і центрів та синхронізації їх діяльності [2, 15]. Оскільки відомо, що результат на виході функціональної системи визначається ступенем ізохронізму періодів і ритмів збудження фізіологічних субстратів

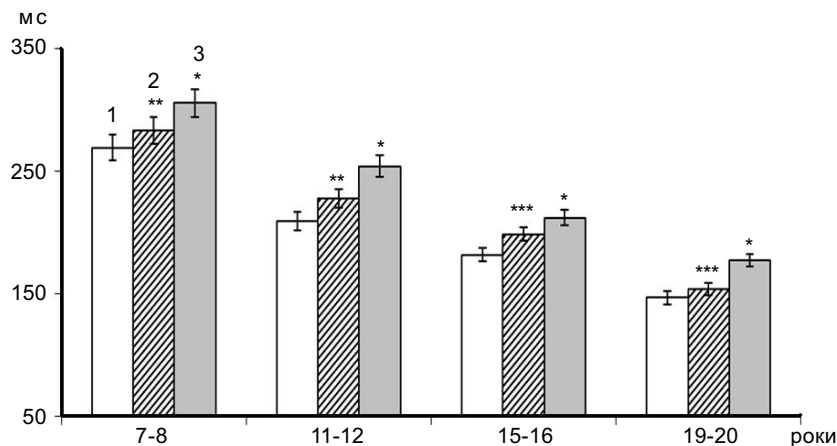


Рис. 2. Швидкість центральної обробки інформації у осіб різного віку з високою (1), середньою (2) та низькою (3) функціональною рухливістю нервових процесів (ФРНП). * $P < 0,05$ між високою та низькою ФРНП у межах одного віку. ** $P < 0,05$ між низькою та середньою ФРНП; *** $P < 0,05$ між високою та середньою ФРНП

[2, 5]. Це положення у фізіології відоме як закон лабільності (рухливості) [1, 8].

Можна припустити, що кожному специфічному сенсомоторному стимулу в корі головного мозку та підкірковому шарі відповідає специфічна просторово-часова мережа збуджених і загальмованих нейронів. Тому високі значення швидкості ЦОІ в наших дослідженнях збігалися з високими значеннями ФРНП, що, слід вважати, може свідчити про високу часову та просторову синхронізацію, когерентність і дискримінаційну здатність декількох різних нейрональних мереж збудження, котрі були активовані в оперативній пам'яті [10, 14, 16].

Крім того, слід зазначити, що швидкість ЦОІ залежить від часу сприйняття сигналу, аналізу, прийняття рішення, передачі його на ефектор і забезпечується складною аналітико-синтетичною діяльністю, специфічними інформаційними механізмами виникнення та припинення нервових процесів, швидкістю їх переміщення по нервовим мережам кори головного мозку [8]. У цьому разі індивідуальні різниці значень швидкості ЦОІ будуть залежати від динамічних властивостей кортикальних структур, тобто цілої працюючої функціональної системи, що визначається ФРНП. Надання ФРНП фізіологічної основи прояву ЦОІ має підстави, оскільки структурно-функціональна організація вищих відділів центральної нервової системи не можлива без участі високо генетично детермінованих властивостей вищої нервової діяльності, до яких відноситься і ФРНП [8].

На основі отриманих результатів можна стверджувати, що кількісні критерії швидкості ЦОІ характеризують індивідуальні відмінності переробки інформації та разом з ФРНП можуть бути індикатором вищих відділів центральної нервової системи.

Важливим результатом нашого дослідження є виявлення високодостовірного зв'язку ФРНП зі швидкістю ЦОІ у всіх вікових групах. На цій основі можна вважати, що у формуванні відповідного

рівня ЦОІ типологічним властивостям вищої нервової діяльності належить вирішальна роль. Тому кількісні критерії ЦОІ у вікових групах дітей, підлітків та юнаків можуть бути використані і для характеристики перебігу низки психофізіологічних функцій в онтогенезі.

ВИСНОВКИ

1. У дітей, підлітків та юнаків швидкісні характеристики ЦОІ та ФРНП поступово підвищуються та сягають максимального рівня у віці 19–20 років.

2. В усіх вікових групах з різними градаціями ФРНП встановлені статистично значимі різниці швидкості ЦОІ, що підтверджується і кореляційним аналізом. Особи з високим рівнем ФРНП характеризуються достовірно вищою швидкістю, ніж обстежувані з низьким та середнім.

3. Швидкість ЦОІ у дітей, підлітків та юнаків характеризує індивідуальні особливості переробки складної інформації і разом з ФРНП може бути використана як інформативний критерій оцінки типологічних властивостей ВНД та низки психофізіологічних функцій, а також поведінкових реакцій.

Н.В. Макаренко, В.С. Лизогуб, Т.В. Кожемяко, Н.П. Черненко

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СКОРОСТИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ИНФОРМАЦИИ У ЛИЦ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПОДВИЖНОСТИ НЕРВНЫХ ПРОЦЕССОВ

У людей в возрасте от 7 и до 20 лет изучали динамику становления скорости центральной обработки информации (ЦОИ) и ее связь с функциональной подвижностью нервных процессов (ФПНП). Выявлено, что у детей, подростков и юношей показатели ЦОИ и ФПНП постепенно повышались и достигали максимального развития в возрасте от 19 до 20 лет. Во всех возрастных группах у обследованных с различным уровнем ФПНП обнаружены статистически значимые различия скорости ЦОИ. Лица с высоким уровнем ФПНП характеризовались достоверно высшими значениями скорости ЦОИ по сравнению с обследованными с низким уровнем. Корреляционный анализ подтвердил эти различия. Установлены общие

возрастные закономерности формирования ЦОИ и ФПНП, что свидетельствует в пользу генетически детерминированной программы их развития. Имеются основания утверждать, что скорость ЦОИ, характеризующая индивидуальные особенности переработки информации, может быть использована в качестве индикатора ФПНП и увеличит возможность анализа экспериментального материала.

Ключевые слова: скорость центральной обработки информации, функциональная подвижность нервных процессов, возрастные особенности, индивидуальные особенности переработки информации.

**M.V. Makarenko, V.S. Lizogub,
T.V. Kozhemyako, N.P. Chernenko**

AGE PECULIARITIES OF THE CENTRAL INFORMATION PROCESSING SPEED AMONG THE PERSONS WITH THE DIFFERENT LEVEL OF THE NERVOUS PROCESSING FUNCTIONAL MOBILITY

The dynamics of the speed formation of the central information processing (CIP) and its connection with functional mobility of nervous processes (FMNP) was investigated among the persons aged 7-20. The indexes of CIP and FMNP among the children, teenagers and youngsters were found to increase gradually and to reach maximum development at the age of 19-20. Statistically significant differences of the CIP speed were found in all age groups of the investigated persons with different levels of FNMP. The persons with high level of FNMP were characterized with reliably high indexes of CIP compared with subjects with the low level of investigated typological properties of high nervous activity (HNA). The correlation proved the reliable relationships between investigated variables. The general age-related conformities in forming CIP and FMNP were established favoring the genetically determined program for development of these nervous system properties. There is a reason to confirm that the index of CIP speed characterizes individual features of information processing and reflects the typological properties of HNA side by side with FMNP.

Key words: speed of the central information processing, functional mobility of nervous processes, age and individual features of information processing.

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

Science-investigation Institution of Cherkassy National University of M. Bosa

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Введенский Н.Е. Возбуждение, торможение и наркоз: Избр. тр. – М., 1952. – Т. 2. – С. 397–412.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Наук.-досл. ін-т фізіології ім. М. Босого Черкаськ. нац. ун-ту
ім. Б.Хмельницького*

2. Иваницкий А.М. Синтез информации в ключевых отделах коры как основа субъективных переживаний // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1997. – 47, вып.2. – С. 209–216.

3. Кравченко О.К. Стан властивостей основних нервових процесів, функції пам'яті та уваги у людей зрілого та похилого віку: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2000. – 19 с.

4. Лизогуб В.С. Онтогенез психофізіологічних функцій людини: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – К., 2001. – 29 с.

5. Ливанов М.Н. Пространственно-временная организация потенциалов и деятельность головного мозга. – М.: Наука, 1989. – 398 с.

6. Макаренко М.В. Методика проведення обстежень та оцінки індивідуальних нейродинамічних властивостей вищої нервової діяльності людини // Фізіол. журн. – 1999. – 45, №4. – С. 123–131.

7. Макаренко М.В., Лизогуб В.С. Швидкість центральної обробки інформації у людей з різними властивостями основних нервових процесів // Там само. – 2007. – 53, №4. – С. 87–91.

8. Макаренко Н.В. Психофизиологические функции человека и операторский труд. – К.: Наук. думка, 1991. – 216 с.

9. Сологуб Е.Б. Корковая регуляция движений человека. – М.: Медицина, 1981. – 184 с.

10. Ухтомский А.А. Физиологический покой и лабильность как биологические факторы / Сб. соч. Т. 2. – Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1951. – С. 123–135.

11. Фарбер Д.А., Корниенко И.А., Соськин В.Д. Физиология школьника. – М.: Педагогика, 1990. – 64 с.

12. Філімонова Н.Б., Куценко Т.В., Макаруч М.Ю. Особливості обробки зорової вербальної та невербальної інформації в оперативній пам'яті людини // Фізика живого. – 2006. – 14, №3. – С. 75–86.

13. Хризман Т.П. Развитие функций мозга ребенка. – Л.: Наука, 1978. – 128 с.

14. Чуприкова Н.И. Психология умственного развития. Принцип дифференциации. – М.: Столетие, 1997. – 480 с.

15. Юхименко Л.І. Психофізіологічні функції людей зрілого віку (18–27 років): Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2003. – 17 с.

16. Burle B., Bonnet M. High-speed memory scanning: a behavioral argument for a serial oscillatory model // Cog. Brain Res. – 2000. – 9. – P. 327–337.

17. Edelman G.M. The remembered present. A biological theory of consciousness. – New-York: Basics Books, 1989. – 346 p.

18. Van der Velde F., Marc de Kamps. A model of visual working memory in // PFC Neurocomputing 52–54, June 2003. – P. 419–424.

19. Vogel E.K., Luck S. Quartering the spotlight: Spatial properties of selective storage in visual working memory // J. Vision. – 2005. – 1(3). – P. 9a.

Матеріал надійшов до редакції 12.04.2010

В.М. Шеверьова

Вплив хронічного емоційного стресу на поведінку в тесті “відкритого поля” щурів із різним рівнем рухової активності

Досліди проводили на 41 щуреві (самці, лінія Вістар) масою 180–220 г. Показано, що за умов тестування у “відкритому полі” тварини різнилися рівнем рухової активності. Незалежно від локомоції досліджувані групи щурів були неоднорідні за критерієм “емоційності” і латентним періодом виходу з центру “поля”. Тривалий нейрогенний стрес виявляв неоднозначний (модульований) вплив на поведінку тварин у тесті “відкритого поля”, яка залежала від їх вихідної активності. У низькоактивних щурів стресування в основному активізувало рухові та пошукові компоненти поведінки на тлі деякого зменшення актів дефекацій. У середньоактивних тварин стресування збільшувало число стійок і посилювало екскреторну функцію, а у високоактивних – зменшувало горизонтальні пересування та знижувало пороги реакцій на електрошкірне больове подразнення, сприяло підвищенню у цих щурів рівня “емоційності”. Спрямованість змін часу виходу з центру “поля” в кожній досліджуваній групі визначалася в основному його вихідними характеристиками і по завершенні періоду стресування мала зворотню залежність. Висловлюється думка, що зміни поведінки тварин у тесті “відкритого поля” за відповідної інтенсивності стресуючих впливів могли бути зумовлені як нейроендокринними зрушеннями, так і стресорним ушкодженням мозкових структур.

Ключові слова: тест “відкритого поля”, рухова активність, хронічний емоційний стрес.

ВСТУП

Дослідження індивідуально-типологічних особливостей поведінки за умов екстремальних впливів нейрогенних чинників є актуальним завданням експериментальної та клінічної нейрофізіології. Серед методів визначення типологічних властивостей поведінки щурів широке застосування знаходить тест “відкритого поля”, який вважається стресовим подразником для тварин [1, 11]. Це дає змогу виявити не тільки індивідуальну реакцію на аверсивні умови відкритого простору, але і на зміни функціонального стану щурів за умов несприятливої дії різноманітних агентів, у тому числі і нейрогенної природи. Дані літератури щодо ефектів стресорних впливів на поведінку у “відкритому полі”

© В.М. Шеверьова

суперечливі, що може бути зумовлено як вибором моделі стресу, показників та режимів стресування, так і індивідуальними особливостями тварин. Урахування індивідуальної реакції на невротизуючі впливи має важливе значення при розробці заходів, спрямованих на попередження стресорних порушень та їх наслідків [17, 27, 29, 30]. Незважаючи на важливість цієї методики, багато питань, що стосуються інтерпретації характеристик поведінки в тесті “відкритого поля”, і дотепер залишаються предметом дискусії. Серед причин, що зумовлюють розбіжності, важливе місце займають генетичні фактори, умови досліду, а також використання авторами різних підходів у пошуку критеріїв індивідуально-типологічних особливостей поведінки

тварин за умов тестування. Існує думка [9], що рухова активність є одним із основних чинників, який визначає різноманітні прояви адаптивної поведінки та стійкість до несприятливих умов навколишнього середовища. Хоча природа спонтанної локомоторної активності та її фізіологічні механізми до цього часу вважаються не встановленими [12], різний рівень рухової активності пов'язують із обміном нейромедіаторів [10], гормонів [1, 3], енергетичними та генетичними факторами [3, 8], взаємовідносинами структур мозку [25], проявами внутрішніх властивостей індивідуума (відповідною потребою у русі) [12] тощо.

Мета нашої роботи – дослідити вплив хронічного нейрогенного стресу на поведінку у “відкритому полі” щурів з різною руховою активністю.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 41 щуреві (самці, лінія Вістар) масою 180–220 г. Для виявлення індивідуальних розбіжностей характеристик поведінки тварин використовували стандартну методику “відкритого поля” [5]. “Поле” являло собою ділянку (1 м²), яка була обмежена по периметру непрозорим бортом висотою 35 см і розділена на 25 рівних квадратів. Джерелом освітлення була лампа напругою 60 Вт, що встановлювали на висоті 1 м над центром “поля”. Тестування у “відкритому полі” проводили у відносно звукоізолюваній камері упродовж 5 хв. Реєстрували горизонтальну та вертикальну (з опорою і без опори на стінку) рухову активність (за числом перетнутих квадратів і стійок), “емоційність” (за числом актів дефекацій і уринацій), реакції умивання та інші види грумінгу (чищення, викушування шерсті та лапок, облизування, почісування), число виходів у центр “поля” (внутрішній і центральний квадрати), латентний період виходу з центру “поля” (центрального

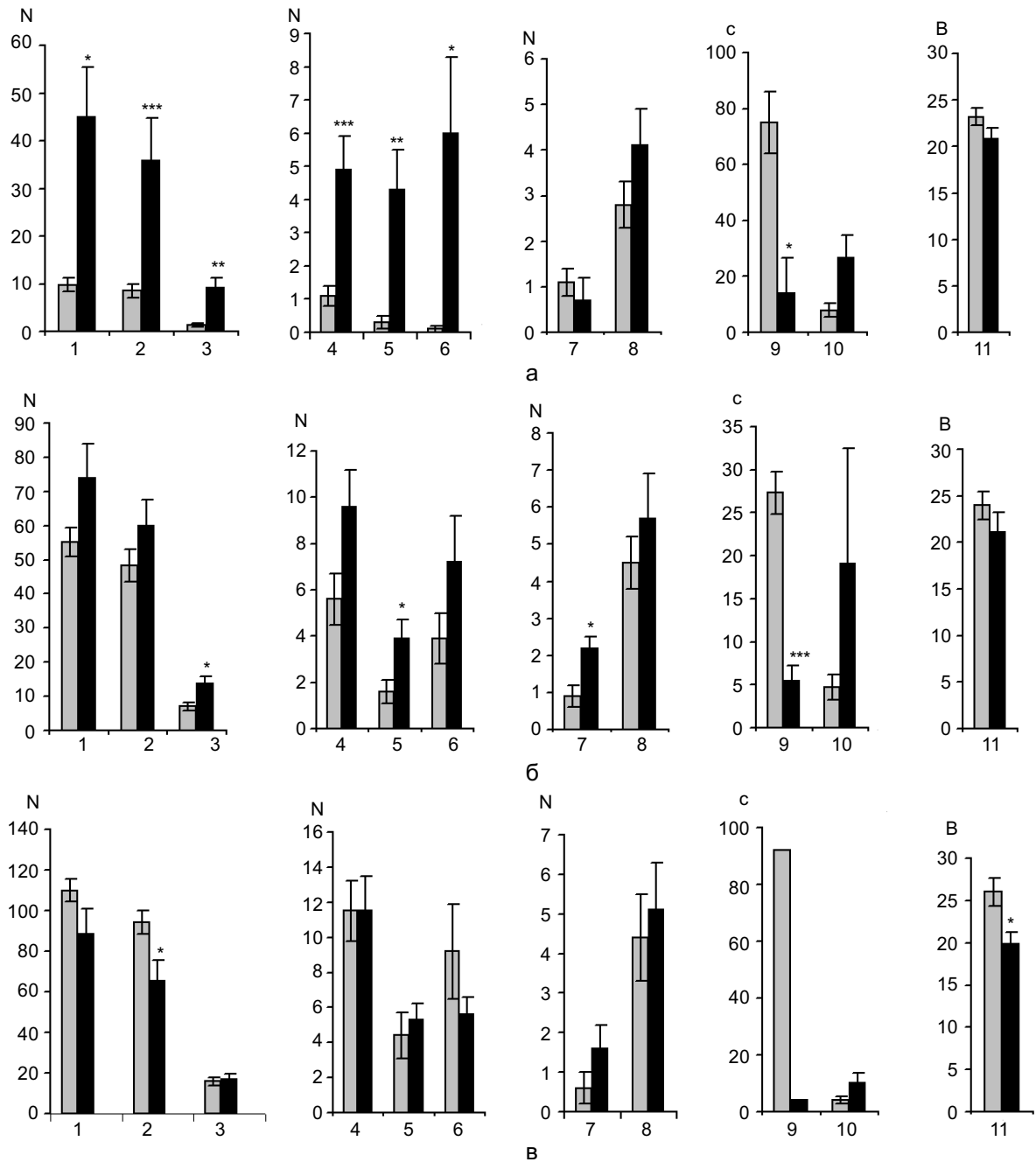
квадрата) на периферію (зовнішні квадрати) на початку тестування. З огляду на сезонні та добові зміни рухової активності, досліди проводили у весняно-літній період у ранкові години з 9.30 до 10.30 [12]. Пороги реакцій щурів на електрошкірне подразнення реєстрували в камері з електрифікованою підлогою. Стрес викликали електростимуляцією кінцівок щурів (тривалість 1 год) у цій самій камері. Використовували синусоїдальний струм частотою 50 Гц. Подразнення наносили за відповідною схемою (тривалість стимуляції та міжстимульного періоду – 10 с). Тривалість стресування 7–8 діб [30]. Параметри подразнення підбирали для кожної тварини індивідуально. Інтенсивність стимуляції помірно перевищувала поріг ноцицепції (про що судили за проявами поведінки). За показниками рухової активності та виходу в центр “поля” всі щури були поділені на 3 групи. До I групи ввійшли тварини з найнижчим рівнем рухливості (мінімальне та максимальне число перетнутих квадратів і стійок 2–23, низькоактивні, n=16, які практично не виходили в центр “поля”). При доборі щурів у II групу враховували початок виходу в центр “поля” (рухова активність цих тварин була вищою, ніж у щурів I групи), а також високий рівень переміщень по периферії без виходу в центр “поля”. Таким чином, у цю групу ввійшли тварини з проміжним рівнем рухової активності (мінімальне та максимальне число перетнутих квадратів і стійок 26–77, середньоактивні, n=14). У щурів III групи рухова активність була найвищою, всі тварини цієї групи виходили в центр “поля” (мінімальне та максимальне число перетнутих квадратів і стійок 84–141, високоактивні, n=11). Незалежно від рухової активності, в кожній досліджуваній групі можна було виділити тварин із різними значеннями латентного періоду виходу з центру “поля”, а також “емоційних” (із дефекацією, уринацією) і “неемоційних”. У III групі була найменша кількість щурів із високими показниками

латентного періоду виходу із центру “поля” та ознаками “емоційності”, до того ж рухова активність у них була найвищою. Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням критеріїв *t* Стьюдента і *T* Вілкоксона (для вибірок, що відрізнялися від нормального розподілу). Коефіцієнти кореляції обчислювали за Спірменом (програма Primer of Biostatistics, Version 4.03).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження поведінки у “відкритому полі” виявило істотні відмінності між групами щурів за загальним числом перетнутих квадратів і стійок ($P < 0,01$), числом перетнутих квадратів ($P < 0,01$), загальним числом стійок з опорою і без опори на стінку ($P < 0,01$) та окремими показниками стійок з опорою ($P < 0,05$) і без опори ($P < 0,05$). Середньоактивні та високоактивні тварини порівняно з низькоактивними істотно різнилися між собою за числом виходів у центр “поля” ($P < 0,02$ та $P < 0,001$ відповідно), а середньоактивні щури порівняно з низькоактивними – за латентним періодом виходу з центру “поля” ($P < 0,02$). Розбіжності між групами за показниками грумінгу, дефекацій та уринацій, порогів реакцій на електрошкірне подразнення були несуттєвими (рисунок). Показано, що пролонгований нейрогенний стрес усіх щурів істотно збільшував число стійок (вихідні значення $7,0 \pm 1,4$; після стресу – $12,7 \pm 1,5$; $P < 0,02$) і більше ніж у 1,5 раза число виходів у центр “поля” й актив дефекації, а також знижував пороги реакцій тварин на електрошкірне подразнення (вихідні значення $25,1 \pm 0,9$; після стресу – $21,6 \pm 1,2$; $P < 0,05$). Обчислення коефіцієнтів кореляції у вихідному стані і за умов стресу виявило тісний позитивний зв’язок між горизонтальною та вертикальною активністю ($r = 0,686$; $P < 0,001$ і $r = 0,857$; $P < 0,001$ відповідно) та відсутність жорсткої зворотної

залежності між руховою активністю (горизонтальною, вертикальною) і латентним періодом виходу щурів із центру “поля” ($r = -0,273$; $P > 0,05$ і $r = -0,310$; $P > 0,05$ відповідно). Тривале стресування неоднозначно впливало на поведінку у “відкритому полі” тварин, які різнилися рівнем рухової активності. Емоційний стрес істотно збільшував рухове збудження (горизонтальну та вертикальну активність, число виходів у центр “поля”) в групі низькоактивних щурів (див. рис.). Проте тільки у половини (у 8) тварин цієї групи показники рухової активності могли сягати вихідного рівня середньо- та високоактивних щурів. У інших низькоактивних тварин зміни рухливості мали різне спрямування, проте загальне число горизонтальних переміщень і стійок у цих щурів залишалося в межах цієї групи. У деяких низькоактивних тварин поява або збільшення актив дефекації не залежали від рухової активності та спостерігалися як у щурів із ознаками гіперактивності, так і у тварин, які демонстрували незначні зміни рівня локомоції. Водночас у більшості “емоційних” щурів цієї групи фізіологічних відправлень по завершенні періоду стресування не було або число актив дефекацій і уринацій зменшувалося. У середньоактивних тварин число горизонтальних переміщень істотно не відрізнялося від вихідних показників. Для щурів цієї групи характерним було істотне збільшення загального числа стійок і стійок без опори на стінку та збільшення майже удвічі відвідувань центру “поля” (див. рис.). На відміну від тварин I групи, кількість “емоційних” щурів (із дефекацією та уринацією) в II групі збільшувалася (на 50 %). У тварин III групи за умов стресу істотно знижувалася горизонтальна активність і зменшувалися відвідування центру “поля” (на 39,1 %) без суттєвих змін показників вертикальної активності (див. рис.). У деяких щурів цієї групи, в тому числі у тварин із найвищим вихідним рівнем



Динаміка поведінки в тесті “відкритого поля” щурів із різним рівнем рухової активності за умов хронічного емоційного стресу: а – низькоактивні; б – середньоактивні; в – високоактивні; 1 – загальне число перетнутих квадратів і стійок; 2 – число перетнутих квадратів; 3 – загальне число стійок; 4 – число стійок із опорою, 5 – без опори на стінку; 6 – число виходів у центр “поля”; 7 – число актів дефекацій і уринацій; 8 – число реакцій грумінгу; 9 – латентний період виходу з центру “поля” у щурів із високими, 10 – низькими його вихідними показниками; 11 – пороги реакцій на електрошкірне подразнення; світлі стовбці – до початку стресу; темні – через 7–8 діб після стресу.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,001$ вірогідність відмінностей зі значеннями до стресу

рухливості та “емоційності”, зменшення горизонтальних пересувань за умов стресу супроводжувалося рясною дефекацією або збільшенням числа болюсів. Інші щури цієї групи залишалися емоційно стабільними у “відкритому полі” і після завершення періоду стресування, проте у деяких із цих тварин число горизонтальних переміщень і стійок різко зменшувалося або щури знаходилися в стані рухової загальмованості. Кількісний аналіз “емоційності” в кожній досліджуваній групі показав, що за умов стресу число болюсів і уринацій у низькоактивних тварин знижувалося майже до вихідного рівня високоактивних щурів, тоді як у високоактивних спостерігався приріст їх показників (на 167 %). За умов стресування екскреторна функція в тесті “відкритого поля” була найбільш виражена у середньоактивних тварин. Частота фізіологічних відправлень у цих щурів істотно підвищувалася і майже в 2,5 раза перевищувала вихідний рівень (див. рис.). Різною мірою виражений приріст реакцій грумінгу в усіх трьох групах (на 46, 26,7 і 15,9 % відповідно) загалом супроводжувався скороченням тривалості умивань. Спрямованість змін латентного періоду виходу із центру “поля” в кожній досліджуваній групі визначалася в основному його вихідними показниками і по завершенні періоду стресування мала зворотну залежність. За умов високих вихідних характеристик часу виходу із центру “поля” його показники при стресі істотно знижувалися в усіх групах. У разі низьких вихідних значень латентного періоду виходу з центру “поля” ці показники підвищувалися у щурів усіх груп, проте найбільш вираженою ця тенденція була у середньо- та високоактивних тварин ($n=7$; $\Delta=3$; $P<0,05$ і $n=9$; $\Delta=6$; $P<0,05$ відповідно; див. рис.). Обчислення коефіцієнтів кореляції між часом виходу із центру “поля” та руховою активністю показало, що стресування значно посилювало зворотну залежність між цими показниками у щурів II та III груп, проте

більш вираженими зміни були в середньоактивних тварин (вихідні значення – $r = -0,187$; $P>0,05$; після стресу – $r = -0,596$; $P<0,05$). Істотне зниження порогів реакцій щурів на електрошкірне подразнення по завершенні періоду стресування спостерігалось лише в групі високоактивних тварин (див. рис.).

Таким чином, дослідження показали, що за умов тестування у “відкритому полі” щури різнилися рівнем рухової активності. Такий висновок узгоджується з літературними даними [14] і з концепцією [9], згідно з якою існує неоднорідність звичної рухової активності людини в різних вікових періодах, що дало змогу виділити три функціональні типи осіб (із низькою, середньою і високою руховою активністю) з властивими їм типологічними характеристиками. Вплив хронічного емоційного стресу на поведінку тварин у тесті “відкритого поля” значною мірою залежав від вихідного рівня їх рухової активності. У низькоактивних щурів нейрогенний стрес впливав переважно на рухові компоненти поведінки (підвищував горизонтальну активність, число стійок і виходів у центр “поля” на тлі деякого зменшення актів дефекації), знижував латентний період виходу із центру “поля” у тварин із високими вихідними його показниками. У середньоактивних щурів стресування істотно збільшувало число стійок і актів дефекації, а у високоактивних – знижувало число горизонтальних переміщень і порогові реакцій тварин на електрошкірне подразнення, посилювало екскреторну функцію, знижувало або підвищувало час виходу із центру “поля”. Такі зміни поведінки в тесті “відкритого поля” свідчили про підвищення емоційної реактивності у середньо- і високоактивних тварин. Вірогідним критерієм “емоційності”, яка зазвичай відображає високий рівень негативного емоційного напруження, більшість авторів вважають дефекацію, інколи – дефекацію і латенцію [10, 11, 23]. Дані літератури щодо зв’язків

рухової активності з “емоційністю” досить суперечливі [11, 23]. Відсутність кореляції між рівнем локомоції та частотою дефекацій у тесті “відкритого поля” дало підставу деяким авторам вважати, що ці показники характеризують різні сторони функції ЦНС – рухові та емоціональні [3]. Тобто серед активних і пасивних особин зустрічаються як “емоційні”, так і “неемоційні”. Зазвичай високу рухливість пов’язували з активністю норадренергічних і дофамінергічних, а низьку – холінергічних і серотонінергічних систем мозку [11, 28]. Рівень “емоційності” позитивно корелював переважно з діяльністю холінергічних і негативно – норадренергічних систем мозку [3, 11]. Низькоактивні щури характеризувалися малим вмістом норадреналіну та дофаміну і високим вмістом продуктів розпаду серотоніну (5-оксиіндолуксусної кислоти) у сенсомоторній корі та голубій плямі, а високоактивні – високим вмістом норадреналіну та дофаміну в голубій плямі та норадреналіну, дофаміну і діоксифенілуксусної кислоти – в сенсомоторній корі [10]. У активних тварин вміст метаболітів дофаміну в стріатумі та активність ферментів обміну медіаторів у сенсомоторній корі, хвостатому ядрі та *n. accumbens* були вищі, ніж у пасивних [6, 22]. Проте деякі автори вважають, що ефективність функціонування ферментативних систем, які визначають енергозабезпечення клітин, добре збалансована у представників різних поведінкових типів [8]. У нормі в низькоактивних (“неемоційних”) щурів вміст катехоламінів у сечі був менший, ніж у високоактивних [3], а вміст катехоламінів у крові низькоактивних і високоактивних менший, ніж у середньоактивних тварин [1]. Стресування підвищувало вміст адреналіну в сечі вегетативно реактивних і норадреналіну у вегетативно малореактивних щурів та адреналіну і норадреналіну у малоактивних тварин майже до вихідного вмісту катехоламінів високоактивних щурів [3]. Так само підвищувався вміст норадре-

наліну у низькоактивних тварин за умов стресу в сенсомоторній корі та голубій плямі [10]. Очевидно, що підвищення рухового збудження у низькоактивних щурів без виражених ознак “емоційності” чи в супроводі уринацій і дефекацій за умов стресу в наших дослідах могло бути пов’язане як із фізіологічною мобілізацією організму, так і зростанням тривожності та емоційної нестабільності, що зазвичай супроводжувалися підвищенням у крові і сечі вмісту норадреналіну та адреналіну відповідно [1, 3, 38]. Високий рівень рухової активності за умов гострого емоційного стресу корелював зі збільшенням у корі та гіпокампі посередників стрес-відповідей, біологічних предикторів занепокоєння і/або депресії [36]. Підвищення локомоції за умов емоційного стресу пояснювали також участю в організації такої поведінки мезолімбічного дофаміну й опіоїдних систем [33]. Щури з низькою руховою та дослідницькою активністю, а також із високою частотою дефекацій і більшою латенцією, тобто з високим рівнем “емоційності”, характеризувалися низькою адаптацією, схильністю до виразок шлунка, ушкоджень сполучної тканини та ендотеліоцитів аорти [3, 10, 27]. У чутливих до стресу “емоційних” тварин (за показниками збільшення маси надниркових залоз, вираженої атрофії тимуса, високого рівня тривожності, рухового збудження тощо) спостерігали підвищений рівень вільнорадикального окиснення в мозку, печінці та міокарді до і після стресу та ультраструктурні зміни в мікроциркуляторному руслі гіпоталамуса і міокарда за умов стресу, підвищувалася активність тирозингідроксилази, що вказувало на посилений обмін катехоламінів у гіпоталамусі та стріатумі [4]. Водночас нечаста дефекація та низький вміст катехоламінів у крові активних і пасивних щурів [1], високий рівень рухових і пошукових реакцій та зниження “емоційності” у пасивних тварин за умов тривалої невротизації дали підставу

деяким авторам зробити висновок про меншу чутливість цих щурів до дії стресуючих агентів порівняно з тваринами, які не сформували домінуючого типу поведінки [23]. Особливості окиснювального метаболізму у щурів із пасивним типом поведінки забезпечували цим тваринам (порівняно з середньоактивними та активними) середній ступінь стійкості і до гіпоксії, і до стресу [21]. З огляду на залежність рухливості в тесті “відкритого поля” від активності дофамінергічної системи, цікавим є той факт, що тривала, але помірна гіпоксія могла сприяти зменшенню негативних проявів хронічного дефіциту церебрального дофаміну [20]. Підвищення рухового збудження та скорочення тривалості грумінгу у “відкритому полі” після одноразової гострої гіпобаричної гіпоксії у щурів із пасивним типом поведінки деякі автори пов’язували з гіпоксичним ушкодженням (дифузною загибеллю нейронів) гіпокампа і неокортекса, яке могло бути спричинене як гострим, так і хронічним стресом [25] і до якого максимально чутливі тварини з пасивним типом поведінки [14]. Відомо, що невротизація призводила до зниження локального кровотоку та ультраструктурних зрушень, характерних для гіпоксичних станів. За цих умов компенсаторне підвищення перекисного окиснення ліпідів порушувало структуру та функцію мембран [25]. Дослідження зони CA1 гіпокампа, яка найбільш чутлива до нестачі кисню та глюкози показало, що короткотривала аноксія–гіпоглікемія призводила до патологічних морфофункціональних змін, а довготривала – до загибелі нейронів [15]. Найбільш виражені дегенеративні зміни за умов “зоосоціального стресу” спостерігалися в гіпокампі [2], а значна роль у розвитку деструктивних змін у цій структурі при тривалому стресі належала кортикостероїдним гормонам [37]. Ушкодження гіпокампа призводило до збільшення всіх показників активності лише у 3-місячних щурів [24]. У дослідженнях Арушанян і

співавт. [2] гіпокампектомія посилювала локомоцію та знижувала тривожність. Отже, морфологічні зміни в новій корі та гіпокампі за умов довготривалого стресу могли порушувати їх специфічну функцію гальмівного впливу на активуючі системи мозку [24]. Не виключено, що за цих умов підвищення рівня рухового збудження і зниження рівня “емоційності” у низькоактивних тварин здійснювалися через вивільнення з-під гальмівного впливу лімбічних утворень (септогіпокампальної системи) активувальних (ретикулярно-неокортикальних) систем мозку [25] або через ушкодження аферентних шляхів, які йшли від гіпоталамуса до лімбічних утворень мозку [31]. З огляду на глибокі зміни в біоелектричній активності лімбіко-неокортикальних структур і емоційній сфері щурів за умов моделювання емоційних порушень [29, 30], особливості поведінки в тесті “відкритого поля” при довготривалому стресі у низькоактивних тварин могли бути наслідком морфологічних зрушень у відповідних відділах нервової системи, що дало би підставу вважати цих щурів найбільш чутливими до емоційного стресу, проте це питання потребує окремого вивчення. Деякі автори чутливість до емоційного стресу намагалися прогнозувати за орієнтувально-дослідницькою поведінкою, за розподілом біогенних амінів у різних структурах мозку, вмістом у гіпоталамусі деяких олігопептидів тощо [8, 10, 23, 27]. Існує думка [6], що оцінка будь-якого поведінкового акту потребує комплексу біохімічних і, очевидно, морфологічних показників з урахуванням “емоційності”, рухової активності, а також інтенсивності та тривалості стресорних навантажень [8]. Окрім того вважають, що, зокрема, генетично зумовлена стійкість до стресорних ушкоджень є не універсальною, а специфічною для різних систем організму, оскільки шури лінії Вістар, які більш стійкі до ушкоджень серцево-судинної системи, менш витривалі

до стресорних ушкоджень шлунка та порушень патернів поведінки, ніж щури інших ліній (лінія Август) [19, 27]. Відомо, що хірургічне видалення гіпокампа та прилеглого неокортекса, а також посилення адренергічних впливів сприяло скороченню тривалості грумінгу [13]. Збільшення частоти грумінгу за умов стресу розглядали як один із компонентів активно-оборонної [26] або як показник “зміщеної” поведінки [1]. Отже, особливості поведінки низькоактивних тварин у тесті “відкритого поля” за умов тривалих стресових впливів (збільшення локомоції, стійок, виходів у центр “поля” на тлі зменшення активів дефекації) могли бути зумовлені як перебудовами в системах нейромедіаторного та гормонального контролю поведінки, так і стресорним ушкодженням мозкових структур.

Відомо, що особини з середнім рівнем рухової активності відрізнялися значною неоднорідністю популяції, зокрема, за стійкістю до гіпоксії [14] або розглядалися як тварини, котрі найбільш чутливі до стресу, на відміну від щурів крайніх типів поведінки [1, 21, 23]. Матрицею збудженого стану зазвичай вважали локомоцію та стійки з опорою на стінку. Вертикальну активність розглядали також як спробу до втечі, як один із прикладів оборонної мотивації. Часті переміщення деяких тварин цієї групи по периферії з униканням центру “поля” (страх відкритого простору) у вихідному стані, виражена тенденція до підвищення латентного періоду виходу із центру “поля” у щурів із низькими вихідними його показниками за умов стресу та збільшення стійок або стійок і активів дефекації, а також збільшення активів дефекації на тлі зниження або підвищення рухового збудження вказували на розвиток у них гострого емоційно-стресового стану (реакції страху, “емоційної тривожності”, рухового неспокою) та посилене реагування щурів на більш слабкий подразник (“відкрите поле”) порівняно з передуючим йому тривалим періодом стресування [1, 16, 23].

Таку поведінку зазвичай вважали характерною ознакою розвитку слабкості нервових процесів [1, 23], що вказувало на понижену резистентність тварин до довготривалого стресу.

Показано, що щури з високою вихідною руховою та дослідницькою активністю, високим порогом больової чутливості, коротким періодом латенції і низькими темпами дефекації були більш стійкими до стресу [10, 17, 23, 27]. Відомо також, що норадренергічні системи мозку, особливо гіпоталамуса, залучають у механізми стресорних реакцій симпатoadреналову систему, надмірне напруження якої призводило до патологічних змін вищої нервової діяльності та формуванню захисних (оборонних) типів поведінки [29, 30, 34, 35]. Очевидно, що істотне зниження горизонтальних переміщень, які зазвичай пов’язували з активно-оборонною поведінкою, та виражена у більшості високоактивних щурів тенденція до підвищення латентного періоду виходу із центру “поля” за умов ситуації, яка унеможливлювала уникнення довготривалого стресу, могли бути наслідком перенапруження та зриву “вищої нервової діяльності” [3]. Зниження в цілому рухової активності та збільшення активів дефекації та вмісту катехоламінів у крові за умов впливу різноманітних стресуючих агентів [1, 38] вказували на посилення у тварин негативної реакції на стресуючий подразник (“відкрите поле”). У високоактивних “емоційних” щурів із підвищеним вихідним вмістом адреналіну в сечі нанесення електрошкірного подразнення могло спричинювати різке зменшення вмісту гормону, що свідчило про зниження у цих тварин тону адренергічних механізмів [3]. Ослаблення вказаних механізмів призводило до зменшення загального та психічного тону організму і розвитку рухової загальмованості [1, 23, 32]. Порушення катехоламінергічної іннервації переднього мозку через уведення 6-оксидофаміну збільшувало латентний

період виходу щурів із центру “поля” [18], знижувало рухову та пошукову активність і підвищувало число болюсів у групі тварин, стійких до акустичного стресу [7]. Головним чинником у розвитку дефіциту поведінки деякі автори вважали зниження вмісту дофаміну [28]. Зменшення вмісту дофаміну після іммобілізаційного стресу відмічали в голубій плямі та сенсомоторній корі щурів лінії Вістар із високим вихідним рівнем рухової активності [10]. Водночас активація дофамінергічного субстрату стріатума полегшувала емоційні реакції негативного характеру та агресивність [4]. Зниження рухливості в тесті “відкритого поля”, ймовірно, спричинялося також гострою гіпоксією, яка вважається одним із потужних стресових факторів [16]. У гіпокампі нетривала киснево-глюкозна депривація індукувала довготривалу потенціацію синаптичної передачі, що в разі пролонгованої дії призводило до гіперзбудження [15]. Відомо, що за умов довготривалого емоційного стресу високий рівень негативного емоційного напруження та перенапруження супроводжувався розвитком у гіпокампі гіперсинхронного ритму або стійкої депресії біопотенціалів [29, 30], а надмірна активація цієї структури призводила до дизритмії та різкого зниження нічної рухливості тварин [2]. Зниження горизонтальних переміщень поряд із тенденцією до підвищення латентного періоду виходу із центру “поля”, зниження порогів реакцій на електрошкірне больове подразнення та збільшення у деяких високоактивних щурів вегетативної реактивності в тесті “відкритого поля” за умов довготривалої стресової ситуації в наших дослідках вказували на початок переходу цих тварин до пасивно-оборонного типу поведінки та про зміну їх нейромедіаторного і гормонального балансу. Свідченням дещо більшої стійкості цих тварин до довготривалого стресу в наших дослідках (переважно за рахунок емоційно стабільних), очевидно, слід вважати меншу вираженість післястресорних

змін поведінки у тесті “відкритого поля”. Разом з тим з огляду на дані літератури та результати наших досліджень, ймовірно, що перебудови в системах нейромедіаторної та гуморально-гормональної регуляції, а також морфологічні зміни в структурах мозку щурів із різними індивідуально-типологічними характеристиками за умов моделювання емоційних порушень [29, 30] призводили до змін у взаємовідносинах різних відділів ЦНС та утворень мозку і визначали симптоматику психоневрологічних і соматовегетативних зрушень, що знаходило своє відображення в різних проявах індивідуальної поведінки тварин у тесті “відкритого поля” [25].

Наші результати узгоджуються з роботами [12] щодо існування тісного позитивного зв'язку між горизонтальною та вертикальною активністю в тесті “відкритого поля” за умов і “безстресової”, і “стресової” ситуації. З одного боку, відсутність тісного зворотного зв'язку між руховою активністю і часом виходу щурів із центру “поля” за результатами сумісного дослідження всіх груп незалежно від умов досліду (вихідного стану, стресу), а з іншого – наявність цих зв'язків у деяких тварин за умов стресу, свідчили про існування відносної незалежності між вказаними характеристиками поведінки.

Отже, тестовані у “відкритому полі” щури різнилися рівнем рухової активності. Незалежно від локомоції всі тварини якоюсь мірою були неоднорідні за критеріями “емоційності” і латентного періоду виходу із центру “поля”. Незалежно від умов досліду (вихідного стану, стресу) тестування у “відкритому полі” виявило вірогідний позитивний зв'язок між горизонтальною та вертикальною активністю і відсутність жорсткої зворотної залежності між руховою активністю (горизонтальною, вертикальною) та латентним періодом виходу щурів із центру “поля”. Хронічний нейрогенний стрес виявляв неоднозначний (модульований) вплив на поведінку тварин у тесті

“відкритого поля”, залежну від їх вихідної рухової активності. За умов довготривалої стресової ситуації у низькоактивних шурів загалом активізувалися рухові та пошукові компоненти поведінки (підвищувалася горизонтальна та вертикальна активність, збільшувалося число виходів у центр “поля”) на тлі деякого зменшення актів дефекації. Тривалий стрес збільшував число стійок і актів дефекації у середньоактивних тварин і знижував горизонтальні переміщення та пороги реакцій на електрошкірне подразнення у високоактивних шурів разом із зміщенням у них вегетативного балансу в бік посилення екскреторної функції. Спрямованість змін латентного періоду виходу з центру “поля” в кожній досліджуваній групі визначалася загалом його вихідними показниками і на піку дії стресу мала зворотну залежність. З огляду на дані літератури та результати власних досліджень, можна припустити, що зміни характеристик поведінки шурів у тесті “відкритого поля” за відповідної інтенсивності стресуючих впливів могли бути зумовлені як нейроендокринними зрушеннями, так і стресорним ушкодженням мозкових структур.

В.М. Шеверёва

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА НА ПОВЕДЕНИЕ В ТЕСТЕ “ОТКРЫТОГО ПОЛЯ” КРЫС С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Опыты проводили на 41 животном (крысы-самцы, линия Вистар) массой 180–220 г. Показано, что тестируемые в “открытом поле” животные различались уровнем двигательной активности. Независимо от уровня локомоции, исследуемые группы крыс были неоднородны по критерию “эмоциональности” и латентному периоду выхода с центра “поля”. Длительный нейрогенный стресс оказывал неоднозначное (модулирующее) влияние на поведение животных в тесте “открытого поля”, зависящее от их исходного уровня активности. У низкоактивных крыс стрессирование в основном активизировало двигательнопойсковые компоненты поведения на фоне некоторого уменьшения актов дефекации. У среднеактивных животных

стрессирование увеличивало число стоек и усиливало экскреторную функцию, а у высокоактивных – уменьшало горизонтальные перемещения и снижало пороги реакций на электрокожное раздражение, способствовало повышению у этих крыс уровня “эмоциональности”. Направленность изменений времени выхода с центра “поля” в каждой тестируемой группе определялась в основном его исходными характеристиками и на пике действия стресса имела обратную зависимость. Предполагается, что изменения поведения животных в тесте “открытого поля” при соответствующих интенсивностях стрессирующих воздействий могли быть обусловлены как нейро-эндокринными сдвигами, так и стрессорным повреждением мозговых структур.

Ключевые слова: тест “открытого поля”, двигательная активность, хронический эмоциональный стресс.

V.M. Shevereva

INFLUENCE OF CHRONICAL EMOTIONAL STRESS ON THE BEHAVIOUR IN “OPEN FIELD” OF RATS WITH DIFFERENT LEVEL OF MOTIONAL ACTIVITY

Experiments were carried out on 41 Wistar male rats with body weight of 180 - 200 g. It was shown that in ‘open field’ the rats differed in the level of motional activity. Independently from level of locomotion investigated groups of rats were dissimilar at the criteria for “emotionality” and latent period of go out from the centre of “field”. Prolonged neurogen stress rendered various (modulating) influence on the behaviour of the rats in ‘open field’ that was depended from their start level of activity. In the lowactive rats stress in the main activated the motional and searching components of behaviour against a background of some decrease of the acts of defecation. In the meanactive rats stress increased the frequency of rearing and strengthened excretion function and in the highactive of rats stress reduced the quantity of horizontal moving and lowered the thresholds of reactions of rats on the skin electrical stimulation, facilitated increase in these of rats the level of “emotionality”. Direction of changes of the time go out from the centre of “field” in each tested group basically depended by its start indexes and on peak of stress action had reverse dependence. It is supposed that changes of behaviour of rats in the “open field” under corresponding intensity of stress may be caused as by neuroendocrine changes as by stress damage of brain structures.

Key words: “open field” test, motional activity, chronical emotional stress.

Research Institute of Biology, V.N. Karazin Kharkov National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Айрапетянц М.Г., Хоничева И.М., Мехедова А.Я. Реакции на умеренные функциональные нагрузки

- у крыс с индивидуальными особенностями поведения // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1980. – **30**, вып. 5. – С. 994–1062.
2. Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. Место гиппокампа в биоритмологической организации поведения // Успехи физиол. наук. – 2001. – **32**, № 1. – С. 79–95.
 3. Бенешова О. Генетически обусловленная изменчивость поведения у крыс и ее биохимические корреляты // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1978. – **28**, вып. 2. – С. 314–321.
 4. Бондаренко Н. А., Девяткина Т.А., Воскресенский О.Н. Влияние хронического эмоционального стресса на состояние перекисного окисления липидов в тканях и крови эмоциональных и неэмоциональных крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1995. – **100**, № 7. – С. 12–14.
 5. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высш. шк. – 1991. – 299 с.
 6. Герштейн Л.М., Камышева А.С., Чеботарева Т.Л. Морфохимическая характеристика мозга крыс линии Вистар, различающихся по локомоторной активности в открытом поле // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1991. – **41**, вып. 2. – С. 300–304.
 7. Гасанов Г.Г., Исмаилова Х.Ю., Громова Е.А. Роль катехоламинергической иннервации фронтальной области неокортекса в регуляции поведения крыс с различной устойчивостью к акустическому стрессу // Там же. – 1995. – 45, вып. 5. – С. 1007–1013.
 8. Гуляева Н.В., Степанычев М.Ю. Биохимические корреляты индивидуально-типологических особенностей поведения крыс // Там же. – 1997, вып. 2. – С. 329 – 338.
 9. Колпаков В.В., Беспалова Т.В., Брагина А.В. Концепция типологической вариабельности физиологической индивидуальности. Сообщение 1. Внутрипопуляционное разнообразие привычной двигательной активности человека и ее типовая оценка // Физиология человека. – 2008. – **34**, № 4. – С. 121–132.
 10. Коплик Е.В., Салиева Р.М., Горбунова А.В. Тест открытого поля как прогностический критерий к эмоциональному стрессу у крыс линии Вистар // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1995. – **45**, № 4. – С. 775–781.
 11. Кулагин Д.А., Болондинский В.К. Нейрохимические аспекты эмоциональной реактивности и двигательной активности крыс в новой обстановке // Успехи физиол. наук. – 1986. – **17**, № 1. – С. 92–108.
 12. Куликов В.П. Индивидуальные особенности спонтанной локомоторной активности и адаптивное поведение крыс // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1990. – **40**, вып. 1. – С. 85–92.
 13. Лепехина Л.М. Влияние резерпина на параметры груминга крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1993. – **115**, № 1. – С. 10–11.
 14. Ливанова Л.М., Айрапетянц М.Г., Германова Э.Л. Долгосрочное влияние однократной острой гипоксии на поведение крыс с разными типологическими особенностями // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1993. – **43**, вып. 1. – С. 157–164.
 15. Лушнікова І. В. Морфологічна пластичність клітин зони СА1 гіпокампа in vitro в умовах короткотривалої аноксії-гіпоглікемії та подальшої реоксигенації // Фізіол. журн. – 2009. – **55**, № 3. – С. 109–117.
 16. Новиков В.Е., Арбаева М.В., Парфенов Э.А. Влияние антигипоксанта Q226 на поведение мышей в “открытом поле” // Психофармакология и биол. наркология. – 2005. – **5**, вып. 3. – С. 979–983.
 17. Петров В.И., Григорьев И.А., Афименко В.Л. Прогнозирование устойчивости крыс к эмоциональному стрессу // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1996. – **46**, вып. 6. – С. 1119–1121.
 18. Подклетнова И.М., Алхо Х.Е. Повреждение катехоламинергической системы обуславливает замедление формирования ранних поведенческих реакций у крыс // Там же. – 1995. – **45**, вып. 5. – С. 1023–1027.
 19. Пшеничкова М.Г., Бондаренко Н.А., Шимкович М.В. Различия в поведении и устойчивости к язвенному поражению желудка при стрессе у крыс линии Август и Вистар, адаптированных и неадаптированных к гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1999. – **128**, № 12. – С. 638–641.
 20. Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Олешко М.М. Система оксиду азоту за умов хронічного дефіциту церебрального дофаміну та гіпоксії // Фізіол. журн. – 1999. – **45**, № 1–2. – С. 16–25.
 21. Саркисова К.Ю., Коломейцева И.А. Индивидуальные различия в реакциях на острый стресс, связанные с типом поведения. Устойчивость (предрасположенность) к нарушениям поведения и сна // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1993. – **116**, № 8. – С. 130–132.
 22. Саульская Н.Б. Влияние невротизации на метаболизм дофамина мозга крыс с различной активностью в тесте “открытое поле” // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1989. – **75**, № 3. – С. 397–400.
 23. Семагин В.Н., Зухарь А.В., Куликов М.А. Тип нервной системы, стрессоустойчивость и репродуктивная функция. – М.: Наука, 1988. – 133 с.
 24. Семенова Т.П. Возрастные особенности адаптивного поведения гиппокампактированных крыс. – В кн.: Механизмы адаптивного поведения. – Л.: Наука, 1986. – С. 54–57.
 25. Симонов П.В. Мотивированный мозг. – М.: Наука, 1987. – 266 с.
 26. Стрекалова Т.В. Изменение оборонительной реакции у крыс под влиянием пептида, вызывающего дельта-сон // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1995. – **45**, вып. 3. – С. 593–595.

27. Судаков К.В. Индивидуальность эмоционального стресса // Общие вопр. неврологии и психиатрии. – 2005. – **105**, № 2. – С. 4–12.
28. Шаповалова К.Б., Горбачевская А.И., Саульская Н.Б. Структурная организация и нейрохимические механизмы участия прилежащего ядра во взаимодействии лимбической и моторной систем и в регуляции двигательного поведения // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1992. – **42**, вып. 2. – С. 226–276.
29. Шеверева В.М. Особенности формирования и обратимости эмоциональных нарушений у крыс при нейрогенном стрессе // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2003. – **35**, № 2. – С. 147–158.
30. Шеверьова В.М. Нейрофізіологічні ефекти β-блокатора обзидану за умов моделювання емоційного стресу // Фізіол. журн. – 1997. – **43**, № 1–2. – С.31–39.
31. Ширяева Н.В., Вайдо А.И., Лопатина Н.Г. Влияние невротизации спустя длительные сроки после ее окончания на поведение крыс, различающихся по возбудимости нервной системы // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1996. – **46**, вып. 1. – С. 157–162.
32. Berman R.M, Narasimhan M., Miller H.L, Anand A. Transient depressive relapse induced by catecholamine depletion: potential phenotypic vulnerability marker? // Arch. Gen. Psychiatry. – 1999. – **56**, № 5. – P. 395–440.
33. Buisman-Pijlman Femke T.A., Herremans A.H.J., Van De Kieft J., Kruse C.G., Van Ree J.M. Behavioural changes after different stress paradigms: Prepulse inhibition increased after physical but not emotional stress // Europ. Neuropsychopharmacol. – 2003. – **13**, № 5. – P. 369–380.
34. Chrousos G.P., Gold P.W. The concepts of stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis // J. Amer. Med. Assoc. – 1992. – **267**. – P. 1244–1252.
35. Craig W. Berridge. Noradrenergic modulation of arousal // Brain Res. Rev. – 2008. – **58**, № 1. – P. 1–17.
36. Huanhuan Li, Wenjuan Lin, Junfa Li. The effects of acute emotional stressor on behavior and phosphorylation levels of neurogranin in rats // Acta Psychol. Sinica. – 2006. – **38**, № 4. – P. 576–582.
37. Sapolsky R. Glucocorticoids, hippocampal damage and glutamatergic synapse // Prog. Brain Res. – 1999. – **86**. – P. 13–23.
38. Weyersa Peter, Bowerd David B., Vogelb Wolfgang H. Relationships of plasma catecholamines to open-field behavior after inescapable shock // Neuropsychobiol. – 1989. – **22**, № 2. – P. 108–116.

Харків.нац. ун-т ім. В.Н. Каразіна М-ва освіти та науки України
E-mail: shevereva@mail.univer.kharkov.ua

Матеріал надійшов до редакції 02.12.2009

ПАМ'ЯТНІ ДАТИ



**Пам'яті
Ірини Миколаївни Алексєєвої**

На 77-му році життя, 9 лютого 2011 р. відійшла від нас знана і шанована людина, завідувач відділу імунології і цитотоксичних сироваток, доктор біологічних наук, лауреат премії ім. О.О.Богомольця Ірина Миколаївна Алексєєва.

Народилася Ірина Миколаївна 25 червня 1934 р. в місті Радомишлі Житомирської області в сім'ї військового лікаря. В 1957 р. закінчила біологічний факультет Київського державного університету імені Тараса Шевченка. Все її подальше наукове життя було пов'язане з Інститутом фізіології імені О.О.Богомольці НАН України, де вона пройшла шлях від лаборанта до завідувача відділу. У 1959–1961 рр. Ірина Миколаївна навчалася в аспірантурі, її науковим керівником був відомий вчений, талановитий дослідник, професор Ю.О. Спасокукоцький. У 1963 р. вона захистила кандидатську, а у 1981 – докторську дисерта-

цію на тему: „Механизмы нарушения и восстановления функций печени противопеченочными антителами”. Основні напрямки наукової діяльності І.М.Алексєєвої пов'язані з визначенням ролі печінки в імунній реактивності організму та з вивченням імунних механізмів ураження печінки різного генезу із залученням ендогенних регуляторів та програмованої клітинної загибелі. Більше як 50 років Ірина Миколаївна працювала в одному відділі, а з 1988 р. була його завідувачем. Вона була талановитим керівником, користувалася великим авторитетом, її поважали за чуйність і людяність, чесність, порядність і принциповість.

Ірина Миколаївна Алексєєва – визнаний спеціаліст у галузі патофізіології печінки та імунної системи, вона є автором понад 200 наукових праць, у тому числі двох монографій: „Противопеченочные антитела и функции печени”; „Печень и иммунологическая реактивность”. І.М.Алексєєва була членом редколегії „Фізіологічного журналу”, членом правління Українського товариства патофізіологів, членом Спеціалізованої вченої ради при Національному медичному університеті ім. О.О. Богомольця. Вона брала активну участь у вітчизняних і міжнародних наукових форумах, останні роки була постійним керівником секції імунології на з'їздах Українського фізіологічного товариства.

Водночас з активною науковою діяльністю Ірина Миколаївна приділяла багато уваги, сил і енергії громадській роботі, тричі обиралася депутатом Київської міської ради (1982–1990 рр.), де очолювала комісію з охорони здоров'я і соціального захисту, від усього серця намагалася допомагати людям.

Як наставник Ірина Миколаївна дала путівку в наукове життя багатьом своїм учням, котрі безмежно вдячні їй. Вона

завжди раділа успіхам своїх учнів, опікувалася їх подальшим науковим шляхом. Серед них – 12 кандидатів і 1 доктор наук, які успішно працюють на наукових теренах України та за її межами.

За творчий внесок у вітчизняну науку та сумлінну наукову, педагогічну і громадську діяльність Ірину Миколаївну було нагороджено медаллю „За працю і звитягу”, Почесними грамотами Академії наук

та Кабінету міністрів України.

Низький уклін Вам, Ірино Миколаївно, за Ваше життя і зроблені справи. Ваша нетлінна наукова спадщина буде всім нам за дороговказ до натхненної праці на тернистій стежині науки.

Світлу пам'ять про Ірину Миколаївну Алексееву, визнаного вченого, високопорядну, чуйну, доброзичливу людину ми назавжди збережемо в наших серцях.

CONTENTS

K.I. Kuznetsov, V.Yu. Maslov, S.A. Fedulova, N.S. Veselovsky. Calcium signals induced by tonic firing in the rat eye retinal ganglion cells	3
A.I. Bondarenko, V.F. Sagach. An inhibitor of mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ -exchanger CGP37157 produces endothelial cell depolarization with membrane potential oscillations	9
E.V. Isaeva, D.S. Isaev. Anaesthetic and postanaesthetic effect of isoflurane on the multiple-unit activity of the immature rat hippocampus	17
P.I. Yanchuk, T.P. Prikhodko, O.M. Pasichnichenko, A.A. Terekhov, V.O. Tsybenko. Mechanisms of contractile action of acetylcholine on hepatic veins	21
B.V. Donskoy, V.P. Chernyshov, D.V. Osypchuk. The immunophenotypic characteristics of two functionally different NK cell's subpopulations in peripheral human blood	29
M. E. Barinova, V.N. Yelsky, E.F. Barinov, O.N. Sulayeva. Functional activity of monocytes and the mechanisms and intracellular regulation of inos during wound process	36
N.V. Bogdanovskaya, A.V. Kotsuruba, N.V. Malikov. The features arginine exchange and nitric oxide synthesis in youths under adaptation to physical stress in training and competitive periods	45
R.B. Strutynskiy, R.A. Rovenets, A.P. Neshcheret, L.V. Tumanovska, A.A. Moibenko. Changes of cardiohemodynamic during pharmacological preconditioning caused intragastric introduction of medicinal form of opener of K _{ATP} channels flocalin.	55
O.I. Tsyryuk. The ways of correction of negative influence of long-term hypergastrinemia on gastric acid secretion	66
A.A. Shuprovich, N.M. Gurina, O.V. Korpacheva-Zinych. Disorders of uric acid metabolism in rats with fructose- induced experimental insulin resistance syndrome	72
E.V. Gura, E.V. Bagatskaya, Yu.P. Limansky. Analgesia evoked by combined effect of corvutin and low-intensity microwaves at mice with different genetic strains with somatic pain	82
M.V. Makarenko, V.S. Lizogub, T.V. Kozhemyako, N.P. Chernenko. Age Peculiarities of the Central Information Processing Speed among the Persons with the Different Level of the Nervous Processing Functional Mobility	88
V.M. Shevereva. Influence of chronical emotional stress on the behaviour in "open field" of rats with different level of motional activity	94