

# Фізіологічний журнал

ТОМ 57 № 6 2011

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

## Зміст

- Струтинська Н.А., Семенихіна О.М., Чорна С.В., Вавілова Г.Л., Сагач В.Ф.*  
Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкриття мітохондріальної пори  
у серці дорослих і старих щурів . . . . . 3
- Падурару О.М., Філіппов І.Б., Болдирев О.І., Владимірова І.А., Найдьонов В.Г.,  
Шуба Я.М.* Уротелійзалежна дія ментолу  
на скорочення гладеньких м'язів сечового міхура . . . . . 15
- Несвітайлова К.В., Гончар О.О., Древицька Т.І., Арабська Л.П., Стешенко М.М.,  
Бакуновський О.М., Серебровська Т.В., Маньковська І.М.* Зміни експресії мРНК  
і білків антиоксидантних ферментів у лейкоцитах крові дітей, хворих  
на бронхіальну астму, при інтервальному гіпоксичному тренуванні . . . . . 23
- Сукач В.А., Бута А.З., Максимюк О.П., Ковальський Д.Б., Вовк М.В., Кришталь О.О.*  
Новітні блокатори рН-чутливих іонних каналів (3-карбоксамідино-2-оксо-2Н-  
хромен-7-ІЛ)-4-гуанідинобензоати . . . . . 31
- Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Сагач В.Ф.* Застосування геніпіну – інгібітора  
роз'єднувальних білків – пригнічує захисний ефект  
ішемічного прекодиціювання . . . . . 38
- Коркушко О.В., Асанов Е.О., Діба І.А.* Вплив позитивного тиску на видиху  
на газообмін у легенях людей похилого віку з прискореним старінням . . . . . 46
- Климюк О.В., Бондзик О.В., Решетнік Є.М., Весельський С.П., Макарчук М.Ю.*  
Особливості жовчоутворення у щурів різної статі за дії естрогену . . . . . 52
- Ткачук О.В.* Вплив стрептозотоніндукованого діабету та неповної глобальної ішемії  
мозку на апоптоз у тимусі щурів . . . . . 58
- Березовський В.Я., Заморська Т.М., Літовка І.Г.* Вплив нормобаричної гіпероксії  
на показники метаболізму кісткової тканини . . . . . 65
- Гуніна Л.М.* Вплив сукцинату натрію на еритроцити за окисного стресу при фізичних  
навантаженнях . . . . . 71

<i>Манько А.М., Берегова Т.В., Непорада К.С., Янковський Д.С.</i> Вплив мультипробіотика симбітеру ацидофільного на патологічні зміни у кістковій тканині пародонта при гіпоацидності . . . . .	80
<i>Панченко О.А., Оніщенко В.О., Лях Ю.Є.</i> Реакція поверхневої та внутрішньої температури тіла людини під впливом екстремального охолодження . . . . .	85
<i>Богданова Л.М., Матішева С.К.</i> Особливості електрокардіограми у самиць чорноморських дельфінів афалін ( <i>Tursiops truncatus</i> ) . . . . .	93
<b>ОГЛЯДИ</b>	
<i>Чекман І.С., Сімонов П.В.</i> Структура та функція біомембран: вплив наночастинок . . .	99
<b>ІСТОРІЯ НАУК</b>	
<i>Мойбенко О.О., Досенко В.Є., Гур'янова В.Л.</i> Науковий портрет Никанора Адамовича Тржаска-Хржонцевського (до 175-річчя від дня народження першого патофізіолога України) . . . . .	118

Н.А. Струтинська, О.М. Семенихіна, С.В. Чорна, Г. Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

## Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці дорослих і старих щурів

У дослідях *in vivo* та *in vitro* на мітохондріях, ізольованих із тканини серця дорослих і старих щурів, досліджували вплив донора сірководню – NaHS, а також субстрату його біосинтезу – L-цистеїну, на чутливість мітохондріальної пори (МП) до дії її природного індуктора  $Ca^{2+}$ . Встановлена концентраційна залежність впливу NaHS ( $10^{-12}$ – $10^{-4}$  моль/л) на набухання мітохондрій серця щурів. Показано, що у безкальцієвому середовищі за умов дії донора сірководню в межах концентрацій  $10^{-12}$ – $10^{-8}$  моль/л відбувалося помірне набухання мітохондрій серця щурів. NaHS у концентрації  $10^{-10}$  моль/л спричиняв набухання мітохондрій, зміна максимальної величини ( $\Delta$ ) якого становила 11 та 15 % у дорослих та старих щурів відповідно. Інгібітор мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів ( $K_{ATP}$ -каналів) 5-гідроксидекааноат ( $10^{-4}$  моль/л) зменшував набухання мітохондрій за наявності NaHS ( $10^{-10}$  моль/л), що може свідчити про внесок цих каналів у кальційнезалежну провідність мембран органел у серці. Донор сірководню у фізіологічних концентраціях  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  і  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л пригнічував кальційіндуковане відкривання МП, що свідчить про його протекторний щодо пороутворення вплив, який становив 31, 76 і 77 % відповідно у серці дорослих щурів. А у старих тварин такий ефект спостерігали тільки при концентрації NaHS  $10^{-5}$  моль/л. Таким чином, донор сірководню в межах досліджуваних концентрацій моль/л спричиняв неоднозначну дію щодо відкривання МП: низькі концентрації ( $10^{-12}$ – $10^{-8}$  моль/л) збільшували набухання органел, а фізіологічні ( $10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) – здійснювали протекторний ефект щодо кальційіндукованого набухання мітохондрій серця щурів. Преінкубація ізольованих мітохондрій з 5-гідроксидекааноатом ( $10^{-4}$  моль/л) зменшувала протекторний ефект NaHS ( $10^{-5}$  моль/л) відносно кальційіндукованого відкривання МП, що свідчить про можливе залучення мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів у залежне від сірководню інгібування пороутворення у серці. В експериментах *in vivo* при одноразовому внутрішньоочеревинному введенні як NaHS ( $10^{-4}$  моль/кг), так і L-цистеїну ( $10^{-3}$  моль/кг) показано зменшення чутливості МП до індуктора  $Ca^{2+}$  у серці дорослих і старих щурів. L-цистеїн у порівнянні з NaHS виявився більш ефективним щодо попередження кальційіндукованого відкривання МП: спостерігали збільшення на порядок концентрації  $Ca^{2+}$ , яка спричиняла набухання мітохондрій у серці тварин. У дослідях *in vivo* при використанні специфічного блокатора фермента цистатіонін- $\gamma$ -ліази – пропаргілгліцину ( $10^{-4}$  моль/кг), який бере участь у біосинтезі сірководню, спостерігали значне підвищення чутливості МП до індуктора  $Ca^{2+}$  внаслідок зменшення на два порядки порогової його концентрації, яка спричиняє набухання органел. Отже, показана причетність ендogenousого сірководню до регуляції пороутворення у серці. Таким чином, результати досліджень свідчать про участь сірководню у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, що може бути важливим регуляторним фактором у розвитку серцево-судинних захворювань.

Ключові слова: сірководень, L-цистеїн, мітохондріальна поря, серце, старіння, щури.

### ВСТУП

Сірководень ( $H_2S$ ) є біологічно активним газовим медіатором, який, поряд з оксидом

азоту (NO) та монооксидом вуглецю (CO), здійснює регулювання низки важливих фізіологічних функцій в організмі, у тому числі модуляторний контроль над функція-

© Н.А. Струтинська, О.М. Семенихіна, С.В. Чорна, Г. Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

ми клітини та їх органелами, такими, як мітохондрії [16, 18].

Подібно до NO і CO,  $H_2S$  є ліпофільною молекулою, що вільно проникає через плазматичну мембрану клітини. У концентрації 20–80 мкмоль/л його виявляють у сироватці крові і у більшості тканинах організму. Фізіологічний рівень сірководню у головному мозку втричі більший (до 100 мкмоль/л), ніж у плазмі крові і фактично дорівнює токсичним концентраціям, характерним для плазми [16, 21]. Негативні токсичні ефекти  $H_2S$  пов'язані з інгібуванням цитохром-с-оксидази електронно-транспортного ланцюга мітохондрій [19].

Основну роль в ендогенному утворенні  $H_2S$  відіграють піридоксаль-5-фосфат-залежні ферменти – цистатіонін- $\beta$ -синтаза та цистатіонін- $\gamma$ -ліаза у головному мозку, серцево-судинній системі, печінці, нирках та інших органах [20]. Дослідження, проведені *in vivo* та *in vitro* на щурах із додаванням DL-пропаргілгліцину (специфічний інгібітор цистатіонін- $\gamma$ -ліази) та L-цистеїну (субстрат цистатіонін- $\gamma$ -ліази) показали, що саме фермент цистатіонін- $\gamma$ -ліаза відіграє ключову роль в утворенні  $H_2S$  у серцево-судинній системі [26].

Крім того, сірководень є важливою сигнальною молекулою, яка бере участь у багатьох метаболічних шляхах клітини. Відомі внутрішньоклітинні сигнальні механізми, в яких задіяний  $H_2S$ , включають активацію АТФ-залежних калієвих каналів ( $K_{ATP}$ -каналів) у судинах, міокарді,  $\beta$ -клітинах підшлункової залози, нейронах, підтримку SH-груп білків у відновленому стані, стимулювання аденілатциклази, транспорту цистеїну у клітини і синтезу відновленого глутатіону (GSH), реакції з активними формами кисню і азоту ( $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ , NO), регуляцію індукцйбельної NO-синтази, підвищення внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  тощо [16].

Існує гіпотеза про функціонування сірководню як прекодиційного медіатора.

Оскільки пізня фаза прекодиційування ініціюється експресією різних білків, то однією з можливих функцій  $H_2S$  є регулювання транскрипції їх генів [22]. Крім того, сірководень здійснює посттрансляційні модифікації білків, регулює експресію генів, які кодують сигнальні білки та транскрипційні фактори, інгібує та активує іонні канали, а також бере участь у метаболічних реакціях, впливаючи на функціональний стан мітохондрій.

Серед біологічних ефектів  $H_2S$  особливу увагу привертають такі: участь  $H_2S$  у регуляції судинного тонуусу [1], скоротливості міокарда, передачі нервових імпульсів, а також у секреції інсуліну. Хоча специфічного тіолового рецептора ще не ідентифіковано, однак відомо, що для здійснення біологічних ефектів у серцево-судинній системі  $H_2S$  взаємодіє з іншими біологічними медіаторами та сигнальними індукторами [21]. Відомо, що при різних патологічних станах, зокрема, артеріальній і легеневій гіпертензії, хворобі Альцгеймера, діабеті, пошкодженнях слизової оболонки шлунка і цирозі печінки спостерігається дефіцит  $H_2S$  [16].

Різні групи вчених довели, що як екзогенний, так і ендогенний сірководень відіграє важливу роль у протекції клітин від ішемічно-реперфузійних пошкоджень у різних експериментальних моделях [8, 22, 27]. Так, його використання було ефективним у захисті печінки від ішемічно-реперфузійних пошкоджень, при цьому інгібувався розвиток апоптозу і підвищувалась експресія білків теплового шоку 90 (HSP-90) та Bcl-2 [12]. Подібні дослідження виявили кардіопротекторну дію донора сірководню NaHS в умовах оксидативного стресу в експериментальних моделях з використанням клітинної лінії кардіоміоцитів. Показано, що  $H_2S$  спричиняв індукцію експресії Bcl-2 та активував Akt-сигнальний шлях, які задіяні у кардіопротекторних механізмах [7]. Крім того, виявлено, що кардіопротекторний

вплив сірководню пов'язаний з функціонуванням  $K_{ATP}$ -каналів [9]. Однак механізм його дії і фізіологічна роль у серцево-судинній системі вивчені недостатньо.

Як відомо, однією з основних причин серцево-судинних захворювань при різних патологічних станах і старінні є мітохондріальна дисфункція. Формування неселективної кальційзалежної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП) між зовнішньою і внутрішньою мембранами лежить в основі індукції клітинної смерті – апоптозу [10, 11]. Проте роль  $H_2S$  у регуляції пороутворення в мітохондріях серця остаточно ще не з'ясована.

Нині актуальною проблемою є пошук медіаторів і з'ясування їх участі у сигнальних механізмах, пов'язаних, зокрема, з регуляцією кальційіндукованого відкриття МП, оскільки підвищена її чутливість до індукторів є причиною розвитку багатьох патологічних станів організму, а також при старінні. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив донора сірководню –  $NaHS$ , а також субстрату його біосинтезу –  $L$ -цистеїну у дослідях *in vitro* та *in vivo* на чутливість МП до дії природного індуктора  $Ca^{2+}$  у серці дорослих і старих щурів та з'ясувати можливі механізми їх впливу.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, 220–250 г) і старих (24 міс, 300–350 г) щурах лінії Вістар. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10–12 тварин.

Серця, видалені з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-м розчином  $KCl$  ( $4^{\circ}C$ ). Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [4] і в суспензії органел визначали вміст білка за методом Лоурі.

Відкриття МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації

набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л):  $KCl$  – 120,  $трис-HCl$  – 25,  $KH_2PO_4$  – 3; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при  $\lambda=520$  нм за 3 хв до і впродовж 15 хв їх набухання за наявності індуктора  $Ca^{2+}$ . Зміну рівня набухання органел визначали як різницю у відсотках ( $\Delta$ ,%) між показником набухання мітохондрій на 15 хв відносно вихідного значення. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з подальшою реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв. Одноразове введення щурам таких речовин як, донор сірководню  $NaHS$ , інгібітор його ендogenous синтезу пропаргілгліцин та амінокислоти  $L$ -цистеїну здійснювали внутрішньоочеревинно за 30 хв до декапітації тварин.

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програми Origin 7.0 («Microcall Inc.», США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідях *in vitro* на ізольованих мітохондріях для визначення відкриття МП у серці щурів використовували природний індуктор  $Ca^{2+}$  у концентрації  $10^{-4}$  моль/л. Характерні криві спонтанного набухання мітохондрій (контроль у безкальцієвому середовищі) та кальційіндукованого набухання органел, що відбувалося внаслідок відкриття МП, у серці дорослих і старих щурів показані на рис. 1. У безкальцієвому середовищі зміна рівнів ( $\Delta$ ) набухання мітохондрій становила 7 та 12 % у дорослих та старих щурів відповідно. В умовах навантаження мітохондрій кальцієм відбувалось суттєве набухання мітохондрій серця старих щурів ( $\Delta = 25$  %), що відрізнялося від такого у дорослих

тварин ( $\Delta = 20\%$ ). Цей факт свідчив про підвищену чутливість кальційіндукованого відкриття МП у серці старих щурів. Слід відмітити, що відкриття МП у серці дорослих щурів повністю пригнічувалося класичним інгібітором циклоспорином А у концентрації  $10^{-5}$  моль/л, а у старих тварин – лише частково (див. рис.1). Ці результати підтверджують той факт, що в мітохондріях серця старих щурів поряд з утворенням класичної МП, частково утворюється неспецифічна нечутлива до циклоспорину А пори [5]. Враховуючи дані попередніх наших досліджень, можна зробити висновок, що описані особливості відкриття МП, що спостерігаються при старінні, пов'язані зі зростанням вмісту активних форм кисню, зниженням вмісту NO, що продукується конститутивною ізоформою NO-синтази, порушенням кальцієвого гомеостазу тощо [3–5].

На наступному етапі роботи досліджували дію донора сірководню – NaHS у межах концентрацій  $10^{-12}$  -  $10^{-4}$  моль/л щодо набухання ізольованих мітохондрій серця дорослих і старих щурів за відсутності впливу природного індуктора відкриття МП –  $Ca^{2+}$  (рис. 2, а). Показано, що за умов дії сірководню в межах концентрацій  $10^{-12}$  –  $10^{-8}$  моль/л відбувалося помірне незалежне

від дії кальцію набухання мітохондрій серця в обох групах тварин. При дії NaHS у концентрації  $10^{-10}$  моль/л спостерігали набухання мітохондрій, максимальна зміна рівня якого становила 11 та 15 % у дорослих і старих щурів відповідно. Отже, NaHS у досліджуваному діапазоні концентрацій за відсутності  $Ca^{2+}$  спричиняв однаковий характер набухання мітохондрій серця, однак його рівень був вищим у старих тварин.

Для встановлення природи  $H_2S$ -індукованого набухання мітохондрій використали інгібітор МП - циклоспорин А і специфічний інгібітор мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів - 5-гідроксидеканоат. На рис. 2, б представлені результати дослідів, в яких вивчали внесок мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів у кальційнезалежну провідність мітохондріальних мембран у серці дорослих і старих щурів в умовах дії донора сірководню NaHS у концентрації  $10^{-10}$  моль/л, котра викликала максимальний ефект щодо набухання органел. Використання 5-гідроксидеканоату ( $10^{-4}$  моль/л) частково зменшувало набухання мітохондрій, а сумісна його дія з циклоспорином А призводила до набухання на рівні контролю у серці дорослих щурів. У старих щурів 5-гідроксидеканоат спричинював зменшення набухання міто-

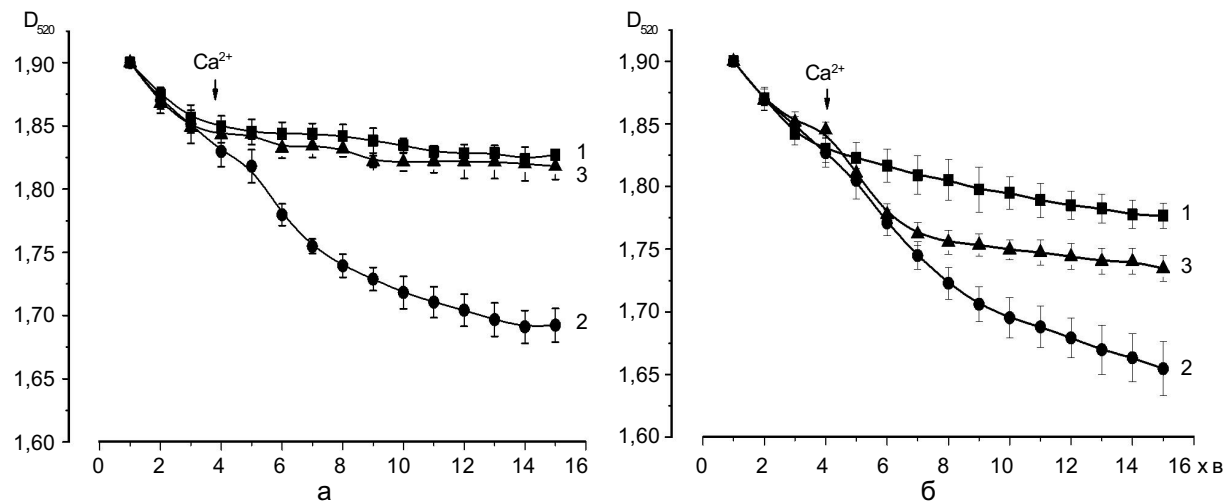


Рис. 1. Набухання мітохондрій серця дорослих (а) та старих (б) щурів за умов дії індуктора мітохондріальної пори  $Ca^{2+}$ : 1 – контроль; 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); 3 – преінкубація з циклоспорином А ( $10^{-5}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$

хондрій до контрольного значення, а сумісна дія обох інгібіторів – до значень, які навіть нижчі від контрольних. Таким чином, при дії NaHS у наднизькій концентрації ( $10^{-10}$  моль/л) набухання мітохондрій спричинене певною мірою активацією мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів як у дорослих, так і старих щурів. Відтак, не можна виключати ймовірну активацію цих каналів в умовах дії донора сірководню у фізіологічних і вищих за них концентраціях.

Вважають, що відкривання  $K_{ATP}$ -каналів у гладеньких м'язах відіграє ключову роль у здійсненні ефектів  $H_2S$ , оскільки останній підвищує потік  $K^+$  через ці канали і викликає гіперполяризацію мембран в ізольованих гладеньких м'язових клітинах. Глібенкламід, блокатор цих каналів, послаблював гіпотензивний ефект  $H_2S$  in vivo і вазодилататорний in vitro [24].

Цікаво, що інгібітори цистатіонін- $\gamma$ -ліази знижували АТФ-залежний калієвий потік, що свідчить про постійну активацію каналів ендогенним  $H_2S$  за фізіологічних умов [18]. Відомо, що клітини міокарда містять

велику кількість  $K_{ATP}$ -каналів, і численними дослідженнями показано протекторну дію їх активаторів у міокарді, зокрема при ішемії–реперфузії [2]. Дані літератури свідчать, що  $H_2S$  бере участь у ішемічному прекодиціонуванні [22]. Однак механізми прояву його кардіопротекторних властивостей  $H_2S$  досі вивчені недостатньо.

У наступній серії експериментів досліджували дію донора сірководню NaHS у широкому діапазоні концентрацій  $10^{-12}$ – $10^{-4}$  моль/л на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів (рис. 3).

Нами було показано, що в умовах преінкубації мітохондрій з донором сірководню у низьких концентраціях ( $10^{-12}$ – $10^{-8}$  моль/л) захисного ефекту щодо кальційіндукованого набухання органел не спостерігали. А в умовах преінкубації ізольованих мітохондрій з NaHS при фізіологічних концентраціях  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  і  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л спостерігали дозозалежне зменшення рівня набухання органел серця у дорослих щурів (31, 76 і 77% відповідно), що свідчить про його захисний

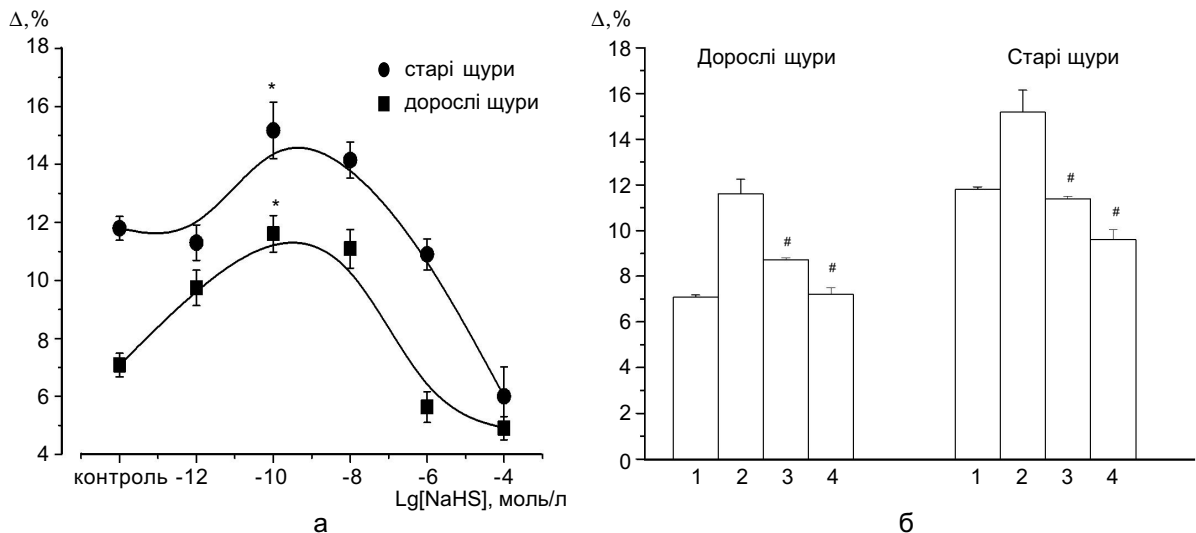


Рис. 2. Концентраційна залежність впливу донора сірководню – NaHS (а) та дія інгібітора мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів 5-гідроксидеканоату та інгібітора мітохондріальної пори – циклоспорину А (б) на набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів у безкальцієвому середовищі: 1 – контроль; 2 – дія NaHS ( $10^{-10}$  моль/л); 3 – преінкубація з 5-гідроксидеканоатом ( $10^{-4}$  моль/л), дія NaHS; 4 – преінкубація з 5-гідроксидеканоатом і циклоспорином А ( $10^{-5}$  моль/л), дія NaHS. Тут і надалі  $\Delta$  – різниця між показником набухання мітохондрій на 15-й хвилині відносно вихідного значення. \* $P < 0,05$  відносно контролю дорослих і старих щурів; # $P_{2,3} < 0,05$ ; # $P_{2,4} < 0,05$

ефект щодо відкриття МП (див. рис. 3, а). На рис. 3, б представлено результати досліджень дії NaHS ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$  моль/л) відносно кальційіндукованого набухання мітохондрій у серці старих щурів. NaHS в концентрації  $10^{-5}$  моль/л повністю попереджав набухання мітохондрій, що можливо також свідчить про відновлення та стабілізацію мітохондріальних мембран у серці старих тварин, а у концентрації  $10^{-6}$  моль/л був неефективним.

Преінкубація суспензії мітохондрій серця зі специфічним інгібітором мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів 5-гідроксидеканоатом ( $10^{-4}$  моль/л) спричиняла послаблення протекторного ефекту донора сірководню NaHS ( $10^{-5}$  моль/л) щодо кальційіндукованого відкриття МП: частково збільшувався рівень набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів. Це говорить про ймовірне залучення мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів у  $H_2S$ -залежне інгібування пороутворення у цих щурів.

Слід відмітити, що при дії донора сірководню у концентрації  $10^{-6}$  та  $10^{-5}$  моль/л, чутливість МП до  $Ca^{2+}$  у серці старих щурів нижча у порівнянні з дорослими тваринами (рис. 4). У високих концентраціях донор ( $10^{-4}$  моль/л) викликав значне інгібування каль-

ційіндукованої МП як у дорослих, так і старих тварин. Отже, в цілому за дії фізіологічних концентрацій донора сірководню ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$  моль/л) було виявлено підвищену чутливість МП до індуктора її відкриття  $Ca^{2+}$  у серці дорослих щурів порівняно зі старими. У концентрації, вищій за фізіологічну, NaHS ( $10^{-4}$  моль/л) також попереджав кальційіндуковане відкриття МП: набухання мітохондрій серця дорослих щурів було нижчим за контрольний рівень, а старих щурів – суттєво зменшене щодо контролю (у відсутності індуктора МП –  $Ca^{2+}$ ). Крім того, на ізольованих мітохондріях серця старих щурів спостерігали підвищену проникність мембран органел, яка значно зменшувалась за наявності донора сірководню в концентрації  $10^{-4}$  моль/л. Зниження рівня набухання мітохондрій, оптична густина яких була більшою у порівнянні з нативними органелами серця дорослих і старих щурів при дії NaHS у концентрації  $10^{-4}$  моль/л, можна пояснити особливостями конформаційних змін мембран органел, а також уповільненням їх метаболічної активності, що зумовлюють проникність мембран і пов'язане з цим відкриття МП [16].

Різні концентрації сірководню неод-

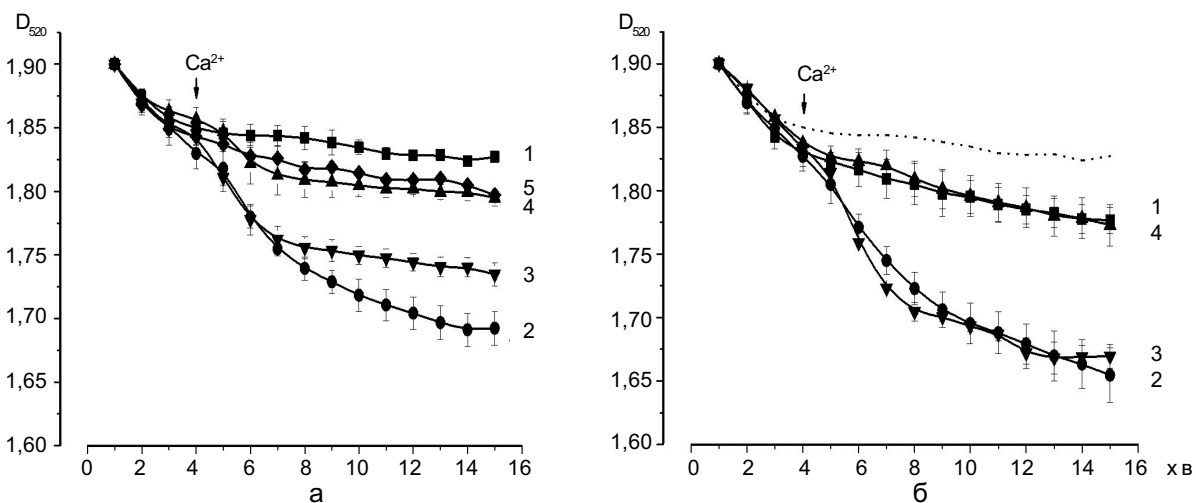


Рис. 3. Дія донора сірководню на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця дорослих (а) та старих (б) щурів: 1 – контроль; 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); 3, 4, 5 – преінкубація з NaHS ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л відповідно) і дія  $Ca^{2+}$



наково впливають на функції клітини та організму в цілому. Завдяки своїй хімічній структурі та біохімічним властивостям  $H_2S$  може легко проникати до клітини крізь плазматичну мембрану без використання специфічних транспортних молекул і викликати певні біологічні ефекти при фізіологічних концентраціях, і токсичний ефект – при високих дозах. Показано [9], що дія  $H_2S$  у мікромольних концентраціях супроводжується цитопротекторним ефектом (антинекротичним і антиапоптотичним), що пов'язують із його здатністю нейтралізувати велику кількість активних форм кисню та інших (оксидорадикали, пероксинітрит, гіпохлоридна кислота, гомоцистеїн).  $H_2S$  позитивно впливає на антиоксидантну систему та разом N-ацетилцистеїном, глутатіоном і супероксиддисмутазою сприяє посиленню адаптивних ефектів [13].

$H_2S$  як тіолвмісна молекула з сильними відновними властивостями здійснює також контроль за окисно-відновним потенціалом клітини разом із іншими тіолами – цистеїном і глутатіоном [25]. Іншим механізмом, за допомогою якого сірководень здійснює свій

цитопротекторний вплив, є підвищення внутрішньоклітинної концентрації глутатіону через активацію експресії  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтази.

З іншого боку,  $H_2S$  може інгібувати клітинне дихання, послаблюючи активність цитохромоксидази, що є механізмом регуляції споживання кисню клітиною. Цей механізм залучений у здійснення фармакологічних і токсичних ефектів дії  $H_2S$ , а також є основою тимчасової затримки життєвих функцій [14]. Так, рівень мітохондріальних ушкоджень змінювався відповідно до умов експерименту і залежав від виду тканини: у цілих клітинах мітохондріальне дихання знижувалося до 50% при дії  $H_2S$  у концентрації 30 мкмоль/л, тоді як 10 мкмоль/л достатньо для зменшення вдвічі дихання у ізольованих мітохондріях. Гідросульфід натрію у концентраціях нижчих за 20 мкмоль/л стимулював споживання кисню мітохондріями і збільшував мембранний потенціал, а у високій концентрації інгібував цитохром-с-оксидазу і погіршував споживання кисню [19].

Натомість, високі концентрації сірковод-

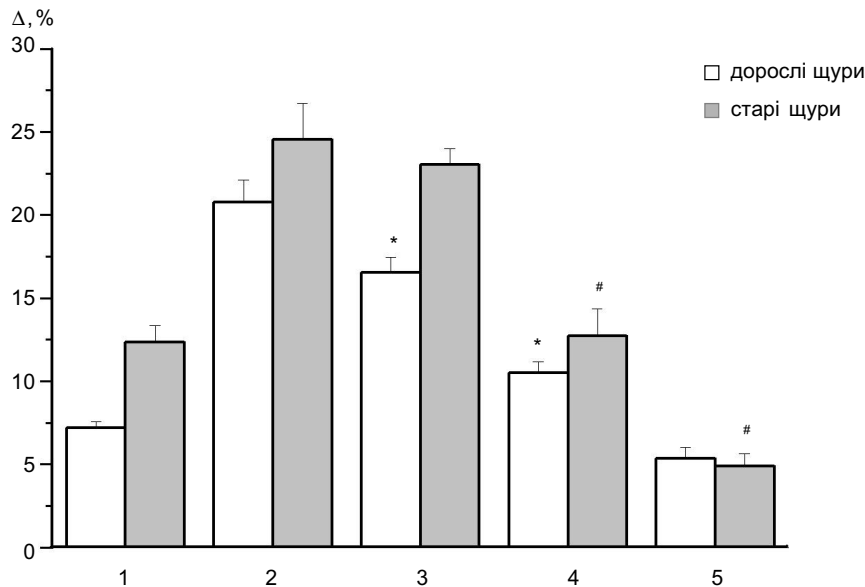


Рис. 4. Порівняння дії донора сірководню на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів: 1 – контроль; 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); 3, 4, 5 – преінкубація з  $NaHS$  ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  моль/л відповідно), дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л). \* $P < 0,05$ , # $P < 0,05$  відносно набухання мітохондрій в умовах дії  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л)

ню є токсичними для клітини через утворення великої кількості вільних радикалів та окисників, мобілізації кальцію, зменшення вмісту глутатіону в клітині, вивільнення внутрішньоклітинного заліза, а також індукцію мітохондріальних сигнальних шляхів апоптозу [18].

Серце є важливим джерелом утворення ендogenous H<sub>2</sub>S [8]. За даними літератури, його концентрація у серцево-судинній системі щурів становить (45,6±14,2) мкмоль/л, а утворення у тканинах міокарда щурів прирівнюється до (18,64±4,49) нмоль·хв<sup>-1</sup>·г<sup>-1</sup> білка [26]. Отримані нами результати вказують на те, що інгібування МП сірководнем відбувалося за фізіологічних його концентрацій, тобто при 1–50 мкмоль/л.

Таким чином, встановлено, що донор сірководню NaHS у межах досліджуваних концентрацій 10<sup>-12</sup>–10<sup>-4</sup> моль/л спричиняв неоднозначну дію щодо набухання мітохондрій: низькі його концентрації (10<sup>-12</sup>–10<sup>-8</sup> моль/л) підвищували набухання органел, а більш високі концентрації (10<sup>-6</sup>–5·10<sup>-5</sup> моль/л) здійснювали протекторний ефект відносно кальційіндукованого набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів. Як підтверджують результати експериментів, це від-

бувається частково внаслідок активації мітохондріальних K<sub>ATP</sub>-каналів і можливо внаслідок прямого впливу донора сірководню NaHS як SH-реагента на мітохондріальні мембрани та структурні компоненти МП.

В експериментах *in vivo* при дослідженні одноразового введення щурам NaHS (10<sup>-4</sup> моль/кг) і амінокислоти L-цистеїну (10<sup>-3</sup> моль/кг) як субстрату для синтезу сірководню, було встановлено зменшення чутливості МП до індуктора Ca<sup>2+</sup> у серці дорослих і старих тварин (рис. 5). Дія L-цистеїну у порівнянні з NaHS виявилася більш ефективною щодо попередження кальційіндукованого відкриття МП: спостерігали збільшення на порядок концентрації Ca<sup>2+</sup>, яка спричиняла набухання мітохондрій у серці дорослих і старих щурів. Цей факт пояснюється можливим залученням L-цистеїну до ендogenous шляхів синтезу сірководню, а також його антиоксидантними властивостями. Слід відмітити, що дія донора сірководню *in vivo*, на відміну від L-цистеїну, була швидкою та транзитornoю, оскільки через 60 хв після введення його щурам не спостерігали зміни рівня набухання мітохондрій або цей ефект був незначний.

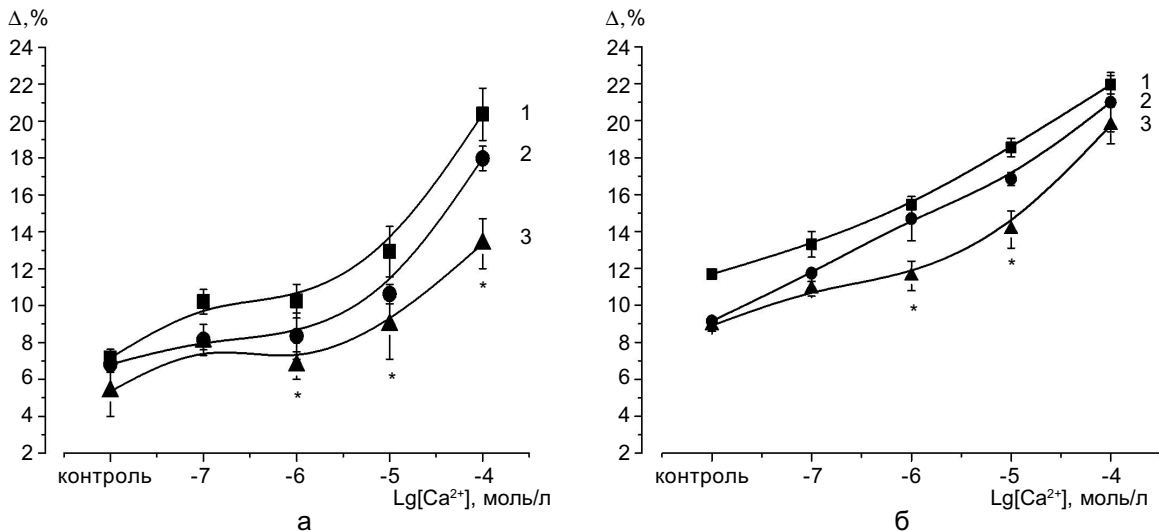


Рис. 5. Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора її відкриття – Ca<sup>2+</sup> у серці дорослих (а) та старих (б) щурів за умов впливу *in vivo* NaHS і L-цистеїну: 1 – контроль; 2 – дія NaHS (10<sup>-4</sup> моль/кг); 3 – дія L-цистеїну (10<sup>-3</sup> моль/кг). \*P<0,05 відносно контролю

Для з'ясування ролі ендogenous сiрководню у регуляцiї вiдкриття МП у серцi дорослих i старих щурiв була проведена серiя експериментiв з використанням специфiчного блокатора ферменту цистатионiн-γ-лiази – пропаргiлглiцину у концентрацiї  $10^{-4}$  моль/кг (рис.6). У дорослих щурiв спостерiгали тенденцiю до збiльшення чутливостi кальцiйiндукованої МП, тодi як у старих - значне її пiдвищення внаслiдок зменшення на два порядки порогової концентрацiї  $Ca^{2+}$ , яка спричиняє набухання органел. У фiзiологiчних умовах органiзму ендogenous сiрководень iмовiрно чинить стабiлізувальну дiю на мембрани мiтохондрiй. Ми припустили, що при введеннi iнгiбитора синтезу сiрководню пропаргiлглiцину ендogenous вiмст газового трансмитера може суттєво зменшуватися, що призводить до пiдвищення чутливостi МП до iндуктора її вiдкриття –  $Ca^{2+}$ . У зв'язку з цим знижений вiмст  $H_2S$  при старiннi може бути наслiдком або зменшення експресiї  $H_2S$ -синтезуючого ферменту цистатионiн-γ-лiази, або його каталiтичної активностi. Таким чином, зниження вiмсту ендogenous сiрководню спричиняє пiдвищення порогу чутливостi МП до кальцiю.

Подiбний ефект спостерiгли у разi пiдвищення чутливостi МП до дiї iндуктора  $Ca^{2+}$  за умов впливу iнгiбитора конститутивної NO-синтази L-NAME [6]. Данi лiтератури вказують на можливу взаємодiю обох газових трансмитерiв – NO та  $H_2S$ , що може мати важливе фiзiологiчне значення. Так, було показано, що  $H_2S$  здатний як посилювати, так i послаблювати дилаторну дiю NO у аортi щурiв, тодi як саме NO iндукує вивiльнення  $H_2S$  у судинах щурiв, а також пiдвищує експресiю цистатионiн-γ-лiази у культурi гладеньком'язових клiтин судин [17].

Вважають, що NO та пероксинiтри можуть взаємодiяти з  $H_2S$ , формуючи нiтрозотiоли, якi регулюють фiзiологiчну дiю NO та  $H_2S$ . Важливо зазначити, що останнiй здатний iнгiбувати продукування NO та експресiю гена iндуцибельної NO-синтази у макрофагах [26]. Механiзм цiєї дiї ще не встановлено, однак вiдомо, що вiн включає експресiю гемоксигенази та утворення CO. Було також показано, що донор  $H_2S$ , NaHS, дозозалежно знижує активнiсть iндуцибельної NO-синтази через iнгiбування процесу перетворення аргiнiну на цитрулiн [15].

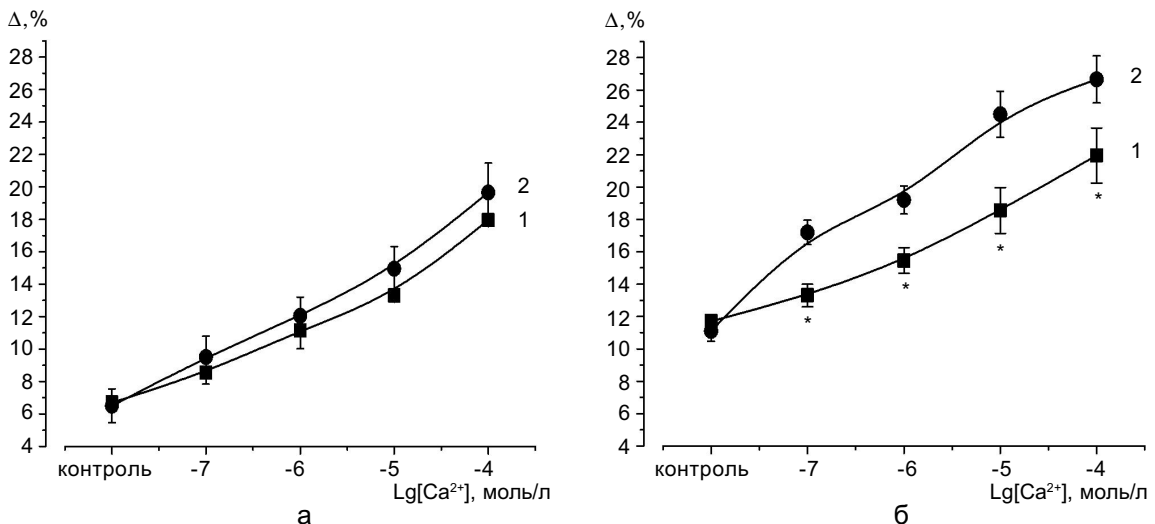


Рис. 6. Змiни чутливостi мiтохондрiальної пори до iндуктора її вiдкриття –  $Ca^{2+}$  у серцi дорослих щурiв (а) та старих (б) щурiв за умов впливу *in vivo* пропаргiлглiцину: 1 – контроль; 2 – дiя пропаргiлглiцину ( $10^{-4}$  моль/кг). \* $P < 0,05$  вiдносно контролю

Оскільки молекула  $H_2S$  має сильні відновні властивості, ми робимо припущення, що протекторні ефекти цієї молекули у фізіологічних концентраціях можуть бути пов'язані з захистом тіолових груп білків, зокрема одного з компонентів МП – аденін-нуклеотидтранслокази, від окиснення (прямий вплив). Окрім того, захисні ефекти, які спостерігаються при дії сірководню на мітохондрії, можуть бути частково викликані активацією мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів (опосередкований вплив).

Таким чином, отримані нами результати свідчать про участь як екзогенного, так і ендogenous сірководню у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, зокрема, через інгібування кальційіндукованого відкриття МП у серці дорослих і старих щурів, тому  $H_2S$  може бути важливим регуляторним фактором у серцево-судинній системі за фізіологічних та патологічних умов.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено дозозалежний вплив донора сірководню NaHS ( $10^{-12}$ – $10^{-4}$  моль/л) у безкальцієвому середовищі щодо набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів.

2. Доведено, що NaHS у фізіологічних концентраціях ( $10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) пригнічує кальційіндуковане відкриття МП, що свідчить про його протекторний вплив на пороутворення у серці дорослих і старих щурів.

3. Преінкубація ізольованих мітохондрій з інгібітором мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів 5-гідроксидеканоатом ( $10^{-4}$  моль/л) спричиняє послаблення протекторного ефекту NaHS ( $10^{-5}$  моль/л) кальційіндукованого відкриття МП: частково збільшується рівень набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів.

4. В експериментах *in vivo* при одноразовому внутрішньоочеревинному введенні щурам як NaHS ( $10^{-4}$  моль/кг), так і L-цистеїну ( $10^{-3}$  моль/кг) показано зменшення

чутливості МП до індуктора її відкриття  $Ca^{2+}$  у серці дорослих і старих тварин.

5. За умов інгібування *in vivo* біосинтезу сірководню при одноразовому внутрішньоочеревинному введенні щурам пропаргіл-гліцину ( $10^{-4}$  моль/кг) слід відмітити незначне підвищення чутливості кальційіндукованого відкриття МП у серці дорослих та суттєве – внаслідок зменшення на два порядки порогової концентрації  $Ca^{2+}$ , яка спричиняє набухання органел у старих тварин.

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

## **СЕРОВОДОРОД УГНЕТАЕТ КАЛЬЦИЙИНДУЦИРОВАННОЕ ОТКРЫТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ В СЕРДЦЕ ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС**

В опытах *in vivo* и *in vitro* на митохондриях, изолированных из ткани сердца взрослых и старых крыс, исследовали влияние донора сероводорода – NaHS, а также субстрата его биосинтеза – L-цистеина, на чувствительность митохондриальной поры (МП) к ее естественному индуктору  $Ca^{2+}$ . Установлена концентрационная зависимость влияния NaHS ( $10^{-12}$ – $10^{-4}$  моль/л) на набухание митохондрий сердца крыс. Показано, что в бескальциевой среде при действии донора сероводорода ( $10^{-12}$ – $10^{-8}$  моль/л) происходило умеренное набухание митохондрий сердца крыс. NaHS в концентрации  $10^{-10}$  моль/л вызывал набухание митохондрий, изменение максимальной величины ( $\Delta$ ) которого составляло 11 и 15 % у взрослых и старых крыс соответственно. Специфический ингибитор митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов 5-гидроксидеканоат ( $10^{-4}$  моль/л) уменьшал набухание митохондрий в присутствии NaHS ( $10^{-10}$  моль/л), что может свидетельствовать о вкладе этих каналов в кальцийнезависимую проводимость мембран органелл в сердце. Донор сероводорода в физиологических концентрациях  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  и  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л ингибировал кальцийиндуцированное открытие МП, что свидетельствует о его протекторном по отношению к порообразованию эффекте, который составлял 31, 76 и 77 % соответственно в сердце взрослых крыс. А у старых животных его наблюдали только при концентрации NaHS  $10^{-5}$  моль/л. Таким образом, донор сероводорода в диапазоне исследуемых концентраций  $10^{-12}$ – $10^{-4}$  моль/л оказывал неоднозначное влияние на набухание митохондрий: низкие концентрации ( $10^{-12}$ – $10^{-8}$  моль/л) увеличивали его, а физиологические ( $10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) – оказывали протекторный эффект на кальцийиндуцированное набухание митохондрий сердца крыс. Преинкубация

изолированных митохондрий с 5-гидроксидекааноатом ( $10^{-4}$  моль/л) уменьшала защитный эффект NaHS ( $10^{-5}$  моль/л) на кальцийиндуцированное открывание МП, что свидетельствует о возможном участии митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов в зависимом от сероводорода ингибировании порообразования в сердце крыс. В экспериментах *in vivo* при однократном внутривенном введении как NaHS ( $10^{-4}$  моль/кг), так и L-цистеина ( $10^{-3}$  моль/кг) показано уменьшение чувствительности МП к индуктору  $Ca^{2+}$  в сердце взрослых и старых крыс. L-цистеин по сравнению с NaHS оказался более эффективным относительно предупреждения кальцийиндуцированного открывания МП: наблюдали увеличение на порядок концентрации  $Ca^{2+}$ , которая вызывала набухание митохондрий в сердце животных. В опытах *in vivo* при использовании специфического блокатора фермента цистатионин-γ-лиазы – пропаргилглицина ( $10^{-4}$  моль/кг), участвующего в биосинтезе сероводорода, наблюдали значительное увеличение чувствительности МП к индуктору  $Ca^{2+}$  вследствие уменьшения на два порядка пороговой его концентрации, вызывающей набухание органелл. Показана причастность эндогенного сероводорода к регуляции порообразования в сердце. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют об участии сероводорода в модуляции изменений проницаемости митохондриальных мембран, что может быть важным регуляторным фактором в развитии сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: сероводород, L-цистеин, митохондриальная пора, сердце, старение, крысы.

**N.A. Strutynska, O.M. Semenykhina,  
S.V. Chorna, G.L.Vavilova, V.F. Sagach**

#### **HYDROGEN SULFIDE INHIBITS Ca<sup>2+</sup>-INDUCED MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING IN ADULT AND OLD RAT HEART**

In experiments *in vivo* and *in vitro* on the mitochondria isolated from adult and old rat hearts, we studied the effects of a donor of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ), NaHS, and  $H_2S$  biosynthesis substrate, L-cysteine, on the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening to its natural inductor,  $Ca^{2+}$ . We found that NaHS ( $10^{-12}$  to  $10^{-4}$  mol/l) influenced mitochondrial swelling in a concentration-dependent manner. It was also demonstrated that the addition of NaHS ( $10^{-12}$  to  $10^{-8}$  mol/l) to the calcium-free medium resulted in moderate a swelling of mitochondria from both adult and old rat hearts. At  $10^{-10}$  mol/l NaHS, the maximal values of the mitochondrial swelling observed in both adult and old hearts were 11 and 15 %, respectively. A specific inhibitor of  $K_{ATP}$ -channels, 5-hydroxydecanoate (5-HD;  $10^{-4}$  mol/l) decreased the mitochondrial swelling in the presence of NaHS ( $10^{-10}$  mol/l), which can be indicative of the contribution of these channels to the calcium-independent conductance of the mitochondrial membranes in the rat hearts. The  $H_2S$  donor NaHS used in

physiological concentrations ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  and  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) exerted the inhibiting effect on the  $Ca^{2+}$ -induced mPTP opening in adult hearts (corresponding values of such effect were 31, 76, and 77%, respectively), while in old hearts the protector effect of NaHS was observed only at its concentration of  $10^{-5}$  mol/l. Therefore, the donor of  $H_2S$  used in the tested concentrations ( $10^{-12}$  to  $10^{-4}$  mol/l) exerted ambiguous effect on the mitochondrial swelling: low concentrations of NaHS ( $10^{-12}$  to  $10^{-8}$  mol/l) increased the mitochondrial swelling, while its physiological concentrations ( $10^{-6}$  to  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) exerted the protective effect on  $Ca^{2+}$ -induced mitochondrial swelling in adult and old hearts. Pre-incubation of isolated mitochondria with 5-HD ( $10^{-4}$  mol/l) resulted in a decrease in the protective effect evoked by NaHS ( $10^{-5}$  mol/l) on  $Ca^{2+}$ -induced mPTP opening, which is indicative of the possible involvement of mitochondrial  $K_{ATP}$ -channels in the  $H_2S$ -dependent inhibition of mPTP formation in both adult and old rat hearts. In experiments *in vivo*, single intraperitoneal injections of both NaHS ( $10^{-4}$  mol/kg) and L-cysteine ( $10^{-3}$  mol/kg) resulted in a decrease in the sensitivity of mPTP to its inductor  $Ca^{2+}$  in adult and old rat hearts. The action of L-cysteine, as compared with that of NaHS, was more effective in prevention of  $Ca^{2+}$ -induced mitochondrial swelling. We observed a rise in  $Ca^{2+}$  concentration by one order of magnitude, which evoked the mitochondrial swelling in adult and old hearts. In experiments *in vivo* in which we used a specific blocker of cystathionine-γ-lyase, propargylglycine ( $10^{-4}$  mol/kg) that is involved in the synthesis of  $H_2S$ , we observed an increase in the sensitivity of mPTP opening in old hearts because of a decrease in the threshold  $Ca^{2+}$  concentration required for mitochondrial swelling by two orders of magnitude. We demonstrate the involvement of endogenous  $H_2S$  in the control of mPTP formation in adult and old hearts. Our studies are indicative of the involvement of  $H_2S$  in modulation of changes in the permeability of mitochondrial membranes, which can be an important regulatory factor in the development of cardiovascular diseases.

Keywords: hydrogen sulfide, L-cysteine, mitochondrial permeability transition pore, heart, aging, rats.

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

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Баскаков М.Б., Гусакова С.В., Желудева А.С., Смаглий Л.В., Ковалев И.В., Вторушина Т.А., Носов Д.С., Еременко К.В., Медведев М.А., Орлов С.Н. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы // Бюл. сибир. медицины. – 2010. – №6. – С. 12–17.
2. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008. – С. 206–251.
3. Сагач В.Ф., Рудик О.В., Вавілова Г.Л., Коцюрuba А.В., Ткаченко Ю.П. Мелатонін відновлює ішемічну толерантність та зменшує чутливість відкриття

- мітохондріальної пори в серці старих щурів // Фізіол. журн. – 2006. – **52**, №3. – С. 3–14.
4. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Рудик О.В., Струтинська Н.А. Вивільнення неіденти-фікованих речовин мітохондріального походження – показник відкриття мітохондріальної пори серця щурів // Там само. – 2003. – **49**, №5. – С. 3–12.
  5. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів // Там само. – 2004. – **50**, №2. – С. 49–63.
  6. Шиманская Т.В., Добровольский Ф.В., Вавилова Г.Л., Струтинская Н.А., Рудик Е.В., Сагач В.Ф. NO-зависимая модуляция чувствительности открытия митохондриальной поры при ишемии/реперфузии изолированного сердца // Рос. физиол. журн. – 2009. – **95**, №1. – С. 28–37.
  7. Cai W.J., Wang M.J., Moore P.K., Jin H.M., Yao T., Zhu Y.C. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation // Cardiovasc. Res. – 2007. – **76**. – P. 29–34.
  8. Chang L., Geng B., Yu F., Zhao J., Jiang H., Du J, Tang C. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats // Amino Acids. – 2008. – **34**. – P. 573–585.
  9. Elsey D.J., Fowkes R.C., Baxter G.F. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulphide (H S) // Cell. Biochem. Funct. – 2010. – **28**. – P. 95–106.<sup>2</sup>
  10. Halestrap A. What is the mitochondrial permeability transition pore? // Molecular and cell. Cardiol. – 2009. – **46**. – P.821–831.
  11. Javadov S, Karmazyn M, Escobales N. Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases // Pharmacol. Exp. Ther. – 2009. – **330**(3) – P. 670–678.
  12. Ji Y., Pang Q.F., Xu G., Wang L., Wang J.K., Zeng Y.M. Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury // Eur. J. Pharmacol. – 2008. – **587**. – P. 1–7.
  13. Kapoor A., Thiernemann C. Hydrogen sulfide, neurogenic inflammation, and cardioprotection: a tale of rotten eggs and vanilloid receptors // Crit. Care Med. – 2010. – **38**. – P. 728–730.
  14. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions // Amino Acids. – 2010. – **45**. – P. 56–61.
  15. Kubo S., Doe I., Kurokawa Y., Nishikawa H., Kawabata A. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: Contribution to dual modulation of vascular tension // Toxicology. – 2007. – **232**. – P. 138–146.
  16. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide (H S) – the third gas of interest for pharmacologists // Pharmacol. Rep. – 2007. – **59**. – P. 4–24.
  17. Li L., Hsu A., Moore P.K. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation—a tale of three gases // Pharmacol. Ther. – 2009. – **123**. – P. 386–400.
  18. Li L., Rose P., Moore P.K. Hydrogen sulphide and cell signalling // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2011. – **51**. – P. 169–187.
  19. Mancardi D., Penna C., Merlino A., Del Soldato P, Wink D.A., Pagliaro P. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter : hydrogen sulphide // Biochem. Biohys. Acta. – 2009. – **1787**. – P. 864–872.
  20. Rui W. Two's company, three's a crowd: can H S be the third endogenous gaseous transmitter // FASEB J. – 2002. – **16**. – P. 1792–1798.
  21. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential // Nat. Rev. Drug Discov. – 2007. – **6**. – P. 917–935.
  22. Sivarajah A., Collino M., Yasin M., Benetti E., Gallicchio M., Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiernemann C. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R // Shock. – 2009. – **31**. – P. 267–274.
  23. Stipanuk M.H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine // Annu. Rev. Nutr. – 2004. – **24**. – P. 539–577.
  24. Tang G., Wu L., Liang W., Wang R. Direct stimulation of K-ATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells // Mol. Pharmacol. – 2005. – **68**. – P. 1757–1764.
  25. Wagner F., Asfar P., Calzia E., Radermacher P., Szaby C. Bench-to bedside review: Hydrogen sulfide – the third gaseous transmitter: applications for critical care // Critical Care. – 2009. – **13**. – P. 213–222.
  26. Whiteman M., Moore P.K. Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability // J. Cell. Mol. Med. – 2009. – **13**. – P. 488–507.
  27. Zhu Y.Z., Wang Z.J., Ho P., Loke Y.Y., Zhu Y.C., Huang S.H., Tan C.S., Whiteman M., Lu J., Moore P.K. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats // Appl. Physiol. – 2007. – **102**. – P. 261–268.

О.М. Падурару, І.Б. Філіппов, О.І. Болдирєв,  
І.А. Владимірова, В.Г. Найдьонов, Я.М. Шуба

## Уротелійзалежна дія ментолу на скорочення гладеньких м'язів сечового міхура

*Серед різноманітних рецепторів, які забезпечують та модулюють сенсорну функцію уротелію, залучений і холододовий рецептор/канал TRPM8. В цій роботі ми дослідили вплив неспецифічного активатора TRPM8-каналів ментолу на скорочення м'язових смужок сечового міхура щурів з інтактним уротелієм та без нього, а також визначили експресію мРНК TRPM8 в гладеньком'язових клітинах (ГМК) і уротелію за допомогою методу напівкількісної полімеразної ланцюгової реакції. Ментол (100 мкмоль/л) зменшував базальний тонус та амплітуду спонтанних скорочень тільки м'язових смужок з інтактним уротелієм. Скорочення, викликані гіперкалієвою ( $[K^+] = 60$  ммоль/л) деполяризацією мембрани ГМК, незалежно від наявності уротелію пригнічувалися ментолом приблизно однаково на 45 %, індуковані агоністом мускаринових холінорецепторів карбахоліном (1 мкмоль/л), – сильніше (на 63 %) за наявності уротелію, ніж без нього (на 12 %). Експресію мРНК TRPM8 в уротелії виявити не вдалося, тоді як у ГМК детрузора вона була незначною. Наші результати свідчать, що модуляцію ментолом скорочувальних відповідей можна пояснити його здатністю блокувати потенціалзалежні кальцієві канали ГМК детрузора та ментолстимульованим вивільненням з уротелію фактора(ів) з розслаблювальним впливом на ГМК детрузора сечового міхура щурів. Стимуляція вивільнення фактора(ів) з уротеліальних клітин найімовірніше відбувається внаслідок ментоліндукованої, TRPM8-незалежної мобілізації кальцію.*

*Ключові слова:* сечовий міхур, уротелій, детрузор, гладенькі м'язи, ментол, холододовий рецептор TRPM8.

### ВСТУП

Уротелій являє собою декілька шарів епітеліальних клітин епідермоїдного гістіо-типу, що вистилають внутрішню стінку сечового міхура, та виконує бар'єрну, сенсорну та модульовальну функції. На уротеліальних клітинах сечового міхура розташовані різні рецептори, включаючи мускаринові, нікотинові, пуринергічні, адренергічні тощо. Крім того уротелій здатен подібно нервовим клітинам сприймати великий спектр таких стимулів, як фізичні фактори (температура), хімічні речовини й нейромедіатори. У відповідь на ці подразники уротелій виділятиме низку біологічно активних речовин і фактори

росту [2, 4]. Зміни в функції уротелію лежать в основі багатьох патологій сечового міхура. Серед різноманітних рецепторів, які забезпечують сенсорну функцію уротелію, виділяють неселективні катіонні канали родини TRP (від англ. transient receptor potential). Більшість із TRP-каналів, виявлених у сечовому міхурі, а саме TRPV1, TRPV2 та TRPV4 належать до ванілоїдної (TRPV) підродини, а два інших – TRPA1 і TRPM8 – до анкиринової (TRPA) та меластатинової (TRPM) підродин відповідно [3, 8]. Усі ці канали крім основних активуючих чинників можуть тією чи іншою мірою модулюватися також механічним стимулом (зміна мікрокривизни або розтягнення мембрани, набухання клітин, напруга

© О.М. Падурару, І.Б. Філіппов, О.І. Болдирєв, І.А. Владимірова, В.Г. Найдьонов, Я.М. Шуба

зсуву з боку потоку рідини тощо).

Класичними активаторами TRPV1-каналів є температура (більше ніж 43 °C) та компонент пекучого перцю капсаїцин. TRPV1-канали, крім нервових аферентних закінчень, були виявлені в гладеньком'язових клітинах (ГМК) детрузора, інтерстиціальних клітинах та в уротелію принаймні у щура [3, 8]. Вважається, що в уротеліальних клітинах TRPV1-канали відіграють роль детектора розтягнення, у відповідь на яке вивільнюються NO та АТФ [4, 5]. Загалом, доволі поширена експресія TRPV1-каналів поки не дає можливості з упевненістю говорити про його фізіологічне призначення в різних типах клітин сечового міхура.

Експресія мРНК ще одного капсаїцинчутливого детектора високих температур (більше ніж 52 °C) – TRPV2 визначена майже в тих самих клітинах, що і TRPV1 [8], однак остаточної відповіді щодо розповсюдження його і залучення у функціональні відповіді поки немає.

До основних активуючих чинників TRPV4-каналів належать: гіпотонічне набухання клітин, температура в діапазоні 24–40 °C, закиснення середовища, форболові ефіри, арахідонова кислота та анандамід [8, 9]. На рівні білка TRPV4 знайдений у базальному уротелію. У нокаутних за TRPV4 мишей спостерігаються суттєві порушення у сечовипусканні [10]. Оскільки TRPV4 може активуватися напругою зсуву рідини, яка протікає, то припускається його роль у спряженні ініціації потоку сечі через уретру зі скороченнями детрузора, хоч механізми такого спряження залишаються не зовсім зрозумілими.

Білок холод- і ментолчутливого TRPM8-каналу був виявлений в уротелію та нервових волокнах субуротеліального шару [8]. Відомо, що інстиляція холодної води в міхур викликає його рефлекторні скорочення – прийом, який використовується в діагностичних цілях для визначення харак-

теру детрузорної активності.

Нарешті, TRPA1-канал, був виявлений тільки в сенсорних нервових терміналях у ділянці трикутника (тригон) сечового міхура і активується такими речовинами, як акролеїн, алілізотіоціонат (виділений з гірчиної олії), аліцил (сполука виділена з часнику) та цинамальдегід (складова кориці). Агоністи TRPA1 можуть викликати скорочення гладеньких м'язів сечового міхура внаслідок стимуляції вивільненням нейропептидів і простагландинів з сенсорних аферентних закінчень [17].

Загалом, існуючі відомості з експресії TRP-каналів у різних клітинах сечового міхура та їх функціональне значення є недостатніми і часто досить суперечливі [9], що можна пояснити змінами в експресії та функції цих каналів залежно від виду, статі, віку та фізичного стану дослідних тварин, а тому одержання нової інформації щодо них залишається актуальним.

Мета нашої роботи – дослідити дію агоніста TRPM8-каналів ментолу на скорочення м'язових смужок сечового міхура щурів з інтактним уротелієм і без нього, а також визначити експресію мРНК TRPM8 у міоцитах детрузора та уротелію за допомогою напівкількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

## МЕТОДИКА

*Приготування м'язових смужок сечового міхура та реєстрація скорочення.* Досліди проводили на кільцевих гладеньких м'язах сечового міхура самців щура масою 200–250 г. Після очищення міхура від жиру та сполучної тканини готували смужки довжиною 10 мм і шириною 2 мм. Використовували м'язові смужки зі збереженням та видаленням уротелієм. З одного боку їх прикріплювали до ємнісного датчика сили, а з другого – нерухомо прикріплювали в камері та пасивно розтягували навантаженням в 1 г. Перед дослідом м'язові смужки



витримували протягом години у розчині Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 120,4, KCl – 5,9, NaHCO<sub>3</sub> – 15,5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2, MgCl<sub>2</sub> – 1,2 CaCl<sub>2</sub> – 1,8 глюкоза – 11,5; рН 7,3. Досліджувані речовини додавали до проточного розчину Кребса, яким омивалися смужки при 37 °С. Скорочення реєстрували за допомогою тензометричного методу та записували на діаграмну стрічку самописця.

Експеримент складався з запису контрольованого скорочення у відповідь на 10-хвилинне прикладання гіперкалієвого розчину Кребса (KCl=60 ммоль/л) або карбахоліну (КХ, 1 мкмоль/л). На 30-й хвилині відмивання розчином Кребса додавали ментол (100 мкмоль/л) і на 10-й хвилині перфузії КХ проводили аплікацію активатора скорочення. М'язові смужки відмивали протягом 30 хв, після чого проводили повторну аплікацію активатора скорочення. При дослідженні впливу ментолу на базальний тонус гладеньких м'язів сечового міхура його прикладали протягом 10 хв. Якщо в експериментах треба було використовувати додаткову речовину, її вносили в омиваючий розчин Кребса за 10 хв до прикладання ментолу.

Ментол розводили в етанолі в базовій концентрації 1 моль/л і додавали до розчину Кребса в необхідній концентрації. Всі досліджувані речовини були від фірми "Sigma-Aldrich" (США).

Результати статистичного аналізу амплітуд скорочувальних відповідей подано як середні арифметичні і стандартне відхилення для певної кількості (n) вимірів.

*ПЛР зі зворотною транскрипцією.* Тканину м'язового шару, або уротелію сечового міхура гомогенізували у лізуючому розчині (Trizol RNA-Prep, "Isogene", Росія), а гомогенат використовували для виділення сумарної РНК. Зворотну транскрипцію здійснювали, беручи 0,3–0,6 мкг сумарної РНК та оліго-dT-праймер. З отриманої одноланцюгової ДНК ампліфіку-

вали за допомогою ПЛР фрагменти генів, що кодують TRPM8 та гліцеральдегідфосфат-дегідрогеназу (ГАФДГ, внутрішній контроль). ПЛР здійснювали у термоциклері Т-СУ ("Стеасон", Нідерланди) за програмою 94 °С (40 с), 58 °С (40 с), 72 °С (30 с) протягом 35–40 циклів. Праймери, специфічні до кДНК TRPM8 і ГАФДГ шура (номер доступу Генбанку NM\_134371 та NM\_017008 відповідно) були розроблені за допомогою програми Primer-BLAST, синтезовані компанією "Metabion" (Німеччина) і мали такі послідовності: TRPM8(f) – 5'-CCCCACCTCCTCACGGTCA-3', TRPM8(r) – 5'-AGGTCGGCAGACTCCCAGCG-3', GAPDH(f) – 5'-GTGATGGGTGTGAACCACGAGAAA-3', GAPDH(r) – 5'-CAGTGGATGCAGGGATGATGTTC-3'.

Візуалізацію ампліконів після горизонтального електрофорезу в 3%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію здійснювали за допомогою трансільюмінатора ViTran ("Біоком", Росія).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Вплив ментолу на базальний тонус гладеньких м'язів сечового міхура.* Гладеньким м'язам сечового міхура як з інтактним, так і з вилученим уротелієм притаманна спонтанна скорочувальна активність з частотою близько 0,5 с<sup>-1</sup> (рис. 1). Прикладання ментолу знижувало базальний тонус і значно пригнічувало амплітуду спонтанних скорочень м'язових смужок з інтактним уротелієм не впливало на ці показники за умов відсутності уротелію. Отже, ментол викликає уротеліязалежне зменшення базального тону сечового міхура.

*Вплив ментолу на КСІ- та КХ-викликані скорочення гладеньких м'язів сечового міхура.* В наступній серії експериментів ми дослідили, чи впливає ментол на скорочення гладеньких м'язів детрузора, викликані гіперкалієвою деполаризацією мембрани

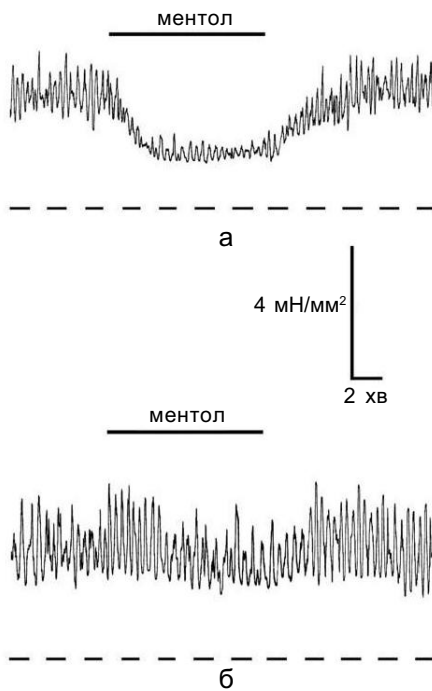
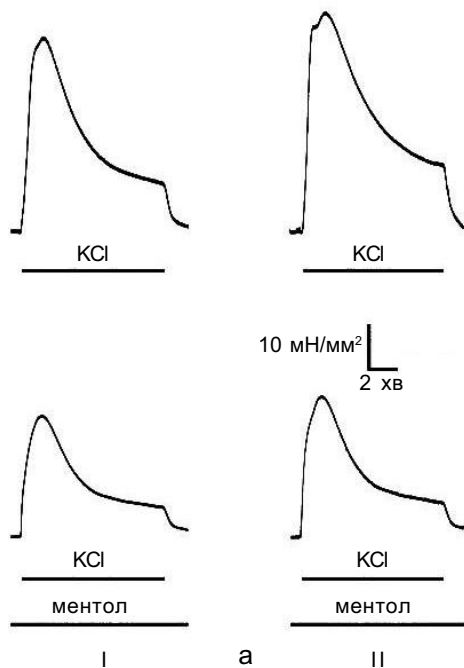


Рис. 1. Оригінальні записи, що демонструють вплив ментолу на базальний тонус і спонтанну скорочувальну активність гладеньких м'язів детрузора щура з інтактним (а) та вилученим уротелієм (б); час прикладання ментолу позначено суцільними горизонтальними лініями; пунктирні горизонтальні лінії позначають нульовий рівень напруження м'яза



ГМК або активацією мускаринових холінорецепторів КХ. КСІ-індуковані скорочення незалежно від наявності чи відсутності уротелію були з вираженими фазним і тонічним компонентами, на які часто накладались осциляції (рис. 2,а). Попередня преаплікація ментолу впродовж 10 хв знижувала амплітуду фазного компонента КСІ-індукованих скорочень смужок з уротелієм на  $45\% \pm 10\%$  ( $n=5$ ), а без уротелію – на  $40\% \pm 12\%$  ( $n=5$ ; див. рис. 2,а,б), але ця різниця в реакціях була статистично недостовірною ( $P>0,1$ ).

В основі скорочення гладеньких м'язів у відповідь на КСІ-деполяризацію мембрани ГМК лежить активація потенціалзалежного входу позаклітинного  $Ca^{2+}$ . Оскільки електронезбудливі уротеліальні клітини не містять потенціалзалежні кальцієві канали (ПЗКК), які згідно з літературними даними можуть блокуватися ментолом [1, 18], то пригнічення фазного компонента КСІ-індукованих скорочень за його наявності може відбуватися внаслідок часткового блокування ПЗКК L-типу ГМК. При цьому скорочення, викликані гіперка-

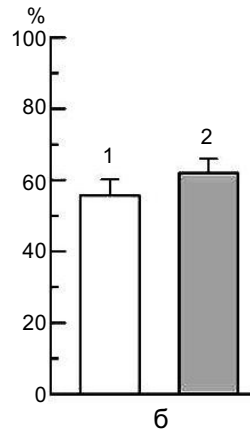


Рис. 2. Записи (а) КСІ-індукованих скорочень гладеньких м'язів детрузора щура з інтактним (I) та вилученим (II) уротелієм, одержані в контролі (верхні записи) та за наявності ментолу (нижні записи); час прикладання гіперкалієвого розчину та ментолу позначено суцільними горизонтальними лініями. На б: діаграма змін амплітуди КСІ-індукованих скорочень гладеньких м'язів детрузора під дією ментолу за наявності (1) та відсутності (2) уротелію

лієвою деполаризацією, пригнічувалися ментолом практично однаково незалежно від наявності уротелію, в той час як за базальних умов (тобто при мембранних потенціалах ГМК, близьких до потенціалу спокою) ментол викликав розслаблення м'язових смужок тільки з уротелієм. Останнє свідчить про те, що уротелійзалежне розслаблення ГМК детрузора є потенціалзалежним – максимальним за потенціалу спокою ГМК, зменшуючись з їх деполаризацією.

Підтвердженням здатності ментолу частково блокувати ПЗКК мембрани ГМК детрузора стали досліди з відомим активатором ПЗКК L-типу Bay K8644. Його прикладання (1 мкмоль/л) призводило до підвищення базального тону м'язових смужок, позбавлених уротелію (рис. 3). Однією з причин дії Bay K8644 [16] є зсув потенціалзалежної активації ПЗКК L-типу в бік гіперполяризації, завдяки чому вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через них стає можливим навіть при потенціалі спокою. Під дією ментолу приріст Bay K8644-викликаного тону зменшувався приблизно на 40 %, а також спостерігалось пригнічення амплітуди спонтанних скорочень.

Інгібувальна дія ментолу на КХ на відміну КСІ-викликаних скорочень залежала від наявності уротелію. На тлі преаплікації ментолу амплітуда фазного компонента КХ-індукованих скорочень м'язових смужок зі збереженням уротелієм

зменшувалась на  $63\% \pm 9\%$  ( $n=5$ ), тоді як на позбавлених уротелію – тільки на  $12\% \pm 8\%$  ( $n=5$ ; рис. 4). Таким чином, потенціалзалежність уротелійопосередкованого розслаблення ГМК детрузора у відповідь на дію ментолу свідчить про те, що КХ-індуковане скорочення активується без значної деполаризації мембрани ГМК, переважно внаслідок мобілізації депонованого кальцію та/або входу позаклітинного через потенціалнезалежні кальційпроникні канали, струм через які не може суттєво впливати на мембранний потенціал. Цей висновок узгоджується з літературними даними про переважну роль мускаринових холінорецепторів  $M_3$ -типу в активації скорочення гладеньких м'язів детрузора щура [20], які посередньо через  $G_q$ -білок, спряжений з сигнальним каскадом гідролізу фосфоліпідів фосфоліпазою C, кінцевими продуктами якого є кальціймобілізуювальний агент інозитолтрифосфат [11].

Розслаблювальна дія ментолу не пов'язана з експресією TRPM8. Ментоліндуковане, уротелійопосередковане розслаблення ГМК детрузора найімовірніше відбувається внаслідок секреції з уротелію розслаблювального фактора(ів). Останній здатний зменшувати внутрішньоклітинний вміст кальцію ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) у ГМК детрузора внаслідок пригнічення його стаціонарного входу та/або посилене виведення з цитозолу. Природа цього фактора, а також каналів або транспортерів ГМК, що можуть бути

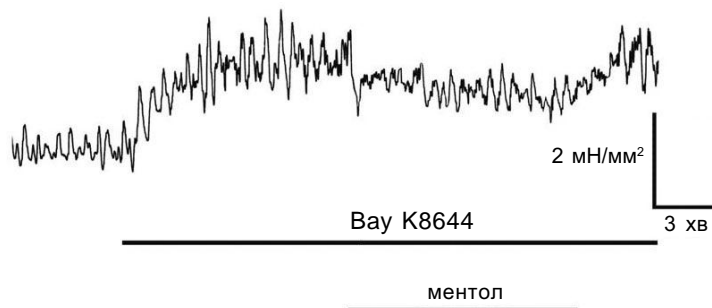
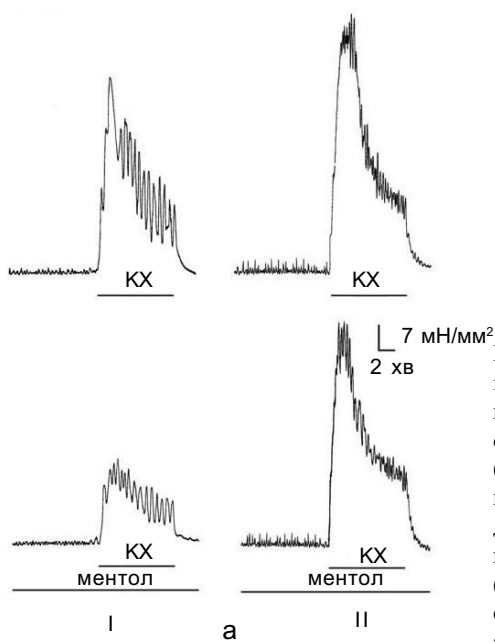


Рис. 3. Скорочення м'язової смужки детрузора, позбавленої уротелію, у відповідь на прикладання активатора потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу Bay K8644 та його часткове блокування ментолом

мішенню його впливу, поки залишається невідомою. Одним з уротеліальних фактів з прямим розслаблювальним впливом на ГМК можна назвати NO [4]. А інші, такі, як АТФ, ацетилхолін, субстанція Р, простагландини [4], можуть відігравати роль проміжної ланки у вивільненні з аферентних нервових закінчень зокрема кальцитоніну, який є відомим релаксуючим чинником вісцеральних гладеньких м'язів [14]. Потенціалзалежними кальційпроникними каналами мембрани ГМК – мішенями дії розслаблювальних уротеліальних факторів можуть бути деякі члени TRPC- та TRPM-підродин [7] і, зокрема, TRPC4, для якого також показано участь у реакціях, опосередкованих М-холінорецепторами деяких типів гладеньких м'язів [12], хоч функціональну експресію цих каналів у ГМК детрузора ще належить довести. Цілком можливо, що зменшення  $[Ca^{2+}]_i$  під дією уротеліальних факторів може відбуватися і внаслідок посилення захоплення  $Ca^{2+}$  в депо саркоплазматичного ретикулула ГМК через активацію  $Ca^{2+}$ -АТФази, хоч при цьому можна було б очікувати відсутність потенціалзалежної дії ментолу.



Стосовно джерела цитозольного  $Ca^{2+}$ , необхідного для активації вивільнення розслаблювального фактора клітинами уротелію під дією ментолу, можна висунути дві гіпотези: 1) кальцій входить через мембранний холодний рецептор-канал TRPM8, для якого ментол є екзогенним хімічним активатором, 2) кальцій вивільнюється з депо ендоплазматичного ретикулула внаслідок активації ментолом резистентного TRPM8 або незалежної від TRPM8 мобілізації, на користь яких є свідчення в літературі [13, 15, 19]. Щоб вибрати один із варіантів ми оцінили експресію мРНК TRPM8 в уротелії сечового міхура щурів за допомогою напівкількісної ПЛР. Для обґрунтованих висновків щодо можливості безпосереднього залучення TRPM8 у скоротливу активність гладеньких м'язів детрузора при дії ментолу експресія мРНК TRPM8 була також оцінена у ГМК.

На рис. 5 наведено результати ПЛР-досліджень, які показують, що мРНК TRPM8 практично відсутня в клітинах уротелію, а в гладеньких м'язах детрузора відповідний сигнал є дуже незначним порівняно з сенсорними нейронами задньо-

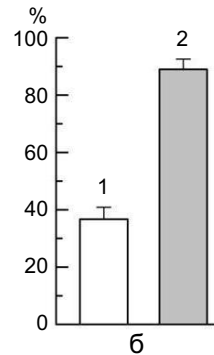


Рис. 4. Оригінальні записи (а) карбахолін (КХ) – КХ-індукованих скорочень гладеньких м'язів детрузора щура з інтактним (I) та вилученим (II) уротелієм, одержані в контролі (верхні записи) та за наявності ментолу (нижні записи); час прикладання КХ (1) та ментолу позначено суцільними горизонтальними лініями. На б – діаграма змін амплітуди КХ-індукованих скорочень гладеньких м'язів детрузора під дією ментолу за наявності (1) та відсутності (2) уротелію (середні значення  $\pm$  стандартна похибка у % відносно контрольних значень амплітуд КХ-індукованих скорочень,  $n=5-7$ )

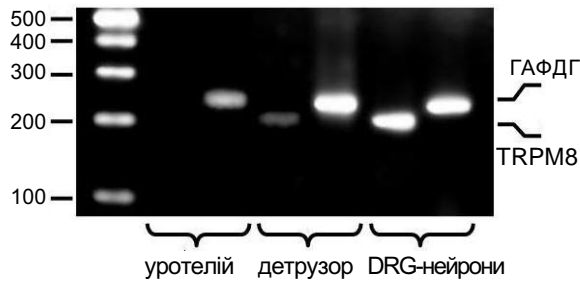


Рис. 5. Результати полімерної ланцюгової реакції аналізу експресії мРНК TRPM8 в уротелії, гладеньких м'язів детрузора та нейронах задньокорінцевих гангліїв (DRG-нейрони, TRPM8-позитивний контроль). Експресія мРНК гліцеральдегідфосфат-дегідрогенази була внутрішнім контролем

корінцевих гангліїв, які були позитивним контролем, і в яких експресія TRPM8 добре виражена. Природно, що відсутність мРНК виключає і відсутність білка. Таким чином, ні TRPM8-опосередкований вхід, ні мобілізація кальцію під дією ментолу, очевидно, не можуть лежати в основі вивільнення уротеліальними клітинами розслаблюючого фактора, а джерелом кальцію для цього, найімовірніше, є ментолактивована TRPM8-незалежна мобілізація, можливість якої була постульована раніше для інших типів клітин [13, 15, 19].

Отже, можна запропонувати таку модель уротелійзалежного розслаблення гладеньких м'язів детрузора під дією ментолу. Останній через мобілізацію кальцію в уротеліальних клітинах без участі TRPM8 призводить до вивільнення активного фактора, який, діючи або безпосередньо на ГМК детрузора, або через вивільнення додаткового фактора з аферентних нервових закінчень, призводить до зменшення цитозольної концентрації кальцію в ГМК. Останнє може відбуватися або пригніченням стаціонарно відкритих кальційпроникних катіонних каналів сарколеми, якими можуть бути деякі члени TRP-родини, або посиленням захоплення  $Ca^{2+}$  в депо саркоплазматичного ретикула, зокрема через фосфорилування відомого регулятора  $Ca^{2+}$ -АТФази білка фосфоламбану [6].

**О.М. Падурару, І.Б. Філіппов,  
А.І. Болдырев, І.А. Владимірова, Я.М. Шуба**

## УРОТЕЛИЙЗАВИСИМОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕНТОЛА НА СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Среди разнообразных рецепторов, обеспечивающих и модулирующих сенсорную функцию уротелия участвует и холододовый рецептор/канал TRPM8. В данной работе мы исследовали влияние неспецифического активатора TRPM8-каналов ментола на сокращения мышечных полосок мочевого пузыря крыс с сохранённым и удалённым уротелием, а также определили экспрессию мРНК TRPM8 в гладкомышечных клетках (ГМК) и уротелии при помощи метода полуколичественной полимеразной цепной реакции. Ментол (100 мкмоль/л) снижал базальный тонус и амплитуду спонтанных сокращений только полосок с интактным уротелием. Сокращения, вызванные гиперкалиевой ( $[K^+] = 60$  ммоль/л) деполяризацией мембраны ГМК независимо от наличия уротелия угнетались ментолом приблизительно одинаково на 45%. Сокращения, индуцированные агонистом мускариновых холинорецепторов карбахолом (1 мкмоль/л), угнетались ментолом значительно сильнее (на 63%) при наличии уротелия, чем без него (на 12%). Экспрессия мРНК TRPM8 в уротелии обнаружена не была, тогда как в ГМК детрузора она была незначительной. Наши данные свидетельствуют, что модуляцию ментолом сократительных ответов можно объяснить блокирующим действием ментола на потенциалзависимые кальциевые каналы ГМК детрузора и ментолстимулированным высвобождением уротелием фактора(ов) с расслабляющим влиянием на ГМК детрузора мочевого пузыря крысы. Стимуляция высвобождения этих факторов из уротелиальных клеток вероятнее всего происходит за счет ментолиндуцированной TRPM8-независимой мобилизации в них кальция.

Ключевые слова: мочевой пузырь, уротелий, детрузор, гладкие мышцы, ментол, холододовый рецептор TRPM8.

**O.M. Paduraru, I.B. Philippov, O.I. Boldyrev,  
I.A. Vladymyrova, Ya.M. Shuba**

## UROTHELIUM-DEPENDENT MODULATION OF URINARY BLADDER SMOOTH MUSCLE CONTRACTIONS BY MENTHOL

TRPM8 cold receptor/channel is considered amongst the variety of receptors that support and modulate sensory function of urothelium, although the information regarding this is still quite contradictory. Here we have studied the effects of non-specific TRPM8 activator menthol on the contractions of the smooth muscle strips of the rat bladder with intact and removed urothelium, and assessed the expression in them of TRPM8 mRNA using semi-quantitative RT-PCR. Menthol (100  $\mu$ M) decreased the basal tone and the amplitude of spontaneous contractions only in the strips with intact urothelium.

Irrespective of the presence of urothelium it similarly inhibited (by ~45 %) the contractions evoked by high-potassium depolarization. Contractions induced by muscarinic agonist carbachol (1  $\mu$ M) were inhibited by menthol much stronger (by ~63 %) if the urothelium was present than without it (by ~12 %). Expression of TRPM8 mRNA in urothelium was not detected, whilst in detrusor smooth muscle it was found very low. We conclude that modulation of contractile responses by menthol is most likely explained by its blocking action on voltage-gated calcium channels of detrusor smooth muscle cells (SMC) and by menthol-stimulated release from urothelium of some factor(s) with relaxant effects on SMCs. Stimulation of the secretion of these factors from urothelial cells most likely involves menthol-induced, TRPM8-independent mobilization of calcium.

Key words: bladder, urothelium, detrusor, smooth muscles, menthol, cold receptor TRPM8.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Baylie R.L., Cheng H., Langton P.D., James A.F. Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by the TRPM8 agonist, (-)-menthol // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2010. – **61**, № 5. – P. 543–50.
- Birder L.A. Urinary bladder urothelium: molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli // *Vascul. Pharmacol.* – 2006. – **45**, № 4. – P. 221–226.
- Birder L.A. TRPs in bladder diseases // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 2007. – **1772**, № 8. – P. 879–884.
- Birder L.A., de Groat W.C. Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction // *Nat. Clin. Pract. Urol.* – 2007. – **4**, № 1. – P. 46–54.
- Birder L.A., Nakamura Y., Kiss S., Nealen M.L., Barrick S., Kanai A.J., Wang E., Ruiz G., De Groat W.C., Apodaca G., Watkins S., Caterina M.J. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1 // *Nat. Neurosci.* – 2002. – **5**, № 9. – P. 856–860.
- Colyer J. Phosphorylation states of phospholamban // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1998. – **853**. – P. 79–91.
- Dietrich A., Chubanov V., Kalwa H., Rost B.R., Gudermann T. Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells // *Pharmacol. Ther.* – 2006. – **112**, № 3. – P. 744–760.
- Everaerts W., Gevaert T., Nilius B., De Ridder D. On the origin of bladder sensing: Tr(i)ps in urology // *Neurourol. Urodyn.* – 2008. – **27**, № 4. – P. 264–273.
- Everaerts W., Serpelyveda M.R., Gevaert T., Roskams T., Nilius B., De Ridder D. Where is TRPV1 expressed in the bladder, do we see the real channel? // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2009. – **379**, № 4. – P. 421–425.
- Gevaert T., Vriens J., Segal A., Everaerts W., Roskams T., Talavera K., Owsianik G., Liedtke W., Daelemans D., Dewachter I., Van Leuven F., Voets T., De Ridder D., Nilius B. Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding // *J. Clin. Invest.* – 2007. – **117**, № 11. – P. 3453–3462.
- Gudermann T., Hofmann T., Mederos Y., Schnitzler M., Dietrich A. Activation, subunit composition and physiological relevance of DAG-sensitive TRPC proteins // *Novartis Found. Symp.* – 2004. – **258**, – P. 103–118
- Lee K.P., Jun J.Y., Chang I.Y., Suh S.H., So I., Kim K.W. TRPC4 is an essential component of the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in mouse visceral smooth muscle cells // *Mol. Cells.* – 2005. – **20**, № 3. – P. 435–441.
- Mahieu F., Owsianik G., Verbert L., Janssens A., De Smedt H., Nilius B., Voets T. TRPM8-independent menthol-induced  $Ca^{2+}$  release from endoplasmic reticulum and Golgi // *J. Biol. Chem.* – 2007. – **282**, № 5. – P. 3325–3336.
- Marshall I. Mechanism of vascular relaxation by the calcitonin gene-related peptide // *Ann NY Acad. Sci.* – 1992. – **657**. – P. 204–215.
- Palade P. Drug-induced  $Ca^{2+}$  release from isolated sarcoplasmic reticulum. II. Releases involving a  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release channel // *J. Biol. Chem.* – 1987. – **262**, № 13. – P. 6142–6148.
- Sanguinetti M.C., Krafte D.S., Kass R.S. Voltage-dependent modulation of Ca channel current in heart cells by Bay K8644 // *J. Gen. Physiol.* – 1986. – **88**, № 3. – P. 369–392.
- Streng T., Axelsson H.E., Hedlund P., Andersson D.A., Jordt S.E., Bevan S., Andersson K.E., Hogestatt E.D., Zygmunt P.M. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder // *Eur. Urol.* – 2008. – **53**, № 2. – P. 391–399.
- Swandulla D., Carbone E., Schafer K., Lux H.D. Effect of menthol on two types of Ca currents in cultured sensory neurons of vertebrates // *Pflug. Arch.* – 1987. – **409**. – P. 52–59.
- Thebault S., Lemonnier L., Bidaux G., Flourakis M., Bavencoffe A., Gordienko D., Roudbaraki M., Delcourt P., Panchin Y., Shuba Y., Skryma R., Prevarskaya N. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, № 47. – P. 39423–39435.
- Wang P., Luthin G.R., Ruggieri M.R. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1995. – **273**, № 2. – P. 959–966.

*In-t фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
E-mail: oksana@biph.kiev.ua

*Матеріал надійшов до редакції 20.12.2010*

**К.В. Несвітайлова, О.О. Гончар, Т.І. Древицька, Л.П. Арабська, М.М. Стешенко, О.М. Бакуновський, Т.В. Серебровська, І.М. Маньковська**

## **Зміни експресії мРНК і білків антиоксидантних ферментів у лейкоцитах крові дітей, хворих на бронхіальну астму, при інтервальному гіпоксичному тренуванні**

*Досліджували вплив 10-добового інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ) на рівень експресії мРНК і вміст білків ферментів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-S-трансферази у лейкоцитах крові дітей, хворих на бронхіальну астму. Встановлено, що після курсу ІГТ експресія мРНК супероксиддисмутази знизилася на 32,5 % ( $P < 0,05$ ), а вміст білка при цьому не змінився. Вміст мРНК гена каталази та білка у лейкоцитах крові дітей збільшилися на 67 та 13 % відповідно. Показано збільшення кількості білка глутатіон-S-трансферази на 90 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з показниками до тренування.*

*Ключові слова: антиоксидантні ферменти, експресія мРНК та білків, гіпоксичні тренування, бронхіальна астма.*

### **ВСТУП**

Епідеміологічні дослідження свідчать, що у різних країнах, у тому числі в Україні, на бронхіальну астму (БА) хворіють від 4 до 35 % населення, серед них – 5–10 % дітей [6, 12, 15]. В останні 10–15 років у зв'язку зі збільшенням забруднення навколишнього середовища, появою нових хімічних алергенів збільшується кількість дітей, хворих на БА, а їх лікування не завжди ефективне, спостерігаються побічні реакції [15]. Тому є нагальна потреба подальшого пошуку нових патогенетичних шляхів лікування рецидивних і хронічних бронхолегеневих захворювань, у тому числі БА.

Доведено, що розвиток запального процесу в легенях активує вільнорадикальне окиснення та гліколіз, знижує активність системи антиоксидантного захисту, значно порушує окиснювально-відновлювальні реакції, що призводить до «замкненого»

патологічного кола [5, 10]. У дихальних шляхах найпотужнішими продуцентами супероксидного аніона, – попередника усіх вільних радикалів кисню, є альвеолярні макрофаги. Паралельно з ними до місцевої генерації супероксид-аніона залучаються рециркулюючий пул лейкоцитів, еозинофіли, нейтрофіли та моноцити. При цьому концентрація  $O_2$  збільшується в шість–сім разів під час загострення запального процесу [5]. Активні форми кисню (АФК) – супероксид-аніон, перекис водню, гідроксильний радикал, синглетний кисень – мають низку негативних ефектів: бронхоконстрикторний, розвиток гіперреактивності бронхів і гіпертрофії гладеньких м'язів, ушкоджувальний вплив на епітелій бронхів, посилення викиду клітинами гістаміну тощо [2]. АФК посилюють також синтез В-лімфоцитами імуноглобуліну Е (IgE), одночасно пригнічуючи активність Т-супресорів. Продукти перекисного окиснення ліпідів контролюють

© К.В. Несвітайлова, О.О. Гончар, Т.І. Древицька, Л.П. Арабська, М.М. Стешенко, О.М. Бакуновський, Т.В. Серебровська, І.М. Маньковська

розщеплення мембранних фосфоліпідів і активність фосфоліпази  $A_2$ , результатом чого є вивільнення арахідонової кислоти та утворення бронхоконстрикторних ейкозаноїдів, зокрема лейкотриєнів. Вони, діючи на еозинофіли, знову сприяють генерації супероксид-аніона. Низькомолекулярна форма фактора активації тромбоцитів, який також є продуктом метаболізму арахідонової кислоти, викликає синтез інтерлейкіну-1 – найпотужнішого медіатора запалення [9, 11]. Протистояти інтенсифікації вільнорадикальних процесів здатна антиоксидантна система, яка в організмі представлена неферментативними (глутатіон, вітаміни А, Е, С) та ферментативними сполуками (каталаза – КАТ, супероксиддисмутаза – СОД, глутатіонпероксидаза). Регенерація антиоксидантної системи потребує тривалого часу і не завжди може забезпечити потреби організму в разі хронічного впливу вільнорадикальних сполук. Тому цілком доцільним вважається застосування терапії, яка усуває порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу у хворих на БА.

Інтервальні гіпоксичні впливи – найбільш ефективні засоби модулювання антиоксидантної системи [12]. Тому перспективним напрямком у лікуванні та профілактиці БА можуть бути методи адаптації до дозованої гіпоксії. Доведено, що під час інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ) мобілізуються компенсаторні можливості організму, суттєво покращується стан функціональної системи дихання, підвищується аеробна продуктивність організму та його працездатність [13]. Але, незважаючи на різнобічне використання цього методу, механізми його адаптивного впливу ще остаточно не з'ясовані. Нині акцент у вивченні цієї проблеми переноситься на субклітинний і молекулярний аспекти, причому велика увага приділяється процесам регуляції на генному рівні [8]. Всі попередні праці, що стосуються встановлення ролі антиокси-

дантних ферментів у розвитку та перебігу різних легеневих патологій і БА зокрема, торкаються в основному питань змін активності таких ферментів, як СОД, КАТ тощо у сироватці крові або у еритроцитах [21].

Метою цього дослідження було вивчення експресії мРНК і білків антиоксидантних ферментів у лейкоцитах крові дітей, хворих на БА, до та після ІГТ, встановлення взаємозв'язку експресії мРНК і синтезу білків антиоксидантного захисту, а також визначення можливості використання останніх для оцінки ефективності тренування.

## МЕТОДИКА

Під час стаціонарного лікування у відділенні захворювань органів дихання Державної установи "Інститут педіатрії, акушерства та гінекології НАМН України" обстежено 16 дітей віком від 9 до 13 років (13 хлопчиків і 3 дівчинки), хворих на БА, до і після проведення ІГТ. Усі хворі мали діагноз: БА, персистуюча форма, середня важкість, період між нападами без ознак дихальної недостатності. Вони одержували базисну терапію зарекомендованими схемами [1]. При роботі дотримувалися всіх етичних принципів обстеження людей. Одержано дозвіл від Комітету з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця.

Перед курсом ІГТ для визначення індивідуальної чутливості до гіпоксичного впливу проводили гіпоксичну пробу, на підставі результатів якої розраховували індивідуалізований режим ІГТ за оригінальною методикою, розробленою у відділі з вивчення гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця. Методика гіпоксичної проби полягала у зворотному диханні через маску в дихальний контур з поглиначем вуглекислого газу автоматизованого комплексу „Гіпотрон” (виробник – Науково-дослідний інститут автоматизації проектування динамічних об'єктів та



систем „АПРОДОС” Національного технічного університету України „Київський політехнічний інститут”) в довільному режимі з індивідуально прийнятним темпом росту еукапічної нормобаричної гіпоксичної гіпоксії до досягнення 12 % O<sub>2</sub> у вдихуваному повітрі (в середньому за 2–3 хв). Далі концентрація кисню автоматично підтримувалась апаратом протягом 5 хв. Початковий об’єм дихального контуру регулювали відповідно до життєвої ємності легень і хвилинного об’єму дихання. Після припинення проби пацієнт продовжував 3–5 хв дихати через маску комплексу „Гіпотрон” для моніторингу динаміки відновлення. Згідно з вентиляторною відповіддю на гіпоксичний подразник призначався індивідуалізований режим ІГТ на основі базової схеми 10-добового циклу по 4 щоденних сеанси. Один сеанс складався з дихання гіпоксичною сумішшю упродовж 5–7 хв з 5-хвилинними інтервалами дихання атмосферним повітрям.

Експресію мРНК антиоксидантних ферментів Cu, Zn-супероксиддисмутази (Cu, Zn-СОД), КАТ і глутатіон-S-трансферази (GST) визначали у лейкоцитах периферичної крові. Тотальну РНК виділяли з використанням набору „Trizol RNA Prep 100” (Росія), який містить Trizol (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат і фенол) та Extra-Gene E (суспензія суміші іонообмінників). Для зворотної транскрипції застосовували „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit” („Fermentas”, Литва). Для ампліфікації використовували по парі специфічних праймерів до кожного гена, синтезовані фірмою „Fermentas”, Литва. Cu, Zn-СОД: прямого – 5’-TGAAGAGAGGC ATGTTGGAG-3’ та зворотного – 5’-TCTT CATTTCCACSTTTGCC-3’; КАТ: прямого – 5’-TCCATTCGATCTCACCAAGG-3’ та зворотного – 5’-TCCATTCGATCTCACCA AGG-3’; GST: прямого – 5’-GCTGATGGC GA TGAATGAACACTG-3’ та зворотного –

5’-CATCACAGACAAGAAATCCT-3’. ПЛР проводили в термоциклері „Applied Biosystems 2700” („PerkinElmer”, США). Ампліфікати розділяли в 1,6%-му агарозному гелі у тріс-боратному буфері, який містив бромистий етидій. Візуалізацію ампліфікатів генів після горизонтального електрофорезу (160 В протягом 40 хв) проводили за допомогою транслюмінатора „Біоком” (Росія), після чого зображення опрацьовувалися програмним забезпеченням ViTran 2.0 („Біоком”, Росія).

Дослідження рівня експресії мРНК і білків проводили за 1 добу до проходження курсу ІГТ і через 1 добу після його закінчення. Експресію білків Cu, Zn-СОД, КАТ і GST визначали методом Western blotting. Рівну кількість білка у кожній пробі (50–100 мкг) використовували для електрофоретичного розділення білків за методом Laemmli [20]. Після перенесення білків з гелю на мембрану PVD („Sigma”, США) останню інкубували з первинними моноклональними антитілами („Santa Cruz”, США; розведення 1:1000), а потім – із вторинними антикролячими IgG, кон’югованими з пероксидазою хрому („Santa Cruz”, США; розведення 1:2000). Для візуальної оцінки білків використовували субстрат-фарбник для пероксидази. Кількісний розрахунок отриманих імуноблотів проводили за допомогою їх сканування та обробки комп’ютерною програмою GelPro Analyzer.

Статистичну обробку матеріалу проводили з використанням комп’ютерної програми Excel 7.0 for Windows XP із обчисленням середніх значень ( $M \pm m$ ), критерію t Стьюдента. Для встановлення ступеня зв’язку між вивченими показниками був проведений кореляційний аналіз із визначенням коефіцієнта кореляції Спірмана ( $r$ ).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведеного ІГТ відмічали значне покращення самопочуття хворих

дітей, що збігається з літературними даними [18]. Відмічено також поліпшення об'ємних та швидкісних характеристик і показників легеневої вентиляції.

Нами було вперше встановлено, що після курсу ІГТ у дітей, хворих на БА, експресія мРНК Cu, Zn-SOD і вміст білка цього ферменту у лейкоцитах змінювалися по-різному. Експресія мРНК Cu, Zn-SOD знизилася на 32,5 % ( $P < 0,05$ ; рис. 1,а), а білка при цьому не змінився (рис. 2). Експресія мРНК гена КАТ та вміст її білка у лейкоцитах крові дітей збільшилися на 67 та 13 % відповідно ( $P < 0,05$ ; див. рис. 1,б та рис. 3). Експресія мРНК гена GST практично не змінювалася (спостерігалася статистично недостовірна тенденція до його збільшення), при цьому значно підвищився вміст білка GST – на 90 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з показниками до початку курсу (див. рис. 1,в та рис. 4). Таким чином, при аналізі змін експресії мРНК і білків антиоксидантних ферментів, які відбуваються під впливом ІГТ, можна констатувати, що взаємозв'язок цих показників складний. Якщо вміст мРНК генів цих ферментів частіше залишається на рівні до тренування (Cu, Zn-SOD та GST) або збільшується (КАТ), то синтез білка або значно зростає (GST), або не змінюється (Cu, Zn-

СОД). Такий характер взаємозв'язку експресії мРНК та інтенсивності трансляції білків антиоксидантних ферментів з посиленням останньої, ймовірно, можливо пояснити тим, що після дії ІГТ працюють особливі регуляторні механізми на трансляційному рівні. Так, при гіпоксії накопиченню деяких білків у клітинах сприяє або припинення їх розщеплення протеасомним протеолізом, або стабілізація кінцевого продукту на рівні біосинтезу [23], а синтез усіх інших білків, навпаки, припиняється і їх вміст знижується внаслідок гіпоксичного пригнічення кіназозалежного фосфорилування фактора ініціації трансляції eIF26 [22, 24].

Отримані нами результати щодо змін експресії мРНК і білків антиоксидантних ферментів після ІГТ цікаво порівняти з літературними даними. Відомо, що адаптація до гіпоксії посилює активність антиоксидантних систем організму, а також знижує активність систем, що генерують активні форми кисню [4]. Так, після 3-тижневого курсу ІГТ у дорослих хворих на БА з легким персистуючим перебігом активність СОД у еритроцитах крові підвищилася на 24 %, КАТ – на 6 %, глутатіонпероксидази – на 13 % [3]. Позитивний вплив 20-добового курсу ІГТ на системний про- та антиоксидантний статус у хворих на БА

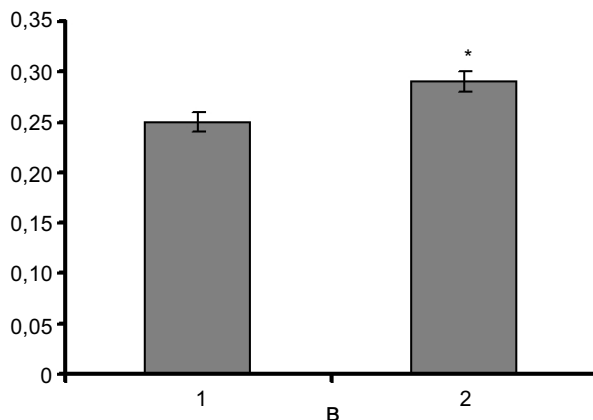
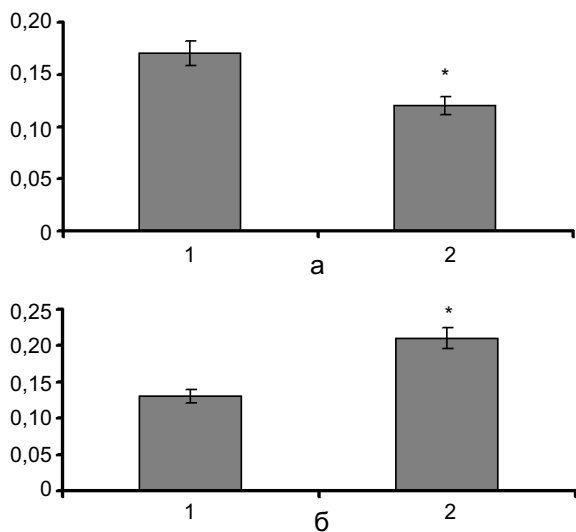


Рис. 1. Зміни рівня експресії мРНК генів Cu, Zn-супероксиддисмутази (а), каталази (б) та глутатіон-S-трансферази (в) до (1) та після (2) інтервальних гіпоксичних тренувань. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем

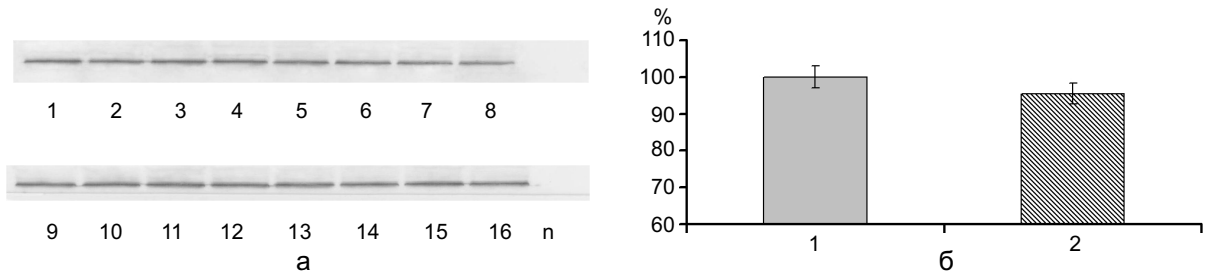


Рис. 2. Рівень експресії білка Cu, Zn-супероксиддисмути до (1) та після (2) інтервальних гіпоксичних тренувань у дітей різних груп: а – електрофореграма, б – відносний рівень; n – індивідуальні показники рівня експресії білка для кожної особи. \*P < 0,05 порівняно з контролем

позначився у підвищенні активності у плазмі крові СОД на 23 %, КАТ – на 9 %, глутатіонпероксидази – на 31 % порівняно з показниками до початку курсу ІГТ [4]. Таким чином, після курсу ІГТ підвищу-

валася активність майже всіх важливих антиоксидантних ферментів, що дає змогу визначити дефіцит антиоксидантного захисту клітин як одну з головних ланок патогенезу БА, а також вважати, що ІГТ

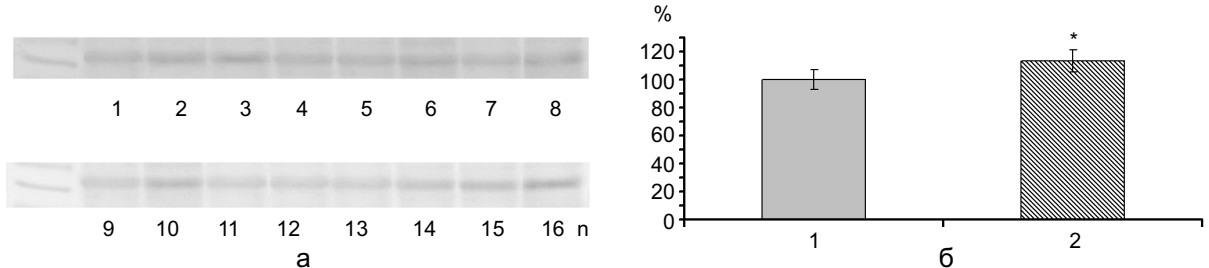


Рис. 3. Рівень експресії білка каталази до (1) та після (2) інтервальних гіпоксичних тренувань у дітей різних груп: а – електрофореграма, б – відносний рівень; n – індивідуальні показники рівня експресії білка для кожної особи. \*P < 0,05 порівняно з контролем

можна застосовувати для попередження загострень цього захворювання [3, 4, 18].

Показано, що після проведення курсу ІГТ між експресією мРНК КАТ та вмістом білка КАТ є позитивна кореляція ( $r = 0,5256$ ). Тобто підвищення рівня експресії мРНК гена призводить до збільшення вмісту білка. Позитивна кореляція відміча-

лася також між рівнем експресії мРНК і вмістом білка GST ( $r = 0,4042$ ). Проте зміни експресії мРНК Cu, Zn-СОД не виявили достовірної кореляції зі змінами кількості самого білка Cu, Zn-СОД. Літературних відомостей щодо взаємозв'язку експресії мРНК та білка СОД дуже мало. Наші результати показали, що у тварин при

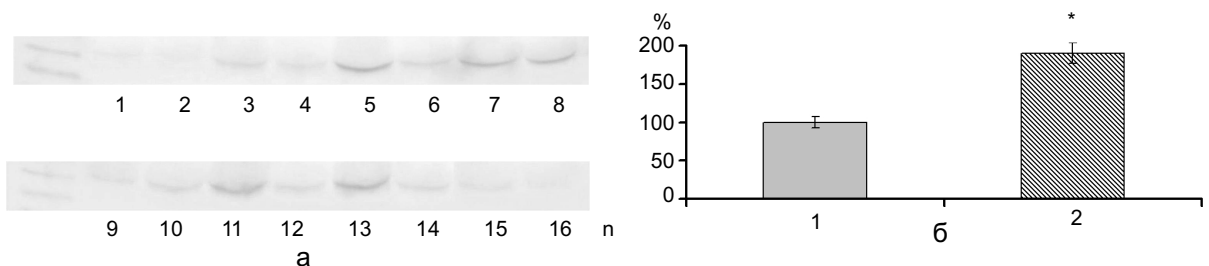


Рис. 4. Рівень експресії білка глутатіон-S-трансферази до (1) та після (2) інтервальних гіпоксичних тренувань у дітей різних груп: а – електрофореграма, б – відносний рівень; n – індивідуальні показники рівня експресії білка для кожної особи. \* P < 0,05 порівняно з контролем

гіпоксії була виявлена негативна кореляція між рівнями експресії білка та мРНК Mn-SOD у мітохондріях міокарда [6]. Це може свідчити про посилення процесів трансляції зі швидким накопиченням білка ферменту за умов гіпоксії, у той час як активація експресії його мРНК на цьому етапі ще не відбувалася.

Загалом, отримані результати дають нам змогу зробити припущення, що ІГТ стимулює експресію білків KAT, GST і Cu, Zn-SOD. У свою чергу експресії мРНК генів Cu, Zn-SOD і GST до проведення курсу ІГТ корелювали між собою ( $r = 0,5872$ ), що свідчить про взаємоузгоджену дію цих антиоксидантних ферментів і наявність прямої залежності між активностями Cu, Zn-SOD і GST. Між іншими показниками у дітей, хворих на БА, не було виявлено вірогідної кореляції.

Раніше було показано, що важливою ланкою патогенезу бронхолегеневих захворювань є оксидативний стрес, який призводить до певного дисбалансу в системі перекисне окиснення ліпідів – антиоксидантний захист [10, 14]. При БА існує дефіцит активності усіх головних антиоксидантних ферментів, величина якого суттєво не відрізняється від ступеня зниження загальної антиоксидантної активності [2, 5]. Так, деякі автори відмічали, що у хворих на БА активність СОД (однак не вміст білка цього ферменту) була нижчою в плазмі крові порівняно зі здоровими особами, і ця активність корелювала з порушеннями механіки дихання. Чим вищим був рівень оксидативного стресу у цих пацієнтів, тим більшою була інактивація СОД, що посилювало запалення та обмежувало рух повітря у бронхах [17]. Згідно з іншими дослідженнями, у пацієнтів з БА Cu, Zn-SOD і Mn-SOD мРНК та рівень експресії цих білків залишалися незмінними при зниженні активності Cu, Zn-SOD у порівнянні з контрольною групою [21]. Було відмічено, що у бронхіальній рідині пацієнтів з хронічними обструктивними захворюваннями легень не виявлено змін експресії генів

Cu, Zn-SOD і Mn-SOD порівняно із контрольною групою, однак реєструвалося значне підвищення експресії гена клітинної СОД, що викликало збільшення активності загальної СОД у крові. Для каталази кореляція експресії мРНК і проявів хронічних обструктивних захворювань легень не була виявлена [16]. У хворих з такими захворюваннями підвищення активності СОД в еритроцитах крові було викликане індукцією експресії цього антиоксидантного ферменту прооксидантами [19].

Отже, збільшення експресії білка та мРНК генів антиоксидантних ферментів за умов ІГТ може бути певною мірою зумовлено наявністю в промоторі цих генів регуляторних послідовностей транскрипційних факторів, чутливих до гіпоксії. Крім того, це збільшення може бути маркером реакції з боку системи антиоксидантного захисту і мРНК їх генів навіть на помірну гіпоксію.

Таким чином, було встановлено, що ІГТ сприяє підвищенню в лейкоцитах крові дітей, хворих на БА, експресії білків KAT, GST і Cu, Zn-SOD. На основі аналізу змін експресії мРНК і білків антиоксидантних ферментів зроблено припущення про можливість використання їх як маркерів ефективності ІГТ у дітей при БА, але для такого висновку треба детально проаналізувати зв'язок між збільшенням експресії мРНК і білків антиоксидантних ферментів та покращенням клінічного стану хворих і функції їх зовнішнього дихання.

**К.В. Несвитаїлова, О.А. Гончар,  
Т.И. Древицкая, Л.П. Арабская,  
М.М. Стешенко, А.М. Бакуновський,  
Т.В. Серебровская, И.Н. Маньковская**

#### **ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК И БЕЛКОВ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ ПРИ ИНТЕРВАЛЬНОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ТРЕНИРОВКЕ**

В работе исследовали влияние 10-суточной интервальной гипоксической тренировки (ИГТ) на уровень экспрессии мРНК и содержание белков ферментов антиоксидантной

защиты – супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы в лейкоцитах крови детей, больных бронхиальной астмой. Установлено, что после курса ИГТ экспрессия мРНК супероксиддисмутазы снизилась на 32,5 % ( $P<0,05$ ), а содержание белка при этом не изменилось. Содержание мРНК гена каталазы и белка в лейкоцитах крови детей увеличились на 67 и 13 % соответственно. Показано увеличение количества белка глутатион-S-трансферазы на 90 % ( $P<0,05$ ) по сравнению с показателями до тренировки.

Ключевые слова: антиоксидантные ферменты, экспрессия мРНК и белков, гипоксические тренировки, бронхиальная астма.

**K.V. Nesvitalova, O.A. Gonchar,  
T.I. Drevitskaya, L.P. Arabskaya,  
M.M. Steshenko, O.M. Bakunovsky,  
T.V. Serebrovskaya, I.N. Mankovskaya**

#### **CHANGES IN MRNA AND PROTEIN EXPRESSION OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA AFTER INTERVAL HYPOXIC TRAINING**

The effect of 10 days of interval hypoxic training (IHT) on the mRNA expression and protein content of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione-S-transferase) in leukocytes of children with bronchial asthma (BA) was investigated. It was shown that after sessions of IHT the mRNA expression of superoxide dismutase decreased by 32,5% ( $P<0,05$ ), but the level of protein was unchanged. The level of catalase gene mRNA and protein content in leukocytes after IHT increased by 67% and 13% accordingly. We detected a 90% increase in glutathione S-transferase level following IHT. Key words: antioxidant enzymes, mRNA and protein expression, hypoxic training, bronchial asthma.

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

*Institute for Pediatrics, Obstetrics and Gynecology NAMN Ukraine, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Антипкін Ю.Г., Уманець Т.Р., Лапшин В.Ф. Клінічні настанови з діагностики та лікування бронхіальної астми у дітей // Здоров'я України, – 2010. – № 3(14). – С. 39–41.
2. Болевич С., Даниляк І.Г., Коган А.Х. Новые доказательства включения активных форм кислорода в патогенезе бронхиальной астмы // Клини. медицина. – 1997. – №8. – С. 34–36.
3. Борукова И.Х. Эффективность интервальной гипоксической тренировки при бронхиальной астме у детей и подростков // Педиатрия. – 2007. – 86, №4. – С. 29–35.

4. Галактионова Я.П., Варшавский Б. Я., Кореновский Ю. В. Влияние интервальной гипоксии на оксидантно-антиоксидантный статус больных бронхиальной астмой // Сиб. мед. журн. – 2003. – №4. – С. 9–13.
5. Герасимов С.В. Пероксидна оксидация ліпідів та антиоксидантний захист при бронхіальній астмі // Укр. мед. часопис. – 2000. – №1. – С. 86–94.
6. Гончар О.О., Стешенко М.М., Маньковська І.М., Французова С.Б. Корекція мітохондріальної дисфункції в міокарді щурів в умовах окиснювального стресу гіпоксичного генезу // Загальна патологія та патол. фізіологія. – 2010. – № 3. – С. 44–48.
7. Гордеев В.И., Александрович Ю.С., Паршин Е.В. Респираторная поддержка у детей. – СПб: Элби, 2009. – 169 с.
8. Горовенко Н.Г., Подольська С.В., Чернюк Н.В. Визначення молекулярно-генетичних маркерів спадкової схильності до виникнення хронічного обструктивного захворювання легень // Укр. пульмонолог. журн. – 2009. – № 4. – С. 13–16.
9. Гушин И.С., Цыкаловский О.Р. Система свободных радикалов и активизация клеток-мишеней аллергии // Патол. физиология эксперим. терапия. – 1990. – №6. – С. 3–10.
10. Даниляк І.Г., Коган А.Х., Болевич С.Н. Генерация активных форм кислорода лейкоцитами крови, ПОЛ и антиперекисная защита у больных бронхиальной астмой // Терап. архив. – 1992. – №3. – С. 54–57.
11. Захарян А.К., Амадуни В.Г. О взаимосвязях изменения содержания простагландинов, катехоламинов и перекисного окисления липидов у больных бронхиальной астмой // Вопр. мед. химии. – 1991. – 37. – №3. С. 45–47.
12. Іпатов А.В., Сергієні О.В., Паніна С.С., Войтчак Т. Г., Гондуленко Н.О. Епідеміологічні та медико-експертні аспекти інвалідності внаслідок бронхіальної астми в Україні // Укр. пульмонолог. журн. – 2004. – № 3. – С. 23–26.
13. Колчинская А.З., Цыганова Т.Н., Остапенко Л.А. Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте. – М.: Медицина, 2003. – 407 с.
14. Треумова С.И. Антиоксидантная обеспеченность и перекисное окисление липидов у больных бронхиальной астмой // Лікар. справа. – 1997. – №6. – С. 76–77.
15. Чернюк Н.В. Динаміка основних критеріїв якості життя у хворих на бронхіальну астму та встановлення ефективності лікування // Буковин. мед. вісн. – 2001. – №1. – С. 125–129.
16. Bentley A., Emrani P., Cassano P. Genetic variation and gene expression in antioxidant related enzymes and risk of COPD: a systematic review // Thorax. – 2008. – 63. – P. 956–961.
17. Comhair S., Ricci K., Arroliga M., Lara A., Dweik R., Song W., Hazen S., Bleecker E., Busse W., Chung K. Correlation of systemic superoxide dismutase defi-

- ciency to airflow obstruction in asthma // Amer. J. Respir. Crit. Care Med. – 2005. – **172**. – P. 306–313.
18. Geppé N., Kurchatova T., Dairova R., Tkatchouk E., Farobina E. Interval hypoxic training in bronchial asthma in children // Hyp. Med. J. – 1995. – № 3. – P. 11–14.
19. Hanta I., Kocabas A., Canacankatan N. Oxidant-antioxidant balance in patients with COPD // Lung. – 2006. – **184**. – P. 51–55.
20. Laemmli N. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**. – P. 680–685.
21. Raghunath R., Phadke M.S. Plasma oxidant-antioxidant status in different respiratory disorders // Ind. J. Clin. Biochem. – 2006. – **21**. – P. 161–164.
22. Twan van den Beucken, Koritzinsky M., Wouters B. Translational control of gene expression during hypoxia // Cancer Biol Therapy. – 2006. – **5**. – P. 749–755.
23. Sung Hoon Back, Scheuner D, Han J. Translation attenuation through eIF2 $\epsilon$  phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells // Cell Metab. – 2009. – **10**(1). – P. 13–26.
24. Yan Liu, Csaba Lószly, Yi Liu, Wei Liu, Xiaozhuo Chen, Susan C Evans, Shiyong Wu. Regulation of G1 Arrest and Apoptosis in Hypoxia by PERK and GCN2-Mediated eIF2 $\epsilon$  Phosphorylation // Neoplasia. – 2010. – **12**(1). – P. 61–68.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;  
Ин-т педіатрії, акушерства та гінекології НАМН України, Київ  
E-mail: ogonchar@yandex.ru  
drevitskaya@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до  
редакції 28.05.2011*

В.А. Сукач, А.З. Бута, О. П. Максимюк, Д.Б. Ковальський,  
М.В. Вовк, О.О. Кришталь

## Новітні блокатори рН-чутливих іонних каналів (3-карбоксамідино-2-оксо-2H-хромен-7-ІЛ)-4-гуанідино- бензоати

*Ішемічний інсульт – одна з найбільш тяжких патологій головного мозку, що вкрай важко піддається терапії. Нещодавно було встановлено, що при ішемічному інсульті відбувається патологічна активація рН-чутливих іонних каналів (ASIC) підтипу, котра є однією з ключових причин загибелі нейронів головного мозку. Синтезовані нами похідні 3-карбоксамідинокумаринів ефективно та концентраційнозалежно інгібують активність ASIC-каналів типу 1a та 3. Найбільш активна сполука пригнічує ASIC-струми з концентраціями половинного пригнічення 7,3 та 13,2 мкмоль/л для ASIC1a- та ASIC3-струму відповідно. Наші результати вказують на те, що 3-карбоксамідинокумарини можуть бути використані як структурна основа для генерації нового покоління високоефективних антиішемічних препаратів.*

*Ключові слова:* 3-амідино-7-гідроксикумарини, (3-карбоксамідино-2-оксо-2H-хромен-7-іл)-4-гуанідинобензоати, блокатори рН-чутливих іонних каналів, антиішемічні препарати.

### ВСТУП

Ішемічний інсульт – одна з найбільш тяжких патологій мозку, котра вкрай важко піддається лікуванню. Відомо, що саме нейрони центральної нервової системи (ЦНС) є одними з найчутливіших до ішемічного ураження клітин організму. Найбільшою проблемою цієї хвороби є незворотна інвалідизація пацієнта, котра суттєво погіршує якість життя, аж до повної неспроможності самостійно задовольняти найелементарніші побутові потреби.

Встановлено, що активація рН-чутливих іонних каналів (ASIC від англ. acid-sensing ion channel), а саме підтипу 1a, внаслідок розвитку ішемічного ацидозу, є однією з ключових причин загибелі нейронів головного мозку [11]. Показано, що нейротоксичний ефект в основному досягається внаслідок надмірного підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, що проникають через ASIC1a-провідності

внаслідок їх патологічної активації ацидозом.

Раніше вважалося, що основним джерелом патологічного нагромадження внутрішньоклітинних іонів кальцію у таких процесах є N-метил-D-аспартат (NMDA) рецептори та потенціалкеровані кальцієві канали [8]. Однак часове терапевтичне вікно їх антагоністів становить лише 30 хв, що практично унеможлиблює ефективну терапію, у зв'язку з чим виявлена авторами дослідження роль ASIC1a-каналів, як джерела патологічного накопичення внутрішньоклітинного кальцію набула важливого значення у патофізіології ішемічних уражень. Для підтвердження запропонованої теорії згаданими авторами було успішно реалізовано *in vivo* модель ішемічного інсульту головного мозку та продемонстровано нейропротекторну дію як молекулярно-генетичного видалення ASIC1a-рецептора, так і застосування його антагоністів [8].

© В.А. Сукач, А.З. Бута, О. П. Максимюк, Д.Б. Ковальський, М.В. Вовк, О.О. Кришталь

Зважаючи на вагому роль ASIC у фізіологічних та патологічних процесах, пошук їх модуляторів – актуальна проблема як фундаментальної фізіології, так і медицини. Однак нині відомі лише декілька природних пептидів і синтетичних сполук, які є вираженими антагоністами цих рецепторів [10]. Найбільш вивченим серед них є амilorид – відомий діуретик з широким спектром блокувальної дії на епітеліальні натрієві іонні канали [4]. Природний токсин PsTX1, виділений з отрути павука-птахоїда *Psalmoroeus Cambridgei*, є сильним селективним блокатором ASIC1a, але має складну будову та обмежену доступність [2]. В останні роки [6] запропоновано використовувати 7-алкініл-2-нафтиламідин у ролі інгібітора ASIC-рецепторів із концентрацією половинного пригнічення ( $IC_{50}$ ) до 0,4 мкмоль/л. Як наслідок побічної дії антикоагулянта нафамостату, Угава та співавт. [9] виявили здатність цього препарату блокувати ASIC1a і ASIC3 (рис. 1). Слід зазначити, що селективні антагоністи серед перерахованих сполук невідомі.

## МЕТОДИКА

Інфрачервоні (ІЧ)-спектри синтезованих сполук записані на спектрофотометрі UR-20 в таблетках KBr. Спектри ЯМР  $^1H$  отримані в розчинах  $DMCO-d_6$  на приладі Bruker Avance DRX-500 (500,13 МГц), внутрішній стандарт – тетраметилсилан (с – синглет, д – дублет, т – триплет, кв – кuartет, м – мультиплет).

*Синтез гідрохлоридів 7-гідрокси-2-оксо-6-*R*-2*H*-хромен-3-карбоксамідинів (4–6).*

До розчину 5,46 ммоль 2,4-дигідрокси-5-*R*-бензальдегіду (1–3) в 15 мл етанолу послідовно додають 1,0 г (5,46 ммоль) етилціаноацетату та 1,26 г (16,38 ммоль) ацетату амонію, кип'яють протягом 10 хв і охолоджують до кімнатної температури. Отриманий осад відфільтровують, промивають етанолом, суспендують в 10 мл

води, додають 20 мл 1 М розчину соляної кислоти і суміш перемішують 1 год при кімнатній температурі. Осад відфільтровують, промивають 10 мл води та висушують у вакуумі водноструменевого насоса при 90 °С (рис. 2).

*Гідрохлорид 7-гідрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-карбоксамідину (4).*

Вихід 72 %, т. топл. 291–295 °С. ІЧ-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1735 (C=O), 3330–3355 (N-H), 3440 (OH). Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.ч.: 7,50 с (1H), 7,56 с (1H), 8,02 с (1H), 8,88 с (1H), 9,50 м (4H), 11,20 с (1H). Знайдено, %: C 50,07; H 3,63; N 11,40.  $C_{10}H_9ClN_2O_3$ . Вирахувано, %: C 49,89; H 3,77; N 11,65.

*Гідрохлорид 7-гідрокси-2-оксо-6-хлоро-2*H*-хромен-3-карбоксамідину (5).*

Вихід 75 %, т. топл. >300 °С. ІЧ-спектр,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1730 (C=O), 3320–3350 (N-H), 3450 (OH). Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.ч.: 7,53 с (1H), 8,14 с (1H), 8,95 с (1H), 9,44 м (4H), 11,25 с (1H). Знайдено, %: C 43,70; H 3,11; N 11,42.  $C_{10}H_8Cl_2N_2O_3$ . Вирахувано, %: C 43,63; H 2,93; N 11,65.

*Гідрохлорид 7-гідрокси-2-оксо-6-етил-2*H*-хромен-3-карбоксамідину (6).*

Вихід 75 %, т. топл. 285–290 °С. ІЧ-спектр KBr,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 1730 (C=O), 3320–3340 (N-H), 3460 (OH). Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м.ч.: 1.02 т (3H,  $J = 6,8$  Гц), 2,48 кв (2H,  $J = 6,8$  Гц), 7,53 с (1H), 8,14 с (1H), 8,95 с (1H), 9,44 м (4H), 11,25 с (1H). Знайдено, %: C 53,88; H 4,75; N 10,55.  $C_{12}H_{13}ClN_2O_3$ . Вирахувано, %: C 53,64; H 4,88; N 10,43.

*Синтез дигідрохлоридів (3-карбоксамідино-2-оксо-6*R*-2*H*-хромен-7-іл)-4-гуанідинбензоатів (7–9).*

До розчину 2,08 ммоль гідрохлориду 7-гідрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-карбоксамідину (4–6) в 5 мл сухого диметилформаміду (ДМФА) при перемішуванні при 40 °С додають розчин 0,45 г (2,08 ммоль) 4-гуанідинбензойної кислоти в 5 мл сухого ДМФА, а потім 1,1 мл диізопропілкарбодіміду. Суміш перемішують 24 год при кімнатній температурі, розбавляють 2 мл сухого ацетонітрилу та перемішують до-



датково 6 год. Утворений осад відфільтровують, промивають сухим ДМФА, ацетонітрилом і висушують при 70 °С.

*Дигідрохлорид (3-карбоксамідино-2-оксо-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідинбензоату (7).*

Вихід 67 %, т. топл. 235–237 °С. ІЧ-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1730–1740 (C=O), 3350–3380 (N-H). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 7,45–7,51 м (3H), 7,67 с (1H), 7,94–8,05 м (5H), 8,19 д (2H,  $J = 8,0$  Гц), 8,90 с (1H), 9,50 м (4H), 10,80 с (1H). Знайдено, %: С 49,62; Н 4,05; N 16,23.  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_4$ . Вирахувано, %: С 49,33; Н 3,91; N 15,98.

*Дигідрохлорид (3-карбоксамідино-2-оксо-6-хлоро-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідинбензоату (8).*

Вихід 69 %, т. топл. 249–253 °С. ІЧ-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1735–1740 (C=O), 3350–3390 (N-H). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 7,50–7,58 м (3H), 7,90–8,17 м (5H), 8,15–8,18 м (2H), 8,90 с (1H), 9,45–9,53 м (4H), 10,73 с (1H). Знайдено, %: С 45,92; Н 3,33; N 17,61.  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_5\text{O}_4$ . Вирахувано, %: С 45,74; Н 3,41; N 14,82.

*Синтез дигідрохлориду (3-карбоксамідино-2-оксо-6-етил-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідин-бензоату (9).*

Вихід 65 %, т. топл. 218–220 °С. ІЧ-спектр,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1740–1745 (C=O), 3345–3385 (N-H). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м.ч.: 1,11 т (3H,  $J = 7,0$  Гц), 2,55 кв (2H,  $J = 7,0$  Гц), 7,51–8,17 м (10H), 8,90 с (1H), 9,56 м (4H), 10,64 с (1H). Знайдено, %: С 51,77; Н 4,40; N 14,83.  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_4$ . Вирахувано, %: С 51,49; Н 4,54; N 15,02.

*Дослідження впливу дигідрохлоридів (3-карбоксамідино-2-оксо-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідинбензоатів (7–9) на рН-чутливі іонні канали.*

Дію речовин досліджували на гомомерних ASIC1a-іонних каналах лінії людських ембріональних ниркових клітин (НЕК-293) і на ASIC3-іонних каналах нейронів дорсально-корінцевих гангліїв шурів (ДКГ). Для вивчення впливу речовин на рН-чутливі іонні канали було використано метод фіксації потенціалу у конфігурації відве-

дення струму від цілої клітини. Зовнішньоклітинний розчин (кондиціонувальний) містив (ммоль/л): NaCl – 130;  $\text{CaCl}_2$  – 2; KCl – 5;  $\text{MgCl}_2$  – 2; HEPES – 20; pH 7,5 доведений NaOH. Склад активаційного розчину був аналогічний кондиціонуальному, за винятком буфера (HEPES було замінено на MES (10 ммоль/л, pH 5,0 доведений NaOH). Скляні мікропіпетки (опір 3–4 МОм) заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): KF – 120, тріс-Cl – 20; pH 7,3 доведений KOH. При переході з кондиціонувального до активаційного розчину (швидкість зміни розчину близько 50 мс) при підтримуваному потенціалі -60 мВ спостерігалась активація рН-чутливих іонних каналів амплітудою струму 400–800 та 1000–5000 пА для ASIC1a та ASIC3 відповідно. Ці струми швидко десенситизувалися протягом 3–5 с та були чутливими до 3 мкм/л амілориду. Це вказує на те, що вони були викликані активацією рН-чутливих іонних каналів. Експерименти проводили при кімнатній температурі ( $20 \pm 2$ ) °С. Усі хімічні використані реагенти вироблені фірмою «Sigma» (США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами розроблено дизайн нових аналогів нафамостату, в яких замість нафталенової системи міститься кумариновий фрагмент. Зазначимо, що введення кумаринового циклу в структуру нових потенційних антагоністів рН-чутливих іонних каналів зумовлено його фармакофорними властивостями в різноманітних типах біоактивних сполук, поширеністю в природі та доступністю [1, 3, 7].

Ключовою стадією в запропонованому підході до отримання цільових 3-амідинокумаринів (2-оксо-2Н-хромен-3-карбоксамідинів) є реакція 2,4-дигідроксибензальдегідів (1–3) з етилціаноацетатом та ацетатом амонію. При нагріванні реагентів упродовж 10 хв у розчині етанолу відбувається формування кумаринового циклу та

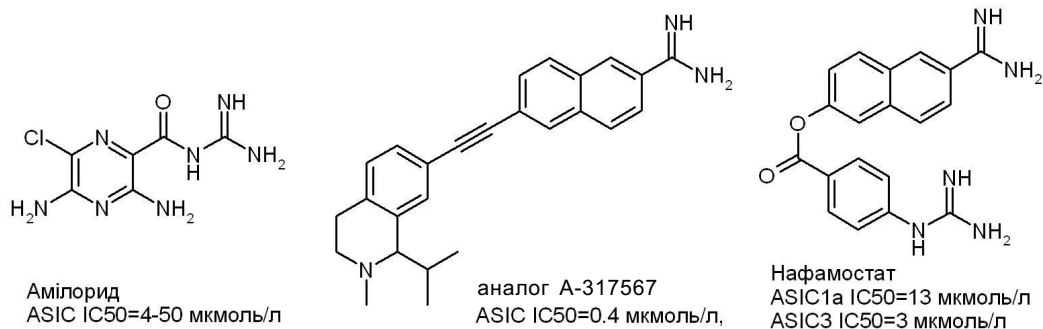


Рис. 1. Відомі синтетичні антагоністи рН-чутливих іонних каналів

його функціоналізація в положенні 3 амідиною групою, в результаті чого з виходом 72–75 % утворюються 7-гідрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-карбоксамідини (4–6). Конденсація останніх з гідрохлоридом 4-гуанідинобензойної кислоти за наявності диізопропілкарбодіміду в безводному ДМФА призводить до утворення дигідрохлоридів (3-карбоксамідино-2-оксо-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідинобензоатів (7–9) з виходом 6–69 % (рис. 2).

Структура синтезованих сполук 7–9 узгоджується з результатами вимірів їх спектральних параметрів. Зокрема, ІЧ-спектри характеризуються інтенсивними смугами поглинання груп C=O (1730–1745

см<sup>-1</sup>) та N-H (3350–3390 см<sup>-1</sup>). У спектрах ЯМР <sup>1</sup>H поряд із типовими сигналами протонів ароматичних ядер та екзоциклічних амідинових та гуанідинових фрагментів наявні синглети C<sup>4</sup>-H-протонів кумаринової системи при 8,90 м.ч.

рН-Чутливі іонні канали є так званими «рецепторами до протонів», що активуються при зниженні рН середовища та експресуються у багатьох типах клітин, зокрема у нейронах ЦНС та периферичної (ПНС) нервової системи [5]. Активація ASIC-каналів спричиняє транзйентний іонний трансмембранний струм, що спадає протягом декількох секунд навіть за умов підтримання кислого середовища внаслідок процесу

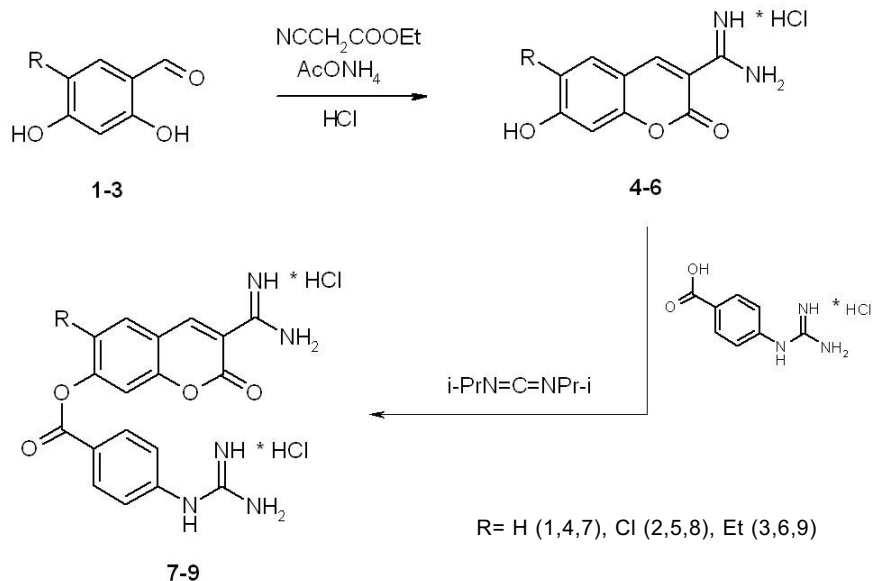


Рис. 2. Спрощена схема синтезу дигідрохлоридів (3-карбоксамідино-2-оксо-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідинобензоатів (7–9)

десенситизації рецептора. Незважаючи на багаторічні дослідження, механізми відкриття рН-чутливого іонного каналу, його переходу в десенситизований і закритий стани наразі залишаються нез'ясованими.

Усього ідентифіковано чотири гени, котрі кодують ASIC-канали, формуючи загалом зі сплайсинговими варіантами шість підтипів їх субодиниць. Залежно від підтипу, ASIC локалізуються як у ПНС, так і в ЦНС і відповідно виконують різну

фізіологічну роль. Найбільш поширеним підтипом в ПНС є ASIC3, тоді як в ЦНС переважно експресується ASIC1a.

При дослідженні пригнічення струмів, викликаних активацією рН-чутливих іонних каналів за наявності 10 мкмоль/л дигідрохлоридів (3-карбоксамідино-2-оксо-2H-хромен-7-іл)-4-гуанідинбензоатів 7–9 знайдено, що сполука 7 викликає найбільш значне зворотне зменшення амплітуди іонного трансмембранного струму (таблиця).

#### Пригнічення струмів ASIC1a та ASIC3 типів за наявності сполук 7–9 у концентрації 10 мкмоль/л

Сполука	Ступінь пригнічення, %	
	ASIC1a-струму у ембріональних ниркових клітинах людини (HEK-293)	ASIC3-струму у клітинах дорсально корінцевих гангліїв щурів
7	58	45
8	51	42
9	49	39

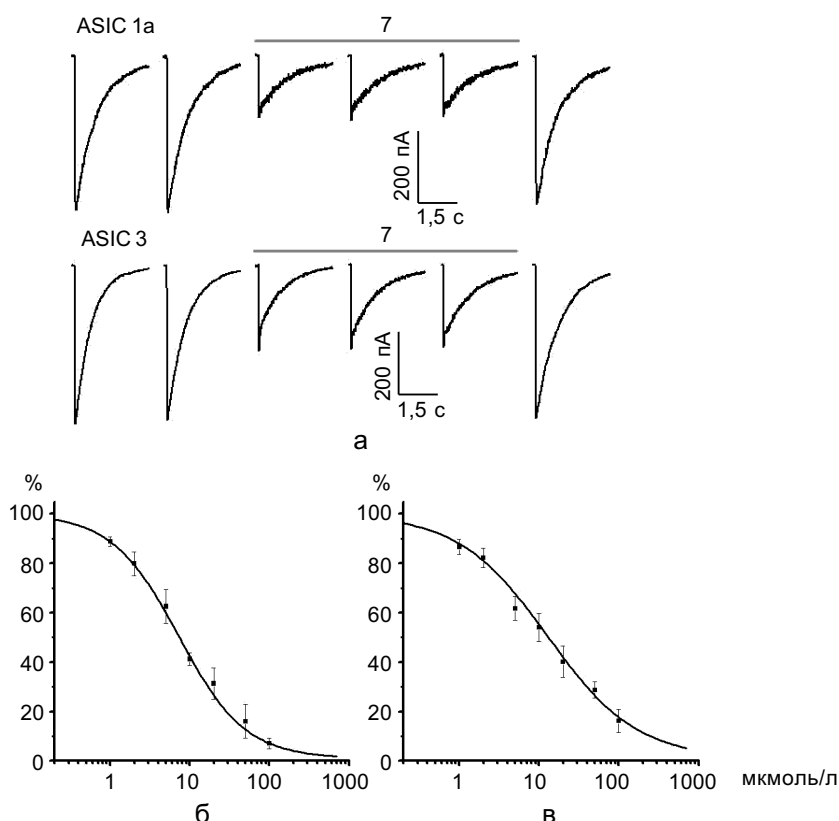


Рис. 3. Дія сполуки 7 (10 мкмоль/л) на активність рН-чутливих іонних каналів підтипів 1a (ASIC1a) та 3 (ASIC3): а – зворотне пригнічення струмів; б, в – криві залежності доза–ефект блокувальної дії сполуки 7 на амплітуду струму ASIC1a у клітинах лінії HEK-293 та ASIC3 у нейронах дорсально-корінцевих гангліїв щурів

Значення концентрації половинного пригнічення ( $IC_{50}$ ) активованих струмів ASIC1a для неї становить  $7,3 \text{ мкмоль/л} \pm 0,2 \text{ мкмоль/л}$  (рис. 3,б), а підтипу ASIC3 –  $13,2 \text{ мкмоль/л} \pm 1,3 \text{ мкмоль/л}$  (див. рис. 3,в), для нафамостату –  $13,5$  та  $3,0 \text{ мкмоль/л}$  відповідно [9].

Таким чином, пригнічення найактивнішою сполукою 7 струмів рН-чутливих іонних каналів перевищує рівень відомого аналога – нафамостату відносно підтипу ASIC1a. Знайдені антагоністи можуть бути прототипами для створення принципово нових високоефективних нейропротекторних лікарських засобів.

**В.А. Сукач, А.З. Бута, А. П. Максимюк, Д.Б. Ковальський, М.В. Вовк, О.А. Крышталь**

**НОВЫЕ БЛОКАТОРЫ  
РН-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ  
КАНАЛОВ – (3-КАРБОКСАМИДИНО-2-  
ОКСО-2Н-ХРОМЕН-7-ИЛ)-4-  
ГУАНИДИНОБЕНЗОАТЫ**

Ишемический инсульт – одна из самых тяжелых патологий головного мозга, крайне трудно поддающаяся терапии. Недавно было установлено, что при ишемическом инсульте происходит патологическая активация рН-чувствительных ионных каналов (ASIC) подтипа 1a (ASIC1a), которая является одной из ключевых причин гибели нейронов головного мозга. Синтезированные нами производные 3-карбоксамидинокумаринив эффективно концентрационнозависимо подавляют активность ASIC-каналов типа 1a и 3. Наиболее активное соединение подавляет ASIC-токи с концентрациями половинного угнетения  $7,3$  и  $13,2 \text{ мкмоль/л}$  для ASIC1a- и ASIC3-тока соответственно. Наши результаты показывают, что 3-карбоксамидинокумарини могут быть использованы в качестве структурного основания для генерации нового поколения высокоэффективных антиишемических препаратов.

Ключевые слова: 3-амидино-7-гидроксикумарини, блокаторы рН-чувствительных ионных каналов, антиишемические препараты.

**V. A. Sukach, A.Z. Buta, O.P. Maximyuk, D.B. Kovalsky, M.V. Vovk, O.O. Krishtal**

**(3-CARBOXAMIDINO-2-OXO-2H-CHROMEN-  
7-YL)-4-GUANIDINOBENZOATES ARE NOVEL  
BLOCKERS OF ACID SENSING ION  
CHANNELS**

Ischemic stroke is one of the most severe brain pathologies that is extremely difficult to treat. Recently it has been found

that acidosis accompanying cerebral ischemia induces activation of acid-sensing ion channel ASIC1a which results in its turn in the neuronal death. Here we present novel derivatives of 3-carboxamidinocoumarines that effectively inhibit ASIC1a and ASIC3 channels in concentration-dependent manner. The most active compound inhibits ASIC1a and ASIC3 channels with corresponding  $IC_{50}$  of  $7.3$  and  $13.2 \text{ }\mu\text{M}$ . Our data suggest that 3-carboxamidinocoumarines can be used as a scaffold for novel type of highly efficient anti-ischemic drugs.

Key words: 3-amidino-7-hydroxycoumarines, 3-carboxamidino-2-oxo-2H-chromene-7-yl)-4-guanidinebenzoates, ASIC blockers, anti-ischemic drugs.

*Institute of Organic Chemistry of NAS of Ukraine, Kyiv;  
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. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. М.: Изд-во Новая Волна. – 2005. – 1200 с.
2. Escoubas P., Bernard C., Lambeau G., Lazdunski M., Darbon H. Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1a proton-gated cation channels // *Protein Sci.* – 2003. – **12**. – P. 1332–1343.
3. Farinola N., Piller N. Pharmacogenomics: Its role in re-establishing coumarin as treatment for lymphedema // *Lymphat. Res. and Biol.* – 2005. – **3** (2). – P. 81–86.
4. Korkushko A.O., Kryshchal O.A. Organic-cation-blocking of proton-induced sodium permeability in the membrane of rat trigeminal neurons // *Neurophysiology.* – 1984. – **16**, № 4. – P. 557–561.
5. Krishtal O. The ASICs: Signaling molecules? Modulators? // *Trends in Neurosci.* – 2003. – **26**, № 9. – P. 477–483.
6. Kuduk S.D., Di Marco C.N., Bodmer-Narkevitch V., Cook S.P., Cato M.J., Jovanovska A., Urban M.O., Leitel M., Sain N., Liang A., Spencer R.H., Kane S.A., Hartman G.D., Bilodeau M.T. Synthesis, structure activity relationship, and pharmacological profile of analogs of the ASIC-3 inhibitor A-317567 // *ACS Chem. Neurosci.* – 2010. – **1**, № 1. – P. 19–24.
7. Link K.P. The Discovery of dicumarol and its sequels // *Circulation.* – 1959. – **19**, №1. – P. 97–107.
8. Pignataro G., Simon R.P., Xiong Z.-G. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia // *Brain* – 2007. – **130**. – P.151–158
9. Ugawa S., Ishida Y., Ueda T., Inoue K., Nagao M., Shimada S. Nafamostat mesilate reversibly blocks acid-sensing ion channel currents. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – **363**. – P. 203–208.
10. Xiong Z.-G., Pignataro G., Li M., Chang S.Y., Simon R.P. Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmaco-

logical targets for neurodegenerative diseases // Curr. Opinion in Pharm. – 2008. – 8. – № 1. – P. 25–32.  
11. Xiong Z.-G., Zhu X.-M., Chu X.-P., Minami M., Hey

J., Wemmie J.A., Price M., Welsh M.J., Simon R.P. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels //

*Ін-т органічної хімії НАН України, Київ*

*E-mail: mvovk@i.com.ua*

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

*E-mail: at@biph.kiev.ua*

*Міжнар. центр молекул. фізіології НАН України, Київ*

*E-mail: at@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов  
до редакції 23.06.2011*

Ю.В. Гошовська, Т.В.Шиманська, В.Ф.Сагач

## Застосування геніпіну – інгібітора роз'єднувальних білків –пригнічує захисний ефект ішемічного прекодиціювання

*Функціональне значення роз'єднувальних білків UCP2 і UCP3 у клітині і організмі залишається невивчені і нині. З'явилися повідомлення про їх участь у клітинних механізмах захисту, що лежать в основі феномена ішемічного прекодиціювання. Метою нашої роботи було з'ясування ролі роз'єднувальних білків UCP2 і UCP3 у формуванні кардіопротекторного ефекту ішемічного прекодиціювання. В експериментах на ізольованих серцях щурів було показано збільшення рівня експресії генів UCP2 і UCP3 у тканинах серця як під впливом ішемічного прекодиціювання у вигляді трьох 5-хвилинних епізодів зупинки перфузії, так і тривалої ішемії-реперфузії міокарда. Блокада активності UCP2 геніпіном ("Wako Inc.", США,  $10^{-5}$  моль/л, перфузія ізольованого серця протягом 15 хв) пригнічувала захисний ефект адаптації до ішемії. Зроблено висновок, що роз'єднувальні білки беруть активну участь у формуванні кардіопротекторного ефекту ішемічного прекодиціювання.*

*Ключові слова: ізольоване серце, роз'єднувальні білки UCP2 і UCP3, геніпін, ішемічне прекодиціювання.*

### ВСТУП

Група транспортних протеїнів, які вбудовані у внутрішню мембрану мітохондрій і здатні впливати на мембранний потенціал, відомі під назвою роз'єднувальних білків окисного фосфорилування (UCP, від англ. uncoupling proteins). Функціональне значення цих білків у клітині і організмі в цілому широко дискутується і залишається не зрозумілим і нині. Факти вказують на участь білків UCP у клітинних механізмах захисту від впливу активних форм кисню (АФК), зокрема при ішемії-реперфузії [2]. Здатність UCP активуватися під дією АФК відповідає більш раціональному витрачання енергії в клітині.

Ішемічне прекодиціювання (ІП) залишається найпотужнішим методом кардіопротекції від реперфузійних порушень. Толерантність до ішемії, що викликається ІП, характеризується в першу чергу гальмуванням утворення великої кількості АФК

[1, 4]. Активація аденіннуклеотидтранслокази (АНТ), збільшення транспорту вільних жирних кислот і «м'яке роз'єднання» встановлені серед мітохондріальних механізмів ІП [10]. Кардіопротекторний ефект адаптації до ішемії багато в чому зумовлюється станом біоенергетики серця. Ми припускаємо, що активація протонопровідної активності UCP, яка може запобігати надмірній продукції АФК дихальним ланцюгом, є одним із захисних шляхів ІП [8, 11].

Метою нашої роботи було з'ясування участі UCP у реалізації механізмів кардіопротекторного впливу ІП.

### МЕТОДИКА

Експерименти виконували на дорослих самцях щурів лінії Вістар віком 6 міс, масою 300–350 г з дотриманням вимог Європейської конвенції щодо роботи з експериментальними тваринами (Страсбург, 1986).

© Ю.В. Гошовська, Т.В.Шиманська, В.Ф.Сагач

Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно (за методом Лангендорфа в умовах постійного тиску 75–80 мм рт.ст.) при 37°C і аерації карбогеном (95 % O<sub>2</sub> і 5 % CO<sub>2</sub>) розчином такого складу (ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO<sub>4</sub> – 1,2; NaHCO<sub>3</sub> – 24; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; глюкоза – 10; CaCl<sub>2</sub> – 2,5. Тиск у порожнині лівого шлуночка (ТЛШ), його першу похідну  $dP/dt_{max}$  і  $dP/dt_{min}$ , кінцевий діастолічний тиск (КДТ) вимірювали за допомогою латексного балончика тензодатчиками 746 (Мингограф-82, “Elema”, Швеція) і реєстрували на комп’ютері за допомогою програмного забезпечення Global Lab. 2.0. Розраховували частоту серцевих скорочень (ЧСС), інтенсивність скоротливої функції серця (ТЛШ . ЧСС). Коронарний потік оцінювали за об’ємом перфузійного розчину, якій відтікав від серця протягом 1 хв.

Для розрахунку споживання кисню міокардом за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk-2 Radiometer (“Elema”, Швеція) реєстрували напруження кисню у пробах перфузійного розчину, що притікав і відтікав від серця. Кисневу вартість роботи серця виражали як співвідношення споживання кисню до інтенсивності скоротливої функції серця.

Адаптацію до ішемії здійснювали за допомогою 3 сеансів тотальної 5-хвилинної ішемії, розділених 5-хвилинними періодами реперфузії. Ішемію міокарда моделювали припиненням перфузії серця на 20 хв. Реперфузію спостерігали протягом 40 хв.

Вивільнення мітохондріального фактора, що є маркером відкривання МП в експериментах *in situ* [6, 19], визначали за зростанням оптичної густини розчинів, що відтікали від серця до ішемії та на 1-й хвилині реперфузії. Оптичну густину проб вимірювали в ультрафіолетовому спектрі в діапазоні довжини хвилі 230–260 нм спектрофотометром СФ-46.

Геніпін (“Wako Inc.”, США) вводили у перфузійний розчин у концентрації 10<sup>-5</sup> моль/л протягом 15 хв перед початком ІІІ.

Експресію генів UCP2 і UCP3 визначали в зразках тканин серця в таких серіях: 1 – контроль (n=5); 2 – ішемія–реперфузія (n=6); 3 – ІІІ і ішемія–реперфузія (n=8); 4 – ІІІ (n=6). Контрольні серця перфузували протягом години без жодних впливів. Верхівку серця щурів відрізували і одразу використовували для виділення РНК за допомогою реагенту Trizol (“Sigma”, США). Зворотну транскрипцію проводили за допомогою набору RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва), використовуючи 300–600 нг тотальної РНК і рандомний гексамерний праймер. Отриману одноланцюгову ДНК застосовували для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для ампліфікації фрагментів генів UCP2 і UCP3 [23], а також фрагмент гена GADPH (гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогенази) як внутрішній контроль. Послідовність нуклеотидів у праймерах: прямий – 5’-TCATCAAAGATACTCTCCTGAAAGC-3’, зворотний – 5’-TGACGGTGGTGCAGAAGC-3’ для гена UCP2; прямий – 5’-GTGACSTATGACATCATCAAGGA-3’, зворотний – 5’-GCTCCAAAGGCA GAGACAAAG-3’ для гена UCP3; прямий – 5’-GGGTGTGAACCACGAGAAAATATGA-3’, зворотний – AGCACCAGTGGATG CAGGGGATGAT-3’ для гена GADPH. Суміш для ампліфікації містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 30 пмоль/л кожного з праймерів (“Metabion“, Німеччина), 0,5 Од Таq-полімерази (“Ампли-Сенс”, Росія) і ДНК-матрицю, отриману в результаті зворотної транскрипції. Об’єм проби доводили до 25 мкл дейонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmp System 2700” (“Applied Biosystems”, США). Ампліфікація фрагментів вказаних генів складалася з 35 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 58°C (1 хв) і елонгація – 72°C (1 хв). Візуалізацію і оцінку яскравості ампліфікатів після горизонтального елект-

рофорезу (150 В протягом 30 хв) в 1,5%-му агарозному гелі з бромідом етидію, проводили за допомогою транслюмінатора і програмного забезпечення ViTran (“Биоком”, Росія). Розраховували відношення яскравості ампліфікатів генів UCP до GADPH.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою Microsoft Excel з використанням методу різниць. Усі результати виражали у вигляді середнього  $\pm$  стандартне відхилення. Достовірність змін показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента, достовірними вважали зміни при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що ІП ефективно запобігало розвитку важких реперфузійних порушень функції ізольованого серця і виникненню фібриляцій, підвищувало ефективність роботи дихального ланцюга мітохондрій кардіоміоцитів і використання кисню міокардом [4]. Серед можливих захисних механізмів, що включаються при ІП, розглядають стимуляцію експресії низки протекторних генів, до числа яких зокрема можна зарахувати індукцибельну NO-синтазу [7]. Беручи до уваги участь UCP

у формуванні захисних механізмів клітини для протистояння окисному стресу, ми визначали за допомогою ПЛР зміни експресії генів UCP2 і UCP3 у серцях щурів після впливу короткочасних ішемічних епізодів або тривалої ішемії–реперфузії без і на фоні ІП (рис. 1, 2). Встановлено, що при адаптації серця до ішемії спостерігалася стійка тенденція до підвищення експресії генів UCP, а тотальна 20-хвилинна ішемія міокарда призводила до достовірного збільшення співвідношення UCP2/GADPH і UCP3/GADPH відносно вихідного рівня їх експресії. До 40-ї хвилини реперфузії коронарних судин експресія мРНК досліджуваних генів мала тенденцію до подальшого зростання і становила  $127 \pm 7,5$  і  $133 \pm 1,0\%$  відповідно порівняно з їх базовим рівнем. Таким чином, результати наших експериментів свідчили про стимулювальний ефект ішемії–реперфузії на експресію генів UCP2 і UCP3, що підтверджувалося даними Murray і співавт. [18], які спостерігали підвищення експресії білка UCP3 у щурів у відповідь на тривалу коронарооклюзію. Ми вважаємо, що запуск клітиною експресії генів UCP мав захисний характер, оскільки показано, що активація UCP супроводжується зменшенням продукції вільних радикалів [9]. Встановлений

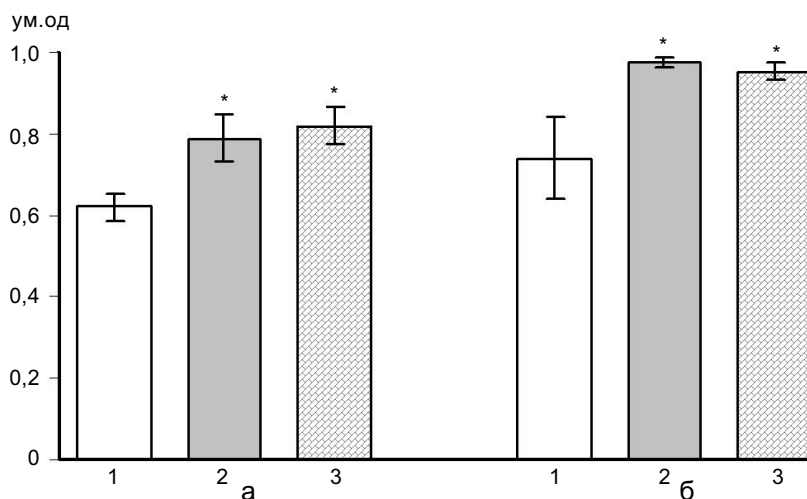


Рис. 1. Відносні рівні експресії мРНК UCP2/GADPH (а) і UCP3/GADPH (б) у серці щурів у контролі (1), після ішемії–реперфузії без (2) і на фоні ішемічного прекоондиціювання (3). \* $P < 0,05$  відносно контролю



нами факт підвищення експресії генів UCP2 і UCP3 внаслідок короточасних ішемічних стимулів міокарда цілком узгоджується з повідомленням про зростання в нейронах гіпокампа вмісту білка UCP2 після ІП, яке супроводжувалося великим відсотком виживання клітин за дії наступної ішемії [16]. Таким чином, підвищення експресії генів UCP2 і UCP3 під впливом як короточасних стимулів, так і тривалої ішемії дає нам змогу вважати, що UCP задіяні у захисному механізмі клітини при її протистоянні ішемії–реперфузії.

Для з'ясування фізіологічної ролі UCP у підвищенні стійкості міокарда щурів до ішемії–реперфузії і участі їх в механізмі ІП, ми здійснювали блокаду активності UCP2 за допомогою геніпіну. Геніпін – компонент геніпозиду – сполуки, виділеної з екстракту плодів *Gardenia jasminoides* Ellis, який з давніх пір активно використовувався у народній медицині як протизапальний, антигіпертензивний засіб [21]. Існують свідчення, що геніпін проявляє антиоксидантні властивості [14], його з успіхом використовують при діабеті [22], який характеризується розвитком глибокого окисного стресу. З іншого боку, в експериментах на мітохондріях нокаутних за геном UCP2 тварин доведено, що геніпін інгібує UCP2-залежний протонний потік, але не є при цьому скавенджером супероксидного

радикала [24]. Саме такі властивості геніпіну роблять його важливим інструментом вивчення функції UCP.

Введення в перфузійний розчин геніпіну скасовувало захисний вплив ІП на розвиток реперфузійних порушень функції серця (рис. 3). На відміну від серії з ІП спостерігали істотне пригнічення функціонального стану серця на 10-й хвилині реперфузії: ТЛШ становив лише  $37,0\% \pm 17,1\%$  щодо  $82,5\% \pm 8,8\%$  у серії з ІП ( $P < 0,05$ ) і  $32,5\% \pm 7,9\%$  у контрольній серії, скорочувальна активність міокарда була  $37\%$ , а в серії без геніпіну її відновлення сягало більше ніж  $80\%$ . Отже, характер реакції сердець на відновлення потоку перфузії в серії з ІП на фоні введення геніпіну був схожий з таким у контрольній серії. Оскільки блокада активності UCP геніпіном істотно зменшувала захисний вплив ІП ми дійшли висновку, що ці білки беруть активну участь у реалізації такого механізму.

Для підтвердження цього висновку ми перевіряли вплив геніпіну на реакцію серця при ішемії–реперфузії. Якщо останній має потужні антиоксидантні властивості [14], він повинен інгібувати утворення мітохондріальних пор при ішемії–реперфузії і, відповідно, покращувати відновлення функціонального стану серця. Тобто феномен ІП можна імітувати за допомогою вибіркового фармакологічного впливу на серце.

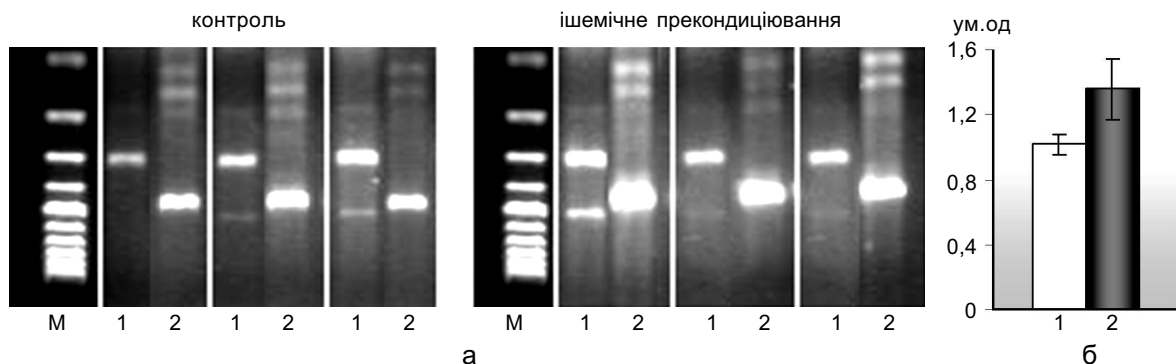


Рис. 2. Результати електрофорезу (а) ампліфікованих фрагментів генів GADPH (1) і UCP3 (2). Гистограма усереднених результатів (б) відносних рівнів експресії мРНК UCP3/GADPH у контролі (1) і після ішемічного прекодиціювання (2)

Зіставлення ступеня реперфузійних порушень функції серця тварин без і на фоні застосування геніпіну свідчило про відсутність істотних відмінностей у реакції серця. Виключенням був КДТ, який на 10-й хвилині реперфузії становив 31,0 мм рт.ст.  $\pm$  4,0 мм рт.ст., а в контрольній серії – 6,0 мм рт.ст.  $\pm$  4,4 мм рт.ст. ( $P < 0,001$ ), до кінця спостереження достовірної різниці у його значенні не спостерігалось. Ін’єкція геніпіну певним чином також покращувала кисневий обмін серця: киснева вартість його роботи на 40-й хвилині реперфузії збільшувалася лише до 125%  $\pm$  11% щодо 153%  $\pm$  13% у контрольних тварин. Однак цього було недостатньо для істотного відновлення функ-

ціонального стану серця в цілому у період реперфузії.

При однаковій амплітуді підйому кривої на  $\lambda = 250$  нм, яка відображає ступінь вивільнення мітохондріального фактора і проникність мітохондріальних мембран, оптична густина розчину, що відтікав від ізольованого серця щурів у першу хвилину реперфузії в експериментах з застосуванням геніпіну достовірно перевищувала таку у контрольній серії (рис. 4). Останнє свідчило, що геніпін не проявляв властивостей інгібітора мітохондріальних пор, характерних для відомих антиоксидантів тролоксу і мелатоніну [5]. Оскільки введення геніпіну істотно не покращувало ступінь

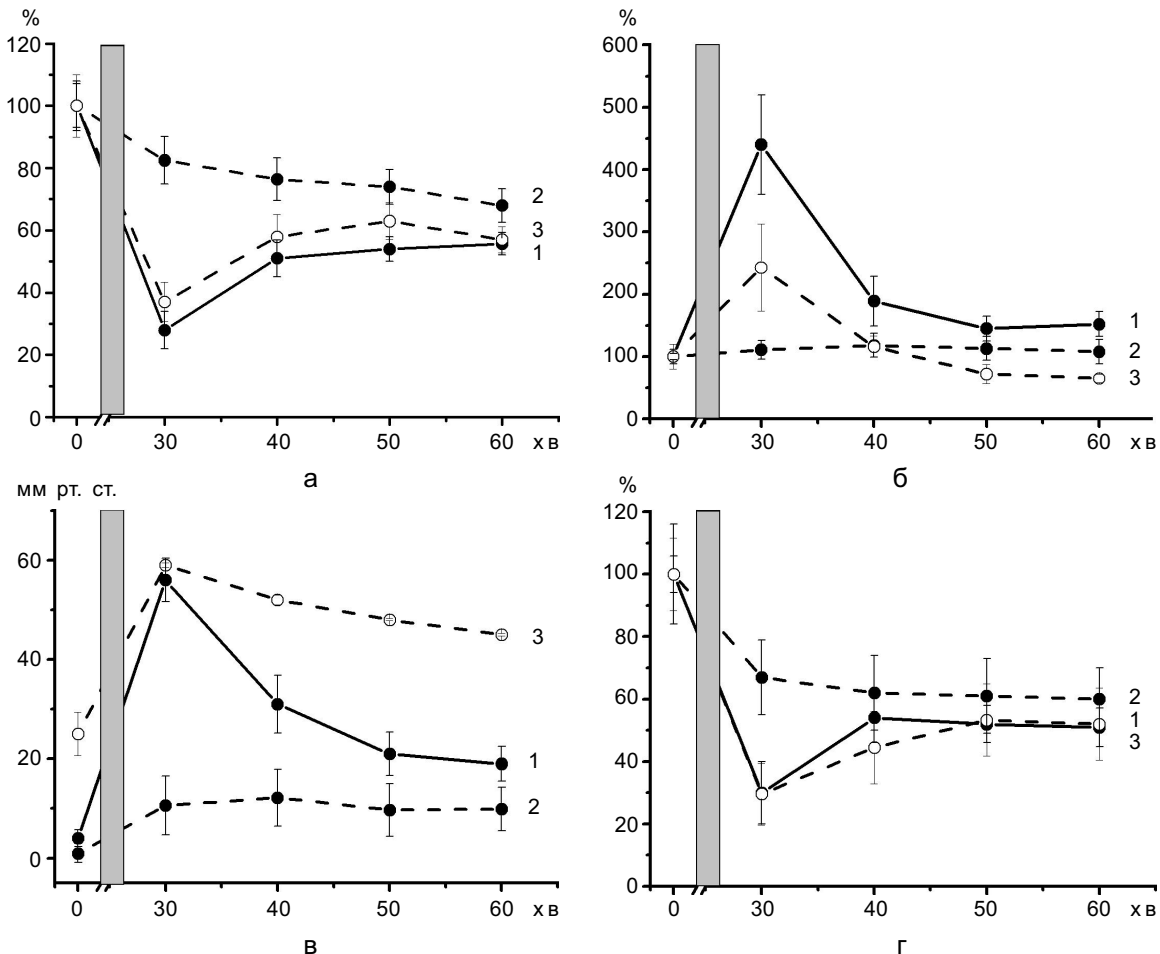


Рис. 3. Відновлення показників функціонального стану серця підчас реперфузії у контрольних умовах (1), після ішемічного прекондичіювання без (2) і на фоні введення геніпіну (3): а – тиск у лівому шлуночку; б – киснева вартість роботи серця; в – кінцево-діастолічний тиск; г – інтенсивність скоротливої функції міокарда

відновлення функції серця дорослих щурів після тривалої ішемії, але і не пригнічувало її як у старих тварин з підвищеним базовим рівнем експресії генів UCP2 і UCP3 [2, 3], ми вважаємо, що він проявляв антиоксидантну силу, але недостатню для істотного зменшення реперфузійних порушень функції серця.

Отже, пригнічення ефекту ІП геніпіном імовірно було зумовлено не його антиоксидантними властивостями, а блокадою активності UCP.

Таким чином, UCP беруть активну участь у формуванні кардіопротекторного ефекту ІП, оскільки блокада їх активності геніпіном пригнічувала захисний ефект адаптації до ішемії, а короточасне або довготривале припинення перфузії стимулювало збільшення експресії генів UCP2 і UCP3 у серці.

Багато досліджень присвячено вивченню внутрішньоклітинних захисних сигнальних шляхів, що включаються у механізм ІП. Факторами, які вивільнюються під час коротких періодів ішемії і діють через відповідні рецептори - аденозин, брадикінін, норадреналін, ендорфіни активується протеїнкіназа С [13]. АФК, які виділяються в «проміжних» реперфузіях, також задіяні в процесах її активації. Відомо, що антиоксиданти здатні інгібувати формування

адаптаційної толерантності серця до ішемії-реперфузії. Кінцевим підсумком процесів передачі сигналу при ІП вважається фосфорилування і активація АТФ-залежних калієвих каналів [12, 15]. Серед мітохондріальних механізмів ІП відомо про активацію АНТ, збільшення транспорту вільних жирних кислот і «м'яке роз'єднання» [10], а також – запуск протонпровідної активності UCP, що в свою чергу може запобігати надмірній продукції АФК дихальним ланцюгом [8, 11].

Участь UCP2 і UCP3 у механізмах прекодиціювання можуть опосередковано підтвердити результати молекулярно-генетичних експериментів. Було виявлено збільшення вмісту мРНК UCP2 у мозку після ІП [17], а також в серіях з ішемією-реперфузією, ІП, ІП і ішемією-реперфузією гіпокампо показано одночасне збільшення експресії гена і білка UCP2 [16]. Отримані нами результати про збільшення експресії генів UCP2 і UCP3 у серці щурів після реперфузії без і на фоні ІП цілком узгоджуються з наведеними літературними даними. Таким чином, активація системи UCP за умов ІП відбувається не лише на рівні функціонування білкових молекул, але й експресії генів UCP2 і UCP3.

Другим доказом участі UCP у кардіопротекторному механізмі ІП можуть бути результати експериментів з попереднім введенням геніпіну, внаслідок чого відновлення функції ізольованого серця за характером нагадувало таке у серії з контрольною ішемією міокарда. Існує думка, що UCP властива також функція регуляції кальцієвого гомеостазу [3, 20], ймовірно саме тому їх інгібування супроводжується істотними порушеннями скоротливої функції серця. Блокада активності UCP2 геніпіном може призводити до перевантаження клітин іонами кальцію. У таких умовах підвищується чутливість мітохондрій до утворення МП, відповідно ефект ІП нівелюється, що ми і спостерігали.

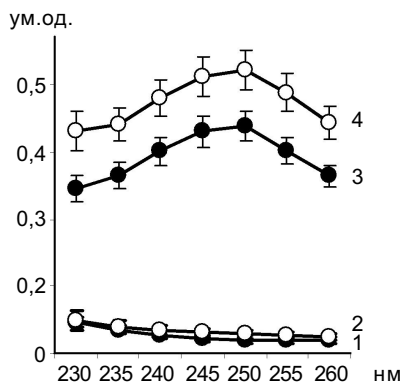


Рис. 4. Зміни оптичної густини розчину, що відтікав від ізольованого серця щурів перед ішемією (1, 2), за першу хвилину реперфузії без (3) і на фоні введення геніпіну (4)

## ВИСНОВКИ

1. UCP беруть активну участь у формуванні кардіопротекторного ефекту ІП, оскільки блокада їх активності геніпіном пригнічувала захисний ефект адаптації до ішемії.

2. Під впливом ІП і тривалої ішемії–реперфузії міокарда збільшується експресія генів UCP2 і UCP3 у тканинах серця, що вказує на їх участь у формуванні кардіопротекторного ефекту.

*Автори висловлюють подяку провідному науковому співробітнику відділу загальної і молекулярної патофізіології В.Є Досенку за сприяння у проведенні генетичних досліджень.*

**Ю.В. Гошовская, Т.В. Шиманская, В.Ф. Сагач**

### **ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНИПИНА – ИНГИБИТОРА РАЗОБЩАЮЩИХ БЕЛКОВ – УГНЕТАЕТ ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ**

Функциональное значение разобщающих белков UCP2 и UCP3 в клетке и организме остается не выясненным до настоящего времени. Появились сообщения об их участии в клеточных механизмах защиты, лежащих в основе феномена ишемического preconditionирования. Целью данной работы было выяснение роли UCP2 и UCP3 в формировании кардиопротекторного эффекта ишемического preconditionирования. В экспериментах на изолированных сердцах крыс было показано увеличение уровня экспрессии генов UCP2 и UCP3 в тканях сердца как под влиянием ишемического preconditionирования в виде трех 5-минутных эпизодов остановки перфузии сердца, так и длительной ишемии-реперфузии миокарда. Блокада активности разобщающих белков UCP2 геніпіном («Wako Inc.», США,  $10^{-5}$  моль / л, перфузия изолированного сердца в течение 15 минут) отменяла защитный эффект адаптации к ишемии. Сделан вывод, что разобщающие белки принимают активное участие в формировании кардиопротекторного эффекта ишемического preconditionирования.

Ключевые слова: изолированное сердце, разобщающие белки UCP2 и UCP3, геніпін, ишемическое preconditionирование.

**Yu.Goshovska, T.Shimanskaya, V.Sagach**

### **GENIPIN, AN UNCOUPLING PROTEINS INHIBITOR, REDUCES THE PROTECTIVE EFFECT OF ISCHEMIC PRECONDITIONING**

The functional significance of uncoupling proteins UCP2 and

UCP3 in the cell and the organism remains unknown. There have been reports about their involvement in cellular protection mechanisms underlying the phenomenon of ischemic preconditioning. The purpose of this study was to elucidate the role of uncoupling proteins UCP2 and UCP3 in the formation of cardioprotective effect of ischemic preconditioning. In experiments on isolated rat hearts we show here an increase in the level of UCP2 and UCP3 gene expression in the heart tissue under the influence of ischemic preconditioning with three episodes of 5 min stopping the flow perfusion. Similar effects were induced by a prolonged ischemia-reperfusion of myocardium. The blockade of the UCP2 activity by genipin (Wako Inc., USA,  $10^{-5}$  mol/L, isolated heart perfusion for 15 minutes) abolished the protective effect of adaptation to ischemia. It was concluded that uncoupling proteins take part in the cardioprotective effect of ischemic preconditioning.

Key words: isolated heart, uncoupling proteins UCP2 and UCP3, genipine, ischemic preconditioning.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Галагудза М.М. Роль активных форм кислорода в механизмах локального и дистантного ишемического preconditionирования миокарда // Регион. Кровообращения и микроциркуляции. – 2005. – 4, №16. – С. 72–78.
2. Гошовська Ю.В., Лісовий О.О., Шиманська Т.В., Сагач В.Ф. Зміни експресії генів UCP2 та UCP3, функціонального стану і кисневої вартості роботи міокарда в умовах старіння та ішемії–реперфузії // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №3. – С.26–36.
3. Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Сагач В.Ф. Вплив геніпіну – інгібітора UCP2 – на функцію серця старих шурів // Там само. – 2009. – 55, №5. – С.28–34.
4. Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Рудик О.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Проникність мітохондріальних мембран як мішень ішемічного preconditionування // Там само. – 2011. – 57, №4. – С.
5. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Попередження постреперфузійних порушень функції серця та неефективного використання кисню за допомогою інгібіторів мітохондріальної пори // Там само. – 2002. – 48, №6. – С. 3–9.
6. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Там само. – 2003. – 49, №4. – С. 6–12.
7. Barrier A., Olaya N., Chiappini F., Roser F, Scatton O., Artus C., Franc B., Dudoit S., Flahault A, Debuire B., Azoulay D., Lemoine A. Ischemic preconditioning modulates the expression of several genes, leading to the overproduction of IL-1Ra, iNOS, and Bcl-2 in a human model of liver ischemia-reperfusion // FASEB

- J. – 2005. – **19**. – P. 1617–1626.
8. Brand M.D., Buckingham J.A., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Murphy M.P., Pakay J.L., Talbot D.A., Echtay K.S. Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production // *Biochem. Soc. Symp.* – 2004. – **71**. – P. 203–213.
  9. Brand M.D., Esteves T.C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3 // *Cell Metabol.* – 2005. – **2**. – P.85–93.
  10. Carreira R.S., Miyamoto S., DiMascio P., Goncalves L.M., Monteiro P., Providencia L.A., Kowaltowski A.J. Ischemic precondition enhances fatty acid-dependent mitochondrial uncoupling // *J. Biochem. Bioenerg.* – 2007. – **39**. – P. 313–320.
  11. Echtay K.S., Roussel D., St-Pierre J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., Brand M.D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein // *Nature.* – 2002. – **415**. – P. 96–99.
  12. Garlid K.D., P. Paucek, V. Yarov-Yarovoy, Murray H.N., Darbenzio R.B., Lonzo A.J., Longe N.J., Smith M.A., Grover G.I. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanisms of cardioprotection // *Circ.Res.* – 1997. – **81**. – P. 1072–1082.
  13. Javadov S. A., Clarke S., Das M., Griffiths E.J., Lim K.H.H., Halestrap A.P. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart // *J. Physiol.* – 2003. – **549**. – P. 513–524.
  14. Koo H.J., Song Y.S., Kim H.J., Lee Y.H., Hong S.M., Kim S.J., Kim B.C., Jin C., Lim C.J., Park E.H. Anti-inflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – **495**. – P. 201–208.
  15. Liu Y., T. Sato, B. O'Rourke, E. Marban. Mitochondrial ATP dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection // *Circulation.* – 1998. – **97**. – P. 2463–2469.
  16. Liu Y., Chen L., Xu X., Vicaute E., Sercombe R. Both ischemic preconditioning and ghrelin administration protect hippocampus from ischemia/reperfusion and upregulate uncoupling protein-2 // *BMC Physiol.* – 2009. – **9**. – P. 17–31.
  17. Mattiasson G., Shamloo M., Gido G., Mathi K., Tomasevic G., Yi S., Warden C.H., Castilho R.F., Melher T., Gonzalez-Zulueta M. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma // *Nat. Med.* – 2003. – **9**. – P. 1062–1068.
  18. Murray C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Circulation.* – 1986. – **74**. – P. 1124–1136.
  19. Nadtochiy S.M., Nauduri D., Shimanskaya T.V., Sagach V.F., Brookes P.S. Purine release: a protective signaling mechanism of the mitochondrial permeability transition pore in ischemia // *Фізіол. журн.* – 2008. – **54**, 6. – С.5–14.
  20. Trenker M., Fertschai I., Malli R., Graier W.F. UCP2/3 – likely to be fundamental for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniport // *Nature Cell Biol.* – 2008. – **10**, 11. – P. 1237–1240.
  21. Tseng T.H., Chu C.Y., Huang J.M., Shiow S.J., Wang C.J. Crocetin protects against damage in rat primary hepatocytes // *Cancer Lett.* – 1995. – **97**. – P.61–67.
  22. Wu S.Y., Wang G.F., Liu Z.Q., Rao J.J., Li L., Xu W., Wu S.G., Zhang J.J. Effect of geniposide, a hypoglycemic glucoside, on hepatic regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin // *Acta Pharmacol Sin.* – 2009. – **30**, 2. – P. 202–208.
  23. Young M.E., Patil S., Ying J., Depre C., Ahuja H.S., Shipley G.L., Stepkowski S.M., Davies P.J., Taegtmeyer H. Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor (alpha) in the adult rodent heart // *FASEB J.* – 2001. – **15**, 3. – P.833–845.
  24. Zhang Ch.-Y., Parton L.E., Ye C.P., Krauss S., Shen R., Lin C.T., Porco J.A.Jr., Lowell B.B. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets // *Cell Metab.* – 2006. – **3**, 6. – P. 417–427.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: tshimanskaya@gmail.com*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 02.08.2011*

О.В. Коркушко, Е.О. Асанов, І.А. Діба

## Вплив позитивного тиску на видиху на газообмін у легенях людей похилого віку з прискореним старінням

*Вивчені реакції газообміну в легенях при диханні з позитивним тиском на видиху у літніх людей з фізіологічним (24 людини) і прискореним (26 осіб) старінням дихальної системи. Показано, що у людей з прискореним старінням дихальної системи невеликий опір видиху покращує ефективність газообміну в легенях. Однак дихання зі значним опором видиху (15 мм вод. ст.) викликає пригнічення газообміну в легенях. Встановлено, що у людей з прискореним старінням дихальної системи знижена реакція легеневого газообміну на дихання з опором видиху.*

*Ключові слова: опір на видиху, газообмін у легенях, прискорене старіння.*

### ВСТУП

Як відомо, процес старіння може проходити за фізіологічним або прискореним типом [6, 8]. При фізіологічному старінні вікові зміни починаються природно та розвиваються поступово. Прискорене старіння проявляється більш значним обмеженням пристосувальних і вираженим скороченням резервних можливостей організму. Це послаблює здатність організму адаптуватися до навколишнього середовища. Прискорене старіння сприяє зниженню стійкості організму до гіпоксії та розвитку патологічних станів і хвороб [1, 6, 8].

У разі прискореного старіння відбуваються морфофункціональні зміни в легенях, які призводять до напруженої, недостатньо ефективної діяльності дихальної системи, обмеження її функціональних можливостей, зниження ефективності легеневого газообміну та зумовлюють артеріальну гіпоксемію, що є істотним чинником у розвитку різних патологічних процесів [4, 6]. Тому розробка методів підвищення функціональних можливостей дихальної системи та ефективності легеневого

невого газообміну в людей похилого віку з прискореним старінням має велике практичне значення. У цьому зв'язку цікаві дихальні тренування з позитивним тиском наприкінці видиху [2, 3].

Режим позитивного тиску наприкінці видиху – РЕЕР (від англ. positive end expiratory pressure) широко застосовується при проведенні дихальних тренувань у клінічній медицині з лікувальною та профілактичною метою [2, 3, 9, 11–14]. Позитивний тиск на видиху перешкоджає ранньому експіраторному закриттю дихальних шляхів, викликає розправлення альвеол і залучення в газообмін таких, які не функціонують, знижує альвеолярний мертвий простір, поліпшує вентиляційно-перфузійні співвідношення [2, 3, 13, 14]. Тим самим створюються умови для збільшення ефективної поверхні газообміну, його поліпшення в легенях і підвищення насичення крові киснем. Це покращує кисневе забезпечення органів і систем організму.

Оскільки вплив РЕЕР на стан легеневого газообміну в людей похилого віку із прискореним старінням не вивчали, метою нашої роботи було дослідження особливос-

тей газообміну в легенях при різних рівнях опору на видиху в людей похилого віку з прискореним старінням дихальної системи.

## МЕТОДИКА

Обстежено 50 практично здорових людей-добровольців (60–74 роки) з фізіологічним (24 особи) і прискореним (26 осіб) старінням дихальної системи. В дослідження не включали осіб з патологією серцево-судинної, дихальної, ендокринної та інших систем організму. Всі пацієнти отримали докладну інформацію про дослідження та підписали інформовану згоду.

Функціональний вік системи дихання визначали на спірографі “Spirobank” (“Mir”, Італія) за допомогою розробленої нами формули. При цьому прискорено старіючими людьми похилого віку вважали осіб, у яких функціональний вік системи дихання перевищував паспортний більш ніж на 10 років [4]. Дифузійну здатність легень ( $DL_{CO}$ ) визначали за вмістом CO методом стійкого стану на апараті “Годарт” (Голландія), рівномірність вентиляції легень (РВЛ) методом розведення гелію за допомогою геліометра «ПООЛ-1» (СРСР). Сатурацію крові ( $SpO_2$ ) реєстрували за допомогою монітора “ЮМ-300” фірми “ЮТАС” (Україна) пульсоксиметричним методом.

Легеневий газообмін вивчали у вихідному стані (без опору на видиху) і після 15-хвилинного дихання з РЕЕР при різних режимах опору на видиху: 5, 10 і 15 мм вод. ст. Дихання з РЕЕР проводили за допомогою дихального тренажера “Threshold PEP” (Німеччина). Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики за допомогою комп’ютерної програми “Statistica 6.0” («StatSoft», США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Установлено, що у вихідному стані у людей похилого віку із прискореним старінням

дихальної системи РВЛ і  $DL_{CO}$  були трохи нижчими. Отримані розходження можна пояснити більш вираженим розвитком фіброзу альвеол, зменшенням еластичності легень і бронхіальної прохідності, утворенням місцевих ателектазів [4, 6].

Дихання з опором на видиху 5 мм вод. ст. у людей похилого віку з фізіологічним старінням дихальної системи помітно не впливало як на  $DL_{CO}$  і РВЛ, так і на  $SpO_2$  (таблиця). Реакція легеневого газообміну починалася при диханні з опором на видиху 10 мм вод. ст. (див. таблицю). При цьому поліпшувалися показники РВЛ і  $DL_{CO}$ , що призводило до підвищення в них  $SpO_2$  (див. таблицю). Було встановлено взаємозв’язок зрушень  $DL_{CO}$  і  $SpO_2$  ( $r = 0,36$ ,  $p=0,048$ ; рисунок, а). При збільшенні опору на видиху до 15 мм вод. ст., як показали проведені дослідження, подальшого поліпшення легеневого газообміну в людей похилого віку з фізіологічним старінням не спостерігалось (див. таблицю).

Разом з тим у людей похилого віку із прискореним старінням дихальної системи відзначалося незначне, але достовірне підвищення РВЛ при диханні з РЕЕР 5 мм вод. ст. Це повинно призводити до збільшення поверхні газообміну і поліпшення умов альвеоло-капілярної дифузії [5]. Дійсно, вивчення  $DL_{CO}$  показало, що в умовах дихання з опором на видиху 5 мм вод. ст. відзначається незначний, але достовірний приріст цього показника. Підвищення  $DL_{CO}$  і РВЛ в умовах позитивного тиску видиху зумовлено, ймовірно, зниженням альвеолярного мертвого простору, збільшенням ефективної альвеолярної вентиляції, підвищенням напруження кисню в альвеолах і зростанням альвеоло-капілярного градієнта за киснем. Підвищення  $DL_{CO}$  і РВЛ при диханні з опором на видиху 5 мм вод. ст. у людей похилого віку із прискореним старінням трохи покращувало газообмін в легенях, про що свідчить підвищення  $SpO_2$  (див. таблицю).

## Показники газообміну в легенях при диханні з опором на видиху в людей похилого віку з фізіологічним і прискореним старінням дихальної системи

Показники	Старіння	
	фізіологічне	прискорене
Сатурація крові (SpO <sub>2</sub> ), вихідний рівень, %	96,58±1,23	95,21±1,18**
Δ SpO <sub>2</sub> при позитивному тиску наприкінці видиху, %		
5 мм вод. ст.	0,58±0,17	0,55±0,14*
10 мм вод. ст.	1,73±0,23***	0,71±0,17***
15 мм вод. ст.	1,85±0,54*	-0,41±0,18*
Дифузійна здатність легень (DL <sub>co</sub> ), вихідний рівень, мл·хв <sup>-1</sup> ·(мм рт.ст.) <sup>-1</sup>	20,72±0,44	16,92±0,48**
Δ DL <sub>co</sub> при позитивному тиску наприкінці видиху, мл·хв <sup>-1</sup> ·(мм рт.ст.) <sup>-1</sup>		
5 мм вод. ст.,	0,22±0,21	0,69±0,12**
10 мм вод. ст.	1,72±0,18***	1,07±0,14***
15 мм вод. ст.	1,75±0,22***	-0,31±0,13**
Час розведення гелію, вихідний рівень, хв	3,89±0,12	4,66±0,14*
Δ Час розведення гелію при позитивному тиску наприкінці видиху, хв		
5 мм вод. ст.	-0,07±0,08	-1,03±0,10**
10 мм вод. ст.	-2,68±0,23*	-1,85±0,17***
15 мм вод. ст.	-2,77±0,20*	0,54±0,25**

\*P < 0,05; \*\*P < 0,05 – достовірність порівняно з відповідною групою людей, які старіють фізіологічно; \*\*\*P < 0,05 – порівняно із відповідною групою з опором видиху 5 мм вод. ст.

Реакцію легеневого газообміну в людей похилого віку з прискореним старінням дихальної системи вже при диханні з опором на видиху 5 мм вод. ст., на відміну від людей, які старіють фізіологічно, можна пояснити таким чином. Як відомо, при старінні знижується бронхіальна прохідність, знижується ефективність легеневого газообміну в легенях і розвивається артеріальна гіпоксемія [5, 9]. При розвитку прискореного старіння дихальної системи усі ці процеси посилюються [4]. Це сприяє більш вираженій компенсаторній роботі дихальних м'язів під час видиху та підвищенню внутрішньогрудного тиску. У результаті це може спричинити експіраторне закриття дихальних шляхів на більш ранній фазі видиху, додатковій затримці газу в легенях, збільшення залишкового об'єму, альвеолярну гіпоксію та артеріальну гіпоксію. Тому в людей похилого віку з прискореним старінням дихальної системи, на відміну від людей, які старіють фізіологічно, навіть невеликий опір видиху вже поліпшує процеси легеневого газообміну.

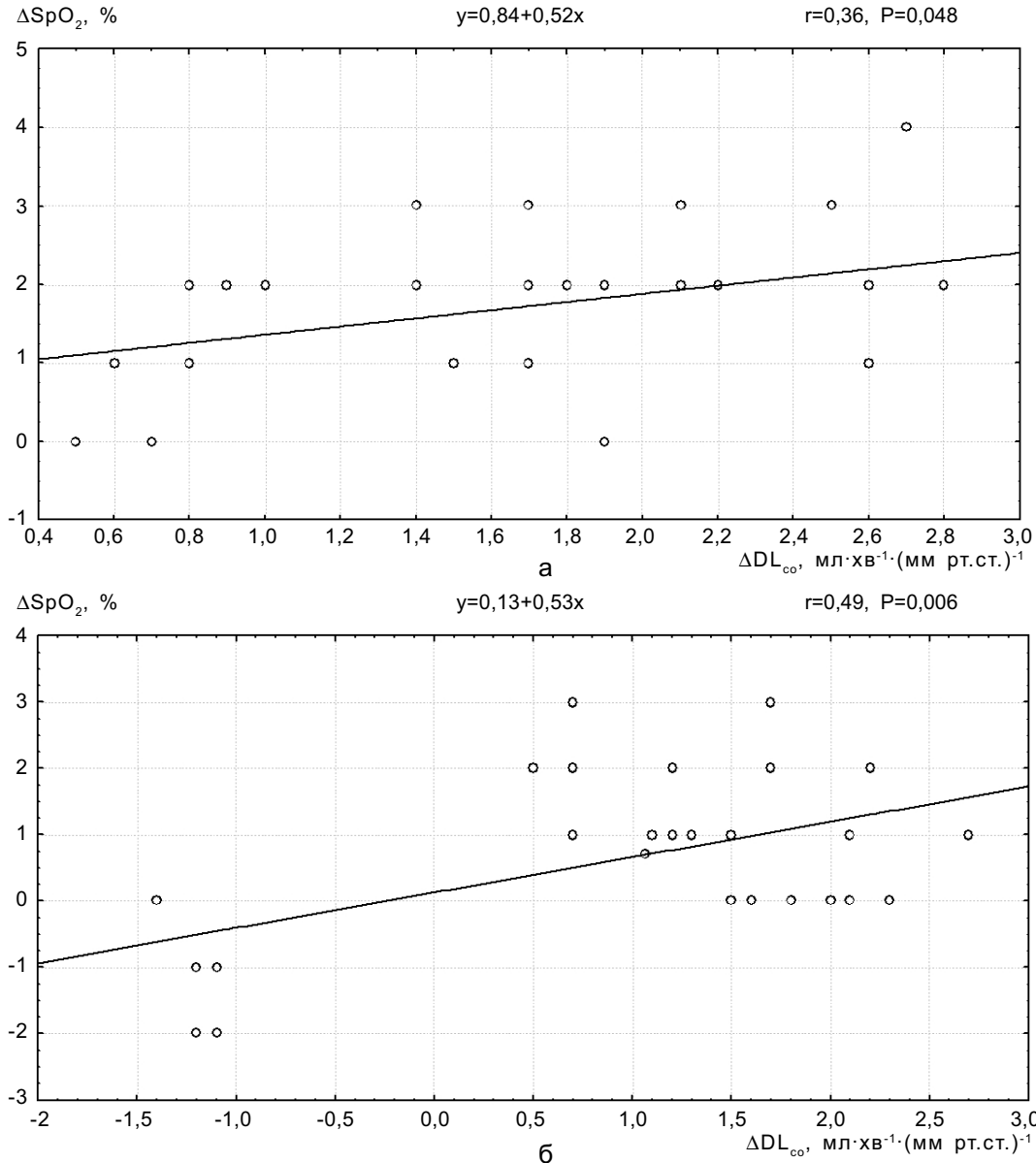
Аналіз проведених досліджень також показав, що більш виражене підвищення ефективності легеневого газообміну в людей із прискореним старінням відбувалося при диханні з опором на видиху 10 мм вод. ст. Підтвердженням цьому є достовірні зміни PVL, DL<sub>co</sub> і SpO<sub>2</sub> (див. таблицю). Причому була виявлена достовірна кореляція змін DL<sub>co</sub> і SpO<sub>2</sub> (r = 0,49, p=0,006; див. рисунок, б). Варто відзначити, що в деяких обстежуваних дихання з РЕЕР 10 мм вод. ст. викликало незначне пригнічення легеневого газообміну, хоча суб'єктивно переносилося добре. Крім того, як видно з таблиці, у людей похилого віку з прискореним старінням дихальної системи при диханні з РЕЕР порівняно людьми, які старіють фізіологічно, на однаковий (10 мм вод. ст.) опір на видиху зрушення PVL, DL<sub>co</sub> і, відповідно, SpO<sub>2</sub> були менші. Це свідчить про зниження чутливості механізмів регуляції тонуусу бронхів у людей похилого віку з прискореним старінням.

Реакція легеневого газообміну на дихання з опором видиху має складний генез.



Підвищення опору в дихальних шляхах подовжує видих, зменшує раннє експіраторне закриття дихальних шляхів, залучає в газообмін не вентилявані альвеоли [2, 3, 11, 12]. Останні характеризуються також зниженням залишкового об'єму та альвеолярного кровотоку внаслідок зниження кількості й якості сурфактанту. При диханні з опором видиху в цих альвеолах відновлюється початковий об'єм, залишкова

ємність і перфузія. Має значення і активація холінергічних механізмів і, як наслідок, відновлення перфузії та збільшення кількості сурфактанту [11–13]. Все це знижує альвеолярний мертвий простір, збільшує ефективну альвеолярну вентиляцію, зменшує внутрішньолегенеє шунтування, знижує комплайнс легень, активацію легеневого газообміну і збільшує напруження кисню в крові [2, 3, 12, 14]. Однак



Залежність зрушень сатурації крові від зрушень дифузійної здатності легень при диханні з опором на видиху 10 мм вод. ст. у людей похилого віку з фізіологічним (а) та прискореним (б) старінням дихальної системи

при диханні з опором на видиху 15 мм вод. ст. у людей похилого віку з прискореним старінням, навпаки, відзначалося навіть деяке пригнічення обміну кисню в легенях. Свідченням цьому є зниження РВЛ і  $DL_{CO}$ , як наслідок, зменшення  $SpO_2$  (див. таблицю). Такі зміни можуть бути пов'язані зі звуженням бронхів і порушенням евакуації слизу внаслідок більш активної роботи дихальних м'язів з подолання надмірно високого опору в дихальних шляхах і підвищення тиску в грудній порожнині при РЕЕР. Також погіршенню газообміну при РЕЕР, на думку деяких авторів, сприяє набряклість альвеоло-капілярної мембрани внаслідок активації волюмрецепції, ниркової реабсорбції та затримки рідини в організмі, які можуть бути при диханні з надмірним опором на видиху [2, 3, 13].

## ВИСНОВКИ

1. Дихання з опором на видиху поліпшує дифузійну здатність, рівномірності вентиляції легень і підвищує ефективність легеневого газообміну в людей похилого віку з фізіологічним і прискореним старінням дихальної системи.

2. У людей з прискореним старінням дихальної системи, вже невеликий опір на видиху підвищує дифузійну здатність і рівномірність вентиляції легень і поліпшує ефективність газообміну в легенях. Це може бути пов'язане з більш вираженими порушеннями легеневого газообміну внаслідок експіраторного закриття дихальних шляхів на більш ранній фазі видиху та більш високим внутрішньогрудним тиском.

3. У людей із прискореним старінням дихальної системи, знижена реакція легеневого газообміну на дихання з опором на видиху.

4. Дихання зі значним опором на видиху (15 мм вод. ст.) у людей із прискореним старінням дихальної системи викликає зниження дифузійної здатності, рівномірності

вентиляції легень і погіршення газообміну в них. Це може бути пов'язане зі звуженням бронхів внаслідок більш активної роботи дихальних м'язів з подолання надмірно високого опору в дихальних шляхах і підвищення тиску в грудній порожнині при диханні з позитивним тиском наприкінці видиху.

5. Отримані результати слід враховувати при виборі опору на видиху та проведенні дихальних тренувань із позитивним тиском на видиху в людей похилого віку.

**О.В. Коркушко, Э.О. Асанов, И.А. Дыба**

## **ВЛИЯНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ НА ВЫДОХЕ НА ГАЗООБМЕН В ЛЕГКИХ У ПОЖИЛЫХ ЛЮДЕЙ С УСКОРЕННЫМ СТАРЕНИЕМ**

Изучены реакции газообмена в легких при дыхании с положительным давлением на выдохе у пожилых людей с физиологическим (24 человека) и ускоренным (26 человек) старением дыхательной системы. Показано, что у людей с ускоренным старением дыхательной системы небольшое сопротивление выдоху улучшает эффективность газообмена в легких. Однако дыхание со значительным сопротивлением выдохе (15 мм вод. ст.) вызывает угнетение газообмена в легких. Установлено, что у людей с ускоренным старением дыхательной системы снижена реакция легочного газообмена на дыхание с сопротивлением выдоху.

Ключевые слова: сопротивление на выдохе, газообмен в легких, ускоренное старение.

**O. V. Korkushko, E. O. Asanov, I. A. Dyba**

## **EFFECT OF POSITIVE END EXPIRATORY PRESSURE ON BREATH TEST PULMONARY GAS EXCHANGE IN ELDERLY PEOPLE WITH ACCELERATED AGING**

The reaction of cerebral blood flow during breathing with positive end expiratory pressure in elderly people with physiological (24 pers.) and accelerated (26 pers.) aging of the respiratory system were studied. It is shown that in people with accelerated aging of the respiratory system some resistance to expiration improves the efficiency of gas exchange in the lungs. However, breathing with considerable resistance to expiration (15 mm water column) in people with accelerated aging of the respiratory system, causing depression of gas exchange in the lungs. Found that people with accelerated aging of the respiratory system decreased pulmonary gas ex-

change response to breathing resistance expiration.

Keywords: positive end expiratory pressure, pulmonary gas exchange, accelerated aging.

*D.F. Chebotariov Institute of Gerontology, National Academy of Medical Science of Ukraine, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анисимов В.Н. Средства профилактики ускоренного старения (геропротекторы) // Успехи геронтологии. – 2000. – Вып. 4. – С. 55–75.
2. Зильбер А.П. Дыхательная недостаточность. – М.: Медицина, 1989. – 512 с.
3. Кассиль В.Л., Лескин Г.С., Выжигина М.А. Респираторная поддержка: Руководство по искусственной и вспомогательной вентиляции лёгких в анестезиологии и интенсивной терапии. – М.: Медицина, 1997. – 320 с.
4. Коркушко О.В., Асанов Э.О., Писарук А.В., Чеботарев Н.Д. Изменения газообмена в легких при гипоксии у пожилых людей с физиологическим и ускоренным старением дыхательной системы // Укр. пульмонолог. журн. – 2010. – №1. – С. 54–56.
5. Коркушко О.В., Писарук А.В., Лишневська В.Ю., Асанов Е.О., Чеботарьов М.Д. Вікові особливості реакції кардіореспіраторної системи на гіпоксію // Фізіол. журн. – 2005. – 51, №6. – С. 11–17.
6. Коркушко О.В., Шатило В.Б., Ярошенко Ю.Т. Передчасне старіння: фактори ризику, діагностика, засоби попередження, метаболічна терапія. Бібліотечка практ. лікаря. – К.: Тов. ДСГ Лтд, 2003. – 52 с.
7. Путиенко Ж.Е. Эффективность применения положительного давления в конце выдоха в коррекции легочной вентиляции у больных бронхиальной астмой и хроническим обструктивным бронхитом // Укр. пульмонолог. журн. – 1999. – №2. – С. 42–44.
8. Фролькис В.В. Старение: воспоминания о будущем // Лікування та діагностика. – 1998. – №7. – С. 14–23.
9. Фролькис В.В. Регуляция дыхания в старости. – В кн.: Дыхание, газообмен и гипоксические состояния в пожилом и старческом возрасте. – К.: Здоров'я, 1975. – С. 17–20.
10. Curtis A.S., Kellogg R.H. Ventilatory response of goats to transient changes in CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> during acute hypoxia // Resp. Physiol. – 1995. – 24, №2. – P. 163–171.
11. Fujiwara M., Abe K., Mashimo T. The effect of positive end-expiratory pressure and continuous positive airway pressure on the oxygenation and shunt fraction during one-lung ventilation with propofol anesthesia // J. Clin. Anesth. – 2001. – 13. – P. 473–477.
12. Inomata S., Nishikawa T., Saito S., Kihara S. 'Best' PEEP during one-lung ventilation // Brit. J. Anaesth. – 1997. – 78. – P. 754–756.
13. Pelosi P., Ravagnan I., Giurati G. Positive end-expiratory pressure improves respiratory function in obese but not in normal subjects during anesthesia and paralysis // Anesthesiology. – 1999. – 91. – P. 1221–1231.
14. Richard J., Maggiore S., Jonson B. et al. Influence of tidal volume on alveolar recruitment. Respective role of PEEP and a recruitment maneuver // Amer. J. Respir. Crit. Care Med. – 2001. – 163. – P. 1609–1613.

*ДУ «Ін-т геронтології НАМН України  
ім. акад. Д.Ф. Чеботарьова», Київ  
E-mail: eoasanov@ukr.net, www.dr-asanov.narod.ru*

*Матеріал надійшов до  
редакції 11.04.2011*

О.В. Климяк, О.В. Бондзик, Є. М. Решетнік, С.П. Весельський, М.Ю. Макачук

## Особливості жовчоутворення у щурів різної статі за дії естрогену

*Досліджувався вплив естрогену (8 мкг/100 г) на зовнішньосекреторну функцію печінки та зміни в жовчнокислотному складі жовчі у щурів різної статі. Встановлено, що естроген достовірно змінював динаміку холерезу у самиць, а також зумовлював різнонаправлені зміни у жовчнокислотному складі жовчі самців і самицьок. Встановлено, що естроген у застосованій дозі більш ефективно стимулює жовчоутворення у печінці самиць щурів, яке супроводжувалося достовірними змінами в динаміці холерезу. Естроген зумовлював різнонаправлені зміни у жовчнокислотному складі жовчі, які свідчать про посилення процесів кон'югації жовчних кислот з таурином і гліцином в печінці самиць щурів. У самців збільшувалася біосинтез вільних і кон'югованих діоксихоланових жовчних кислот.*

*Ключові слова: естроген, холерез, жовч, жовчні кислоти.*

### ВСТУП

Серед численних ендогенних факторів, які змінюють жовчосекреторну функцію печінки, значна регуляторна роль належить естрогенам [14]. Відомим є істотний вплив кастрації на жовчоутворення, при цьому характер і ступінь змін залежать як від видових, так і індивідуальних особливостей тварин, а також від часу, що збіг після кастрації [8]. Зокрема, видалення статевих залоз у білих щурів призводило до тривалого (до двох місяців) посилення холесекреції зі зниженням загальної концентрації холатів і білірубину в жовчі. Гіперсекреція жовчі у них відбувалася на фоні підвищення активності кислої фосфатази та розширення перибіліарних ділянок локалізації її по периферії печінкових часточок, а також збільшення активності лужної фосфатази жовчних капілярів [1, 4]. Водночас введення екзогенних естрогенів і їх аналогів та зміна експресії естрогенових рецепторів призводять до інтенсифікації захоплення клітинами печінки холестерину з крові та збільшення його синтезу de novo в гепато-

цитах [11, 12, 15]. Отже естрогени регулюють численні метаболічні процеси в печінці. Разом з тим вони впливають на проліферативні процеси у біліарних трактах і змінюють секреторну активність холангіоцитів різними шляхами [2, 11].

Істотне значення відводиться естрогенам в розвитку патологічних станів гепатобіліарної системи [14, 15]. Саме їх вплив відіграє ключову роль у провокуванні захворюваності на жовчнокам'яну хворобу жінок [4, 10, 14, 15]. Встановлено значне зниження синтезу жовчних кислот у вагітних жінок, а також при терапії естрогенами в постменопаузі та застосуванні гормональних протизаплідних засобів [5, 15]. Варто зазначити, що при введенні в організм естрогенів, як і під час вагітності, разом зі зниженням синтезу та секреції жовчних кислот і фосфоліпідів посилюється виділення до жовчі холестерину [15]. Всі описані зміни спричинюють перенасичення ним жовчі з наступною нуклеацією його циклопентанфенантренових основ і утворенням ядер жовчних каменів, а отже викликають збільшення літогенності жовчі [14, 15].

© О.В. Климяк, О.В. Бондзик, Є. М. Решетнік, С.П. Весельський, М.Ю. Макачук

Слід відзначити, що концентрація одного з природних естрогенів – естрону (3-Оксиестра-1,3,5(1 О-триент-17-он) часто підвищується в крові впродовж вагітності. Естрон є метаболітом ферментативного перетворення естрадіолу, а також він надходить від плоду, де утворюється з сульфату дегідроепіандростерону у надниркових залозах [6]. Тож імовірно, що виявлені у жінок під час вагітності відхилення в процесах жовчоутворення певною мірою зумовлені значними змінами у співвідношенні стероїдних статевих гормонів. Нині відмічено зростання захворюваності на жовчнокам'яну хворобу і серед чоловіків та у людей з нормальною масою тіла [7]. У зв'язку з цим необхідним є порівняльне вивчення особливостей впливу естрогенів (зокрема естрону) в особин різної статі. Тому метою нашої роботи було дослідження впливу естрону на процеси жовчоутворення в печінці тварин та на якісні й кількісні характеристики продукуюваної жовчі.

## МЕТОДИКА

Експерименти проведено на білих щурах масою 180–250 г, які перед дослідженням були позбавлені їжі на 18–20 год з вільним доступом до води. Під час гострого досліду тварини знаходилися під тіопенталовим наркозом (5 мг/100 г, внутрішньоочеревинно). Після лапаротомії у відпрепаровану жовчну протоку через надріз її стінки вводили тонку пластикову канюлю з приєднаною поліетиленовою трубкою, котра з'єднувалася з мікропіпеткою. Впродовж 30 хв після канюлювання жовчної протоки визначали вихідний рівень жовчовиділення за допомогою збору трьох 10-хвилинних порцій жовчі. Після цього дослідним тваринам внутрішньопортально вводили естрон (8 мкг/100г маси), розчинений у 200 мкл фізіологічного розчину. Контрольній групі тварин аналогічним способом вводили

відповідний об'єм фізіологічного розчину. Об'єм секретованої жовчі реєстрували кожні 10 хв протягом трьох годин досліду. Інтенсивність секреторної функції печінки оцінювали за середньою об'ємною швидкістю секреції жовчі, котру розраховували за об'ємом жовчі (нанолітри), що продукувалася впродовж однієї хвилини у перерахунку на один грам маси тіла. Крім того, розраховували сумарний об'єм жовчі, виділеної впродовж 30-хвилинних проміжків часу та за весь період досліду. У кожній півгодинній пробі отриманої жовчі методом тонкошарової хроматографії [3] визначали якісний і кількісний вміст жовчних кислот (таурохолевої, суміші таурохенодезоксихолевої та тауродезоксихолевої, глікохолевої, суміші глікохенодезоксихолевої та глікодезоксихолевої, вільної холевої, хенодезоксихолевої та дезоксихолевої). Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням стандартизованих методів варіаційної статистики (STATISTICA 6.0) з врахуванням критерію t Стьюдента. Нормальність розподілу результатів оцінювали за допомогою тесту Шапіро – Уїлка.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні зовнішньосекреторної функції печінки, за умов гострого експерименту, необхідним є введення канюлі в загальну жовчну протоку, що призводить до розмикання ентерогепатичного круообігу жовчних кислот і виключає їх стимулювальну дію на холерез. У зв'язку з цим у контрольних дослідах як у самців, так і самиць поступово знижувалась об'ємна швидкість холесекреції впродовж трьохгодинного експерименту. У самиць зниження цього показника було дещо суттєвішим. У шостому півгодинному проміжку швидкість холесекреції у самців зменшилася на 10,1 %, а у самиць на 14,3 % порівняно з першим (вихідним) півгодинним проміжком (табл. 1). Кількість жовчі, що виділялася печінкою

Таблиця 1. Об'ємна швидкість холесекреції (нл · г<sup>-1</sup> · хв<sup>-1</sup>) у щурів за дії естроу (M±m; n=21)

Півгодинні проміжки дослідів	Самці		Самиці	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
10.00–10.30	49,75±2,6	48,1±1,75	40,87±2,03	48,51±2,23
10.30–11.00	47,37±2,24	47,6±2,23	39,86±1,79	47,70±2,36
11.00–11.30	45,9±2,8	48,1±1,75	37,53±1,84	42,63±2,9
11.30–12.00	47,23±1,56	48,4±1,87	35,01±2,34	46,61±1,72**
12.00–12.30	44,71±1,2	49,4±2,7	35,01±2,34	50,02±1,4**

Тут і в табл. 2 \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001

самиць за весь дослід (у розрахунку на 1 г тканини) знизилася на 24,1% (P<0,05).

Аналізуючи якісні і кількісні характеристики отриманої жовчі слід зазначити, що загальний вміст жовчних кислот у всіх пробах контрольного дослідів у самців був значно вищим, ніж у самиць. Так, загальна концентрація жовчних кислот у жовчі самців у першій півгодинній пробі становила 492,46 мг% ± 21,8 мг%, а у самиць лише 430,86 мг% ± 18,2 мг%, тобто на 14,3 % була нижчою. В останній (шостій) півгодинній пробі контрольного дослідів загальний вміст жовчних кислот у жовчі самців перевищував такий у самиць на 15,2 % (P<0,05; табл. 2).

Співвідношення окремих жовчних кислот у жовчі самиць та самців мало певні особливості. Зокрема, якщо вміст таурохолевої та суми тауродіоксихоланових кислот майже не відрізнявся між собою в обох статей, то концентрація глікохолевої кислоти у жовчі самців була у 1,5–2,0 рази вищою (P<0,001). Водночас концентрація суми глікохенодезоксихолевої та глікодезоксихолевих кислот у більшості півгодинних проб жовчі самиць контрольного дослідів була вищою на 37,1–54,2 % (P<0,05) порівняно з відповідними пробами жовчі самців. Слід відмітити, що вміст як окремих вільних жовчних кислот, так і їх суми був дещо вищим (на 3,9–5,6 %) у жовчі самиць (див. табл. 2).

Внутрішньопортальне введення естроу зумовило суттєві зміни як в динаміці холерезу, так і в спектрі жовчних кислот у

жовчі, отриманій під час експерименту на щурах. Зокрема, під впливом цього гормону в самиць щурів спостерігалася хвилеподібне підвищення секреції жовчі печінкою. В першій півгодинній проміжок часу після введення естроу об'ємна швидкість холесекреції підвищилася на 18,69 % порівняно з контрольними значеннями (див. табл. 1). Стимулювальний ефект гормону в другому півгодинному проміжку дещо підсилювався і об'ємна швидкість секреції жовчі зросла на 19,67 % (P<0,05) порівняно з контролем. Жовчоутворення у третьому півгодинному проміжку частково загальмувалося. Найбільш потужне стимулювання холесекреції естроном відбувалося в четвертому та п'ятому (на 35,03 і 40,73 %; P<0,05; див. табл. 1) півгодинних проміжках. І як наслідок, за весь час експерименту сумарний об'єм секретованої жовчі у дослідній групі самиць порівняно з контролем збільшився на 19,55 %; P<0,05; див. табл. 1).

Естрон майже не впливав на холерез у самців впродовж першого півгодинного проміжку після введення препарату, уповільнюючи його лише на 3,0 %. Надалі відбувалося осциляційне підвищення жовчоутворення, особливо в третьому (на 4,7 %) та п'ятому (на 9,8 %) півгодинних проміжках порівняно з контрольними значеннями. Таке підвищення холерезу призвело лише до статистично незначного (на 2,9 %) збільшення загальної кількості отриманої жовчі у дослідних щурів-самців за весь дослід порівняно з контролем (див. табл. 1).

За дії естроу якісні і кількісні характе-

Таблиця 2. Концентрація жовчних кислот (мг %) у жовчі щурів за дії естрогену ( $M \pm m$ ;  $n = 21$ )

Півгодинні проміжки досліджу		Таурохолева кислота	Таурохенодезоксихолева і тауродезоксихолева кислоти	Глікохолева кислота	Глікохенодезоксихолева і глікодезоксихолева кислоти	Холева кислота	Хенодезоксихолева і дезоксихолева кислоти
Самці							
10.00–10.30	Контроль	182,94±6,5	110,02±4,1	151,44±6,5	23,60±2,6	15,48±2,1	6,74±0,4
	Дослід	196,75±5,4	114,75±4,2	119,54±14,4	33,88±2,8*	21,15±0,8*	11,31±0,8**
10.30–11.00	Контроль	180,60±6,4	106,46±3,6	147,30±6,3	22,16±2,5	14,84±1,9	6,50±0,4
	Дослід	215,05±5,2***	123,31±4,3**	126,25±15,5	34,88±2,5**	23,72±0,9***	13,15±1,1***
11.00–11.30	Контроль	178,50±5,9	103,70±3,8	144,74±6,5	21,70±2,1	15,04±2,0	6,46±0,5
	Дослід	209,40±4,8**	127,94±5,9**	113,25±12,6*	31,81±2,1**	22,40±1,0	12,38±0,8***
11.30–12.00	Контроль	172,50±5,4	100,08±3,1	136,64±9,1	20,14±1,9	15,82±2,0	6,86±0,5
	Дослід	211,97±5,9***	122,08±4,4**	113,51±12,2	33,50±2,0**	23,25±0,7**	11,35±0,5***
12.00–12.30	Контроль	166,22±6,8	95,24±3,4	132,12±8,5	18,74±1,9	16,74±1,8	7,16±0,5
	Дослід	197,50±7,6**	112,32±4,8**	105,77±10,3	28,10±1,0***	21,18±0,7	10,27±0,4***
Самиці							
10.00–10.30	Контроль	177,58±6,5	99,18±7,8	92,52±8,0	36,18±2,3	16,34±1,5	7,68±0,5
	Дослід	199,80±9,6*	92,35±3,7	82,87±3,7	26,42±2,2**	13,60±0,8	8,53±0,2
10.30–11.00	Контроль	171,76±6,3	96,00±7,6	70,56±16,0	34,18±2,3	15,26±1,4	7,88±0,5
	Дослід	202,87±10,2*	88,85±5,3	78,23±4,9	24,20±3,7*	14,47±0,8	8,47±0,2
11.00–11.30	Контроль	168,28±6,3	95,28±6,4	85,38±7,9	32,38±2,1	14,70±1,2	7,60±0,4
	Дослід	196,77±9,2**	86,50±5,2	74,07±5,2	24,35±2,0*	13,67±0,5	7,82±0,4
11.30–12.00	Контроль	163,10±6,3	93,82±7,4	81,06±6,8	29,72±2,1	15,34±1,6	7,56±0,5
	Дослід	197,73±9,6**	83,90±4,5	73,02±3,8	23,90±2,9	13,20±0,5	7,65±0,1
12.00–12.30	Контроль	159,72±6,1	90,38±6,5	77,84±6,1	27,20±1,9	15,76±1,3	7,92±0,6
	Дослід	189,70±8,9*	82,46±4,1	70,02±3,6	21,58±1,8	11,60±0,9*	7,06±0,2

ристики жовчі самиць і самців щурів змінювалися впродовж експерименту по-різному. Концентрація вільної холевой кислоти суттєво зросла впродовж усього експерименту у жовчі самців, з двома чіткими високостовірними максимума змін у другій (60,1 %,  $P < 0,001$ ) та четвертій (47,5 %,  $P < 0,05$ ) півгодинних пробах порівняно з контролем (див. табл. 2). Концентрація цього метаболіту в пробах жовчі самиць, отриманих після введення препарату, була нижчою на 7,5–16,6 %, ніж у контрольних тварин, а в останній пробі досліджу ця різниця сягала достовірних значень і становила 26,6 % ( $P < 0,05$ ; див. табл. 2).

Зменшення концентрації холевой кислоти у жовчі самиць за дії естрогену ймовірно є

наслідком підвищеної її кон'югації з таурином, про що свідчить зростання концентрації таурохолевой кислоти у більшості проб (див. табл. 2). У жовчі самців вміст таурохолевой кислоти також підвищувався з відповідними максимумами змін у другій (19,1 %,  $P < 0,01$ ) та четвертій (22,9 %,  $P < 0,01$ ) пробі. Це разом з більш високою концентрацією холевой кислоти може свідчити не лише про активацію поліферментних систем, які здійснюють кон'югацію холатів з таурином, а також посилення біосинтезу останньої в тканині печінки самиць. Слід відмітити, що кон'югація цієї жовчної кислоти з гліцином під дією естрогену помітно знизилася, особливо в тканині печінки самців (див. табл. 2).

Загальна концентрація хенодезоксихолевої та дезоксихолевої кислот значно вища за дії естрогену у всіх півгодинних пробах жовчі щурів самців порівняно з відповідними контрольними значеннями, а максимальне підвищення її (більше ніж удвічі;  $P < 0,01$ ) спостерігалось в третій півгодинній пробі жовчі (див. табл. 2). Естрон не зумовлював підвищення вмісту вільних жовчних кислот у жовчі самиць. При цьому у всіх їх проаналізованих пробах виявили незначне зниження вмісту кон'югованих з таурином і гліцином діоксихоланових кислот (див. табл. 2). Це не виключає можливості їх часткового розбавлення завдяки стимуляції холерезу у самиць досліджуваним гормоном.

Слід зазначити, що окрім виявленого більш значного, порівняно з холевою кислотою, підвищення вмісту вільних діоксихоланових кислот, у жовчі самців спостерігалось і одночасне достовірне збільшення концентрації кон'югованих із таурином діоксихоланових кислот та, особливо, їх глікокон'югатів. Так, у другому півгодинному проміжку сумарна концентрація глікохено- та глікодезоксихоланових кислот у жовчі дослідних самців перевищувала таку контрольних тварин на 57,2 % ( $P < 0,01$ ). А в п'ятому півгодинному проміжку сумарна концентрація цих кислот була більшою за відповідні контрольні значення на 66,7 % ( $P < 0,01$ ). Таке суттєве зміщення рівноваги в бік підвищення вмісту діоксихоланових похідних може вказувати на те, що досліджувана доза естрогену сприяє не лише активації поліферментних систем, які забезпечують кон'югацію жовчних кислот, але і посилює їх біосинтез «кислим» шляхом із залученням мітохондріальних ферментів [4]. Останнє пов'язане з активацією гормоном процесів тканинного дихання у печінці [9]. Отже, виявлені за дії естрогену зміни холерезу та секреції окремих вільних і кон'югованих жовчних кислот у самиць і самців щурів вказують на комплексну дію

досліджуваного гормону на зовнішньосекреторну функцію печінки щурів. Не виключено, що виявлені, швидкі в часі метаболічні перебудови в певних ланках жовчнокислотного обміну можуть реалізовуватися завдяки швидкій взаємодії досліджуваного нами гормону з високоспіднятими до естрогенів мембранними та цитоплазматичними білками-рецепторами [1]. Швидкі та пролонговані в часі зміни у зовнішньосекреторній функції печінки ймовірно відбуваються завдяки багаторівневій взаємодії естрогену з іншими чинниками, включаючи перебудову нейрогуморальної системи з відповідними наслідками в перебігу фізіолого-біохімічних процесів у печінковій тканині.

Таким чином, естрон, введений внутрішньопортально в організм щурів в дозі 8 мкг/100 г достовірно стилював холерез у самиць порівняно з контрольними тваринами. Навантаження організму щурів естроном зумовлювало суттєві і різнонаправлені зміни в процесах біосинтезу та кон'югації жовчних кислот у печінці дослідних тварин різної статі, що відображалось у певних змінах співвідношення вільних і кон'югованих жовчних кислот у жовчі тварин.

**О.В. Климяк, О.В. Бондик, Е. М. Решетник, С.П. Весельский, М.Ю. Макаруч**

#### **ОСОБЕННОСТИ ЖЕЛЧЕОБРАЗОВАНИЯ У КРЫС РАЗНОГО ПОЛА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭСТРОНА**

Исследовалось влияние эстрогена (8 мкг/ 100 г) на внешнесекреторную функцию печени и изменения в желчекислотном составе желчи у крыс разного пола. Установлено, что гормон в исследуемой дозе более эффективно стимулирует желчеобразование в печени самок крыс, которое сопровождалось достоверными изменениями в динамике холереза. Эстрон обуславливал разнонаправленные изменения в желчнокислотном составе желчи, свидетельствующем об усилении процессов конъюгации желчных кислот с таурином и глицином в печени самок крыс. У самцов наблюдалось увеличение биосинтеза свободных и конъюгированных диоксихолановых желчных кислот.

Ключевые слова: эстрон, холерез, желч, желчные кислоты.



**O.V. Klimyuk, O.V. Bonzik, E.M. Reshetnik,  
S.P. Veselsky, M. Yu. Makarchuk**

**PECULIARITIES OF BILE FORMATION  
IN RATS OF DIFFERENT SEX  
IN ESTRON INFLUENCE**

The influence of estron (8 µg/100g of animal's body weight) on the exocrine function of liver and the changes in bile acid composition of bile on different sex rats was studied. It was shown, that hormone at the applied dose, effected choleresis of female rats more effectively. Estron also caused different changes in bile composition. So, estron stimulated bile acid conjugation with taurine and glycine in female rat liver. Increasing of free and conjugated bile acid biosynthesis in male rats was observed.

Key words: estron, choleresis, bile, bile acids.

*Taras Shevchenko Kyiv National University*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бабичев В.Н. Рецепторные механизмы действия половых гормонов. Может ли рецептор работать без лиганда? // Проблемы эндокринологии. – 2006. – 52, № 1. – С.32–38.
2. Ведерникова Н.Н., Майский А.И. Анализ критериев специфичности действия половых гормонов на печеночную ткань // Успехи совр. биологии. – 1978. – 86, Вып.2. – С. 283–292.
3. Способ определения желчных кислот в биологических жидкостях: А.с.4411066/14 СССР, МБИ Г 01 N 33/50/ С.П. Весельский, П.С. Ляшенко, И.А. Лукьяненко (СССР). – №1624322; Заявлено 25.01.1988; Оpubл. 30.01.1991, Бюл. № 4.
4. Вишнякова Т.Г., Шныра А.А., Бочаров А.В. Выявление прямого регуляторного действия эстрогенов на гепатоциты, оцениваемого по изменению уровня особого эстроген-связывающего белка в первичной структуре клеток // Биохимия. – 1989. – № 4. – С. 694–701.
5. Жукова Л.А., Сумин С.А., Лебедев Т.Ю., Андреева Н.С., Гуламов А.А. Неотложная эндокринология: учебное пособие. – М.: Мед. информ. агентство, 2006. – 160 с.
6. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 800 с.
7. Корочина И.Э. Гастроэнтерологические аспекты метаболического синдрома // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – 18. – С. 26–37.
8. Розен В.Б. Половые гормоны и их циторецепция в множественном контроле функций печени // Вестн. АМН СССР. – 1983. – № 2. – С.80–86.
9. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. – М.: Мир, 1989. – 653 с.
10. Alvaro D., Mancino M.G., Onori P., Franchitto A., Alpini G., Francis H., Glaser S., Gaudio E. Estrogen and pathophysiology of the biliary tree // World J. Gastroenterol. – 2006. – 12, № 22. – P.3537–3545.
11. Bravo E., Cantafora A., Avella M., Botham K. M. Metabolism of chylomicron cholesterol is delayed by estrogen. An in vivo study in the rat // Exp. Biol. Med. – 2001. – 226, №. – P.112–118.
12. Bravo E., Cantafora A., Cicchini C., Avella M., Botham K. M., The influence of estrogen on hepatic cholesterol metabolism and biliary lipid secretion in rats fed fish oil // Biochim. et Biophys. Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 1999. – 1437, № 3. – P.367–377.
13. Cirillo D. J., Wallace R. B., Rodabough R. J., Greenland P., LaCroix A. Z., Limacher M. C., Larson J. C. Effect of Estrogen Therapy on Gallbladder Disease // JAMA – 2005 – 293, № 3 – P.330–339.
14. Kalala S., Krishna M., Shah R., Lebovics E., Frishman W. H. Pstmenopausal hormone replacement therapy and the risk of calculous gallbladder disease // Clin. Geriatrics. – 2006. – 14, №3. – P.25–29.
15. Wang H. H., Afdhal N. H., Wang D. O-H. Overexpression of estrogen receptor β increases hepatic cholesterogenesis, leading to biliary hypersecretion in mice // J. Lipid Res. – 2006 – 47, № 4 – P.778–786.

*Київ.нац.ун-т ім. Тараса Шевченка*

*Матеріал надійшов  
до редакції 22.04.2011*

О.В. Ткачук

## Вплив стрептозотоциніндукованого діабету та неповної глобальної ішемії мозку на апоптоз у тимусі щурів

*Досліджено вплив неповної глобальної ішемії–реперфузії головного мозку на активність прота антиапоптотичних процесів у тимоцитах за інтенсивністю експресії білків p53 та Bcl-2. Показано, що в кірковій зоні тимуса щурів із чотиримісячним цукровим діабетом, а також у контрольних щурів і щурів із цукровим діабетом після ішемії–реперфузії головного мозку в цілому переважають антиапоптотичні процеси. У мозковій зоні залози щурів із діабетом, ускладненим і неускладненим ішемією–реперфузією головного мозку, також превалюють антиапоптотичні механізми, однак меншою мірою, ніж у кірковій.*

*Ключові слова: цукровий діабет, ішемія–реперфузія головного мозку, тимус, апоптоз.*

### ВСТУП

Незважаючи на значну кількість досліджень, присвячених аутоімунним процесам, відсутня єдина думка щодо тригерного механізму їх розвитку. Однак нині немає жодних сумнівів стосовно того, що провідна роль у їх формуванні належить тимусу. У свою чергу головним механізмом селекції лімфоцитів і формування імунофенотипу тимуса та периферичних лімфоїдних органів є апоптоз [8, 12, 14]. Тому його порушення спричиняє дисрегуляцію Т-клітинної ланки імунної системи, що призводить до розвитку аутоімунних ендокринопатій [2, 4, 13]. Загалом, мабуть не буде перебільшенням сказати, що тимус – єдиний орган, в якому протягом усього життя процеси апоптозу відбуваються так інтенсивно. Однак надзвичайна численність регуляторів апоптозу зумовлює й недостатню дослідженість цієї проблеми. Лише сімейство білків Bcl-2 налічує понад 15 членів [14, 16]. Ми зосередили зусилля на вивченні експресії білків Bcl-2 та p53 у тимусі щурів зі стрептозотоциновим цукровим діабетом,

ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку, оскільки обидві ці патології сьогодні відносять до тих, що, принаймні частково, мають імунопатологічну природу [1, 5, 3, 11]. Розвиток діабету й ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку супроводжуються швидкими змінами морфофункціонального стану тимуса [2, 4, 6, 9, 10, 15], однак поєднаний вплив цих патологічних станів на інтенсивність апоптозу в залозі недосліджений, хоча в забезпеченні ауто толерантності цього процесу належить визначальна роль.

Мета нашого дослідження – вивчити співвідношення експресії проапоптотичного білка p53 та антиапоптотичного білка Bcl-2 у клітинах лімфоїдної популяції тимуса щурів із поєднаною дією стрептозотоциніндукованого діабету та неповної глобальної ішемії–реперфузії головного мозку.

### МЕТОДИКА

Для моделювання цукрового діабету самцям білих нелінійних щурів віком 2 міс однократно внутрішньоочеревинно вводили

© О.В. Ткачук

стрептозотонин (“Sigma”, США, 60 мг/кг) [2, 15]. Тривалість діабету (з моменту введення стрептозотонину) – 4 міс. Глікемію контролювали глюкозооксидазним методом, в експеримент брали тварин зі вмістом глюкози 10 ммоль/л і більше. У 6-місячному віці частині щурів із діабетом, а також контрольним тваринам аналогічного віку під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг) здійснювали двобічну оклюзію загальних сонних артерій протягом 20 хв [7]. Тварин виводили з експерименту на 12-ту добу постішемичного періоду декапітацією під наркозом. Експресію білків Vcl-2 та p53 виявляли методом імунофлуоресценції у випадково відібраних серійних зрізах тимуса товщиною 5 мкм. Зрізи депарафінували в ксилолі, регідрували в низхідних концентраціях етанолу, тричі по 10 хв відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4). Для виявлення експресії Vcl-2 зрізи протягом 18 год інкубували у вологій камері при 4°C із первинними мишачими моноклональними антитілами до Vcl-2 щура (mouse IgG1 isotype; “Sigma Chemical”, США). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хв (37°C) зі вторинними антитілами (козячі антитіла до повної молекули IgG миші, кон’юговані з флуоресцеїну ізотіоціонатом (FITC; “Sigma Chemical”, США) у розведенні 1:64.

Експресію p53 виявляли методом подвійної імунофлуоресценції. Для цього регідровані зрізи тимуса впродовж 18 год інкубували у вологій камері при 4°C одночасно з первинними кролячими моноклональними антитілами до p53 щура та мишачими моноклональними антитілами до CD4 щура (“Beckman Coulter”, США), кон’югованими з FITC, промивали 0,1 М фосфатним буфером і заключали в суміш гліцерину та фосфатного буфера (9:1) для подальшої люмінесцентної мікроскопії.

Vcl-2<sup>+</sup>- та p53<sup>+</sup>-лімфоцити кіркової й мозкової зон тимуса ідентифікували за допомогою флуоресцентного мікроскопа

АХІОСКОР. Зображення вводили в комп’ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 (“Kontron Elektronik”, Німеччина) [2, 3, 4].

Статистичну значимість відмінностей оцінювали за критерієм t Стьюдента для незалежних вибірок. Результати представлені у вигляді середніх арифметичних і стандартного відхилення.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ішемія–реперфузія головного мозку в контрольних тварин призвела до зниження в кірковій речовині тимуса сумарної щільності як Vcl-2<sup>-</sup>, так і p53-позитивних лімфоцитів, яке було нерівномірним: в 1,4 раза для Vcl-2<sup>+</sup>- та 4 рази – для p53<sup>+</sup>-лімфоцитів (табл.1, 2). Таким чином, співвідношення p53<sup>+</sup>/Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцити зменшилося з 1,69 у контролі до 0,60 при ішемії–реперфузії. Такі зміни обох чинників відбулися за рахунок усіх класів тимоцитів: щільність лімфобластів, великих, середніх, малих Vcl-2<sup>+</sup>- та p53<sup>+</sup>-лімфоцитів зменшилася у 2,0, 1,6, 1,5, 1,3, та в 4,0, 3,9, 6,0, 3,2 раза відповідно. Отже, в цілому депресія проапоптотичного чинника значно переважала над такою протиапоптотичного, що підтверджується результатами визначення вмісту відповідних білків (табл. 3, 4).

Слід відмітити посилення експресії білка Vcl-2 у великих, середніх та малих тимоцитах при зниженні експресії білка p53 у всіх класах тимоцитів.

У кірковій зоні залози щурів із цукровим діабетом сумарна щільність Vcl-2<sup>+</sup>-клітин зросла у 2,9 раза (щільність лімфобластів, великих, середніх і малих лімфоцитів підвищувалась у 2,1, 2,2, 2,2, 3,5 раза відповідно), а p53-лімфоцитів – знизилася в 1,3 раза, винятково за рахунок середніх лімфоцитів. Унаслідок цього співвідношення p53<sup>+</sup>/Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцити становило 0,47.

За цих експериментальних умов експресія білка Vcl-2 підвищилася тільки у великих тимоцитах, а зниження експресії білка p53 виявлено в середніх і малих.

**Таблиця 1. Щільність Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцитів (на 1 мм<sup>2</sup>) у тимусі щурів зі стрептозотоніндукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M ± m)**

Група спостереження	Сумарна щільність Vcl-2 <sup>+</sup> -клітин	Vcl-2 <sup>+</sup> -лімфо-бласти	Лімфоцити		
			Vcl-2 <sup>+</sup> -великі	Vcl-2 <sup>+</sup> -середні	Vcl-2 <sup>+</sup> -малі
Кіркова зона					
Контроль	59,2±3,87	4,00±0,44	6,55±0,59	16,0±1,23	32,3±2,35
Ішемія–реперфузія	41,5±2,45*	2,01±0,23*	4,16±0,36*	10,9±0,78*	24,4±1,57*
Діабет	170±8,02*	8,24±0,79*	14,3±1,14*	35,3±2,15*	112±5,91*
Діабет та ішемія–реперфузія	54,9±3,84**	3,02±0,26**	4,88±0,53**	11,7±0,98**	35,1±2,65**
Медулярна зона					
Контроль	36,1±3,28	1,45±0,37	3,70±0,68	10,0±0,98	21,0±1,75
Ішемія–реперфузія	30,1±2,94	0,99±0,21	3,73±0,49	7,10±0,78*	18,3±1,97
Діабет	34,6±4,14	0,48±0,17*	2,71±0,46	9,20±1,15	22,2±2,18
Діабет та ішемія–реперфузія	49,0±4,83**	2,73±0,46**	4,24±0,59**	9,28±1,15	32,7±3,40**

Примітки. Тут і в табл. 2–4 \*P<0,05 щодо контролю, \*\* – щодо значень тварин із цукровим діабетом

Отже, зазначені зміни про/антиапопто-тичного потенціалу реалізуються головним чином внаслідок змін кількості Vcl-2<sup>+</sup>- та p53<sup>+</sup>-позитивних тимоцитів і меншою мірою – ступеня експресії відповідних білків.

На нашу думку, виявлене у тварин із діабетом посилення антиапоптотичного потенціалу тимоцитів може лежати в основі погіршення процесів їх селекції і відображати активацію аутоімунних процесів.

Реакція досліджених регуляторів апоптозу на ішемію–реперфузію головного мозку у тварин із цукровим діабетом

кількісно відрізнялася від такої в контрольних щурів: сумарна щільність Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцитів знизилася в 3,1 раза, а p53<sup>+</sup>-лімфоцитів – у 2,3 раза (лімфобластів, великих, середніх і малих тимоцитів – у 2,7, 2,9, 3,0, 3,2 раза відповідно для Vcl-2<sup>+</sup> та в 1,4, 2,5, 2,2, 2,5 раза – для p53<sup>+</sup>). Таким чином, на відміну від контрольних тварин, в яких ішемія–реперфузія мозку значно знизилася сумарну щільність p53<sup>+</sup>-лімфоцитів, у щурів із діабетом кількісно переважало зниження сумарної щільності Vcl-2<sup>+</sup>-тимоцитів. Однак внаслідок тих змін, які

**Таблиця 2. Щільність p53<sup>+</sup>-лімфоцитів (на 1 мм<sup>2</sup>) у тимусі щурів зі стрептозотоніндукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M ± m)**

Група спостереження	Сумарна щільність p53 <sup>+</sup> -клітин	p53 <sup>+</sup> -лімфобла-сти	Лімфоцити		
			p53 <sup>+</sup> -великі	p53 <sup>+</sup> -середні	p53 <sup>+</sup> -малі
Кіркова зона					
Контроль	100±5,88	4,37±0,45	8,20±0,63	35,4±2,50	51,3±3,21
Ішемія–реперфузія	25±1,80*	1,08±0,16*	2,12±0,26*	5,88±0,53*	16±1,25*
Діабет	80±5,45*	4,35±0,54	8,16±0,83	17,1±1,41*	50,0±3,81
Діабет та ішемія–реперфузія	34±2,44**	3,16±0,34**	3,25±0,36**	7,81±0,66**	19,8±1,42**
Медулярна зона					
Контроль	35,6±3,50	0,82±0,24	3,51±0,62	7,92±1,17	23±2,19
Ішемія–реперфузія	54±3,69*	2,78±0,36*	4,13±0,47	13±1,09*	34±2,55*
Діабет	11,7±1,14*	0,26±0,11*	0,24±0,10*	2,67±0,57*	8,51±1,66*
Діабет та ішемія–реперфузія	23±1,76**	1,37±0,28**	1,89±0,36**	5,31±0,75**	14,4±1,85**

виникли під впливом діабету, співвідношення p53<sup>+</sup>/Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцити становило 0,62, тобто не відрізнялося від значень у контрольних тварин. Проте аналіз експресії відповідних білків дає змогу дійти висновку, що істотно пригнічуються апоптотичні процеси, оскільки зменшення експресії білка p53 відбувається в усіх субпопуляціях тимоцитів, а Vcl-2 – лише у великих і малих тимоцитах.

У мозковій зоні тимуса контрольних тварин співвідношення p53<sup>+</sup>/Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцити становило 0,97. У відповідь на ішемію–реперфузію мозку підвищилася сумарна щільність p53<sup>+</sup>-позитивних тимоцитів (в 1,5 раза) внаслідок збільшення щільності лімфобластів, середніх і малих клітин у 3,4, 1,6, 1,5 раза при незмінній щільності Vcl-2<sup>+</sup>

тимоцитів. Серед них на таке втручання відреагували зниженням в 1,4 раза лише середні лімфоцити, що не вплинуло на сумарний показник. Співвідношення p53<sup>+</sup>/Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцити у тварин цієї експериментальної групи становило 1,79, що мало б свідчити на користь посилення апоптозу. Однак аналіз експресії білка Vcl-2 показав її посилення в усіх класах тимоцитів, а білка p53 – тільки в середніх і малих, що до деякої міри нівелює наслідки зростання щільності p53<sup>+</sup>-тимоцитів.

У тварин із цукровим діабетом сумарна щільність p53<sup>+</sup>-позитивних тимоцитів знизилася втричі за рахунок лімфобластів, великих, середніх і малих клітин, щільність яких зменшилася в 3,2, 15, 3,0 та 2,7 раза відповідно. Щільність Vcl-2<sup>+</sup>-позитивних

**Таблиця 3. Вміст білка Vcl у тимоцитах щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M±m)**

Група спостереження	Лімфобласти	Лімфоцити		
		великі	середні	малі
Кіркова зона				
Контроль				
сумарний вміст	2,706±0,015	2,447±0,009	2,095±0,008	1,394±0,009
питомий вміст	0,693±0,011	0,639±0,008	0,591±0,005	0,499±0,003
Ішемія–реперфузія				
сумарний вміст	2,736±0,020	2,503±0,012*	2,149±0,009*	1,391±0,008
питомий вміст	0,723±0,017	0,697±0,010*	0,638±0,006*	0,520±0,003*
Діабет				
сумарний вміст	2,710±0,013	2,476±0,008*	2,102±0,008	1,389±0,007
питомий вміст	0,699±0,009	0,674±0,007*	0,597±0,004	0,503±0,002
Діабет та ішемія–реперфузія				
сумарний вміст	2,728±0,014	2,449±0,011	2,107±0,011	1,364±0,009**
питомий вміст	0,708±0,015	0,644±0,009**	0,591±0,007	0,493±0,002**
Мозкова зона				
Контроль				
сумарний вміст	2,631±0,040	2,407±0,019	2,071±0,016	1,390±0,017
питомий вміст	0,649±0,030	0,611±0,016	0,576±0,010	0,503±0,005
Ішемія–реперфузія				
сумарний вміст	2,778±0,030*	2,461±0,018*	2,148±0,014*	1,390±0,013
питомий вміст	0,713±0,026	0,660±0,017*	0,637±0,010*	0,526±0,004*
Діабет				
сумарний вміст	2,737±0,049	2,422±0,018	2,090±0,013	1,358±0,014
питомий вміст	0,713±0,033	0,640±0,014	0,581±0,007	0,493±0,004
Діабет та ішемія–реперфузія				
сумарний вміст	2,659±0,022	2,427±0,014	2,105±0,014	1,341±0,011
питомий вміст	0,660±0,015	0,618±0,013	0,599±0,009	0,479±0,003**

тимоцитів, як сумарна, так і в межах окремих субпопуляцій, не відрізнялася від такої у тварин контрольної групи, за винятком зниження у 2,5 раза кількості лімфобластів. Отже, як і в кірковій зоні, у мозковій знизилася потужність проапопто-тичного чинника, про що свідчить також співвідношення p53<sup>+</sup>/Vcl-2<sup>+</sup>-лімфоцити, яке становило 0,34. Достовірних змін експресії білків Vcl-2 та p53 не виявлено в жодному класі тимоцитів. Таким чином, у тварин цієї експериментальної групи коливання про/антиапоптотичного потенціалу тимоцитів мозкової зони відбулися внаслідок змін сумарної кількості клітин, здатних до експресії того чи іншого маркера.

Те саме спостерігалось і в мозковій зоні тимуса щурів, яким на тлі діабету моделю-

вали ішемію–реперфузію головного мозку – ступінь експресії білків у тимоцитах практично не змінився (за винятком експресії Vcl-2 у малих тимоцитах), однак щільність усіх класів Vcl-2<sup>+</sup>- та p53<sup>+</sup>-тимоцитів зросла порівняно з групою щурів з діабетом. При цьому сумарна щільність Vcl-2<sup>+</sup>-тимоцитів навіть перевищувала таку в контрольних тварин. У групі тварин із діабетом сумарна щільність p53-лімфоцитів підвищилася вдвічі, а лімфобластів, великих, середніх і малих клітин – у 5,3, 8,2, 2,0, 1,7 раза відповідно. Приріст сумарної щільності Vcl-2<sup>+</sup>-тимоцитів становив 1,4 раза, зокрема, лімфобластів, великих і малих клітин – 5,7, 1,6, 1,5 раза відповідно.

Отже, реакція гена p53 у тимоцитах мозкової зони щурів із цукровим діабетом

**Таблиця 4. Вміст білка p53 у тимоцитах щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M ± m)**

Група спостереження	Лімфобласти	Лімфоцити		
		великі	середні	малі
<b>Кіркова зона</b>				
Контроль				
сумарний вміст	2,688±0,014	2,504±0,011	2,201±0,006	1,471±0,007
питомий вміст	0,670±0,013	0,713±0,010	0,688±0,005	0,567±0,003
Ішемія–реперфузія				
сумарний вміст	2,623±0,025*	2,446±0,015*	2,052±0,011*	1,331±0,010*
питомий вміст	0,582±0,021*	0,642±0,013*	0,568±0,007*	0,472±0,003*
Діабет				
сумарний вміст	2,715±0,016	2,496±0,012	2,143±0,010*	1,385±0,009*
питомий вміст	0,698±0,012	0,698±0,011	0,617±0,006*	0,518±0,003*
Діабет та ішемія–реперфузія				
сумарний вміст	2,710±0,017	2,440±0,015**	2,077±0,013**	1,360±0,010**
питомий вміст	0,636±0,013**	0,634±0,014**	0,574±0,006**	0,479±0,003**
<b>Мозкова зона</b>				
Контроль				
сумарний вміст	2,651±0,053	2,461±0,018	2,077±0,019	1,330±0,015
питомий вміст	0,667±0,047	0,665±0,018	0,567±0,012	0,474±0,005
Ішемія–реперфузія				
сумарний вміст	2,736±0,018	2,487±0,015	2,150±0,010*	1,380±0,010*
питомий вміст	0,735±0,016	0,698±0,013	0,643±0,007*	0,518±0,003*
Діабет				
сумарний вміст	2,627±0,080	2,397±0,064	2,061±0,019	1,375±0,022
питомий вміст	0,600±0,084	0,572±0,044	0,564±0,011	0,481±0,006
Діабет та ішемія–реперфузія				
сумарний вміст	2,644±0,027	2,443±0,024	2,063±0,018	1,349±0,017
питомий вміст	0,629±0,019	0,644±0,022	0,570±0,012	0,474±0,004

на ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку була схожою на таку в контрольних щурів. Водночас, незважаючи на відсутність змін щільності Bcl-2<sup>+</sup>-тимоцитів у відповідь на ішемію–реперфузію головного мозку в контрольних тварин, у щурів із діабетом значення цього показника збільшилося внаслідок чого співвідношення p53<sup>+</sup>/Bcl-2<sup>+</sup>-лімфоцити (0,47), хоча й стало дещо вищим, ніж у тварин із діабетом, залишалось значно нижчим порівняно з контролем. Таким чином, як і в кірковій речовині, зниження активності чинника, що забезпечує апоптоз, може бути ознакою погіршеної селекції тимоцитів і прояву аутоімунного процесу.

## ВИСНОВКИ

1. У кірковій зоні тимуса контрольних тварин після ішемії–реперфузії головного мозку за сумарною оцінкою змін щільності p53<sup>+</sup>- та Bcl-2<sup>+</sup>-тимоцитів і ступеня експресії в них відповідних білків депресія проапоптотичного чинника значно переважає над такою протиапоптотичного. У щурів із чотиримісячним цукровим діабетом виявлено зниження проапоптотичної активності головним чином внаслідок змін співвідношення щільності p53<sup>+</sup>- та Bcl-2<sup>+</sup>-тимоцитів, а у тварин із діабетом, ускладненим ішемією–реперфузією головного мозку – більшою мірою за рахунок змін експресії білків-маркерів апоптозу.

2. У мозковій зоні тимуса контрольних щурів за умов ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку підвищення сумарної щільності p53<sup>+</sup>-тимоцитів (за рахунок усіх досліджених класів клітин) нівелюється посиленням експресії білка Bcl-2 у всіх класах лімфоцитів. Цукровий діабет у цій зоні знижує сумарну щільність і щільність усіх класів p53<sup>+</sup>-тимоцитів, не впливаючи на таку Bcl-2<sup>+</sup>-клітин та експресію обох досліджених маркерів апоптозу. При поєднанні цукрового діабету та ішемії–реперфузії головного мозку підвищується

щільність як p53<sup>+</sup>-, так Bcl-2<sup>+</sup>-тимоцитів (останніх – вище від рівня в контрольних щурів), при відсутності змін експресії відповідних білків.

**А.В. Ткачук**

### ВЛИЯНИЕ СТРЕПТОЗОТОЦИНИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА И НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА НА АПОПТОЗ В ТИМУСЕ КРЫС

Исследовано влияние неполной глобальной ишемии–реперфузии головного мозга на активность про- и антиапоптотических процессов в тимocyтах по интенсивности экспрессии белков p53 и Bcl-2. Показано, что в корковой зоне тимуса крыс с четырехмесячным сахарным диабетом, а также у контрольных крыс и крыс с сахарным диабетом после ишемии–реперфузии головного мозга, в целом, преобладают антиапоптотические процессы. В мозговой зоне железы крыс с диабетом, осложненным и неосложненным ишемией–реперфузией головного мозга, также превалируют антиапоптотические механизмы, однако в меньшей мере, чем в корковой.

Ключевые слова: сахарный диабет, ишемия–реперфузия головного мозга, тимус, апоптоз.

**A.V. Tkachuk**

### EFFECT OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES AND INCOMPLETE GLOBAL BRAIN ISCHEMIA ON APOPTOSIS IN THE RATS THYMUS

The influence of incomplete global ischemia-reperfusion of the brain on the activity of pro- and antiapoptotic processes in the thymocytes by the intensity of p53 and Bcl-2 - proteins expressions has been investigated. It has been shown that in the cortical zone of thymus of rats with a four-month diabetes, as well as in the control rats and rats with diabetes mellitus after brain ischemia, the antiapoptotic processes are dominated. In the medullary zone of the gland in rats with diabetes, complicated and uncomplicated with brain ischemia-reperfusion the antiapoptotic mechanisms predominate too, but to a lesser extent than in the cortical zone.

*Bukovinian State Medical University, Chernivtsi*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бояджян А.С., Аракуелова Э.А., Айвазян В.А., Манукян Л.А. Интерлейкины и хемокины при остром ишемическом инсульте, отягощенном и не отягощенном диабетом // Цитокины и воспаление. – 2008. – 7, № 1. – С. 40–43.

2. Камышный А.М. Влияние экспериментального сахарного диабета на особенности экспрессии иммунной субъединицы протеасомы LPM-2 и проапоптотического белка P53 в тимусе у крыс со спонтанной гипертензией // Запорож. мед. журн. – 2009. – №1 (52). – С. 17–20.
3. Камышный А.М., Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Калиниченко Н.А. Характеристика экспрессии белка Bcl-2 в тимусе у крыс с экспериментальным сахарным диабетом // Клін. анатомія та оперативна хірургія. – 2007. – №1. – С. 68–71.
4. Камышный А.М., Колесник Ю.М., Абрамов А.В. Участие индуцибельной NO-синтазы и белка Bcl-2 в регуляции апоптоза тимоцитов у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом // Патологія. – 2006. – 3, №3. – С.23–26.
5. Константинова Н.А., Скворцова В.И., Еремін І.І., Константинова Е.В., Комаров А.Н. Аутоиммунные механизмы при ишемии // Аллергология и иммунология. – 2005. – 6, №2. – С. 147–149.
6. Сашук М.М., Ткачук С.С. Реорганізація структури лімфоїдної популяції вилочкової залози неповною глобальною ішемією мозку та її корекція емоксипіном в експерименті //Клін. анатомія та оперативна хірургія. – 2006. – 5, №3. – С. 45–51.
7. Скибо Г.Г. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга // Патологія. – 2004. – 1, №1. – С. 22–30.
8. Geenen V., Brilot F. Role of the thymus in the development of tolerance and autoimmunity towards the neuroendocrine system // Ann. N.Y.Acad. Sci. – 2003. – 992. – P. 186–195.
9. Geenen V., Brilot F., Louis C., Hansenne I., Renard Ch., Martens H. Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes // Rev. Med. Liege. – 2005. – 60, № 5–6. – P. 291–295.
10. Horwitz M.S., Ilic A., Fine C., Rodriguez E., Sarvetnick N. Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes // J. Clin. Invest. – 2002. – 109, №1. – P. 79–87.
11. Hughes P., Bouillet P., Strasser A. Role of Bim and other Bcl-2 family members in autoimmune and degenerative diseases // Curr. Dir. Autoimmun. – 2006. – 9. – P. 74–94.
12. Liadis N., Murakami K., Eweida M., Elford A.R., Sheu L., Gaisano H.Y., Hakem R., Ohashi P.S., Woo M. Caspase-3-dependent  $\beta$ -cell apoptosis in the initiation of autoimmune // Diabet. Mellitus Mol. Cell. Biol. – 2005. – 25, №9. – P. 3620–3629.
13. Lin M., Yin N., Murphy B., Medof M.E., Segerer S., Heeger P.S., Schroppe B. Immune Cell-Derived C3 Is Required for Autoimmune Diabetes Induced by Multiple Low Doses of Streptozotocin // Diabetes. – 2010. – 59, №9. – P.2247–2252.
14. Marsden V., Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more // Annu. Rev. Immunol. – 2003. – 21. – P. 71–105.
15. Mic A.A., Mic F.A., Tatu C.A., Ionac M., Ordodi V.L., Paunescu V. Indomethacin inhibits thymic involution in mice with streptozotocin-induced diabetes // Compar. Med. – 2007. – 57, № 5. – P. 476–481.
16. Willis S., Day C., Hinds M., Huang D. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway // J. Cell. Sci. – 2003. – 116. – P. 4053–4056.

Буковин. мед. ун-т, Чернівці  
E-mail: vfmyslickij@rambler.ru

Матеріал надійшов до  
редакції 02.09.2011



В.Я. Березовський, Т.М. Заморська, І.Г. Літовка, Р.В. Янко

## Вплив нормобаричної гіпероксії на показники метаболізму кісткової тканини

*Вивчено вплив модельованої протягом 14 і 28 діб нормобаричної гіпероксії на метаболізм кісткової тканини у 3- і 12-місячних щурів-самців лінії Вістар. Показано, вірогідне зниження вмісту С-термінального пропептиду колагену I типу на 36 %, збільшення концентрації піридиноліну на 37 % і С-термінального телопептиду колагену I типу на 8 % у сироватці крові молодих тварин, які протягом 14 сеансів дихали нормобаричною газовою сумішшю з 90 % O<sub>2</sub>. У дорослих щурів за таких самих умов виявлено вірогідне зниження концентрації піридиноліну в сироватці крові на 27 %, вміст С-термінального пропептиду колагену I типу не змінювався у жодній із досліджуваних груп. Вважаємо, що 14-добова нормобарична гіпероксія (90%) супроводжується порушенням синтезу колагену у молодих щурів. У дорослих тварин не виявлено негативних наслідків впливу обох рівнів нормобаричної гіпероксії на метаболізм кісткової тканини.*

*Ключові слова: нормобарична гіпероксія, С-термінальні пропептиди колагену I типу, С-термінальні телопептиди колагену I типу, піридинолін.*

### ВСТУП

Визначення фізіологічного стану кісткової тканини за допомогою біохімічних показників дає змогу оцінити стан кістки, встановити швидкість обмінних процесів. Важливу інформацію про метаболізм кісткової тканини дають такі показники синтезу, як С-термінальні пропептиди колагену I типу (СІСР) або продукти деградації колагену I типу С-термінальні телопептиди колагену I типу ( $\beta$ -CrossLaps) і піридинолін.

Вивчення компонентів колагену I типу, насамперед пропептидів колагену I типу має певний інтерес, адже він є основним органічним компонентом кісткової тканини і створює передумови для використання СІСР як складової кісткоутворення. Відомо, що зріла молекула колагену I типу включається у склад кісткового матриксу, а СІСР залишаються в екстрацелюлярній рідині. Співвідношення кількості колагену, що відкладається у кістковий матрикс і

СІСР, що надходить у кровообіг, теоретично дорівнює одиниці. Тому за вмістом пропептидів можна говорити про спроможність остеобластів синтезувати колаген I типу.

Дослідження  $\beta$ -CrossLaps у сироватці крові дає змогу оцінити темпи деградації кісткової тканини. Вважають, що вміст С-телопептиду спірального домену у сироватці крові, який визначають імунологічним методом, є показником метаболізму колагену, а не специфічним маркером кісткової резорбції [7].

Піридинолін або гідроксилізілпіридинолін – невідновлюваний поперечнозв'язаний піридин, також є компонентом колагену I типу. Він відіграє значну роль в його стабілізації і надає своєрідність структурі колагену та еластину. Поперекові зв'язки формуються у міжклітинному матриксі після структурної організації молекул колагену. Під час резорбції кісткової тканини, що здійснюється остеокластами та при руйнуванні колагену, можливий вихід піридиноліну в судинне русло.

© В.Я. Березовський, Т.М. Заморська, І.Г. Літовка

Парціальний тиск кисню ( $P_{O_2}$ ) є важливим чинником енергетичного метаболізму та процесів остеогенезу. З 60-х років ХХ сторіччя у дослідженнях *in vivo* та *in vitro* відтворені численні спроби встановити ефекти змін  $P_{O_2}$  на процеси ремоделювання кісткової тканини [3, 5, 7, 9, 10]. Однак отримані дані суперечливі. Це пов'язують з різними умовами проведення експериментів. Більшість досліджень здійснено в умовах гіпербарії, коли  $P_{O_2}$  дорівнював 1 – 3 ата [1, 2, 5]. Відомо також, що само по собі перебування людини чи тварини в умовах підвищеного атмосферного тиску, призводить до суттєвих змін у роботі основних систем і тканин організму. Тому варто визначати як атмосферний тиск, так і  $P_{O_2}$  у середовищі.

Мета нашої роботи – вивчення показників метаболізму кісткової тканини в умовах моделювання двох рівнів нормобаричної гіпероксії на щурах різного віку.

## МЕТОДИКА

Дослідження було проведено на 80 щурах-самцях віком 3 і 12 міс (на початок експерименту). Дослідним тваринам впродовж 14 та 28 діб щоденно по годині подавали нормобаричну гіпероксичну газову суміш (ГГС) із вмістом  $O_2$  40 % ( $P_{O_2} = 304$  мм рт.ст.) і 90 % ( $P_{O_2} = 684$  мм рт.ст.; табл.1). Контрольних щурів кожної вікової групи утримували в умовах віварію протягом такого самого терміну.

У сироватці крові щурів методом імуноферментного аналізу за допомогою стандартних наборів реактивів визначали вміст СІСР («IDS Inc.», США),  $\beta$ -CrossLaps («IDS Inc.», США), піридинолін («Quidel Corporation», США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень показали, що у 3-місячних тварин через 14 сеансів дихання

ГГС із 90 %  $O_2$  вміст СІСР вірогідно знизився на 36 %. Після 28 сеансів спостерігали лише тенденцію до його зниження (рис. 1).

У 12-місячних щурів вміст СІСР у сироватці крові вірогідно не змінювався в жодній із досліджуваних груп тварин.

Отримані нами результати свідчать про відсутність змін концентрації СІСР у сироватці крові молодих і дорослих щурів, які впродовж 14, так і 28 діб дихали нормобаричною ГГС із 40 %  $O_2$ . Це відповідає встановленому для клінічної медицини безпечному рівню концентрації  $O_2$  у газовому середовищі, призначеному для оксигенотерапії. Перебування молодих тварин протягом 14 сеансів за умов більш високого ступеня нормобаричної гіпероксії (90 %) призводить до вірогідних змін концентрації СІСР, що можна вважати ознакою оксидативного стресу. Він супроводжувався зниженням вмісту СІСР на 36 %. Припускаємо, що такі зміни можуть бути наслідком зниження як кількості остеобластів, так і їх спроможності синтезувати колаген I типу в кількостях, потрібних для нормального розвитку кісткової тканини молодих тварин.

Дослідження показників резорбції кісткової тканини показало, що концентрація  $\beta$ -CrossLaps вірогідно збільшувалася відносно контрольних значень у молодих тварин після 14 сеансів дихання ГГС із вмістом  $O_2$  90 % (рис. 2,а). У 3-місячних щурів інших дослідних груп вірогідних відмінностей від контролю не спостерігали.

Дорослі тварини (12 міс) дещо інакше реагували на нормобаричну гіпероксію. У них через 14 сеансів дихання ГГС із вмістом  $O_2$  40 % концентрація  $\beta$ -CrossLaps вірогідно знижувалася (див. рис. 2,б).

Таким чином, визначення вмісту  $\beta$ -CrossLaps у сироватці крові молодих щурів після їх перебування у ГГС із 90 %  $O_2$  протягом 14 сеансів показало підвищення темпів деградації колагену. У дорослих тварин у тих самих умовах (14 і 28 сеансів)

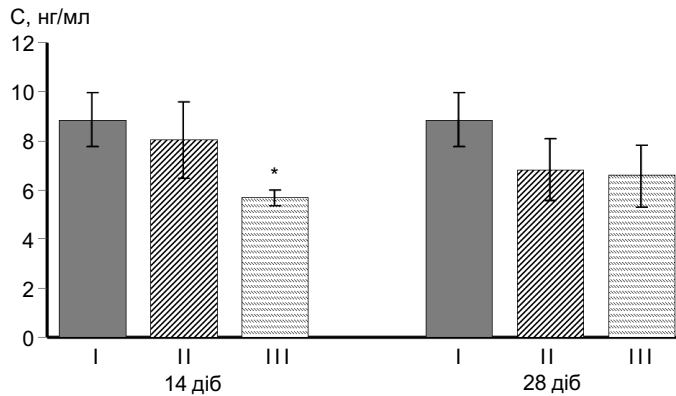


Рис. 1. Зміни концентрації С-термінального пропептиду колагену I типу у сироватці крові 3-місячних контрольних (I) та дослідних (II – 40 % O<sub>2</sub>, III – 90 % O<sub>2</sub>) груп щурів. \*P<0,05 порівняно з контролем

не виникає вірогідних змін показників метаболізму колагену. На наш погляд, така різниця в реакції може відбуватися за рахунок надлишку дози кисню, який отримували тварини протягом експерименту. Якщо прийняти, що в атмосферному повітрі 21 % O<sub>2</sub>, що відповідає 160 мм рт. ст., то за одну годину умовна доза впливу кисню буде  $9,6 \cdot 10^3$  мм рт.ст. · год. У ГГС (40 % O<sub>2</sub> за годину) умовна надлишкова доза кисню становить  $18 \cdot 10^3$  мм рт.ст. · год і зростає майже вдвічі відносно атмосферного повітря. При подальшому підвищенні кисню у ГГС (90 % O<sub>2</sub>) протягом години умовна надлишкова доза кисню стає  $41 \cdot 10^3$  мм рт.ст. · год, що в 4,3 раза вище, ніж при диханні атмосферним повітрям. Саме це призвело до виразних змін у метаболізмі колагену кісткової тканини молодих щурів (табл. 2).

При визначенні концентрації піридиноліну у сироватці крові молодих тварин, які протягом години дихали газовою сумішшю зі вмістом 40 % O<sub>2</sub> як 14, так і 28 сеансів, ми спостерігали лише тенденцію до його підвищення. При перебуванні цих щурів у газовому середовищі з 90 % O<sub>2</sub>

протягом 14 діб вміст піридиноліну у сироватці крові вірогідно підвищувався порівняно з контролем на 37 % (рис. 3,а). Отримані результати односпрямовані з такими стосовно змін концентрації СІСР при цій самій умовній дозі надлишку кисню.

У 12-місячних тварин за умов дихання 90 % кисню протягом 14 сеансів концентрація піридиноліну у сироватці крові вірогідно знизилася порівняно з контрольними значеннями на 27 % (див. рис. 3,б). При диханні газовою сумішшю зі вмістом O<sub>2</sub> 40 % протягом 14 і 28 сеансів у дорослих щурів значення цього показника не змінювалося.

Вірогідне підвищення концентрації піридиноліну у сироватці крові молодих тварин після 14 сеансів дихання газовою сумішшю з вмістом 90 % O<sub>2</sub> свідчить про руйнування колагену і зростання активності остеокластів.

У літературі існують відомості про те, що в експериментах *in vitro* на культурі остеобластів максимальний остеогенез відбувається в газовому середовищі з 35 % O<sub>2</sub>, тобто у стані помірної гіпероксії. Концентрація кисню 95 % спричиняє істотне гальмування остеогенезу та значну втрату

Таблиця 1. Тривалість гіпероксичного впливу та число циклів гіпероксія–оксигенація за 14 і 28 діб

Режим впливу	За 14 діб		За 28 діб	
	Час впливу	Число циклів	Час впливу	Число циклів
40 % O <sub>2</sub>	840	14	1680	28
90 % O <sub>2</sub>	840	14	1680	28

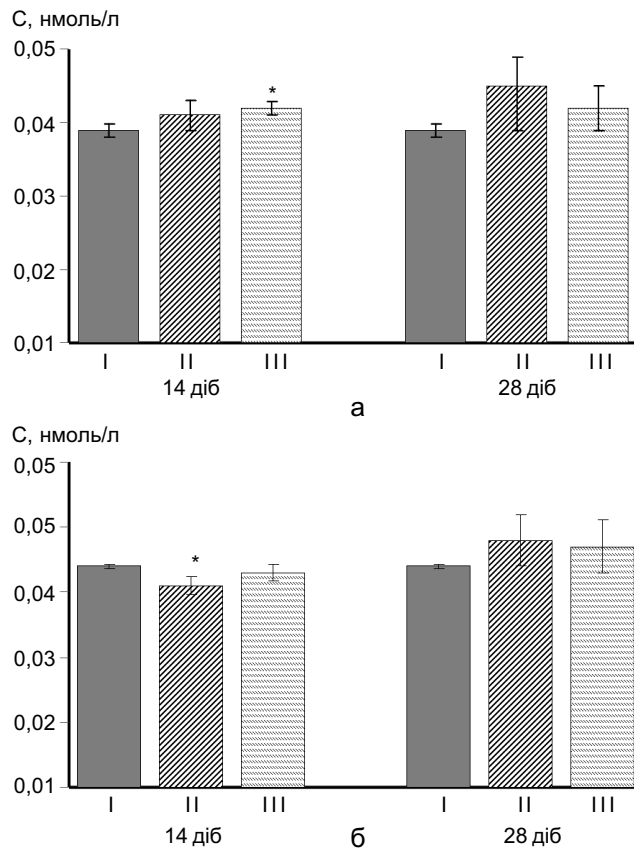


Рис. 2. Зміни концентрації С-термінального телопептиду колагену I типу у сироватці крові 3-місячних (а) і 12-місячних (б) контрольних (I) і дослідних (II – 40 % O<sub>2</sub>, III – 90 % O<sub>2</sub>) груп щурів. \* P<0,05 порівняно з контролем

клітин. Автори дослідження припускають, що такий ефект виникає в наслідок збільшення продукції високотоксичних активних форм O<sub>2</sub>, які викликають оксидативний стрес [9]. Подібні дані отримані іншими дослідниками на культурі клітин гомілки 11-добових ембріонів курчат при інкубації на згустках плазми у п'яти різних газових середовищах із вмістом O<sub>2</sub> – 5, 20, 35, 65 і 95 %. Посилення остеогенезу спостерігали в умовах середовища з 35 % O<sub>2</sub>. Форму-

вання колагенових волокон і активність остеогенезу пригнічувалися за умов зниження O<sub>2</sub> до 5 %. При 95 % O<sub>2</sub> воно відбувалося, але в меншому ступені [8].

На підставі результатів проведених нами експериментів можна зробити висновок, що 40 % O<sub>2</sub> у вдихуваному повітрі по 1 год щоденно не викликає істотних змін досліджених показників синтезу колагену, що відповідає встановленому для клінічної медицини безпечному рівню концентрації

Таблиця 2. Умовна доза кисню у гіпероксичній газовій суміші при різній тривалості дихання

Показники	1 сеанс		14 сеансів		28 сеансів	
	40 %	90 %	40 %	90 %	40 %	90 %
Умовна доза впливу, мм рт.ст. · год гіпероксичної газової суміші	18 · 10 <sup>3</sup>	41 · 10 <sup>3</sup>	252 · 10 <sup>3</sup>	574 · 10 <sup>3</sup>	504 · 10 <sup>3</sup>	1148 · 10 <sup>3</sup>
надлишку кисню	8,4 · 10 <sup>3</sup>	31,4 · 10 <sup>3</sup>	117,6 · 10 <sup>3</sup>	439,6 · 10 <sup>3</sup>	235,2 · 10 <sup>3</sup>	879,2 · 10 <sup>3</sup>

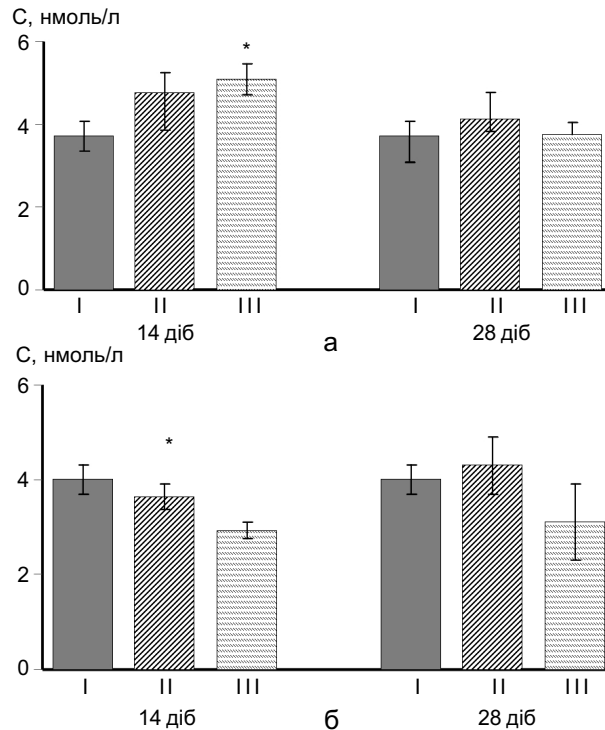


Рис. 3. Зміни концентрації піридиноліну у сироватці крові 3-місячних (а) і 12-місячних (б) контрольних (I) та дослідних (II – 40 % O<sub>2</sub>, III – 90 % O<sub>2</sub>) груп щурів. \* P<0,05 порівняно з контролем

кисню у газовому середовищі. Перебування молодих щурів (3 міс) протягом 14 одиноднинних сеансів в умовах нормобаричної гіпероксії (90 % O<sub>2</sub>) супроводжується вірогідним зниженням СІСР на 36 %, зростанням концентрації піридиноліну на 37 % та концентрації β-CrossLaps на 8 % у сироватці крові. Вважаємо, що 14-добова нормобарична гіпероксія (90%) супроводжується порушенням синтезу колагену у молодих щурів. У дорослих тварин не виявлено негативних наслідків впливу обох рівнів нормобаричної гіпероксії на метаболізм кісткової тканини.

**В.А. Березовский, Т.М. Заморская,  
И.Г. Литовка, Р.В. Янко**

### **ВЛИЯНИЕ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПЕРОКСИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА КОСТНОЙ ТКАНИ**

Изучено влияние нормобарической гипероксии, моделированной в течение 14 и 28 сут, на метаболиты костной ткани у 3- и 12-месячных крыс-самцов линии Вистар.

Показано, достоверное снижение концентрации С-терминального пропептида коллагена I типа на 36 %, увеличение содержания пиридинолина на 37 % и С-терминального телопептида коллагена I типа на 8 % в сыворотке крови молодых животных, которые в течение 14 сеансов дышали нормобарической газовой смесью с 90 % O<sub>2</sub>. У взрослых крыс в тех же условиях выявлено достоверное снижение концентрации пиридинолина в сыворотке крови на 27 %, а содержание С-терминального пропептида коллагена I типа не изменялось ни в одной из исследованных групп животных. Считаем, что 14-суточная нормобарическая гипероксия (90 %) сопровождается нарушением синтеза коллагена костной ткани у молодых крыс. У взрослых животных не обнаружено негативных последствий влияния обеих уровней гипероксии на метаболиты костной ткани.

Ключевые слова: нормобарическая гипероксия, С-терминальные пропептиды коллагена I типа, С-терминальные телопептиды коллагена I типа, пиридинолин.

**V.A. Berezovskiy, T.M. Zamorska, I.G. Litovka,  
R.V. Yanko**

### **NORMOBARIC HYPEROXIA EFFECTS ON THE MARKERS OF BONE METABOLISM**

We studied the influencing of normobaric hyperoxia one hour

daily during 14 and 28 days on the bone metabolism for 3- and 12-monthly Wistar male-rats (n =80). It was shown, that breathed normobaric gas mixture with 90% O<sub>2</sub> during 14 days significant reducing of C-terminal propeptides of type I collagen levels for 36%, an increasing piridinolin levels for 37% and concentration of C-terminal telopeptides of type I collagen for 8% in the blood serum. We found reliable decreasing the concentration of piridinolin levels for 27% in adult rats in the same conditions. The C-terminal propeptides of type I collagen levels did not change in any of the groups' research. We believe that 14 days normobaric hyperoxia (90%) in young animals accompanied by violation of collagen synthesis. The adult rats were more stable and had no changes after influence the two hyperoxia levels.

Key words: normobaric hyperoxia, C-terminal propeptides of type I collagen, C-terminal telopeptides of type I collagen, piridinolin.

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

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гюльназарова С.В., Кучиев А.Ю. Возможности гипербарической оксигенации в коррекции сниженной минеральной плотности кости у больных с несращением переломов // Травматология и ортопедия России. – 2007. – 3, №45. – С. 27–30.
2. Кучиев А.Ю. Применение гипербарической оксигенации при лечении ложных суставов трубчатых костей, осложненных остеопорозом (экспериментально-клиническое исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. Наук. – Новосибирск, 2008. – 26 с.
3. Літовка І.Г. Кісткова тканина в умовах дефіциту навантаження. – К.: ДП “Інформаційно-аналітичне агентство”, 2011. – 243 с.
4. Asher M.A., Sledge C.B. Hyperoxia and in vitro bone resorption // Clin. Orthop. and Rel. Res. – 1968. – 61, №6 – P. 48–51.
5. Goldhaber P. The effect of hyperoxia on bone resorption in tissue culture // Arch. Pathol. – 1958. – 66, №5. – P. 635–641.
6. Gokce S., Bengi O., Akin E., Karacay S., Sagdic D., Kurkcü M., Gokce H. Effects of hyperbaric oxygen during experimental tooth movement // Ang. Orthod. – 2008. – 78, №2. – P.304–308.
7. Gray D.H., Katz J.M., Speak K.S. The effect of varying oxygen tensions on hydroxyproline synthesis in mouse // Clin. Orthop. and Rel. Res. – 1980. – 146, №5 – P.276–281.
8. Hassager C., Jensen L.T., Podenphant J., Thomsen K., Christiansen C. The carboxy-terminal pyridinoline cross-linked telopeptide of type I collagen in serum as a marker of bone resorption: the effect of nandrolone decanoate and hormone replacement therapy // Calc. Tiss. Int. – 1994. – 54, №.1– P.30–33.
9. Joseph L., Shaw M.D., Andrew C.L., Bassett M.D. The effects of varying oxygen concentrations on osteogenesis and embryonic cartilage in vitro // J. Bone and Joint Surg. – 1967. – 49-A, №1. – P.73–80.
10. Tuncay O.C., Ho D., Barker M.K. Oxygen tension regulates osteoblasts function // Amer. J. Orthd. Dent. Orthop. – 1994. – 105, №5. – P. 457–463.

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

*Матеріал надійшов до редакції 29.03.2011*

Л.М. Гуніна

## Вплив сукцинату натрію на еритроцити за окисного стресу при фізичних навантаженнях

*На основі модельних експериментів in vitro із застосуванням сукцинату натрію – основної складової дієтичної добавки “ЯнтарІн-Спорт” – доведено можливість корекції структурно-функціонального стану мембран еритроцитів. Встановлено нормалізацію про- та антиоксидантного балансу еритроцитів зі зростанням вмісту відновленого глутатіону з  $2,34$  до  $3,12 \cdot 10^{-12}$  ммоль  $\cdot$  ер.<sup>-1</sup>, а також зниження їхньої сорбційної здатності (з 35,6 до 27,1 %) та проникності (з 4,61 до 3,98 ум. од). У дослідженнях in vivo із застосуванням “ЯнтарІну-Спорт” підтверджено його позитивний вплив на еритроцитарні характеристики кваліфікованих спортсменів, що є підґрунтям для застосування похідних бурштинової кислоти для попередження спортивної анемії, поліпшення процесів мікроциркуляції та збільшення швидкості кровообігу.*

*Ключові слова: сукцинат натрію, мембрани еритроцитів, окисний стресс, фізичні навантаження, спортивна анемія, дієтична добавка “ЯнтарІн-Спорт”.*

### ВСТУП

Під час аеробної роботи працюючим м'язам спортсмена потрібне адекватне забезпечення їх киснем. Однією з основних складових киснетранспортної функції крові є еритроцити, які саме й здійснюють перенесення кисню за рахунок молекули гемоглобіну. Зрілі еритроцити не здатні синтезувати білки; до того ж, вони втрачають мітохондрії, внаслідок чого не можуть метаболізувати піруват у циклі лимонної кислоти [17]. Тобто більшість метаболічних функцій, що властиві іншим клітинам організму, в зрілих еритроцитах відсутні [13, 20]. Але еритроцити все ж таки є метаболічно активними, і це допомагає їм виживати в кровообігу і виконувати свою основну функцію - транспорт кисню [16]. Для забезпечення адекватного метаболізму еритроцитів дуже важливою є їхня плазматична мембрана, через яку, в основному, відбувається обмін речовин і енергії між червоною клітиною крові та яке її оточує

середовищем [18, 20]. Відповідно, різноманітні зсуви гомеостазу організму призводять до порушень структурно-функціонального стану мембран еритроцитів [5, 15].

За окисного стресу (ОС), який викликано інтенсивними фізичними навантаженнями, в мембрані еритроцитів спостерігається конформація ліпід-білкового бішару з його ущільненням, що призводить до зниження трансмембранної функції та формування так званої “жорсткої” мембрани [2, 13, 21]. Зростання в'язкості цитозолю, особливо в примембранному шарі глікокаліксі, призводить до накопичення у мембрані високотоксичних продуктів обміну речовин, що проявляється змінами форми та розміру еритроцитів, зниженням здатності їх до деформації, появою аномальних за своїми агрегаційними властивостями клітин [23, 27]. Це супроводжується змінами реологічного стану крові, погіршенням мікроциркуляції та уповільненням тканинного кровообігу, що спричинює зниження оксигенації м'язів і функцію-

© Л.М. Гуніна

нальних резервів спортсмена [2, 6, 10]. Структурно-функціональні перебудови еритроцитарної мембрани, викликані ОС при фізичних навантаженнях, призводять й до інших негативних гомеостатичних зрушень, зокрема, до виникнення тимчасової функціональної анемії, яка є однією з важливих причин погіршення працездатності спортсменів [2, 4, 6, 14, 27]. Кінцевою фазою перебудов в еритроциті може стати ериптоз (від англ. eryptosis) – клітинна смерть, яка програмується, та характеризується зменшенням об'єму еритроцитів, мембранним блебінгом, активацією протеаз і виходом фосфатидилсерину на зовнішню мембранну поверхню [7, 20]. Стресорними факторами, що можуть запустити ериптоз, є різкі осмотичні зміни середовища, яке оточує клітини, ОС з виникненням про- та антиоксидантного дисбалансу, зменшення проникності кальційзалежних іонних каналів та виснаження енергетичних ресурсів клітин [18, 19].

Тому пошук шляхів покращання стану еритроцитів і, відповідно, структури та функції їхніх плазматичних мембран, є дуже актуальним для попередження спортивної анемії та в подальшому – ериптозу. Одним з таких напрямків може бути використання речовин, які беруть участь в енергетичному обміні, і тому саме вони є дуже важливими при інтенсивних фізичних навантаженнях [16, 25]. Виходячи з цього, оптимальним було б дослідження зрушень змін стану мембран еритроцитів у спортсменів під впливом метаболітів циклу трикарбонових кислот, який є складовою процесу енергозабезпечення організму, і, в першу чергу, сукцинату (бурштинової кислоти). Саме тому за пропозицією співробітників лабораторії стимуляції працездатності та адаптаційних реакцій у спорті вищих досягнень НДІ НУФВСУ на основі натрієвої солі бурштинової кислоти вітчизняною фірмою ТОВ "СигмаПівдень" була створена дієтична добавка (ДД)

"ЯнтарІн-Спорт" (ЯС) (ТУ У 15.8.-20990275.001-2001), проте її властивості недостатньо досліджені.

Метою нашої роботи було визначення *in vivo* та *in vitro* впливу сукцинату натрію на біохімічні та структурні змін мембран еритроцитів в умовах ОС за інтенсивних фізичних навантажень.

## МЕТОДИКА

Дослідження деяких показників гематологічного гомеостазу, біохімічних характеристик і функціональних властивостей еритроцитарних мембран проведені у 36 веслувальників на байдарках і каное під час тренувань з виконанням роботи аеробного характеру, з яких 20, що приймали ДД, склали основну групу, а решта 16 – контрольну. Середній вік спортсменів становив  $(21,3 \pm 2,4)$  роки. За статтю (чоловіки), ростом, масою, віком, кваліфікацією вибірки спортсменів були репрезентативні. Також для порівняння гематологічні та біохімічні показники проаналізовано у 12 здорових нетренованих осіб (донори) відповідного віку та статі. Для проведення досліджень у спортсменів і донорів в стані спокою натщесерце брали кров з ліктьової вени (5 мл).

У досліджах *in vivo* за допомогою автоматичного гематологічного аналізатора "Erma-PCE 210" ("ERMA INC.", Японія) тестували зміни під впливом ДД ЯС клітинного складу периферичної крові та еритроцитарних характеристик, а саме середньої кількості (МСН, від англ. Mean Corpuscular Hemoglobin) та середньої концентрації (МСНС, від англ. Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) гемоглобіну в еритроциті, середнього об'єму червоних кров'яних тілець (МСV, від англ. Mean Corpuscular Volume) і анізоцитозу як коефіцієнта варіації об'єму еритроцитів.

Для вивчення механізмів впливу різних метаболітів циклу Кребса (у вигляді



натрієвих солей) на мембрани еритроцитів використовували зразки крові спортсменів тільки контрольної групи, які не приймали ДД. Ці 16 зразків крові було відповідно до використаного метаболіту циклу Кребса розподілено на 3 підгрупи (1-ша – 6 зразків, 2-га та 3-тя – по 5 зразків). До зразків крові 1-ї підгрупи додавали сукцинат натрію, 2-ї групи – малат натрію та до 3-ї – цитрат натрію.

Для проведення модельних досліджень з еритроцитами *in vitro* при вивченні впливу метаболітів циклу Кребса на зміни розміру еритроцитів і структурно-функціонального стану мембран червоних клітин зразок крові спортсмена розподіляли порівну. Одну частину застосовували як контроль і не додавали ніяких речовин. Усі досліджені речовини – сукцинат, малат і цитрат натрію – додавали до решти зразка (2,5 мл) свіжезаготовленої стабілізованої гепарином крові до кінцевої концентрації 5 ммоль/л та інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Після інкубації зразків цільної крові спортсменів з метаболітами циклу Кребса досліджували структурно-функціональний стан мембран еритроцитів. Таким чином, ідентичні гематологічні та біохімічні дослідження були проведені зі зразками, крові, яку інкубували з дослідженими речовинами, та з інтактною кров'ю спортсменів. Аналогічні дослідження були проведені також зі зразками крові донорів, за виключенням інкубації з метаболітами циклу Кребса.

Для біохімічних досліджень застосовували суспензію еритроцитів, яку отримували після триразової обробки гіпотонічним розчином натрію хлориду (0,65 %) з наступним центрифугуванням при 3000 хв<sup>-1</sup> протягом 10 хв. Потім осад еритроцитів відмивали від залишків плазми в 155 ммоль/л розчині натрію хлориду і центрифугували ще раз за тих самих умов [11]. У відмитих еритроцитах вивчали інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) за накопи-

ченням ТБК-активних продуктів, вміст яких оцінювали спектрофотометрично за вмістом малонового діальдегіду (МДА) при довжинах хвиль 532 і 580 нм [1]. Антиоксидантну активність еритроцитів тестували за змінами вмісту відновленого глутатіону після інкубації еритроцитарної суспензії з реактивом Елмана, вимірюючи за довжини хвилі 412 нм оптичну густину утвореного продукту реакції (тіонітрофенільні аніони) [7].

Як показники функціонального стану мембран визначали сорбційну здатність еритроцитів за змінами поглинання вітального барвника метиленового синього, а також їхню проникність. Для оцінки цього показника 1 мл суспензії еритроцитів (вміст клітин був  $4 \cdot 10^7$ ) змішували з 3 мл розчину вітального барвника метиленового синього ("Chemapol", Чехія, 0,002 % на ізотонічному розчині натрію хлориду), інкубували 10 хв при кімнатній температурі та центрифугували 10 хв при 3000 хв<sup>-1</sup>. Оптичну густину вихідного розчину та надосадової рідини визначали при довжині хвилі 630 нм в одиницях екстинкції відносно ізотонічного розчину [12]. Проникність еритроцитів досліджували, як описано в праці Михайловича та співавт. [9].

Для характеристики густини глікокалікса еритроцитів визначали його сорбційну ємність змішуванням 1 мл суспензії еритроцитів ( $4 \cdot 10^7$  клітин) з 3 мл розчину барвника альціанового синього ("Bio-Optica", Італія, 0,005 % на ізотонічному розчині натрію хлориду). Суміш інкубували при 18–21 °С і центрифугували протягом 10 хв при 1000 хв<sup>-1</sup>. Вимірювали концентрацію барвника в надосадовій рідині при  $\lambda = 617$  нм, використовуючи як контроль ізотонічний розчин [11].

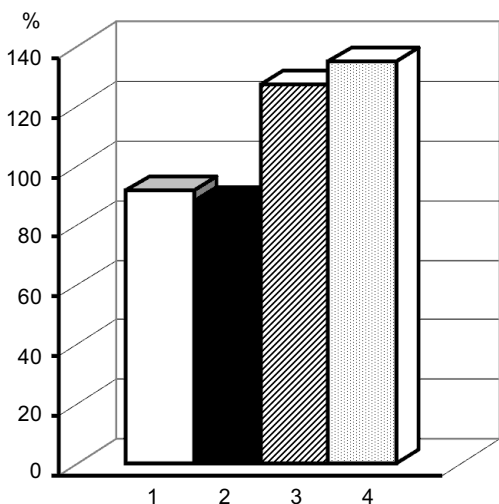
Отримані результати обробляли статистично з використанням прикладного пакету програм Excel 97 і ліцензованої програми GraphPad InStat. Для оцінки достовірності різниці застосовували критерій t Стьюдента. Малі вибірки аналізували із застосу-

ванням непараметричного критерію Вілкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У гематологічних дослідженнях *in vivo* було показано, що існують достовірні відмінності між середнім об'ємом еритроцитів і ступенем їхнього анізоцитозу в здорових нетренованих осіб і кваліфікованих спортсменів (рисунок). Інтенсивні фізичні навантаження призводять до зменшення MCV і, відповідно, до підвищення анізоцитозу. Це пояснюється змінами про- та антиоксидантного балансу в мембранах еритроцитів внаслідок хронічного ОС при фізичних навантаженнях [2, 4, 23, 26, 27] та, на нашу думку, на першому етапі є проявом пристосувальних реакцій з боку системи червоних кров'яних тілець.

Водночас результати гематологічного аналізу свідчать, що у спортсменів курсове застосування ДД ЯС протягом 21 доби на фоні інтенсивних фізичних навантажень призводить до певних позитивних змін як клітинного складу крові, так й еритроцитарних індексів, зокрема MCH, MCHC,



Вплив аеробної роботи на розмір еритроцитів у відсотках щодо значень у донорів: 1, 2 – середній об'єм еритроцитів *in vivo* та *in vitro* відповідно, 3, 4 – анізоцитоз *in vivo* та *in vitro* відповідно

MCV, порівняно зі значеннями у спортсменів контрольної групи та референтними значеннями для веслувальників (табл. 1).

Встановлене під впливом ЯС зниження MCV є особливо важливим для процесів мікроциркуляції та, відповідно, швидкості кровообігу, оскільки макроцити (клітини з великим об'ємом) здатні уповільнювати швидкість потоку крові [29]. Достовірні зміни вмісту еритроцитів, які свідчать про прискорення еритропоезу під час фізичних навантажень, також вказують на позитивний вплив ЯС на гематологічний гомеостаз.

У модельному експерименті *in vitro* було встановлено, що у спортсменів, порівняно з донорами, середній об'єм еритроцитів знижується, хоча й не суттєво; при цьому анізоцитоз збільшується, тобто в загальному пулі з'являються клітини різного, як більшого, так і меншого, за нормальні, розміру (див. рисунок). При інкубації стабілізованої крові спортсменів з метаболітами циклу Кребса встановлено, що найбільшу дію на розмір еритроцитів має сукцинат натрію (табл. 2). Анізоцитоз знижується залежно від інкубаційного середовища: більш істотні зміни, порівняно з контролем, відбуваються при інкубації з сукцинатом натрію, а мінімальні – з цитратом натрію. Це збігається з даними відносно усереднення об'єму еритроцитів під впливом ДД на основі сукцинату натрію, що цілком логічно призведе до покращення їх просування по мікросудинам, і, відповідно, – киснетранспортної функції крові [28].

Результати модельного експерименту свідчать, що регулярні фізичні навантаження аеробного характеру призводять до активації процесів ПОЛ у мембранах еритроцитів (вміст МДА зростає на 25,4 %) з одночасним компенсаторним підвищенням вмісту відновленого глутатіону (табл. 3). Накопичення продуктів ПОЛ в еритроцитах призводить до змін їхньої проникності, сорбційної здатності та сорбційної ємності глікокалікса, тобто

**Таблиця 1. Зміни показників гематологічного гомеостазу та еритроцитарних характеристик у спортсменів за дії дієтичної добавки “ЯнтарІн-Спорт” (M±m)**

Показники	Групи спортсменів		Референтні значення
	контрольна	основна	
Вміст еритроцитів, $10^{12} \cdot \text{л}^{-1}$	4,76±0,22	5,47±0,14*	3,86-5,03
Вміст гемоглобіну, $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$	141,8±7,5	159,7±6,5	124,8-167,13
Гематокрит, %	34,7±3,6	41,8±4,2	38-50
Середній об'єм еритроцитів, фл	88,5±4,8	74,7±3,1*	79-88
Середня кількість гемоглобіну в еритроциті, пг	35,4±0,6	40,8±0,4*	24-32
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, $\text{г} \cdot \text{дл}^{-1}$	27,4±2,1	34,6±1,7*	30-38
Анізоцитоз, %	17,82±0,24	14,3±0,12*	до 14

\*P<0,05 порівняно зі значеннями у спортсменів контрольної групи

функціональних характеристик мембран. Це підтверджують отримані раніше нами та іншими дослідниками дані, які говорять, що за ОС при інтенсивних фізичних навантаженнях деформується мембрана еритроцитів і змінюються її властивості [4, 6, 30, 31].

Під впливом досліджених метаболітів циклу Кребса – сукцинату і малату натрію, але не цитрату, достовірно знижується інтенсивність ПОЛ в еритроцитах та їхня проникність відносно вихідного рівня аналогічних показників у спортсменів (див.

**Таблиця 2. Вплив метаболітів циклу Кребса на розмір еритроцитів в модельному експерименті (M±m)**

Умови дослідження	Середній об'єм еритроцитів, фл	Анізоцитоз, %
1-ша підгрупа (додавання сукцинату натрію)	71,91±1,04	13,01±0,27
2-га підгрупа (додавання малату натрію)	74,86±1,21*	15,34±0,28*
3-тя підгрупа (додавання цитрату натрію)	74,26±1,17*	16,66±0,31*

\*P<0,015 порівняно зі значеннями у 1-й підгрупі.

табл. 3). Причому ці зміни найбільш виражені при інкубації еритроцитарної суспензії з сукцинатом натрію.

Існують дані відносно протекторної дії

сукцинату і малату натрію на мембрани мітохондрій за інтенсивних фізичних навантажень [25]. Такий вплив може бути пояснений енергізацією мітохондріальних

**Таблиця 3. Вплив метаболітів циклу Кребса на біохімічні показники і параметри структурно-функціонального стану мембран еритроцитів в модельному експерименті (M±m)**

Показники	Донори	Контроль	Спортсмени		
			1-ша підгрупа (додавання сукцинату натрію)	2-га підгрупа (додавання малату натрію)	3-тя підгрупа (додавання цитрату натрію)
Малоновий діальдегід, $\text{нмоль} \cdot 10^6 \text{ер.}$	3,67±0,10	4,61±0,15*	3,98±0,06**	4,21±0,08**	4,58±0,09*
Відновлений глутатіон, $10^{-12} \text{ммоль} \cdot \text{ер.}^{-1}$	1,65±0,10	2,34±0,12*	3,12±0,09**	2,28±,12*	2,31±0,16*
Сорбційна здатність еритроцитів, %	21,6±2,4	35,6±1,2*	27,1±1,7**	31,6±1,1*	33,2±1,6*
Проникність мембрани еритроцитів, ум. од.	3,67±0,10	4,61±0,15*	3,98±0,06**	4,21±0,08**	4,58±0,09*
Сорбційна ємність глікокалікса, $\text{пг} \cdot \text{ер.}^{-1}$	1,82±0,12	3,11±0,09*	1,96±0,07**	2,78±0,05**	3,12±0,08*

\*P<0,01 порівняно з еритроцитами донорів; \*\*P<0,05 порівняно з контролем.

мембран внаслідок утилізації цих метаболітів у циклі трикарбонових кислот [8, 31]. Підвищення енергетичного балансу клітин у цілому опосередковано впливає на інші мембранні структури, про що свідчить зменшення гіперферментемії [24, 27]. Умови нашого експерименту з відмитими еритроцитами спортсменів виключають такий механізм дії досліджуваних метаболітів, оскільки в цих клітинах відсутній цикл Кребса.

Відомо, що жорсткість мембран еритроцитів і порушення їхнього розміру та форми значною мірою залежить від виснаження в них запасів АТФ [5, 13, 22]. Можна припустити, що в організмі спортсменів при активізації енергетичного обміну під час фізичних навантажень саме через накопичення внутрішньоклітинного АТФ здійснюється вплив на функціональний стан мембран еритроцитів і, відповідно, на зміни рівня анізоцитозу внаслідок зростання кількості дискоїдів-нормоцитів, що не суперечить даним літератури, отриманим за інших умов дослідження, наприклад при серпоподібноклітинній анемії [17, 28]. Але, враховуючи, що наше дослідження було проведено на попередньо відмитих еритроцитах, слід думати й про інші шляхи впливу ЯС на еритроцитарну мембрану. До речі, отримані результати не можна пояснити опосередкованою дією метаболітів через інші формені елементи крові, тому що умови дослідження це теж виключають. Тому, певно, їх слід розглядати як наслідок безпосередньої дії вивчених метаболітів на ізольовані еритроцити за умов хронічного ОС. Результати дослідження свідчать про прямий стабілізуючий вплив сукцинату і, меншою мірою, малату натрію, на еритроцитарну мембрану, що відображується зрушенням про- та антиоксидантного балансу (тобто змінами вмісту МДА і відновленого глутатіону), а також сорбційної здатності та проникності еритроцитів, зменшенням їхнього анізоцитозу тощо. Найбільш активним серед досліджених

метаболітів циклу Кребса в цьому відношенні є сукцинат.

Результати нашої роботи підтверджують зміни стану мембран еритроцитів, виявлені нами раніше за хронічного ОС при злоякісних новоутвореннях [3]. Слід відмітити, що встановлені мембраностабілізуювальні властивості сукцинату натрію відносно еритроцитів спортсменів за ОС при інтенсивній аеробній роботі подібні до змін, що викликає й ОС іншого генезу, наприклад, при опроміненні [8].

Щодо механізму дії ЯС і, відповідно, сукцинату натрію (і, можливо, малату натрію), то одержані нами у спортсменів результати узгоджуються з висунутою у праці [3] гіпотезою про утворення полярних ковалентних зв'язків між негативнозарядженими карбоксилатами дикарбонової кислоти і позитивно зарядженими атомами азоту суміжних гідрофільних головок фосфоліпідів плазматичної мембрани. Утворені таким чином "скобки" сприяють стабілізації мембрани. Геометрія молекулярної структури сукцинату натрію (основної складової ЯС) і фосфоліпідів мембрани не суперечить можливості утворення таких надмолекулярних комплексів.

Існують й інші механізми впливу вивчених метаболітів на мембрану еритроцитів у спортсменів. Гальмування накопичення МДА в нашому дослідженні свідчить про зниження активності ПОЛ, що корелює з упорядкуванням подвійного ліпідного шару в мембранах і призводить до нормалізації їхнього функціонального стану [21, 29]. Раніше також було встановлено, що сукцинат та його похідні здатні інгібувати ПОЛ [24, 31]. Можливо, що отримані нами результати можуть бути пояснені зв'язком, що виникає між молекулами сукцинату та фосфатидилсеринів, які за гіпероксидзації з'являються на зовнішній поверхні клітинної мембрани [20], та стабілізують її. Це має відношення до попередження еритроцитозу, який може виникати у спортсменів за понадінтенсивних і тривалих фізичних навантажень

та зумовлений тим, що за виразного ОС АТФ-залежні фліпази, що у фізіологічних умовах переносять фосфатидилсерини на цитозольний бік мембрани, перестають функціонувати [13].

Відомо, що у спортсменів під час інтенсивних фізичних навантажень поліпшення структурно-функціонального стану мембран еритроцитів сприяє підвищенню їх осморезистентності та здатності до деформування, збільшенню стійкості до ОС і протидіє розвитку спортивної анемії, яка є характерною для навантажень під час тренувань і змагань, покращує агрегаційні властивості еритроцитів, прискорюючи швидкість кровообігу [2, 4, 22]. Усі вищезазначені зміни структурно-функціонального стану мембран еритроцитів позитивно впливають на показники фізичної працездатності [21, 25, 29, 31].

Таким чином, отримані в нашому дослідженні *in vitro* та *in vivo* результати висвітлюють один з можливих тонких механізмів стабілізуючого впливу метаболітів циклу Кребса на мембрани еритроцитів. Тому вони є підґрунтям доцільності застосування сукцинату натрію і засобів на його основі (ДД ЯС, Янтавіт, Енерліт, Метавіт; лікарських препаратів мексидол, мексикор, лимонтар тощо) у складі схем фармакологічної підтримки тренувального процесу для попередження розвитку негативних явищ, пов'язаних з виникненням спортивної анемії та наступного еритроцитозу, зростанням агрегації еритроцитів, уповільненням транспорту кисню та, відповідно, погіршенням фізичної працездатності спортсменів.

Л.М.Гуніна

### **ВЛИЯНИЕ СУКЦИНАТА НАТРИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ ПРИ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ, ОБУСЛОВЛЕННОМ ФИЗИЧЕСКИМИ НАГРУЗКАМИ**

На основе модельных экспериментов *in vitro* с применением сукцината натрия – основной составляющей диетической добавки “ЯнтарИн-Спорт” – доказана возможность

коррекции структурно-функционального состояния мембран эритроцитов. Установлена нормализация прооксидантно-антиоксидантного баланса отмывтых эритроцитов с накоплением в них восстановленного глутатиона (с 2,34 до  $3,12 \cdot 10^{-12}$  ммоль  $\cdot$  эр.<sup>-1</sup>), а также снижение их сорбционной способности (с 35,6 до 27,1 %) и проницаемости (с 4,61 до 3,98 усл. ед.). В исследованиях *in vivo* подтверждено позитивное влияние сукцината натрия на эритроцитарные характеристики у квалифицированных спортсменов, что является основанием для применения производных янтарной кислоты с целью предупреждения спортивной анемии, улучшения процессов микроциркуляции и увеличения скорости кровотока.

Ключевые слова: сукцинат натрия, мембраны эритроцитов, оксидативный стресс, физические нагрузки, спортивная анемия, диетическая добавка “ЯнтарИн-Спорт”.

L.M. Gunina

### **AN INFLUENCE OF SODIUM SUCCINATE ON ERYTHROCYTES AT OXIDATIVE STRESS UNDER PHYSICAL LOADING**

On the basis of model experiments *in vitro* with application of sodium succinate which is the basic constituent of dietary supplementation “YantarIn-Sport”, possibility of correction of the structurally-functional state of red blood cell membranes is well-proven. It is show that prooxidative-antioxidative balance in washed erythrocytes is normalized with the accumulation of recovered glutathione from 2,34 to  $3,12 \cdot 10^{-12}$  mM in one erythrocyte, and their sorption ability (from 35,6 to 27,1 % as well as red blood cells permeability (from 4,61 to 3,98 conditional units) are decreased. *In vivo* research the positive influence of sodium succinate on descriptions of red blood cells of skilled sportsmen is confirmed, that is founding for application of succinic acid derivatives with the purpose of sporting anaemia' warning as well as improvement of microcirculation processes and increase of speed blood flow.

Key words: sodium succinate, erythrocyte membranes, oxidative stress, physical loading, sporting anaemia, dietary supplement “YantarIn-Sport”.

*Science Institute of National University of Physical Education and Sport of Ukraine, Kyiv*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Банкова В.В., Прищепова Н.Ф., Авратинский О.И. Способ оценки патологических изменений плазматической мембраны у детей при различных заболеваниях // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1987. – №3. – С.78–81.
2. Гунина Л.М., Гуменюк Р.С., Парфенюк Н.С., Конончук Е.Н. Влияние коррекции гематологических показателей на физическую работоспособность спортсменов // Спорт. медицина. – 2009. – № 1-2. – С.11–16.

3. Гуніна Л.М., Малюк В.І., Войціцька Т.В. Вплив метаболітів циклу трикарбонових кислот на структурно-функціональний стан мембран еритроцитів у хворих на рак шлунка // Проблеми екол. та мед.генетики і клін. імунології: Зб. наук. праць. – К.-Луганськ-Харків. – 2001. – Вип. 4 (36). – С.109–117.
4. Гуніна Л.М., Олійник С.А., Іванов С.В. Зміни показників крові та прооксидантно-антиоксидантного балансу в мембранах еритроцитів при інтенсивному фізичному навантаженні // Мед. хімія. – 2007. – 9, № 1. – С.91–97.
5. Гуніна Л.М., Орел В.Є., Савоста А.В., Тимченко А.С. Поверхнева архітектоніка цитоскелету еритроцитів у нормі та при метаболічних зрушеннях в організмі // Укр. журн. гематології та трансфузіології. – 2008. – № 2. – С.5-13.
6. Гуніна Л.М. Роль профілактики та корекції функціональної анемії у підвищенні фізичної працездатності спортсменів // Фізіол. журн. – 2007. – 53, № 4. – С. 91–97.
7. Зайцев В.Г., Закревский В.И., Давыдов А.И. Уровень гипергликемии у больных сахарным диабетом // Клін. лаб. діагностика. – 1999. – № 11. – С.32-33.
8. Малюк В.И. Малые дозы ионизирующих излучений: фармакологические подходы к профилактике и коррекции. - В кн.: Медицинские последствия аварии на Чернобыльской атомной станции. – Ч. 3 / Под ред. М.И. Руднева. – К.: Наук. думка, 1999. – С. 192–198.
9. Михайлович В.А., Марусанов В.Е., Бичун А.Б. Проницаемость эритроцитарной мембраны и ее сорбционная способность - оптимальные критерии тяжести эндогенной интоксикации // Анестезиология и реаниматология. – 1993. – № 5. – С.66–69.
10. Новиков В.С., Шустов Е.Б., Горанчук В.В. Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях. – С.-Птб: Наука, 1998. – С. 383–393.
11. Семко Г.А. Структурно-функциональные изменения мембран и внешних примембранных слоев эритроцитов при гиперэпидермопозе // Укр. биохим. журн. – 1998. – 70, №3. – С.113–118.
12. Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В. Способ диагностики эндогенной интоксикации // Лаб. дело. – 1988. – №9. – С.22–24.
13. Bordbar A., Jamshidi N., Palsson B.O. A proteomically derived knowledge-base of erythrocyte metabolism that can be used to simulate its physiological and pathophysiological states // BMC Syst. Biol. – 2011. – 5, № 1. – P. 110–118.
14. Erslev A.I. March hemoglobinuria, sports anemia and other space anemia. – Williams hematology. VI Edition / Eds. Beutler E. – Washington: McGraw-Hill, 2001. – P. 627-628.
15. Gunina L.M., Oliynyk S.A. The effect of Rithmocer on the state of erythrocyte membranes and athlete's adaptation to intensive training loads // Abstr. of the I-th Baltic conf. in exercise and sports sciences and the I-th Baltic conference of young scientists in exercise and sports sciences, 7-10 May 2008, Tartu, Estonia / Eds. T. Jürimäe, M. Pääsuke, J. Jürimäe // Acta Kinesiol. Univ. Tartuensis. – 2008. – 13 (Suppl.). – P. 100–101.
16. Koivunen P., Hirsild M., Remes A.M. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF // J. Biol. Chem. – 2007. – 282, № 7. – P. 4524–4532.
17. Lang K.S., Roll B., Myssina S., Schittenhelm M. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency // Cell Physiol. Biochem. – 2002. – № 12. – P. 365–372.
18. Lang K. S. , Duranton C., Poehlmann H., Myssina S. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes // Cell Death and Differentiation. – 2003. – № 10. – P. 249–256.
19. Lang K.S., Myssina S., Brand V. Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes // Cell Death Differ. – 2004. – № 11. – P. 231–243.
20. Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. Modulation of Erythrocyte Membrane Mechanical Function by Protein 4.1 Phosphorylation // J. Biol. Chem. – 2005. – 280, № 4. – P. 7581–7587.
21. Mastaloudis A., Morrow J.D., Hopkins D.W. et al. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners // Free Rad. Biol. and Med. – 2004. – 36, Issue 10. – P. 1329–1341.
22. Mikhalyov I., Samsonov A. Lipid raft detecting in membranes of live erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – 1808, № 7. – P. 1930–1939.
23. Miller M.W., Miller M.W., Battaglia L.F. Biological and environmental factors affecting ultrasound-induced haemolysis in vitro: 3. Antioxidant (Trolox®) inclusion // Ultrasound Med. and Biol. – 2003. – 29, Issue 1. – P. 103–112.
24. Nguyen E., Picklo M.J. Inhibition of succinic semialdehyde dehydrogenase activity by alkenal products of lipid peroxidation // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – 1637, № 1. – P. 107–112.
25. Repetskaya A.G., Malyuk V.I. Sodium succinate stretches in the rat mitochondrial membrane on intensive training load in experiment // J. Int. Fed. Med. Biol. Engineering. – 2007. – 45. – P. 119–123.
26. Rojas C., Cadenas S., Lypez-Torres M. Increase in heart glutathione redox ratio and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs // Free Rad. Biol. and Med. – 1996. – 21, Issue 7. – P. 907–915.
27. Satoshi S., Kiyoji T., Hiroyo K., Fumio N. Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation // Int. J.

- Biochem. – 2009. – **45**, Issue 8. – P.835–838.
28. Schwarz S., Haest C.W., Deuticke B. Extensive electroporation abolishes experimentally induced shape transformations of erythrocytes: a consequence of phospholipid symmetrization? // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – **1421**, № 2. – P. 361-379.
29. Senturk U.K., Yalcin O., Gunduz F. et al. Effect of antioxidant vitamin treatment on the time course of hematological and hemorheological alterations after an exhausting exercise episode in human subjects // J. Appl. Physiol. – 2005. – **98**. – P. 1272–1279.
30. Stouns R., Redisson D.J., Ninessi A. Red Blood Cell Indices: Implications for Practice: Erythrocyte Structure and Function // Blood. – 2009. – **114**, № 21. – P. 431–442.
31. Vengerovski- A.I., Khazanov V.A. Effects of silymarin and its combination with succinic acid on brain bioenergetics in rats with experimental inhibition of beta-oxidation of fatty acids // Eksp. Klin. Farmakol. – 2007. – **70**, № 2. – P. 51–55.

*НДІ Нац. ун-ту фіз. виховання і спорту України, Київ*  
*E-mail: gunina-sport@yandex.ru*

*Матеріал надійшов до редакції 30.05.2011*

А.М. Манько, Т.В. Берегова, К.С. Непорада, Д.С.Янковський

## Вплив мультипробіотика симбітеру ацидофільного на патологічні зміни у кістковій тканині пародонта при гіпоацидності

*На моделі омепразоліндукованого гіпоацидитету обґрунтовано експериментальну корекцію патологічних змін у кістковій тканині пародонта мультипробіотиком симбітером. Доведено, що його використання в умовах тривалої гіпоацидності шлункового соку сприяє попередженню катаболізму колагенових і неколагенових білків органічного матриксу кісток нижніх щелеп і нормалізації NO-ергічної системи.*

*Ключові слова: пародонт, омепразол, гіпоацидність, протеоглікани, глікопротеїди, оксипролін, NO-ергічна система, симбітер ацидофільний.*

### ВСТУП

Кислотозалежні захворювання верхніх відділів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) займають лідируючі позиції в структурі гастроентерологічної патології та зустрічаються в усіх вікових категоріях населення. Їх поширеність із кожним роком зростає, зокрема в нашій країні. У терапії виразкової хвороби, функціональної диспепсії, гастроєзофагальної рефлюксної хвороби широко застосовують інгібітори протонної помпи (ІПП), наприклад омепразол, лансопрозол. Наслідком тривалого застосування таких препаратів є розвиток гіпоацидитету, що призводить до дисбіозу мікробіоти ШКТ, у тому числі ротової порожнини [16].

Для корекції дисбіозу ротової порожнини при тривалому застосуванні омепразолу в комплексному лікуванні кислотозалежних захворювань органів системи травлення ми застосовували пробіотик, який не тільки коригує порушення мікроекології ШКТ, а й позитивно впливає на імунну та ендокринні системи організму [11].

Мультипробіотик останнього покоління симбітер ацидофільний являє собою мутуа-

лістичний симбіоз 14 штамів пробіотичних бактерій (біфідобактерій, лактобацил, лактококів та пропіоновокислих бактерій) з високою концентрацією життєдіяльних клітин, має важливі фізіологічні та пробіотичні властивості. Він не потребує додаткової активації, а починає проявляти свою дію одразу з ротової порожнини, оскільки це жива біомаса клітин, а не ліофілізат, в якому мікроорганізми знаходяться в анабіозі. Згідно з сучасним уявленням, механізм позитивної дії пробіотика зоснований на багатоманітності властивостей індигенної мікрофлори та передбачає його здатність активно пригнічувати життєдіяльність патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, укріплювати бар'єрну функцію слизових оболонок, активувати природну мікробіоту, позитивно впливати на її метаболічну активність, стимулювати імунну систему, брати участь у покращенні травної функції, проявляти антагоністичну, антитоксичну, антимуtagenну та антиоксидантну дію [3].

Метою нашого дослідження було вивчення впливу мультипробіотика симбітеру ацидофільного на кісткову тканину пародонта за умов довготривалого введення омепразолу.

© А.М. Манько, Т.В. Берегова, К.С. Непорада, Д.С.Янковський



## МЕТОДИКА

Досліди виконані на щурах-самцях (71 тварина) лінії Вістар масою 180–250 г з дотриманням рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень згідно з Європейською конвенцією. Тваринам протягом 7, 14, 21 та 28 діб внутрішньоочередово вводили омепразол (“Sigma”, США) в дозі 14 мг/кг і мультипробіотик симбітер ацидофільний (“О.Д. Пролісок”, Україна), який вводили перорально в дозі 0,14 мл/кг окремо та в поєднанні. Контрольним тваринам упродовж цього часу вводили 0,2 мл води для ін’єкцій. Евтаназію тварин здійснювали під уретановим наркозом через кровопускання. Об’єктами дослідження були кісткова тканина пародонта, в гомогенаті якої визначали вміст вільного оксипроліну [8], фукози [10], глікозаміногліканів (ГАГ) [9], активність NO-синтази (NOS, КФ: 1.14.13.39) [14], вміст нітрит-аніонів [14] і кров тварин. Після завершення експерименту визначали концентрацію гастрину в плазмі крові радіоімунологічним методом із використанням аналітичного набору фірми “MP Biomedicals, LLC” (США). Отримані результати проаналізовані із використанням методів варіаційної статистики.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами встановлено, що вміст гастрину в плазмі крові щурів контрольної групи на 28-му добу експерименту становив 59,0 пг/мл  $\pm$  35,5 пг/мл, у дослідних тварин – 170,7 пг/мл  $\pm$  90,7 пг/мл. Отже, за умов тривалого введення ІПП спостерігається гіпергастринемія, яка є наслідком розвитку гіпоацидності шлункового соку.

Оксид азоту є важливим регулятором внутрішньо- та міжклітинних процесів у живих організмах [13]. Для дослідження NO-ергічної системи тканин пародонта щурів за умов омепразол-індукованої гіпергастринемії визначали активність NOS та вміст  $\text{NO}_2^-$ , який є кінцевим продуктом

обміну NO. Під впливом імуногенних і прозапальних стимулів (ендотоксини, бактеріальні ліпополісахариди (ЛПС) тощо активується експресія гена, що відповідає за синтез індукцибельної NO-синтази – концентрація NO, збільшена в тисячу разів виявляє сильну пошкоджувальну дію на патогенні мікроорганізми, здійснюючи захисну функцію в організмі людини [4]. ЛПС мають виражений пірогенний ефект, у великих дозах викликають некроз тканин макроорганізму та сильну інтоксикацію [12].

Для вивчення експериментальної ефективності використання пробіотиків, щоб відновити нормальну мікрофлору ротової порожнини за умов тривалого застосування омепразолу було обрано мультипробіотик симбітер ацидофільний, основною відмінністю якого від бактеріотерапевтичних засобів попередніх поколінь є наближення його складу та властивостей до природних мікробіоценозів відкритих біологічних систем людини і тварин, які відрізняються полікомпонентністю, широким спектром біологічних активностей та мутуалістичними міжпопуляційними відносинами [2].

Аналізуючи NO-ергічну систему твердих тканин пародонта прослідковується тенденція до зростання активності NOS та вмісту  $\text{NO}_2^-$  на 7-му та 28-му добу експерименту у щурів з корекцією порівняно зі щурами без корекції. На 7-му добу введення омепразолу активність NOS знижується у 2,52 раза ( $P < 0,05$ ) в кістковій тканині пародонта щурів порівняно з контролем, що призводить до вазоконстрикції. При 28-добовому введенні симбітеру ацидофільного активність NOS підвищується в 1,23 раза в кістковій тканині пародонта, а вміст нітритів – у 1,58 раза порівняно зі тваринами, яким протягом цього часу вводили лише ІПП (табл. 1). Це свідчить про нормалізацію кровотоку та місцевих регуляторних процесів у кістковій тканині пародонта внаслідок нормалізації NO-ергічної системи при корекції мультипробіотиком.

Застосування ІПП у високих дозах

**Таблиця 1. Активність NO-синтази та вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в твердих тканинах пародонта щурів за умов тривалого використання інгібіторів протонної помпи та корекції симбітером ацидофільним (M±m)**

Групи тварин	Активність NO-синтази, нмоль [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]/г·хв	Вміст NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , ммоль/г
Контроль (n=12)	0,154 ± 0,012	0,058 ± 0,006
Введення омепразолу протягом		
7 діб (n=5)	0,061 ± 0,006*	0,100 ± 0,015
14 діб (n=5)	0,130 ± 0,019	0,112 ± 0,029
21 доби (n=5)	0,265 ± 0,019	0,228 ± 0,055
28 діб (n=17)	0,174 ± 0,018	0,069 ± 0,005
Введення омепразолу та симбітеру протягом		
7 діб (n=5)	0,085 ± 0,024	0,143 ± 0,021
14 діб (n=5)	0,106 ± 0,023	0,102 ± 0,012
21 доби (n=5)	0,162 ± 0,028	0,222 ± 0,034*
28 діб (n=8)	0,181 ± 0,024	0,144 ± 0,015
Введення симбітеру протягом 28 діб (n=4)	0,217 ± 0,033**	0,109 ± 0,020**

Примітка. Тут і в табл. 2 \* P<0,05 порівняно з контролем, \*\* P<0,05 порівняно з тваринами без корекції.

протягом тривалого періоду підвищує ризик переломів стегна. Омепразол не впливає на кількість остеокластів, а сприяє їхній проліферації та активує кислотопродукуючу функцію цих клітин, сприяючи резорбції кісткової тканини [15]. Таким чином, збільшується продукція остеокластами протонів водню, лактату та гідролітичних ферментів, які викликають руйнування органічного матриксу кісткової тканини [7].

Відомо, що в процесах мінералізації кісткової тканини важливу роль відіграє органічний матрикс, 5 % якого становлять неколагенові білки, зокрема глікопротеїни та протеоглікани [5, 6]. Для оцінки змін орга-

нічної фази кісткової тканини пародонта при тривалому гіпоацидитеті досліджували вміст фукози, яка є мономером глікопротеїдів, а також ГАГ – компонентів протеогліканів.

Нами встановлено, що у твердих тканинах пародонта щурів протягом усього періоду досліджень введення омепразолу вміст вільної фукози та ГАГ достовірно збільшувалися порівняно з контролем, найбільше – на 21-шу добу – у 3,41 та в 1,54 раза відповідно (P<0,05). За умов корекції вміст цих речовин достовірно знижувався із максимально вираженою позитивною динамікою на 21-шу добу експерименту. З табл. 2 видно, що у

**Таблиця 2. Вміст глікозаміногліканів (ГАГ) та фукози в твердих тканинах пародонта щурів за умов тривалого використання інгібіторів протонної помпи та корекції симбітером ацидофільним (M±m)**

Групи тварин	Вміст ГАГ, мкмоль/г	Вміст фукози, мкмоль/г
Контроль (n=12)	0,337 ± 0,013	1,136 ± 0,115
Введення омепразолу протягом		
7 діб (n=5)	0,389 ± 0,012*	3,012 ± 0,433*
14 діб (n=5)	0,407 ± 0,014*	3,227 ± 0,567*
21 доби (n=5)	0,519 ± 0,010*	3,873 ± 0,366*
28 діб (n=17)	0,468 ± 0,011*	2,932 ± 0,214*
Введення омепразолу та симбітеру протягом		
7 діб (n=5)	0,317 ± 0,013	1,148 ± 0,366
14 діб (n=5)	0,351 ± 0,010	1,578 ± 0,268
21 доби (n=5)	0,361 ± 0,014**	1,363 ± 0,134**
28 діб (n=8)	0,358 ± 0,020	1,659 ± 0,214
Введення симбітеру протягом 28 діб (n=4)	0,284 ± 0,016*	0,448 ± 0,090*

тканинах пародонта тварин, яким вводили симбітер ацидофільний вміст фукози та ГАГ вірогідно зменшився в 2,54 та 1,19 раза відповідно порівняно зі щурами контрольної групи. Отже, введення щурам цього мультипробиотика за умов омепразоліндукованого гіпоацидитету запобігає деполімеризації фукопротеїдів і протеогліканів в кістковій тканині пародонта.

Контроль (n=12)	3,790 ± 0,150
Введення омепразолу протягом	
7 діб (n=5)	5,734 ± 0,414
14 діб (n=5)	6,231 ± 0,194
21 доби (n=5)	4,834 ± 0,343
28 діб (n=17)	5,303 ± 0,200
Введення омепразолу та симбітеру протягом	
7 діб ( n=5)	4,521 ± 0,131
14 діб ( n=5)	5,551 ± 0,251
21 доби ( n=5)	4,374 ± 0,155
28 діб ( n=8)	4,700 ± 0,182
Введення симбітеру протягом 28 діб ( n=4)	3,171 ± 0,161

При введенні омепразолу у кістковій тканині пародонта спостерігається збільшення вмісту вільного оксипроліну порівняно з контрольною групою тварин: на 14-ту добу в 1,64 раза ( $P < 0,05$ ), на 28-му добу – в 1,4 раза ( $P < 0,05$ ). А у тварин, яким вводили симбітер ацидофільний протягом цього часу він достовірно знизився в 1,67 раза порівняно з щурами без корекції ( $P < 0,05$ ). Гіпоацидитет сприяє активації колагенолізу нижньощелепних кісток пародонта, який позитивно коригується застосуванням мультипробиотика симбітеру ацидофільного.

Таким чином, експериментальна ефективність пробіотикотерапії за умов тривалого гіпоацидитету доведена на підставі нормалізації ендотеліальної дисфункції та пригнічення підвищеного катаболізму органічного матриксу кісткової тканини пародонта, що підтверджується зниженням вмісту мономерів колагенових і неколагенових білків.

Колаген є основним білком кісткової тканини пародонта, який катаболізується за участю специфічних металоматричних протейназ. Оксипролін–маркер катаболізму колагену [1].

Вміст вільного оксипроліну (мкмоль/г) у твердих тканинах пародонта за умов тривалого використання ІПП та корекції симбітером був таким:

**А.М. Манько, Т.В. Береговая, К.С. Непорада, Д.С. Янковский**

#### **ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПРОБИОТИКА СИМБИТЕРА АЦИДОФИЛЬНОГО НА ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОСТНОЙ ТКАНИ ПАРОДОНТА ПРИ ГИПОАЦИДНОСТИ**

На модели омепразолиндуцированного гипацидита обоснована экспериментальная коррекция патологических изменений в костной ткани пародонта мультипробиотиком симбитером. Доказано, что его использование в условиях длительной гипацидности желудочного сока способствует предупреждению катаболизма коллагеновых и неколагеновых белков органического матрикса нижнечелюстных костей и нормализации NO-эргической системы. Ключевые слова: пародонт, омепразол, гипацидность, протеогликаны, гликопротеиды, оксипролин, NO-эргическая система, симбитер ацидофильный.

**A.M. Manko, T.V. Beregova, K.S. Neporada, D.S. Yankovsky**

#### **THE INFLUENCE OF SYMBITER, AN ACIDOPHILIC MULTIPROBIOTIC, ON PATHOLOGICAL CHANGES IN BONE PERIODONTAL TISSUE UNDER HYPOACIDITY**

The omeprazole-induced hypacidity leads to metabolic dis-

orders in the bone periodontal tissue: a disbalance of NO-ergic system, activation of collagen and noncollagen proteins catabolism. We have shown that such disorders are corrected by a multiprobiotic of new generation - symbiter acidophilic. Key words: periodontium, omeprazole, hypoacidity, proteoglycans, glycoproteids, oxyproline, NO-ergic system, symbiter acidophilic.

*Ukrainian Medical Dental Academia, Poltava;  
Scientific Production Company "O.O.Prolisok", Kyiv;  
Petro Bohach Institute, Department of Biology Faculty,  
National Taras Shevchenko University, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аскерова Т.А., Юсифова Н.А., Гасанова Г.Т. Диагностическая значимость определения свободного оксипролина при наследственных и приобретенных коллагенозах // Клин. лаб. диагностика. – 2009. – №9. – С. 15–17.
2. Бережной В.В., Крамарев С.А. Микроэкологические нарушения у детей и современные возможности повышения эффективности их коррекции // Здоровье женщины. – 2002. – №4 (12). – С. 79–92.
3. Лукьянова Е.М., Антипкин Ю.Г., Янковский Д.С., Дымент Г.С. Перспективы использования пробиотиков в педиатрии // Сучасні аспекти застосування пробиотиків в педіатрії: зб. праць сателітного симпоз., 28 травня 2008: матеріали доп. – К., 2009. – С. 4–21.
4. Мешишен І.Ф. Пішак В.П., Григор'єва Н.П. Біомолекули: структура та функції. – Чернівці: Медик, 1999. – 149 с.
5. Минченко Б.И., Беневоленский Д.С., Тишенина Р.С. Биохимические показатели метаболических нарушений в костной ткани // Клин. лаб. диагностика. – 1999. – Ч. 1: Резорбция кости, №1. – С. 8–15.
6. Минченко Б.И., Беневоленский Д.С., Тишенина Р.С. Биохимические показатели метаболических нарушений в костной ткани // Там же. – Ч. 2: Образование кости, №4. – С. 11–17.
7. Поворознюк В.В., Мазур И.П. Костная система и заболевания пародонта. – К.: Экспрес, 2004. – 446 с.
8. Тетянець С.С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови // Лаб. дело. – 1985. – №1. – С. 61–62.
9. Шараев П.Н. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях // Там же. – 1987. – №5. – С. 530–532.
10. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Кильдиярова Р.Р. Метод определения фукозы, несвязанной с белками // Клин. лаб. диагностика. – 1997. – №4. – С. 17–18.
11. Янковский Д.С. Микробная экология человека. Современные возможности ее поддержания и восстановления. – К.: Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.
12. Branderburg K., Andri J., Miller M. Physico-chemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity // Carbohydr. Res. – 2033. – №338. – P. 2477–2489.
13. Garthwaite J. Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system. – Amsterdam: Excerpta medica, 1990. – P. 138–155.
14. Hevel I.M. Purification of the inducible murene macrophage nitric oxide synthase // J. Biol. Chem. – 1991. – 266. – №34. – P.22789–22791.
15. Hyun J.J., Kim E.S., Kim H.S., Jung W.W. PPI, is a friend or a foe to the osteoclasts // Gut. – 2009. – 58. – Suppl. II. – P0837.
16. Olbe L., Cederberg C., Lind T., Olausson M. Effect of omeprazole on gastric acid secretion and plasma gastrin in man // Scand J. Gastroenterol., 1989. – 27 (suppl.166) – P. 27–32.

*ВДНЗ України "Укр. мед. стомат. академія", Полтава;  
Наук.-вироб. об'єднання "О.Д. Пролісок";  
Наук.-досл. ін-т ім. Петра Богача біол. факультету Київ.  
нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка  
E-mail: tanko\_ann@mail.ru*

*Матеріал надійшов до  
редакції 03.08.2010*

О.А. Панченко, В.О. Оніщенко, Ю.Є. Лях

## Реакція поверхневої та внутрішньої температури тіла людини під впливом екстремального охолодження

*У роботі розглянута динаміка показників поверхневої і внутрішньої температури тіла при систематичному курсовому впливі ультранизької температури, джерелом якої була використана аерокріокамера «Cryo Therapy Chamber» Zimmer Medizin Systeme фірми «Zimmer Electromedizin» (Німеччина) (-110 °С). Поверхнева температура тіла і температура в зовнішньому слуховому проході в обстежуваних вимірювалася методом безконтактної інфрачервоної термометрії безпосередньо перед відвідуванням кріокамери і відразу після виходу з неї. Під час дослідження проведено 47464 вимірювання температури тіла. Встановлено, що внутрішня температура тіла людини під впливом ультранизької температури в запропонованому режимі впливу залишається постійною, а поверхнева – знижується в середньому на 11,57 °С. Визначено часові рамки стабілізації адаптаційних процесів системи терморегуляції при екстремальному кріовпливі.*

*Ключові слова: ультранизька температура, поверхнева температура тіла, внутрішня температура тіла, терморегуляція, сумарний час кріовпливу.*

### ВСТУП

Проблема екстремальних впливів на людину особливо актуальна на сучасному етапі, коли з прогресом науки і техніки розширюються сфери діяльності людей, застосовуються нові чинники лікувального впливу. Одним з таких чинників, що використовуються з лікувальною метою, є ультранизька температура [3, 15, 16]. До теперішнього часу накопичено деякий емпіричний клінічний досвід застосування такої температури в галузі фізіотерапії, спортивної медицини, екологічної фізіології, курортології та космічної медицини [3, 8, 11, 16].

Система терморегуляції є однією з головних систем, яка першою зустрічається з дією екстремального чинника – ультранизькою температурою [1, 16]. Відомо, що температура тіла підрозділяється на температуру ядра тіла (внутрішню) і температуру оболонки тіла (поверхневу) [4, 14].

© О.А. Панченко, В.О. Оніщенко, Ю.Є. Лях

При цьому коливання температури тіла у відповідь на зміну температури довкілля виражені значною більшою мірою на поверхні тіла, а температура ядра тіла підтримується системою терморегуляції на постійному рівні. Багато фізіологічних ефектів і механізмів впливу ультранизької температури на організм людини залишаються недостатньо вивченими і знаходяться на початковій стадії дослідження, з іншого боку немає систематичних досліджень реакцій організму на дію цього подразника.

Метою нашої роботи було виявлення особливостей змін поверхневої та внутрішньої температури тіла при систематичному курсовому впливі ультранизької температури, створеної кріокамерою.

### МЕТОДИКА

Дослідження проводили в Державному закладі «Науково-практичний медичний

реабілітаційно-діагностичний центр» (ДЗ «НПМ РДЦ») МОЗ України. У ньому брали участь 185 пацієнтів, що знаходяться на диспансерному обліку, з них 127 жінок (68,7%) і 58 чоловіків (31,3%) віком від 18 до 75 років. Як джерело ультранизької температури було використано аерокріокамеру “Cryo Therapy Chamber” Zimmer Medizin Systeme фірми «Zimmer Electromedizin» (-110 °C) (Німеччина). Всі пацієнти перед курсом кріотерапії пройшли загальноклінічне обстеження для виключення осіб з абсолютними протипоказаннями для ультранизького температурного впливу.

У процесі дослідження було проведено 47464 вимірювання температури тіла пацієнтів. Вивчення поверхневої температури тіла проводили за показниками температури шкіри в окремо обраних точках. Внутрішню температуру визначали за значеннями в зовнішньому слуховому проході.

Поверхневу температуру тіла і температуру в зовнішньому слуховому проході у пацієнтів вимірювали до відвідування кріокамери і безпосередньо після виходу з неї. Поверхнева температура тіла визначалася на відкритих ділянках тіла, що знаходилися у безпосередньому контакті з екстремальним чинником у восьми симетричних маркірованих локальних зонах: на плечі (Br), грудях (Th), спині (Dr), стегні (рис. 1). Виміри поверхневої температури тіла та температури у зовнішньому слуховому проході робили методом безконтактної інфрачервоної термометрії за допомогою медичного термометра DT – 635 («AND», Японія) з відповідними датчиками. Дослідження виконувалися в приміщенні, де підтримувалася комфортна температура повітря у межах 21–26°C, при цьому пацієнти знаходилися в положенні сидячи.

Пацієнти при відвідуванні кріокамери були роздягнуті до нижньої білизни з бавовняних тканин. Відкриті ділянки тіла

(вуха, кисті рук і стопи) були додатково захищені бавовняною тканиною, на обличчя надіта марлева пов'язка. Під час першого сеансу екстремальної кріотерапії (ЕКТ) тривалість перебування пацієнта в передкамері (-60 °C) становила 10 с, в основній камері (-110 °C) – 30 с. При наступних сеансах час знаходження пацієнта в основній камері поступово збільшувався кожен сеанс на 30 с і сягав максимальної тривалості 180 с. Процедури проводили щодня з дводенними перервами (субота, неділя) через кожні 5 діб. При будь-якій негативній реакції або за бажанням пацієнта сеанс (курс) кріотерапії міг бути припинений. Курс кріовпливу становив в середньому 20–30 сеансів [1, 2, 7]. Динаміка температури тіла розглядалася залежно від сумарного часу кріовпливу (СЧК), який є загальною сумою отриманих пацієнтом хвилин кріовпливу за один безперервний курс кріотерапії. Цей показник було введено для стандартизації ефектів цього виду впливу в часі.

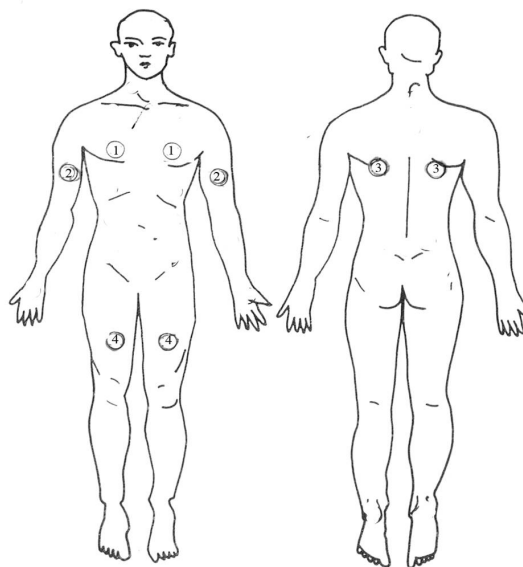


Рис. 1. Точки, де вимірювалася поверхнева температура тіла: 1 – локальна зона для виміру температури на грудях (Th); 2 – на плечі (Br); 3 – на спині (Dr); 4 – на стегні (Fm)

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою ліцензійного пакета прикладних програм “Statistica 5.5A” (StatSoft.ru) та “MedStat” [6]. Були використані базові методи математичної статистики: описувальна статистика, нелінійна регресія та моделювання. Для оцінки достовірності розбіжностей вибірок використовували критерій Вілкоксона. При проведенні множинних порівнянь проводили непараметричний ранговий однофакторний аналіз Крускала–Уолліса. Оцінку виду розподілу виконували за критерієм Шапіро–Уїлка.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Попередній статистичний аналіз отриманих значень температури виявив, що їх розподіл відрізняється від нормального, згідно з цим, при проведенні подальшого аналізу використовувалися непараметричні критерії. У межах описувальної статистики вираховувалися медіана та I та III квартилі ( $Me \pm m$ , [25; 75]) або медіана та вірогідні інтервали ( $Me$  [(95%VI)]).

Нами встановлено, що початкові значення температури в зовнішньому слуховому проході у чоловіків ( $n=308$ ) були  $36,9^\circ\text{C} \pm 0,38^\circ\text{C}$ , а у жінок ( $n=110$ )  $37,0^\circ\text{C} \pm 0,34^\circ\text{C}$ . Вищезгадані відмінності в початкових значеннях температури в зовнішньому слуховому проході у чоловіків і жінок виявилися статистично недостовірними ( $P=0,07$ ).

Вивчення значень температури в зовнішньому слуховому проході без врахування гендерної ознаки ( $n=418$ ) продемонструвало, що до сеансу кріотерапії у обстежуваних температура становила  $36,9^\circ\text{C} \pm 0,03^\circ\text{C}$ , після сеансу вона статистично достовірно знижувалася на  $0,4^\circ\text{C} \pm 0,04^\circ\text{C}$  ( $P<0,05$ ) і встановлювалася на рівні  $36,5^\circ\text{C} \pm 0,05^\circ\text{C}$ .

Слід відмітити, що зміна температури в зовнішньому слуховому проході не залежала від сумарного часу кріовпливу ( $r=0,04$ ;  $P>0,05$ ).

Таким чином, зафіксоване максимальне абсолютне зниження температури зовнішнього слухового проходу до і після кріовпливу не перевищувало  $1,0^\circ\text{C} \pm 0,04^\circ\text{C}$ . Вищеописані зміни температури знаходилися в межах допустимих фізіологічних значень: у літературі є згадки про фізіологічні коливання внутрішньої температури тіла в межах  $1,0^\circ\text{C}$  [14]. Joch та співавт. [17] описують зниження температури у вусі після сеансу кріовпливу на  $0,0-0,2^\circ\text{C}$ . Подібні зміни свідчать про високу стабільність внутрішньої температури тіла та про можливість системи терморегуляції зберігати температурний гомеостаз навіть при впливі на організм ультранизької температури ( $-110^\circ\text{C}$ ) у запропонованому режимі.

При вивченні поверхневої температури тіла було виявлено відсутність статистично достовірних відмінностей у значеннях температури тіла у чоловіків ( $n=18643$ ) і жінок ( $n=31686$ ) як до, так і після кріовпливу ( $P=0,36$ ). Не було зафіксовано також достовірних відмінностей між значеннями поверхневої температури тіла в симетричних точках правого і лівого боків ( $P=0,46$ ). Ці результати дали нам змогу надалі не враховувати гендерну ознаку та об'єднати результати вимірів поверхневої температури тіла на правому і лівому боці тіла пацієнтів.

Встановлено, що мінімальне зниження поверхневої температури під впливом екстремального чинника відбувалося в ділянці спини (точка Dr). Температура в цій точці ( $n=6540$ ) змінювалася в середньому на  $9,4^\circ\text{C} \pm 0,08^\circ\text{C}$  [6,6; 12,1], що достовірно відрізнялося від цього показника на грудях, стегні і плечі ( $P<0,05$ ). Найбільше зниження поверхневої температури тіла зафіксоване в ділянці Br ( $n=6542$ ), яке становило  $12^\circ\text{C} \pm 0,01^\circ\text{C}$  [8,3; 14,7]. Зміни поверхневої температури тіла на стегні (Fm); ( $n=6538$ ) достовірно не відрізнялися від значень, які виявлялися на плечі ( $P>0,05$ ) і становили  $11,8^\circ\text{C} \pm 0,01^\circ\text{C}$  [8,9; 14,5]. Поверхнева температура тіла в ділянці Th ( $n=6540$ )

знижувалася в середньому на  $10,9^{\circ}\text{C} \pm 0,01^{\circ}\text{C}$  [7,9; 14,1]. У ділянці плеча після сеансу екстремальної кріотерапії цей показник знижувався до значень  $18,4^{\circ}\text{C} \pm 1,11^{\circ}\text{C}$  [16,6; 21,3], а в ділянці стегна –  $17,8^{\circ}\text{C} \pm 1,2^{\circ}\text{C}$  [16; 20,2]. За даними С. Richter після сеансу екстремальної кріотерапії поверхнева температура тіла знижується до  $8\text{--}15^{\circ}\text{C}$  [15]. Описано зниження поверхневої температури тіла в ділянці плеча ( $n=20$ ) в діапазоні від  $8,9$  до  $14,6^{\circ}\text{C}$ , в ділянці стегна ( $n=20$ ) – від  $8$  до  $13,3^{\circ}\text{C}$  [9]. Таким чином, зафіксовані нами значення поверхневої температури тіла після сеансу є безпечними та збігаються з даними інших авторів.

Як видно з рис. 2, зміна температури шкіри в точках на плечі, стегні, спині і грудях після сеансу залежно від сумарного часу кріовпливу була подібною, тому надалі застосовувався інтегральний показник, що відображає значення температури всіх ділянок поверхні тіла. Таким показником було вибрано середню поверхневу температуру тіла, що була представлена середньою геометричною температурою досліджуваних ділянок поверхні тіла. Цей показник дав змогу інтегрально відобразити температуру поверхні тіла залежно від сумарного часу кріовпливу.

Вивчення середньої поверхневої темпе-

ратури тіла в динаміці всього курсу показало, що її зниження після окремого сеансу відбувалося нерівномірно на  $10,4^{\circ}\text{C} \pm 1,24^{\circ}\text{C}$  [7,5,13,25], з періодами повільного та швидкого зниження, з періодом стабілізації. Виявлено, що після сеансу кріовпливу середні значення цього показника у пацієнтів знижувалися паралельно з підвищенням сумарного часу кріовпливу (рис. 3,а).

У період з 0,5-ї до 10-ї хвилини спостерігалось швидке зниження середньої поверхневої температури тіла після сеансу кріовпливу до рівня  $24^{\circ}\text{C}$  (95% ВІ  $23\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ), з 11-ї по 30-ту хвилину сумарного часу кріовпливу середня температура після сеансу повільно знижувалася до  $21^{\circ}\text{C}$  (95% ВІ  $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$ ). З 31-ї по 50-ту хвилину значення цього показника стабілізувалися на рівні  $19,5^{\circ}\text{C}$  (95% ВІ  $19\text{--}21^{\circ}\text{C}$ ). З 51-ї хвилини зафіксовано незначне підвищення середньої температури до значень  $20,5^{\circ}\text{C}$  (95% ВІ  $19,5\text{--}21,5^{\circ}\text{C}$ ) з подальшою стабілізацією.

Під час дослідження було встановлено, що зміни в значеннях середньої поверхневої температури тіла відбувалися як після, так і до сеансу кріовпливу.

Як видно з рис. 3,б з 0,5-ї до 40-ї хвилини сумарного часу кріовпливу значення середньої поверхневої температури тіла знаходилось на рівні  $32,5^{\circ}\text{C}$  [32,45–32,65], потім з 31-ї по 50-ту хвилину відзначалося

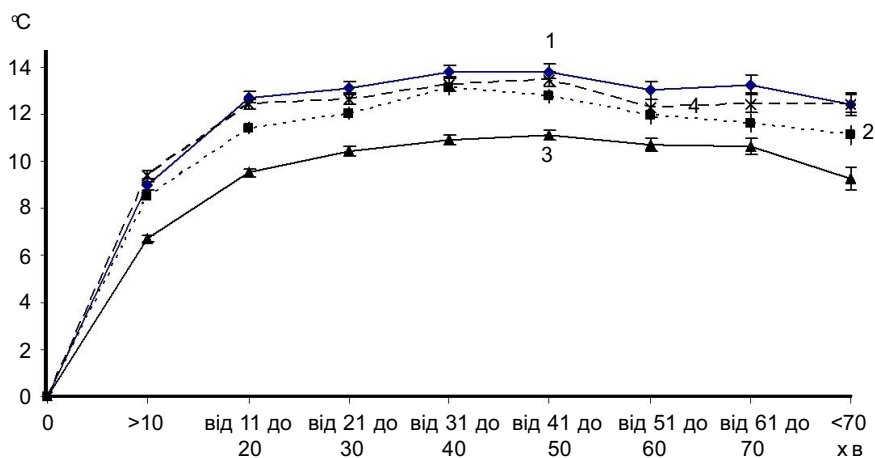


Рис. 2. Динаміка приросту температури шкіри в точках Br (1), Th (2), Dr (3), Fm (4) залежно від сумарного часу кріовпливу



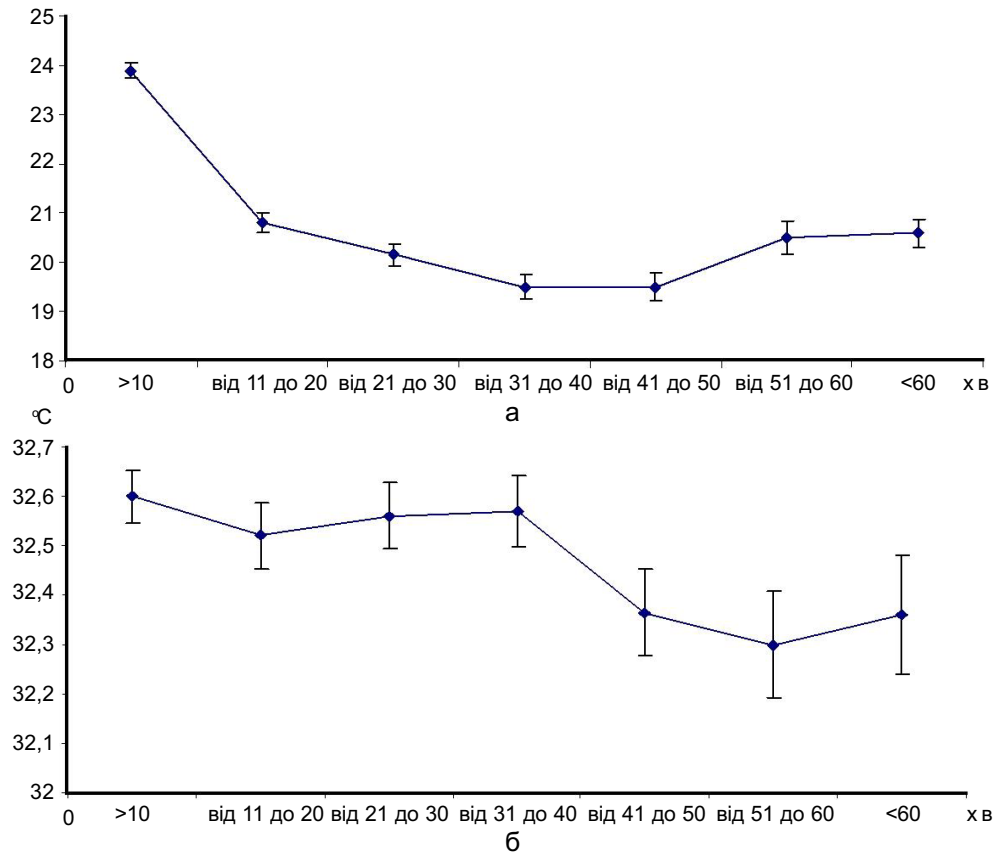


Рис. 3. Зміни середньої поверхневої температури тіла після (а) та до (б) сеансу кровопливу залежно від сумарного часу кровопливу

зниження значення цього показника до 32,3 °С [32,2; 32,4] ( $P < 0,05$ ). Починаючи з 51-ї хвилини, середня поверхнева температура тіла встановлювалася в температурному діапазоні від 32,3 до 32,4 °С.

Таким чином, зміни середньої поверхневої температури тіла до сеансу кровопливу свідчать про формування неспецифічних адаптаційних реакцій до цього виду впливу, які призводять до встановлення температурного гомеостазу на більш високому функціональному рівні. Вищеназвані реакції за стадійністю збігаються з даними Раренфів [16] і починаються з короткострокової відповіді організму на дію ультранизькотемпературного фактора, а при багаторазово повторюваному його впливі призводять до активації довгострокового регуляторного процесу і на завершення, до формування

нового рівня функціонування організму в екстремальних умовах зовнішнього середовища.

Найбільшою мірою доказовості експериментальних висновків є побудова адекватної математичної моделі. Застосування принципу моделювання як дослідницького методу набуло важливого значення в експериментальній фізіології та патології, його використовують для вивчення сутності процесів, для перевірки гіпотез та прогнозування [5]. Для теоретичної оцінки реакції організму на зовнішній вплив навколишнього середовища була побудована математична модель залежності абсолютного приросту (зниження) середньої температури поверхні тіла до і після сеансу екстремальної кріотерапії від сумарного часу кровопливу у вигляді відомого в біології

рівняння Ферхюльста [5]:

$$y = a \cdot \exp(b+c \cdot x) / (1+\exp(b+c \cdot x)),$$

де  $y$  - середнє значення різниці температури поверхні тіла до і після сеансу;  $x$  - сумарний час крiовпливу,  $x \in [0; 10]$ ;  $a, b, c$  - постійні

коефіцієнти.

Значення постійних коефіцієнтів та їх інтерпретація наведено в таблиці.

Модель є адекватною, про що говорить значення коефіцієнта детермінації  $R^2=0,9851$ .

**Абсолютні значення коефіцієнтів у рівнянні Ферхюльста**

Коефіцієнт	Абсолютне значення	Інтерпретація
A	11,57	Абсолютний приріст середньої поверхневої температури тіла, що встановився
b/c	0,85	Точка перетинання – точка переходу швидкого росту у повільний

Графічно математична модель представлена на рис. 4.

Слід відмітити, що у період з 1-ї по 4-ту хвилину сумарного часу крiовпливу відбу-

вається плавний негативний абсолютний приріст середньої поверхневої температури тіла до рівня 1 °С; з 5-ї по 14-ту хвилину – різкий швидкий абсолютний приріст із 1,5

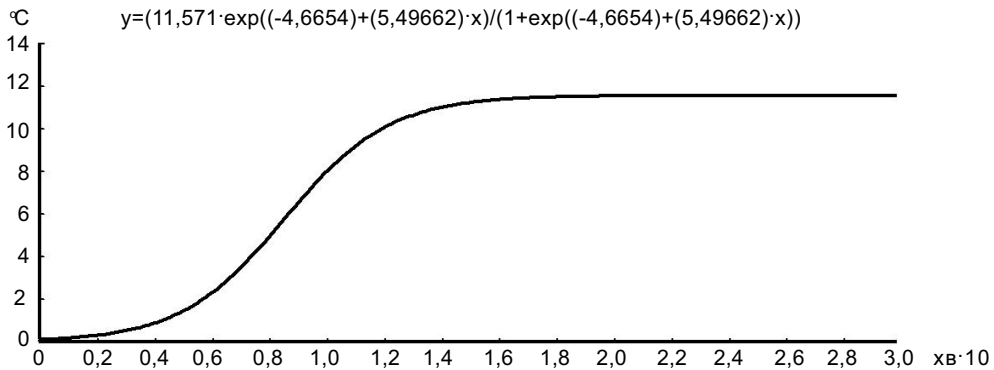


Рис. 4. Математична модель залежності абсолютного негативного приросту середньої поверхневої температури тіла від сумарного часу крiовпливу після сеансу екстремальної крiотерапії

до 11,55 °С, з 15-ї по 20-ту хвилину – повільне зростання абсолютного приросту до рівня 11,57 °С, та з 20-ї хвилини – стабілізація негативного абсолютного приросту на рівні 11,57 °С, яка триває аж до 80-ї хвилини. Таким чином, після 20-ї хвилини крiовпливу стабілізуються зміни поверхневої температури тіла.

## ВИСНОВКИ

1. Зміна внутрішньої температури тіла при екстремальному крiовпливі не залежить від значення сумарного часу крiовпливу, що говорить про стійкість гомеостатичних показників системи терморегуляції організ-

му у відповідь на дію ультранизького температурного фактора.

2. Зниження поверхневої температури тіла в процесі крiовпливу не залежить від гендерної ознаки і розташування точок у симетричних ділянках тіла. Найбільше зниження температури визначається на кінцівках, а найменше – в ділянці спини при збереженні фізіологічного краніокаудального градієнта поверхневої температури тіла.

3. Абсолютний негативний приріст середньої температури поверхні тіла становить 11,57 °С і знаходиться у межах допустимих значень, при виході за які можуть відбуватися патологічні зміни в тканинах.

4. Адаптаційні процеси до такого виду ультранизької температури стабілізуються в середньому з 20-ї хвилини сумарного часу кріовпливу.

5. Особливості реакції системи терморегуляції на екстремальний кріовплив характеризуються неспецифічністю змін і загальнофізіологічними закономірностями, що описуються за допомогою моделі Ферхюльста.

6. Розроблено модель залежності абсолютного негативного приросту середньої поверхневої температури тіла від сумарного часу кріовпливу, яка дає змогу контролювати реакцію системи терморегуляції окремого обстежуваного протягом усього курсу екстремальної кріотерапії. Встановлено, що трихвилинний вплив ультранизької температури не призводить до перенапруження гомеостатичних показників системи терморегуляції організму людини.

7. Результати дослідження дають змогу науково обґрунтувати застосування ультранизькотемпературного впливу в клінічній практиці при проведенні загальної кріотерапії в реабілітаційних центрах відновлювального лікування, в клініках терапевтичного, ревматологічного, дерматологічного профілю, спортивно-оздоровчих установах.

8. Отримані експериментальні результати важливі для перспективних фундаментальних і прикладних досліджень ультранизькотемпературних впливів.

**О.А. Панченко, В.О. Онищенко, Ю.С. Лях**

#### **РЕАКЦИЯ ПОВЕРХНОСТНОЙ И ВНУТРЕННЕЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРЕМАЛЬНОГО ОХЛАЖДЕНИЯ**

В работе рассмотрена динамика показателей поверхностной и внутренней температуры тела при систематическом курсовом воздействии ультранизькой температуры. В качестве источника ультранизькой температуры была использована аэрокриокамера «Cryo Therapy Chamber» Zimmer Medizin Systeme фирмы «Zimmer Electromedizin» (Германия) (-110 °C). Поверхностная температура тела и

температура в наружном слуховом проходе у обследуемых измерялась методом бесконтактной инфракрасной термометрии непосредственно перед посещением криокамеры и сразу после выхода из нее. В процессе исследования проведено 47464 измерения температуры тела. Установлено, что внутренняя температура тела человека под влиянием ультранизькой температуры в предложенном режиме воздействия остается постоянной, а поверхностная – снижается в среднем на 11,57 °C. Определены временные рамки стабилизации адаптационных процессов системы терморегуляции при экстремальном кривоздействии. Ключевые слова: ультранизькая температура, поверхностная температура тела, внутренняя температура тела, терморегуляция, суммарное время кривоздействия.

**O.A. Panchenko, V.O. Onishenko, Y.E. Liakh**

#### **THE REACTION OF HUMAN THERMOREGULATION ON THE IMPACT OF EXTREME ULTRA-LOW TEMPERATURE**

The dynamics of changes in the parameters of the surface and core body temperature under the systematic impact of ultra-low temperature is described in this article. As a source of ultra-low temperature was used «Cryo Therapy Chamber» Zimmer Medizin Systeme firm Zimmer Electromedizin (Germany) (-110 °C). Surface and internal body temperature was measured by infrared thermometer immediately before visiting cryochamber and immediately after exiting. In the study conducted 47,464 measurements of body temperature. It was established that the internal temperature of the human body under the influence of ultra-low temperatures in the proposed mode of exposure remains constant, and the surface temperature of the body reduces by an average of 11,57 °C. The time frame stabilization of adaptive processes of thermoregulation under the systematic impact of ultra-low temperature was defined in the study.

Keywords: ultra-low temperature, the surface temperature of the body, internal body temperature, thermoregulation, total time of cryotherapy.

*Scientific-practical Medical Rehabilitation-diagnostic Centre, Ministry of Health of Ukraine, Konstantynivka, Donetsk region*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Антонова В.О. Особенности терморегуляции у лиц, подвергшихся воздействию экстремальной кривотерапии // Питання експерим. та клін. медицини. – 2009. – 2, Вип. 13. – С. 11–17.
2. Антонова В.О. Оценка изменений психофизиологического состояния человека под воздействием ультранизьких температур // Там само. – 2010. – 1, Вип. 14. – С. 17–23.
3. Баранов А.Ю., Кидалов В.Н. Лечение холодом. Криомедицина. – СПб.: Изд-во Атон, 1999. – 272 с.
4. Бачериков А.Н., Кузьминов В.Н., Ткаченко Т.В.

- Современные представления о системе терморегуляции // Вісн. психіатрії та психофармакотерапії. – 2006. – № 1. – С. 178–182.
5. Лях Ю.Е., Уманский В.Я., Савченко М.В. Моделирование процессов роста длины и массы тела у детей // Вестн. гигиены и эпидемиологии. – 2001. – 5, №1. – С. 56–60.
  6. Лях Ю.Е., Гурьянов В.Г., Хоменко В.Н., Панченко О.А. Основы компьютерной биостатистики. Анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MedStat. – Донецк: Папакица Е.К., 2006. – 214 с.
  7. Лях Ю.Е., Панченко О.А., Тетюра С.М., Антонова В.О. Оценка воздействия экстремально низких температур на организм пациентов в процессе проведения общей воздушной криотерапии // Університ. клініка. – 2009. – 5, № 1–2. – С. 78–82.
  8. Лях Ю.Е., Панченко О.А., Тетюра С.М., Антонова В.О. Предварительные результаты использования экстремальной криотерапии в условиях реабилитационного центра // Актуал. вопросы теор. и приклад. биофизики, физики и химии: V Международ. конф. – Севастополь, 2009. – С. 133–136.
  9. Назаренко Г.И., Героева И.Б., Глушков В.П., Сайковская Т.В. Повышение качества жизни больных ревматоидным артритом методом общей воздушной криотерапии // Общая и локальная воздушная криотерапия. – 2009. – С. 22–25.
  10. Обухова А.А., Батурина Т.Д. Функциональные взаимосвязи показателей термотопографии здоровых лиц с гемодинамическим статусом организма // Кардиология. – 1991. – 31. – С. 56–59.
  11. Портнов В.В., Медалиева Р.Х. Общая криотерапия // Общая и локальная криотерапия. – М., 2009. – С. 5–24.
  12. Стихарев А.А. Сравнительная оценка температуры тела, измеряемой в разных точках у человека на холоде // Гигиена и санитария. – 1993. – № 5. – С. 46–48.
  13. Тетюра С.М., Антонова В.О. Вплив екстремальної кріотерапії на функціональний стан серцево-судинної системи людини // Питання експерим. та клін. Медицини. – 2009. – 2, Вип.13. – С. 72–79.
  14. Ульмер Х.-Ф., Брюк К., Эве К. Физиология человека. – М.: Мир, 1996. – Т. 3. – С. 665–687.
  15. Fricke R. Ganzkurperkaltetherapie in einer Kaltekammer mit Temperaturen um -110 °C // Z. Phys. Med. Baln. Med. Klim. – 1989. – 18. – P. 1–10.
  16. Papenfus W. Power from the Cold / Winfried Papenfus. – Edition k, holder: Friedrich Kehler, Regensburg, 2006. – P. 143.
  17. Joch W., Fricke R., Uckert S. Der Einfluss von Kalte auf die sportliche Leistung // Leistungssport. – 2002. – 32, №2. – P. 11–15.

*ДЗ «Наук.-практ. мед. реабілітаційно-діагност. центр МОЗ України»,  
м. Костянтинівка, Донецької обл.*

*Матеріал надійшов до  
редакції 06.12.2010*

Л.М. Богданова, С. К. Матішева

## Особливості електрокардіограми у самиць чорноморських дельфінів афалін (*Tursiops truncatus*)

*Розроблено методи реєстрації та механічні прилади для запису ЕКГ. Досліджено особливості ЕКГ здорових і хворих самиць чорноморських афалін. Виявлені відхилення, характерні для хворих самиць дельфінів: порушення ритму, зміни спрямованості зубців і їх полярності, наявність екстрасистол, а також зміни розрахункових показників серцевої діяльності.*

### ВСТУП

Діяльність серця дельфінів методами електрокардіографії досліджували і раніше [1, 4–8]. Найбільше реєстрували електрокардіограми (ЕКГ) при вивченні еколого-фізіологічних відмінностей їх поведінки в різних умовах. Ці методи не використовували для отримання інформації про стан здоров'я чи патологію серцевої діяльності дельфінів, оскільки вони не характеризують поверхневі електрокардіопотенціали та їх зміни у дельфінів, життя яких проходить у провідниковій морській воді. Не надавалося належного значення і узгодженості щодо типових схем встановлення електродів і відведення електрокардіопотенціалів, їх реєстрації і трактування. В останні десятиліття поширюється утримання морських ссавців в океанаріумах, де вони беруть участь в шоу-виставах, а також хворіють і розмножуються в умовах неволі. Тому потрібно шукати можливість їхнього діагностування та лікування. Разом з клінічними та біохімічними дослідженнями крові у дельфінів [2, 3] метод електрокардіографії може знайти застосування для ранньої діагностики захворювань і своєчасного лікування порушень діяльності серця. Інформація про встановлені на основі систематизованого аналізу типові показники ЕКГ, зареєстрованих в однотипних

умовах у чорноморських дельфінів-афалін, з врахуванням як виду тварин і їх функціонального стану, так і патології, нечисленна.

Мета наших досліджень – розробка методичних можливостей відведення поверхневого електрокардіопотенціалу і реєстрації ЕКГ та її структурних комплексів у здорових і хворих самиць-дельфінів.

### МЕТОДИКА

Обстежено 55 адаптованих до умов неволі статевозрілих самиць чорноморських дельфінів-афалін віком від 10 до 35 років, масою 180–250 кг. Серед них – 30 здорових і 25 хворих. У обох групах було по 3 самиці віком більше як 25 років. Серцевий ритм і ЕКГ реєстрували на електрокардіографі «Малыш» та на електроенцефалографі «Альвар». Дельфінів обстежували при підйомі їх із води на місток вольєра, при знаходженні у ванні з наповненою морською водою, та під час вільного плавання у відсіку вольєра. ЕКГ реєстрували після того, як самиця ставала спокійною та у неї відновлювався первинний ритм дихання. В період обстежень у дельфінів брали кров з вени хвостового плавника для визначення клінічних показників і оцінки функціонального стану. Розроблені методи та технічні пристрої, які дають змогу реєструвати

© Л.М. Богданова, С. К. Матішева

ЕКГ у дельфінів, визначені місця їх локалізації.

Електроди на тілі дельфінів встановлювали в таких точках: два закріплювали біля основи лівого та правого грудних плавників, два – на середній частині хвостового стебла справа та зліва. Використовували електроди круглої форми, які були виготовлені із нержавіючої сталі та вбудовані всередині гумових еластичних присосок на спеціальних металевих пружинках, що забезпечувало добрий контакт їх з тілом дельфіна та ізоляцію від водного середовища. Для реєстрації ЕКГ дельфінів в умовах вільного плавання застосовували електроди аналогічної конструкції, що мають довгі відвідні провідники, які були приєднані до електрокардіографа «Малыш» і не заважали вільному пересуванню тварин у відсіку утримання. Для реєстрації ЕКГ дельфінів при вільному пересуванні у відсіку вольєра їх заздалегідь навчали підпливати до містка для закріплення та подальшого зняття тренером електродів.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У здорових дельфінів є притаманні їм особливості серцевого ритму і ЕКГ порівняно з хворими, а також з людиною. Ритм

серцевих скорочень у здорових дельфінів і людей, надалі названий нормою, синусовий. Незважаючи на те, що середня частота серцевих скорочень у дельфінів в умовній нормі становить  $50\text{--}70 \text{ хв}^{-1}$  і близька до такої, як у людини, у них у здоровому стані відмічається лабільність серцевого ритму протягом дихального циклу. Різко виражена дихальна аритмія, частий ритм на початку дихальної паузи сповільнюється в її кінці (рис. 1). В різні фази дихального циклу частота серцевих скорочень змінюється в широких межах: від  $150$  до  $100 \text{ хв}^{-1}$  відразу після вдиху до  $70\text{--}40 \text{ хв}^{-1}$  перед черговим видихом–вдихом. Тобто спостерігається дихальна аритмія з вираженою брадикардією в кінці дихального циклу. Через  $1\text{--}2$  с після вдиху серцевий ритм підвищується більше ніж удвічі. Брадикардія, яка настає безпосередньо після вдиху, утримується протягом  $0,6\text{--}0,9$  с. Тахікардія, котра змінює її, триває до  $9\text{--}12$  с, що становить  $32\%$  тривалості дихального циклу, і різко змінюється брадикардією, яка триває більшу частину дихального циклу ( $65\%$  дихальної паузи). Перехід від тахікардії до брадикардії відбувається протягом  $0,6\text{--}0,9$  с. Частий ритм становить усього  $25\text{--}28\%$  від загального числа серцевих скорочень упродовж дихального циклу.

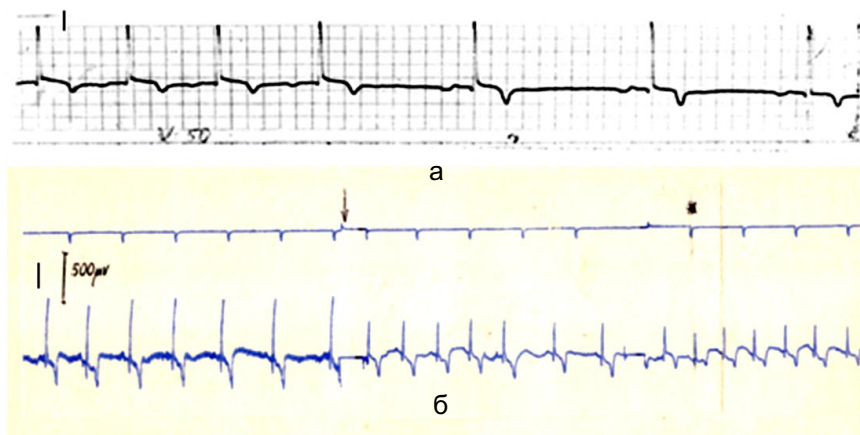


Рис. 1. Електрокардіограма (ЕКГ) здорової самиці афаліни (а). Ритм синусовий, характерна дихальна аритмія (брадикардія наприкінці дихальної паузи); ЕКГ здорової самиці афаліни (б): у ванні без води, далі – у ванні, що заповнена морською водою, стрілкою позначений момент занурення дельфіна у воду

При подібних формі та тривалості кардіоінтервалів на ЕКГ амплітуда зубців у здорових дельфінів, яких піднімали з води на сухий місток, значно вища, ніж у цих самих тварин, коли їх обстежували у ванні, наповненій водою, а також під час реєстрації безпосередньо в період вільного плавання в акваторії вольєра (див. рис. 1).

На ЕКГ у здорових дельфінів, як і у людини, реєструється п'ять зубців: Р, Q, R, S і Т, які мають різну амплітуду відносно ізоелектричної лінії. Особливістю ЕКГ дельфінів є те, що в нормі у них зубець Т у типових стандартних відведеннях негативний, а у людини він позитивний. У стандартних відведеннях амплітуда цього зубця становить 0,2–0,25 від амплітуди зубця R. Амплітуда зубця Р може змінюватися впродовж дихального циклу в межах 0,1–0,2 R. Зубець Q більш виражений в III стандартному відведенні. Амплітуда його в стандартних відведеннях коливається від 0 до 0,2 R. Зубець R на ЕКГ найвищий, як у людини та наземних тварин. Його амплітуда коливається від 5 до 15 мВ. У старих тварин реєструється низьковольтна ЕКГ, зубець R може бути менше ніж 5 мВ. В період стресових ситуацій і при підвищеному тиску його амплітуда може збільшуватися до 13–15 мВ. Упродовж дихального циклу вона змінюється: відразу після дихального акту – значно менша, ніж в його середині, що може бути пов'язано зі зниженням ударного об'єму крові внаслідок зменшення венозного повернення перед видихом [8]. Зубець S добре виражений упродовж дихального циклу, він змінюється в межах 0,2–2R. Інтервал S-T у здорових

тварин або знаходиться на ізолінії, або при сповільненому серцевому ритмі над нею на 0,05–0,2 мм. При частому ритмі серцевих скорочень інтервал S-T може набувати випуклої форми (опуклість обернена вниз). Тривалість зубців і інтервалів ЕКГ дельфінів також має особливості, наприклад, інтервали R-R у афаліні змінюються в межах 0,5–1,5 с, тоді як у людини – від 0,85 до 0,95 с. Тривалість комплексу QRS у дельфінів у нормі менша, ніж у людини. Вона коливається в межах 0,02–0,08 с, а зубця Р у здорових дельфінів – від 0,02 до 0,1 с. Інтервал P-Q варіює в межах 0,14–0,20 с. Інтервал S-T менший, ніж у людини. При частоті серцевих скорочень 120 хв<sup>-1</sup> S-T становить 0,16 ± 0,02 с. Час електричної систоли у афаліні коливається в межах 0,18–0,24 с. Вона зменшується при тахікардії до 0,12–0,16 с і збільшується при брадикардії до 0,24–0,26 с. Систолічний показник у дельфінів непостійкий та змінюється залежно від тривалості серцевого циклу, який у свою чергу змінюється впродовж дихального циклу. Цей показник у здорових дельфінів менший, ніж у людини. Так, при частоті 45–50 хв<sup>-1</sup> він становить 15 % від усього серцевого циклу, при частоті 60–90 хв<sup>-1</sup> – знаходиться в межах 30 %, а при тахікардії (від 120 до 130 хв<sup>-1</sup>) підвищується до 35–37 %. Тобто, кожній частоті серцевих скорочень відповідає свій систолічний показник (таблиця).

Тривалість одного серцевого циклу у здорових чорноморських афаліні у середньому становить 0,85±0,15 с, що більше, ніж у людини. При частоті серцевих скорочень 65–70 хв<sup>-1</sup> апное у дельфінів становить 54–

Середні значення інтервалів ЕКГ (с) у здорових, хворих афаліні і у людини

Об'єкт	R-R	P	P-Q	QRS	Q-T	S-T	Систолічний показник, %
Афаліні							
здорові	0,90±0,40	0,05±0,01	0,16±0,02	0,04±0,01	0,24±0,02	0,20±0,02	29,6±4,6(15-40)
хворі	0,70±0,20	0,08±0,03	0,20±0,01	0,06±0,02	0,28±0,02	0,22±0,01	39,9±8,8(30-55)
Людина	0,89±0,06	0,07±0,02	0,16±0,04	0,08±0,02	0,36±0,04	0,27±0,01	45,0±12(30-60)

55 % від часу всього серцевого циклу, тоді як у людини – 45 %. Наведені результати свідчать про більш економну роботу серця здорових дельфінів-афалін порівняно з людиною.

За допомогою методу електрокардіографії можна оцінити стан здоров'я та визначити правильний діагноз насамперед з врахуванням складності виявлення серцево-судинної патології у дельфінів за зовнішніми ознаками. На відміну, наприклад, від легеневої патології, коли підвищується частота дихання, спостерігаються чхання та плювання мокротинням, відсутність тривалих дихальних пауз, періодичні «зависання» тварини на поверхні води. При виразковій хворобі шлунка почервоніє глотка, з'являється слиз у ротовій порожнині перед годівлею, зменшується кількість споживаного корму, тварина «зависає» на поверхні води з підтягнутим до низу хвостовим стеблом.

ЕКГ дельфінів з серцевою патологією відрізняється від такої здорових дельфінів (рис. 2). Амплітуда зубця Т змінюється, він

стає загостреним, іноді двофазним, може бути ізоелектричним або складати 1/2 від амплітуди зубця R, а у тяжких випадках – бути рівним амплітуді R. При тривалій легеневій патології на ЕКГ зубець Р може мати високу амплітуду і становити 1/3–1/2 від амплітуди зубця R, а зубець Т може бути позитивним, що може свідчити про наявність гіпоксії міокарда.

Траплялися випадки, коли при тривалій серцевої патології зубець Р був дво- чи багатогорбим, маючи високу амплітуду, що визначалося як тремтіння передсердя (див. рис. 2,а).

На ЕКГ деяких хворих дельфінів зубець S ставав двофазним, а комплекс RST – розтягнутим і випуклим. Інколи у тяжко хворих тварин інтервал S-T зливався із зубцем R, утворюючи випуклий вгору комплекс RST, що згідно з медичною практикою визначається як інфаркт міокарда (див. рис. 2,б).

У хворих дельфінів на ЕКГ тривалість зубців P, R, T, інтервалів P-Q, Q-T, T-P і систолічний показник збільшуються. У

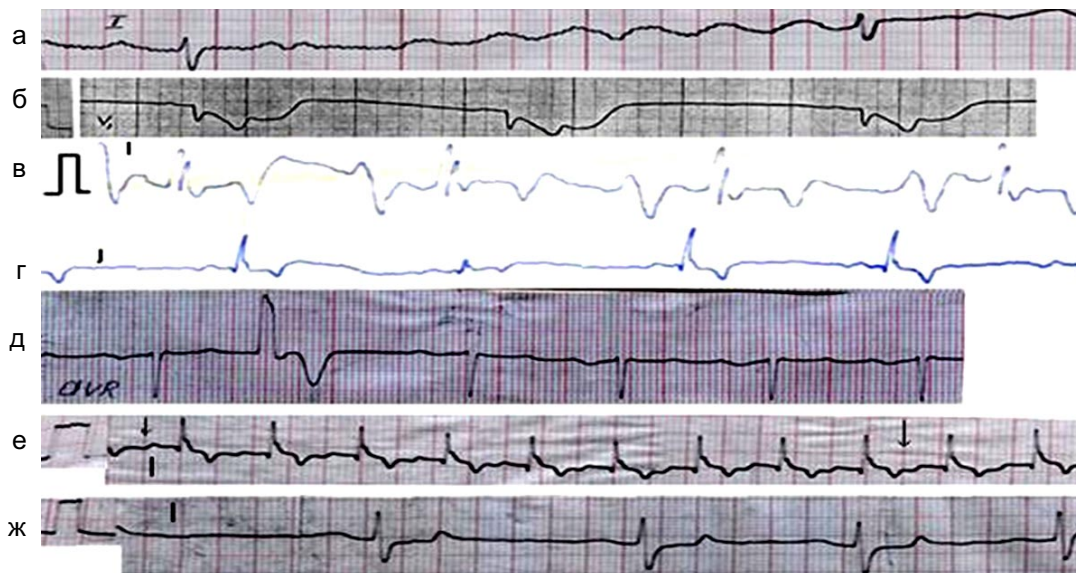


Рис. 2. Електрокардіограма хворих афалін: а – синусовий ритм, Т-двофазний, P±, тремтіння передсердь; б – вузловий ритм, QRS розширений, S-T куполоподібний, піднятий над ізолінією, злився із зубцем R, утворюючи опуклий вгору комплекс RST; в – розширений і розщеплений QRS, P±=R, T=1/2R; г – альтернація ритму, не пов'язана з ритмом дихання; д – екстрасистоли; е – дихальна аритмія відсутня, стрілкою показані вдихи; ж – T+



важко хворих тварин спостерігається екстрасистоія, альтернація ритму, зміна полярності зубців (див. рис. 2,г,д,ж). Ці фактори визначають у дельфіна серцево-судинну недостатність.

Характерними ознаками захворювання дельфінів за показниками ЕКГ є: підвищення середньої частоти серцевих скорочень за хвилину і за дихальний цикл (або її зниження при вузловому ритмі), зменшення амплітуди зубців Р, R, S і Т, збільшення тривалості інтервалів P-Q, QRS, S-T. Відмічається також виражена альтернація ритму, що не пов'язана з ритмом дихання, підвищення або зниження амплітуди окремих зубців порівняно зі здоровими самицями.

У важких випадках спостерігається зміна полярності зубців. Зазвичай такі відхилення поєднуються з відхиленнями від норми показників дихання, коли знижується тривалість дихального циклу, дихального об'єму, змінюються вентиляція та споживання кисню. У деяких дельфінів реєструється вузловий ритм, коли на ЕКГ відсутній зубець Р (див. рис. 2,б), а ритм серцевих скорочень різко знижується до 40–50 ударів за хвилину і визначається високий негативний зубець Т, за амплітудою рівний зубцю R. Зазначені зміни є свідченням серцевої патології.

Розроблені методи та результати досліджень про особливості ЕКГ здорових, хворих самиць дельфінів афалін, можливо використовувати для контролю функціонального стану серцево-судинної системи дельфінів при утриманні в умовах неволі.

## ВИСНОВКИ

1. Розроблені методи та технічні пристрої, які дають змогу реєструвати ЕКГ у дельфінів при обстеженні їх піднятими з води на сушу, знаходженні у ванні, наповненій водою, і в умовах вільного плавання у вольєрі, а наведені показники ЕКГ використовувати як базові для діагностування змін діяльності серця дельфінів і їх функціонального стану.

2. Інформативними ознаками змін діяльності серця дельфінів, характерними для хворих тварин, є: порушення ритму серцевих скорочень, наявність екстрасистол, певні зміни форми та амплітудно-частотної структури кардіокомплексів на ЕКГ, а також розрахункових показників серцевої діяльності.

3. У хворих дельфінів-самиць разом із порушеннями рухової активності та ритму дихання, підвищенням частоти серцевих скорочень, порушення серцевого ритму, певні зміни на ЕКГ форми та амплітудно-частотної структури кардіокомплексів, наявність екстрасистол є прямою ознакою патології діяльності серця та підставою для використання як системи показників в діагностуванні стану здоров'я і серцевої діяльності, зокрема у морських ссавців.

**Л.Н. Богданова, С.К. Матишева**

## ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММЫ У САМОК ЧОРНОМОРСЬКИХ ДЕЛЬФІНОВ АФАЛИН (TURSIOPS TRUNCATUS)

Разработаны методы регистрации и технические устройства для записи ЭКГ. Исследованы особенности ЭКГ здоровых и больных самок черноморских афалин. Определены отклонения, характерные для больных самок дельфинов, к числу которых относятся: нарушение ритма, изменение направленности зубцов и их полярности, наличие экстрасистол, а также изменение расчетных показателей сердечной деятельности.

**L.N. Bogdanova, S.K. Matisheva**

## FEATURES ELECTROCARDIOGRAM IN FEMALE BLACK SEA BOTTLENOSE DOLPHINS (TURSIOPS TRUNCATUS)

Methods and technical devices to record ECG are developed. There've been studied ECG traits in sexually mature Black sea bottlenose dolphin females kept in captivity. It's been shown that sick dolphins have tachycardia, heart rate disturbance, change in directivity of waves and their polarity and extrasystoles.

*Research Center of Armed Forces of Ukraine «State Oceanarium», Sevastopol*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Богданова Л. Н. Особенности биоэлектрической активности сердца морских млекопитающих в норме и при заболеваниях. – У кн.: Морські біотехнічні системи. – Севастополь: Изд-во НВЦ «ЕКОСІ-Гідрофізика», 2002, вип. 2. – С. 129–144.
2. Богданова Л. Н., Лебедев В. Г. Некоторые клинические показатели крови черноморских дельфинов – В кн.: Морфология и экология морских млекопитающих (дельфины). – М.: Наука, 1971. – С. 126–129.
3. Богданова Л. Н., Каганова Н. В., Сергиевская М. О. Динамика изменений клинических и биохимических показателей крови у отловленных черноморских афалин (*Tursiops truncatus ponticus*) на разных сроках адаптации к условиям неволи. – В кн.: Морские биотехнические системы. Биологические и технические аспекты: Тез. докл. Международ. науч.-практ. конф. – Ростов-на Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2008. – С. 13–16.
4. Галанцев В. П., Купин А. Г., Протасов В. А., Шерешков В. П. Исследование особенностей биоэлектрической активности сердца дельфина- афалины *Tursiops truncatus* //Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 1983. – **19**, № 6. – С. 560–564.
5. Галанцев В. П., Кузьмин Д. А., Купин А. Г., Шенрешков В. И. Сравнительная характеристика сердечного ритма у китообразных // Там же. – 1994. – **30**, №3. – С. 358–365.
6. Колчин С. П., Белькович В. М. Некоторые особенности функции сердца у дельфинов // Там же. – 1970. – **19**, № 4. – С. 414–417.
7. Колчинская А. З., Маньковская И. Н., Мисюра А. Г. Дыхание и кислородные режимы организма дельфинов. – К.: Наук. думка, 1980. – 332 с.
8. Черноморская афалина *Tursiops truncatus ponticus*. – М.: Наука, 1997. – С. 186–213.

*Наук.-досл. центр «Державний океанаріум»  
М-ва оборони України, Севастополь*

*Матеріал надійшов до  
редакції 01.09.2010*

І.С. Чекман, П.В. Сімонов

## Структура та функція біомембран: ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК

*Узагальнено сучасні погляди на структуру та функції біомембрани, роль ліпідного, білкового та вуглеводного її компонентів у підтриманні життєдіяльності клітини. Розглянуто сучасну модель будови біомембрани, розділеної на нанокмірки рідини, у якій ліпіди та протеїни підлягають аномальній дифузії. Увагу приділено теорії існування ліпідних рафтів – нанорозмірних мембранних доменів. Проведено аналіз літератури та наукових досліджень стосовно наноприроди іонних каналів, закономірностей впливу наночастинок на біомембрану. Показано, що дані про структуру й функції біомембрани та характер впливу на неї наночастинок є необхідними для створення нових високоефективних терапевтичних і діагностичних засобів, а також для дослідження токсикологічних властивостей нанооб'єктів. Ключові слова: біомембрана, ліпідний бішар, протеїн, дифузія, ліпідний рафт, наночастинка.*

### ВСТУП

Біомембрана є ключовим елементом існування клітини. Ця комплексна структура її оточує, визначає межі та відділяє внутрішнє середовище (цитозоль) від зовнішнього, а вміст органел – від цитозолю. Біомембрана представлена тонкою плівкою товщиною в середньому 5 нм, яка складається з ліпідних і білкових молекул, з'єднаних переважно за допомогою нековалентних зв'язків. Клітинна мембрана – це динамічна, плинна структура; більшість її молекул можуть пересуватися уздовж неї. Ліпідні молекули розташовані у вигляді подвійного шару (бішару), який надає мембрані плинних властивостей та відіграє роль майже непроникного бар'єра для багатьох розчинних у воді сполук. Багато важливих функцій виконують білки, що, пронизуючи ліпідний бішар, транспортують через мембрану специфічні молекули чи прискорюють такі мембраноасоційовані реакції, як синтез АТФ. Деякі протеїни є структурними ланками, що зв'язують цитоскелет (волокнисту актинову коміркову

© І.С. Чекман, П.В. Сімонов

структуру, зв'язану з цитозольною поверхнею біомембрани [32]) через ліпідний бішар із зовнішньоклітинною матрицею чи іншою клітиною, тоді як інші є біосенсорами, що приймають та передають хімічні сигнали у клітинне середовище. Близько 30 % білків, що закодовані у геномі тваринної клітини, є мембранними протеїнами [1].

Цікавим є факт, що біомембрани мають у основі наноструктурні ділянки, чи домени, вивчення яких стало можливим завдяки створенню нових методів дослідження та сучасної апаратури з високою роздільною здатністю.

Окремо слід звернути увагу на актуальне питання впливу наночастинок на структуру й функції біомембрани. Адже знання цього аспекту допомагає досліджувати лікувальні й токсикологічні властивості наноматеріалів, а також знаходити нові сфери їх медичного застосування.

**Біологічне значення та будова ліпідного компонента біомембрани.** Ліпідний бішар – універсальна основа структури біомембрани. Його будову можна спостерігати за

допомогою електронної мікроскопії, хоча для більш детального вивчення необхідно застосовувати рентгеноструктурний аналіз. Бішар утворюється завдяки особливим властивостям молекул ліпідів, що спричинюють їх спонтанну збірку. Ліпіди складають приблизно 50 % від маси більшості тваринних мембран, майже вся інша маса – протеїни. На 1 мкм<sup>2</sup> бішару знаходиться  $5 \cdot 10^6$  молекул ліпідів. Всі молекули амфільні – мають гідрофільну та гідрофобну частини [1].

Переважну більшість ліпідів біомембрани складають фосфоліпіди, що мають полярну групу («голівка») та 2 неполярні «хвости» – жирні кислоти, що відрізняються за довжиною (містять 14–24 вуглецевих атомів). Один з «хвостів» ненасичений, має один чи декілька цис-подвійних зв'язків, тоді як інший є насиченим. Відмінності у довжині та насиченості жирних кислот надзвичайно важливі, тому що впливають на здатність молекул фосфоліпідів упорядковуватися одна напроти одної та впливати на плинність мембрани [24].

Завдяки особливостям структури та амфільним властивостям, ліпіди формують бішар у водному середовищі. Щоб зрозуміти механізм утворення бішару, необхідно розглянути правила поведінки у воді молекул із різною розчинністю. Гідрофільні сполуки легко розчиняються у воді, бо містять заряджені групи чи незаряджені полярні групи, які можуть вступати в електростатичну взаємодію або утворювати водневі зв'язки з молекулами води. Гідрофобні сполуки, навпаки, нерозчинні у воді, бо всі, чи майже всі атоми незаряджені та неполярні, і тому не можуть створити енергетично вигідні зв'язки з молекулами розчинника. У такому випадку молекули води утворюють комірочки навколо гідрофобної сполуки, наслідком чого є збільшення вільної енергії системи, бо утворюються структури більш впорядковані, ніж оточуюча вода. Вільна енергія

зменшується, якщо гідрофобні молекули (або гідрофобні частини амфільних молекул) збираються разом таким чином, щоб залучати у процес меншу кількість молекул води [53, 70, 74].

Аналогічно, ліпідні молекули спонтанно агрегують, щоб «сховати» гідрофобні «хвости» всередину та зорієнтувати гідрофільні «голівки» до води. Існують два шляхи подібної спонтанної агрегації ліпідів: із формуванням *сферичних міцел* з «хвостами», спрямованими до центру, чи *бішару* з «хвостами», розташованими між «голівками».

Завдяки циліндричній формі, молекули фосфоліпідів спонтанно формують бішар у водному середовищі. У цьому енергетично найбільш бажаному розташуванні гідрофільні «голівки» направлені до води по обидва боки поверхні бішару, а гідрофобні «хвости» захищені від води усередині [37].

Кінці плоского бішару гідрофобні, бо мають «хвости» фосфоліпідів на боковій поверхні. Єдиний спосіб уникнути вільних кінців – самооточення з формуванням закритої комірки. Цей фундаментальний закон у створенні живої клітини напругу заснований на формі та амфільній природі молекули фосфоліпиду. Сили, що змушують фосфоліпіди утворювати бішар, також забезпечують властивість ауторепарації. Ушкодження мембрани створює вільну гідрофобну ділянку, яка контактує з водою, що є енергетично не вигідним. Тому ліпіди спонтанно перебудовуються й закривають ушкодження. Зокрема, у еукаріотних мембранах такі дефекти ліквідуються за допомогою потоку внутрішньоклітинних везикул. У плазматичній мембрані клітин ссавців домінують чотири основні фосфоліпіди: фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин та сфінгомієлін. З них тільки фосфатидилсерин має негативний заряд, тоді як інші є електронейтральними при фізіологічних значеннях рН. Завдяки негативному заряду, фосфатидилсерин, що розташований переважно у цито-

зольному моношарі мембрани, відіграє велику роль у створенні її електричного потенціалу. До складу біомембрани також входять інозитол-фосфоліпіди, які представлені у меншій кількості, але мають ключове значення у забезпеченні здатності мембрани виконувати сигнальну функцію [1].

Еукаріотні мембрани містять велику кількість холестерину – приблизно по одній молекулі на кожен молекулу фосфоліпіду. Холестерин відіграє важливу роль у підтриманні бар'єрної функції біомембрани. Гідроксильні групи орієнтуються ближче до «голівки» фосфоліпідів, а стероїдні цикли – до «хвостів», обмежуючи рухливість  $\text{CH}_2$ -груп вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів, тим самим зменшуючи проникність бішару для малих водорозчинних молекул та підвищуючи його стабільність [45].

Зовнішній шар біомембрани багатий на гліколіпіди – структури, що містять вуглеводний компонент та становлять близько 5 % усіх ліпідних молекул зовнішнього моношару. Гліколіпіди здатні до скупчення завдяки утворенню водневих зв'язків між вуглеводними ділянками та силам Ван-дер-Ваальса довгих насичених вуглеводневих ланцюгів.

Гліколіпіди захищають мембрану від дії ферментів та екстремальних значень рН, зв'язуються з лектинами та беруть участь у процесі клітинної адгезії. Заряджені гліколіпіди – гангліозиди беруть участь у створенні електричного потенціалу мембрани та регулюванні концентрацій іонів, особливо  $\text{Ca}^{2+}$ , на мембранній поверхні [1].

Окремі ліпідні молекули здатні дифундувати у бішарі. Дослідження цього явища стало можливим із створенням синтетичних бішарів: ліпосом (сферичних везикул) діаметром 25–1000 нм та «чорних мембран» – планарних бішарів, сформованих у отворі на межі двох водних комірок [5, 36, 51].

Як альтернатива «чорним мембранам» були запропоновані мембрани з підтриманим ліпідним бішаром, створені на таких

поверхнях, як скло, кремній чи золото. Перевага цих структур – механічна стабільність протягом тривалого періоду. Недолік – взаємодія елементів мембрани з поверхнею, неможливість проведення досліджень іонного транспорту та включення у бішар трансмембранних протеїнів з ділянками, що знаходяться над площиною мембрани. Вирішенням цієї проблеми стали мембрани з прив'язним ліпідним бішаром – структури, що містять синтетичні тіоліпіди, які контактують з субстратом, тоді як бішар залишається вільним з обох боків [35].

Для вимірювання руху молекул та їх частин застосовують різноманітні методи. Одна з них – маркування «голівки» спіновою міткою, наприклад нітрогрупою, що містить неподілену пару електронів, спін яких створює парамагнітний сигнал, який може бути зареєстрований електронною парамагнітною резонансною спектроскопією. Такі дослідження показують, що фосфоліпіди дуже рідко мігрують з одного моношару в інший. Цей процес, відомий як «фліп-флоп», для окремої молекули спостерігається раз на місяць. Натомість, ліпіди швидко міняються місцями з сусідніми молекулами у межах одного моношару (у середньому  $10^7$  разів за секунду). Це є причиною швидкої латеральної дифузії з коефіцієнтом  $10^{-8}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , що свідчить про здатність молекули просуватися на відстань у 2 мкм (довжина великої бактеріальної клітини) за 1 с. Дослідження також показали, що індивідуальні молекули ліпідів дуже швидко обертаються навколо своєї осі (обертальна дифузія), а їхні «хвости» здатні до згинання [69].

Подібні дослідження були проведені як на ізольованих біомембранах, так і на живих клітинах. Результати довели, що ліпідний компонент біомембрани є двовимірною рідиною, складові частини якої вільно рухаються латерально. Індивідуальні фосфоліпіди рухаються у межах свого моношару, що створює перешкоду для їх

синтезу, адже вони синтезуються у ендоплазматичному ретикулумі всередині клітини і не можуть самостійно потрапити у зовнішній шар мембрани. Ця проблема вирішується завдяки спеціальному класу зв'язаних з мембраною ферментів – фосфоліпідних транслокаторів (фліпаз), які каталізують процес «фліп-флоп» [19, 45].

Для біомембрани характерна ліпідна асиметрія, яка має велике функціональне значення та характеризується відмінностями у якісному та кількісному складі ліпідів між зовнішнім і внутрішнім моношарами бішару. Багато протеїнів зв'язуються зі специфічними ліпідними «голівками», розташованими саме у цитозольному шарі ліпідного бішару. Наприклад, протеїнкіназа С активується у відповідь на різні зовнішньоклітинні сигнали та зв'язується з цитозольною частиною плазматичної мембрани, де у великій концентрації знаходиться негативно заряджений фосфатидилсерин, необхідний для функціонування протеїнкінази С.

У інших випадках ліпідна «голівка» повинна бути попередньо модифікована для створення ділянок зв'язування з протеїном. Наприклад, фосфатидилінозитол, що знаходиться у цитозольному моношарі, модифікується ліпідними кіназами із додаванням фосфатних груп до інозитольного кільця. Надалі фосфорильовані інозитол-фосфоліпіди зв'язуються зі специфічними цитозольними протеїнами [1].

### **Структура та функції мембранних протеїнів.**

Хоча базова структура біомембрани складається з ліпідного бішару, виконання більшості її специфічних функцій неможливе без участі протеїнів. За масою відношення цих двох фракцій приблизно 1:1, хоча за кількістю молекул ліпідів у мембрані майже у 50 разів більше, ніж білків. [1].

Для протеїнів характерні різні способи зв'язування з біомембраною. Трансмембранні білки перетинають бішар у вигляді

поодинокі  $\alpha$ -спіралі, множинних  $\alpha$ -спіралей чи закрученого  $\beta$ -листа ( $\beta$ -бочки). Деякі з цих протеїнів мають ковалентно приєднаний жирнокислотний ланцюг, уведений у цитозольний ліпідний моношар. Білки іншого типу розташовані тільки по один бік мембрани. Такі протеїни можуть зв'язуватися з мембраною за допомогою амфіфільної  $\alpha$ -спіралі, що з'єднується з цитозольним моношаром гідрофобною ділянкою, через ковалентно приєднаний жирнокислотний ланцюг чи пренільну групу у цитозольному моношарі чи через олігосахаридний посередник – з фосфатидилінозитолом у зовнішньому моношарі [14, 59].

Протеїни, що з'єднуються з бішаром за допомогою нековалентних взаємодій з мембранними білками та можуть бути легко ізольовані дією розчинів з високою іонною силою чи екстремальним значенням рН, отримали назву периферичних мембранних протеїнів, на відміну від інтегральних [59].

Трансмембранні протеїни амфіфільні. Їх гідрофобні частини проходять крізь мембрану та взаємодіють з «хвостами» фосфоліпідів, а гідрофільні – знаходяться на поверхні. Гідрофобність деяких протеїнів підвищується завдяки ковалентним зв'язкам з жирними кислотами, що введені у цитозольну частину бішару [11, 14].

Більшість трансмембранних протеїнів тваринних клітин містить дисульфідні зв'язки, які відіграють важливу роль у стабілізації структури поліпептидного ланцюга чи зв'язку з іншими ланцюгами та розташовані на зовнішньому боці мембрани. У цитозольній частині бішару білки не мають дисульфідних зв'язків через відновлювальне середовище [2].

Для протеїнів не характерний перехід «фліп-флоп», однак їм властива обертальна та латеральна дифузія. Швидкість останньої вимірюється за допомогою флуоресцентного відновлення після фотознебарвлення. Метод включає маркування протеї-

нів флуоресцентною групою із наступним знебарвленням її за допомогою лазерного променя. Вимірюється час, за який прилегли забарвлені протеїни перейдуть у знебарвлену зону [40, 48]. Також для цього застосовується метод флуоресцентної кореляційної спектроскопії, у якому вимірюються та аналізуються коливання у флуоресценції, що виникають під час дифузії мічених молекул у освітлену лазерним променем ділянку об'ємом приблизно 1 фл, та з неї [4, 20].

**Глікокалікс – вуглеводні структури, що оточують біомембрану.** Поверхня еукаріотної клітини вкрита олігосахаридними ланцюгами, ковалентно з'єднаними з мембранними протеїнами (глікопротеїни) та ліпідами (гліколіпіди), а також полісахаридними ланцюгами, ковалентно з'єднаними з протеїновим ядром (протеоглікани). Ця багата на вуглеводи зона отримала назву глікокалікс. Найбільш імовірною функцією глікокаліксу є захист клітини від механічного і хімічного ушкодження та запобігання небажаним взаємодіям між протеїнами.

Олігосахаридні ланцюги глікопротеїнів і гліколіпідів відрізняються наймовірною різноманітністю завдяки розгалуженій структурі та можливості мономерів ковалентно зв'язуватися одне з одним за допомогою різних функціональних груп. Навіть 3 моносахариди, з'єднані разом, можуть формувати сотні оригінальних олігосахаридів. Різноманітність якісного й кількісного складу вуглеводів поверхні клітини забезпечує реалізацію її специфічних функцій [49].

**Нові погляди на структуру біомембрани – нанорозмірні комірки та аномальна дифузія.** Singer та Nicolson [65], спираючись на результати термодинамічних досліджень, запропонували розглядати біомембрану як двовимірну рідину, упорядковану за принципами рідинно-мозаїчної моделі. Відпо-

відно до цієї гіпотези, мембрана – це орієнтований двовимірний в'язкий розчин амфіфільних протеїнів і ліпідів, що перебувають у термодинамічній рівновазі.

Традиційна рідинно-мозаїчна модель передбачає існування протеїнів у біомембрані у площині, перпендикулярній до поверхні клітини. На сьогодні відомо, що білки здатні займати великі за розміром ектодомені на поверхні ліпідів, створюючи об'ємні перешкоди. Прикладом такої структури є АТФ-синтаза, що утворює просторові контакти та здатна до взаємодії зі сполуками поза бішаром. Останні дослідження також показали, що товщина біомембрани не є однаковою по всій довжині. Плинність ліпідів та відносно мала рухливість протеїнів є підставою для висновку, що ліпідний компонент скривлюється для «маскування» гідрофобних ділянок протеїнів, розташованих над поверхнею мембрани. Однак у окремих випадках може спостерігатись також скривлення й протеїнів [15].

Погляди на структуру біомембрани змінюються та еволюціонують із розвитком нових технологій дослідження мікро- та наноструктур. Згідно з Engelman [15], біомембрану слід розглядати як систему з фрагментарним упорядкуванням олігомерних протеїнів.

Нові експериментальні технології, що дають змогу вченим відстежувати окремі молекули чи групи молекул, набувають все більшого значення у вивченні динаміки, структури та функції клітинної мембрани. Ці технології дають дослідникам можливість спостерігати пересування, агрегацію та навіть активацію індивідуальних молекул у плазматичній мембрані живої клітини. У методі флуоресцентного відстеження окремих молекул (ФВОМ) флуоресцентний зонд (молекула протеїну) зв'язується зі сполукою-мішенню. Результат реєструється засобами флуоресцентної мікроскопії [30]. У методі відстеження окремих частинок (ВОЧ) наночастинки золота

діаметром 20–40 нм зв'язуються з певними молекулами для відстеження руху останніх у мембрані за допомогою диференціальної інтерференційно-контрастної мікроскопії чи мікроскопії методом світлого поля [30, 52].

Хоча більшість мембран характеризуються високою плинністю, останні дослідження за допомогою методу ВОЧ виявили комплекс обмежень латеральної рухливості протеїнів, що включає спрямований рух, обмежений рух та аномальну дифузію [15, 31]. Причинами обмеження є утворення великих олігомерів, зіткнення ектодоменів, взаємодії різної природи у бішарі, існування ділянок адгезії та особливості цитоскелетної структури клітини [58].

Двовимірний рідинно-мозаїчний модель біомембрани не передбачає відповіді на два важливі питання. По-перше, чому коефіцієнти дифузії для протеїнів і ліпідів у плазматичній мембрані менші, ніж у штучній мембрані чи у ліпосомах у 5–50 разів. По-друге, чому олігомери чи молекулярні комплекси дифундують значно повільніше порівняно з поодинокими мономерами. Для пояснення природи цих феноменів необхідним стало створення нової моделі структури біомембрани [30].

Результати ВОЧ показали, що дифузія компонентів мембрани не підпорядковується закону броунівського руху. Натомість спостерігається аномальна дифузія, чи стрибкоподібна. Плазматична мембрана поділена на нанокмірки мінімальною довжиною 10 нм (останні дослідження показали, що у природі розміри комірок біомембран залежно від типу живих клітин варіюють від 30 до 250 нм [32]). Всередині комірок дифузія молекул не обмежена перешкодами. Щоб перейти з однієї комірки у іншу, молекулі необхідно здійснити «стрибок», що вимагає витрат часу (рис. 1) [31].

Для пояснення принципів аномальної дифузії були запропоновані модель мембранного актинового цитоскелетного паркану (МАЦП) та модель стовпів із закріп-

лених трансмембранних протеїнів (СЗТП) (рис. 2) [52].

На базі даних ВОЧ, із використанням технології оптичного пінцета та клітин із модифікованими цитоскелетом і цитоплазматичними доменами трансмембранних протеїнів, була сформована модель МАЦП, згідно з якою цитозольні домени протеїнів стикаються з цитоскелетом, призводячи до тимчасового обмеження руху у цитоскелетній нанокмірці. Трансмембранні білки здатні перестрибувати з однієї комірки у іншу, коли між мембраною та цитоскелетом утворюється достатній простір для проходження цитозольної частини протеїну. Цей простір формується у результаті температурних коливань, коли актинові філаменти цитоскелета тимчасово дисоціюють, а трансмембранний протеїн відповідно має достатню кінетичну енергію для подолання бар'єра. Вірність моделі МАЦП підтверджена спостереженнями з використанням атомно-силової мікроскопії з тривимірною реконструкцією зображення за допомогою комп'ютерної томографії [31].

Невирішеним залишалося питання, як обмеження у русі може поширюватися на фосfolіпід у зовнішньому моношарі мембрани – без прямого контакту з цитоскелетом. Для пояснення була запропоно-

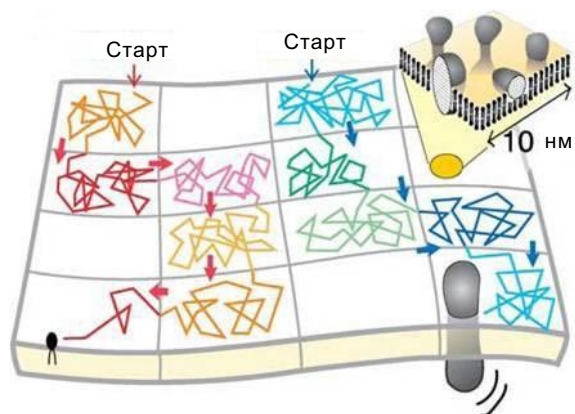


Рис. 1. Нанокмірки та аномальна дифузія у біомембрані (ліворуч – дифузія фосfolіпідів, праворуч – трансмембранного протеїну, зверху – схематичне зображення нанокмірки) [31]



вана модель СЗТП. Деякі трансмембранні протеїни (близько 15 % від загальної кількості [32]) закріплені у цитоскелеті та відіграють роль «стовпів», що обмежують рух ліпідів у бішарі [52]. Цікавим є факт, що протеїни не обов'язково мають бути з'єднані з актиновими філаментами протягом тривалого часу. Враховуючи, що молекула перетинає комірку у 10 нм в середньому за 10 мс, трансмембранний білок може виконувати роль «стовпа» протягом цього короткого проміжку часу, що є достатньою умовою [31].

Мономери мембранних молекул можуть дифундувати з однієї комірки у іншу відносно легко, тоді як молекулярні комплекси мають здійснювати «стрибок» усіма компонентами одночасно, тому швидкість їх переміщення між комірками є більш низькою. Крім того, олігомери часто зв'язуються з елементами цитоскелета, що спричинює тимчасову іммобілізацію комплексів. Цей ефект обмеження дифузії отримав назву олігомеризаційно-індукованої пастки (ОІП). У відповідь на дію зовнішньоклітинного фактора рецептор формує олігомерний комплекс, що, завдяки ефекту ОІП, залишається у комірниці, де був отриманий сигнал (рис. 3). Таке обмеження у просторі надзвичайно важливе для сигналів,

що викликають локальну реорганізацію цитоскелета чи хемотаксичні ефекти [32, 52].

Таким чином, двовимірною рідинно-мозаїчною моделлю не може пояснити явище стрибкоподібного руху молекул у мембранних структурах розмірами більше ніж 10 нм та повинна бути заміщена моделлю розділеної на нанокмірки рідини, у якій ліпіди та протеїни підлягають аномальній (стрибкоподібній) дифузії [30].

**Ліпідні рафти – нанорозмірні мембранні домени.** Більшість ліпідів біомембрани знаходиться у неупорядкованому стані. Сили Ван-дер-Ваальса між сусідніми «хвостами» жирних кислот є недостатньо вибірковими для утримання молекул одного типу разом. Однак для сфінголіпідів, що мають довгі та насичені вуглеводневі ланцюги, сили притягання є достатніми для концентрування сполук у малих доменах, що отримали назву «ліпідні рафти» й розглядаються як локальні ділянки фазового переходу – місця, щільно укомплектовані сфінголіпідами, у яких дещо втрачаються властивості мембрани як рідини [44, 63].

Поштовхом до розглядання проблеми існування ліпідних рафтів стали дослідження утворення впорядкованих ( $L_o$ ) та плинних ( $L_d$ ) фаз у модельних мембранах

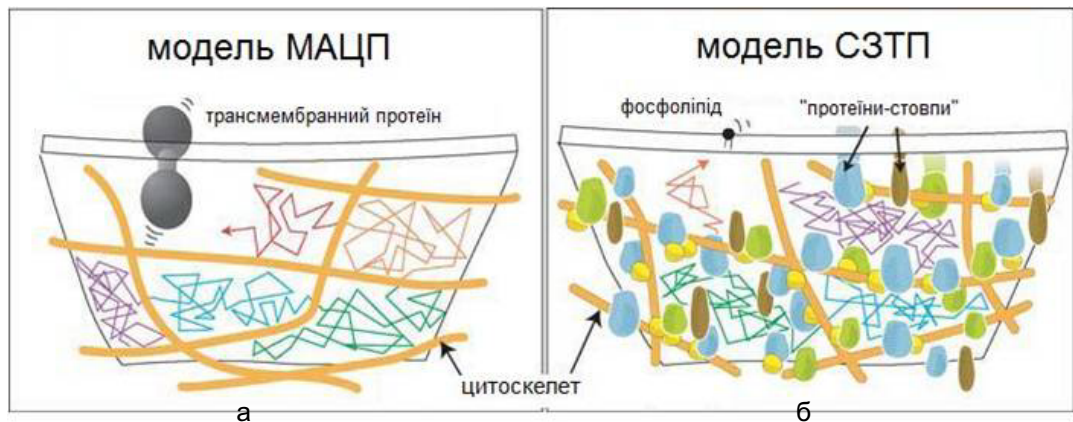


Рис. 2. Модель мембранного актинового цитоскелетного паркану (МАЦП) та модель стовпів із закріплених трансмембранних протеїнів (СЗТП) [31]: а – трансмембранний протеїн вільно дифундує у межах однієї нанокмірки, але, щоб перейти у іншу, молекула білка повинна здійснити «стрибок», що вимагає витрат енергії та часу; б – «протеїни-стовпи» обмежують рух ліпідів у бішарі, внаслідок чого спостерігається явище аномальної дифузії

під впливом холестерину на фосфоліпіди. Дійсно, холестерин впорядковує ацильні ланцюги ліпідів, що призводить до утворення фази  $l_o$ . Процесу упорядкування особливо сприяють сфінголіпіди, що мають лінійні насичені ацильні ланцюги та здатні утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки. Проведені на модельних мембранах експерименти підтвердили динамічне існування двох фаз [61], що лягло у основу «гіпотези рафтів» [62].

Біомембранам властива гетерогенність, яка пояснюється просторовим обмеженням білків та ліпідів у нанорозмірних ділянках [38]. Зміна рухливості та тимчасове скупчення молекул у цих доменах може мати прямий вплив на здатність мембрани виконувати біологічні функції та забезпечувати можливість здійснення таких клітинних процесів, як збудливість, презентація антигенів та міжклітинні взаємодії. Передбачуваний розмір цих мембранних доменів варіює від декількох одиниць до сотень нанометрів.

Коорман [27] запропонував модель мембрани, у якій частина молекул впорядковано розташована у окремих нанорозмірних доменах, що відіграють роль «мембранних організаторів», які підтримують і прискорюють утворення функціональних доменів більших розмірів у відповідь на дію зовнішніх чи внутрішніх чинників. При цьому нанорозмірні ліпідні домени розглядаються як прекурсори рафтів [39]. Відкриття нанодоменів стало можливим завдяки використанню скануючої ближньопольової оптичної мікроскопії [27].

Ліпідні рафти більш щільні, ніж інші ділянки бішару, та є місцем накопичення певних мембранних білків, що уможлиблює їх функціонування у комплексі для перетворення сигналів зовнішнього середовища у внутрішньоклітинну відповідь, а також для участі у процесах екзо- та ендоцитозу, клітинної адгезії та мембранного транспорту. Ліпіди одного моношару рухаються незалежно від ліпідів іншого. Однак у рафтах молекули переміщуються узгоджено у обох

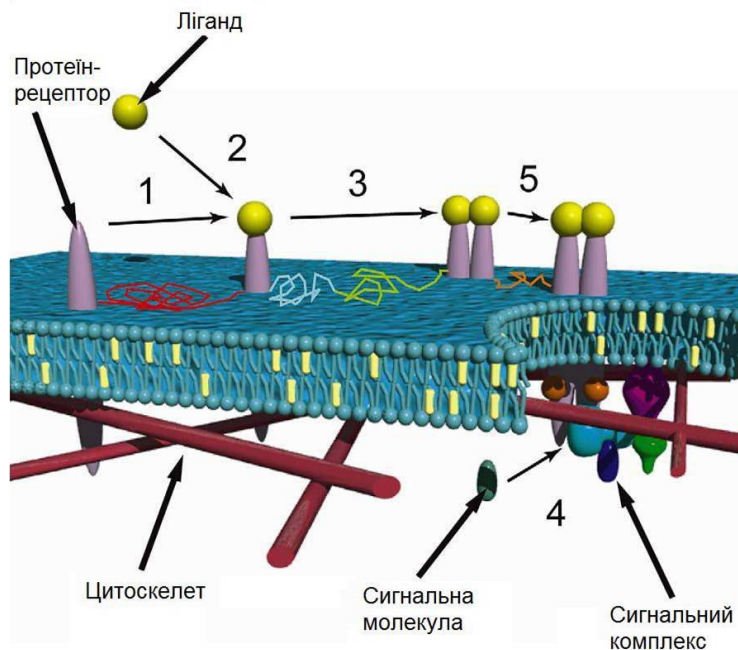


Рис. 3. Олігомеризаційно-індукована пастка. Протеїн-рецептор дифундує у біомембрані (1), реагує з лігандом (2); утворюється олігомерний комплекс (3). Цитозольні сигнальні молекули (4) разом із олігомером формують сигнальний комплекс (5) [52]

моношарах завдяки взаємодії протилежно розташованих вуглеводневих ланцюгів сфінголіпідів [21, 43, 44, 57, 64].

Коорпан [27] була запропонована модель організації клітинної мембрани, у якій у неактивному стані малі ліпідні (рафтові) та протеїнові домени співіснують з окремими мономерами. При активації формуються більші протеїнові домени, стабілізовані ліпідними рафтами (рис. 4).

Плазматична мембрана тваринних клітин містить велику кількість багатих на сфінголіпідів та холестерин ліпідних рафтів, розмір яких залишається предметом дискусій: деякі автори вважають його рівним 15–44 нм [44], інші – 30–250 нм [32]. Причиною цього є відсутність серед вчених світу загальноприйнятих єдиних методів дослідження рафтів і загальних визначень [12]. Відкритим залишається питання, що саме називати рафтами – «мембранні організатори» чи більші активовані функціональні домени, а також, чи існують ліпідні рафти у неактивному стані [27].

#### Біологічні наноканали та нанофлюїдика.

У нормі ліпідний бішар проникний лише для неполярних незаряджених молекул малого розміру. Проходженню гідрофільних і заряджених молекул перешкоджає гідрофобний, діелектричний бар'єр, тобто біомембрана виступає у ролі електричного ізолятора. Для транспортування іонів через

мембрану остання забезпечена спеціалізованими трансмембранними протеїнами – іонними каналами [35, 74]. Деякі з цих каналів, так звані «канали витоку», дають змогу іонам переміщуватися у клітину чи з неї за градієнтом концентрації; інші відіграють більш активну роль та діють як ворітний механізм, що контролює іонні потоки. Протеїни іонних каналів створюють у біомембрані пори, що уможливорює рух іонів у відповідь на різноманітні подразники, серед яких – дія хімічних лігандів, зміни мембранного потенціалу, температури та чинники механічного впливу. Зміни у іонному розподілі можуть у свою чергу спричинювати зміни у мембранному потенціалі та, якщо це іони кальцію, безпосередньо активувати різні внутрішньоклітинні сигнальні каскади. Генеровані іонними каналами сигнали є одними з найшвидших серед зареєстрованих у біосистемах. Іонний потік крізь пору може сягати значень  $10^9$  іон/с [8].

Іонні канали характеризуються високою вибірковістю дії, що можна спостерігати на прикладі ворітних каналів. При мембранному потенціалі спокою вони повністю зачинені та непроникні для потоку іонів. Тим не менш, при зміні мембранного потенціалу, взаємодії з певним лігандом чи під дією іншого фактора, канал може відкритися. Таким чином, існують дві основні групи ворітних каналів – потенціал- та лігандзалежні [35].

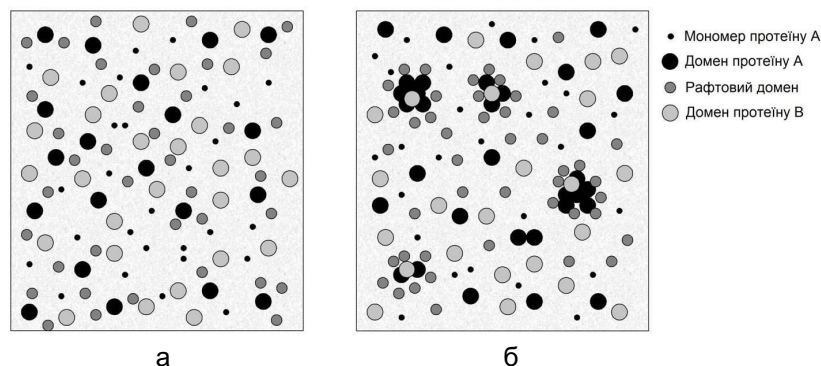


Рис. 4. Модель організації клітинної мембрани, запропонована Коорпан [27]: а – неактивний стан, б – активний стан

Біологічні іонні канали доцільно розглядати як наповнені водою нанорозмірні пори, сформовані молекулами протеїнів у біомембрані. Просторове обмеження рідини у нанопорі призводить до появи нових властивостей, адже розміри пор наближаються до типових молекулярних величин та довжини Дебая – відстані, на яку поширюється дія електричного поля окремого заряду в нейтральному середовищі, що складається з позитивно та негативно заряджених частинок. Довжина Дебая залежить від концентрації заряджених частинок, діелектричної сталої та абсолютної температури. Феномен зміни властивостей рідини у нанорозмірних каналах є об'єктом великого наукового інтересу, адже лежить у основі біологічних процесів, що відбуваються у природних наноканалах біомембрани [29]. Дослідження цього феномену – завдання нанофлюїдики – нової науки, що вивчає властивості рідин у нанорозмірних структурах [6, 16]. Детальне вивчення цих властивостей допоможе зрозуміти наноприроду процесів клітинного гомеостазу та передачі сигналів у нервовій та м'язовій тканинах, що регулюються іонними наноканалами [16].

Нанофлюїдика досліджує декілька феноменів, що виникають у нанорозмірних рідинних системах:

1. *Феномен поверхневої енергії.* У макросистемах з ламінарним потоком рідини прийнято вважати, що швидкість потоку граничного шару рідини дорівнює нулю. У наноканалах опір рідини біля поверхні зменшується, внаслідок чого спостерігається «ефект ковзання» – рідина має відмінну від нуля швидкість переміщення. Ковзання найбільш характерне для рідин біля гідрофобних жорстких поверхонь. Також проявом феномена є створення від'ємного тиску рідини у наноканалі [71].

2. *Феномен надгідрофобності, або «лотос-ефект».* Значна шорсткість поверхні наноканалів спричинює виникнення «надгідрофобних» властивостей. У природі цей

ефект можна спостерігати, коли краплі дощу скочуються по гідрофобній поверхні листка лотоса, очищуючи його від частинок пилу та мікроорганізмів [13].

3. *Феномен зсуву.* Зростання сил зсуву у нанорозмірній рідині уможливорює розтягування та фрагментацію молекул полімерів, що використовується у діагностичних та інших дослідних цілях [13].

4. *Феномен електричного подвійного шару.* Внаслідок наближення значення радіуса наноканалів до довжини Дебая, у останніх спостерігається явище накладання електричних подвійних шарів поверхонь. Це призводить до значного збільшення електропровідності каналу. Іони, що мають однойменний з внутрішньою поверхнею каналу заряд, будуть видалені з нього. Наноканал натомість заповниться іонами протилежного заряду. Наслідком накладання електричних подвійних шарів і підвищення концентрації останніх є підвищення осмотичного та гідростатичного тиску у наноканалах. У нирках цей феномен лежить у основі напівпроникності базальної мембрани нефронів – не дає змоги негативно зарядженим молекулам альбуміну переходити з крові у первинну сечу, бо базальна мембрана нефрону несе негативний заряд. Феномен електричного подвійного шару знайшов практичне використання у синтетичних мембранах, заряд поверхні яких може штучно змінюватися протягом експерименту, що дає можливість застосовувати пристрої як нанофільтри [60].

5. *Феномен розміру.* Розмір молекул та об'ємні сили відштовхування на нанорозмірному рівні спричинюють виникнення ефекту ексклюзії – різної здатності речовин проникати у пори носія, що покладено в основу розділення сполук методом ексклюзійної хроматографії. У природі феномен розміру має значення у функціонуванні водних наноканалів – аквапоринів, що транспортують воду, але є непроникними для високомолекулярних сполук та елект-

ролітів. Завдяки водневим зв'язкам, молекули води проходять через вузький просвіт каналу у вигляді неперервного потоку товщиною в одну молекулу [9]. Створюються умови, згідно з якими електроліти для проходження через наноканал повинні позбутися власної водної оболонки, що є енергетично не вигідним.

6. *Феномен ентропії*. Природні системи прагнуть до збільшення ентропії – збільшення ймовірних станів. Наприклад, ДНК має значно більше ймовірних станів у згорнутому положенні, ніж у розгорнутому. Тому для збільшення ентропії, молекула буде займати великі порожнини поверхні, а не заповнювати малі. Цей феномен знайшов застосування у «пастках ентропії», що використовуються для розділення молекул ДНК за довжиною [68].

7. *Феномен молекулярної структури*. Для нанофлюїдики важливим є врахування взаємодій на рівні окремих молекул системи. Наприклад, для аквапоринів ще однією причиною непроникності для заряджених частинок, зокрема протонів, є існування ароматично-аргінінового селективного фільтра – позитивно заряджений аргінін не дає протонам надходити у наноканал [10].

Крім теоретичних досліджень, нанофлюїдика нині біотехнологічно застосовується у створенні «лабораторій на чипі» – високочутливих аналітичних засобів, що здатні ізолювати та досліджувати окремі макромолекули [6]. Практичне використання знайшов перемикач іонних каналів – біосенсор, що містить іонні канали граміцидину А. Граміцидиновий канал, що містить пору діаметром 0,4 нм та довжиною 2,8 нм, хаотично переміщується у ліпідній мембрані, отже, відіграє роль динамічного нанобіосенсору. Перемикач іонних каналів забезпечує швидке виявлення низько- та високомолекулярних сполук. Сигналом при виявленні аналіту є реакція зі специфічними антитілами, що перекривають транспорт іонів, чи «молекулярними пробками», які блокують каналъну

пору. Перемикач іонних каналів застосовується у діагностиці, зокрема для швидкого виявлення вірусу грипу А у біологічному матеріалі [29].

Для імітації процесів іонного транспорту у біомембранах розроблені штучні наноканали, що дало змогу пришвидшити розвиток наномашин-біосенсорів та засобів нанофлюїдики. Ідеальним вибором для досліджень з нанофлюїдики стали вуглецеві нанотрубки, що хімічно інертні та мають просту структуру; крім цього, довжина й діаметр нанотрубок можуть бути легко модифікованими. Вибірковість іонного транспорту у штучних наноканалах регулюється змінами рН та температури [16, 23].

**Закономірності впливу наночастинок на структуру та функції біомембрани.** Здобуття глибоких та всебічних знань у сфері взаємодії наночастинок з біологічними системами, зокрема з біомембраною, є головним завданням у визначенні лікувальних і токсикологічних їх властивостей та напрямків потенційного застосування як медикаментів і засобів доставки активних речовин [34].

Зацікавленість вчених цим питанням підтверджується проведенням експериментальних досліджень [22, 54, 55] та побудовою комп'ютерних моделей [17, 46] вивчення різних аспектів взаємодії компонентів біомембрани та наночастинок; зокрема, велику увагу приділено їх гідрофобному ефекту.

Hong та співавт. [22] визначили, що незаряджені («гідрофобні») дендримери абсорбуються ліпідним бішаром, тоді як заряджені спричинюють виникнення отворів у мембрані. Дендримери з кінцевими первинними аміногрупами у нейтральному середовищі протонуються, утворюючи катіонний полімер. Такі структури можуть вступати у електростатичну взаємодію з біомембраною, в результаті чого у останній утворюються отвори діаметром 15–40 нм, порушується цілісність. Чим більшу кіль-

кість первинних аміногруп містить дендример, тим вища густина заряду його поверхні, а, отже, сильніший руйнівний вплив на біомембрану. Після видалення розчину дендримерів мембранна структура протягом 2 год може відновитися завдяки процесам ауторепарації. Але у концентраціях більше ніж 500 нмоль/л дендримери-полікатиони спричиняють достатньо масивну дендропорацію (утворення отворів), що призводить до загибелі клітини [22].

Дендримери з термінальними ацетамідними групами не формують отворів, бо не утворюють зарядженого полімеру. Для проникнення у клітину такі дендримери необхідно функціоналізувати залишком фолієвої кислоти для взаємодії з фолат-рецепторами на поверхні мембрани та надходження у клітину за допомогою ендцитозу [22, 33].

Qiao та співавт. [46] дослідили вплив гідрофобності фулеренів на їх поведінку у біомембрані. Тоді як гідрофобний первинний (нефункціоналізований)  $C_{60}$ -фулерен може проникати крізь бішар, його гідрофільні похідні здатні лише адсорбуватися на поверхні. Первинний фулерен при проникненні у мембрану збільшує відстань між «голівками» ліпідів у місці проходження. Це надає більшим за розмірами молекулам можливість проникати у клітину та порушувати цілісність мембрани. Опосередкований механічний вплив на проникність мембрани доповнюється біохімічним механізмом ушкодження – фулерени здатні спричинювати запуск процесів перекисного окиснення ліпідів. Гідрофільні похідні  $C_{60}$  сприяють ущільненню «голівок» ліпідів, що пояснює їх низьку токсичність порівняно з первинним фулереном. Дослідження Kraszewski та співавт. [28] показали, що первинні фулерени здатні зв'язуватися з різними ділянками калієвих каналів біомембрани та діяти як блокатори чи модулятори, спричиняючи токсичні ефекти.

За допомогою методів «крупнозернис-

тої» молекулярної динаміки Li та співавт. [34] продемонстрували механізм взаємодії наночастинок різної гідрофобності з біомембраною. У експерименті були використані гідрофобні та напівгідрофільні частинки діаметром 10 нм. Для визначення можливості їх проникнення крізь мембрану були обчислені профілі вільної енергії. Також були досліджені флуктуаційні ефекти як відображення впливу наночастинок на структуру та цілісність мембрани.

У експерименті з гідрофобною наночастинкою остання послідовно проникала у мембрану, розсовуючи ліпіди та повністю заповнюючи проміжок між ними, і зупинилась у центральній ділянці бішару. Протягом усього експерименту жодна молекула води не проходила крізь ліпідний бішар, що свідчить про збереження мембранної цілісності. Отже, мембрана стає більш щільною, але нових отворів не утворюється [34].

У разі напівгідрофільної наночастинки остання не проникала усередину бішару, але адсорбувалася на поверхні [34]. Ці результати були підтверджені у експерименті, де наночастинки золота, вкриті гідрофільною оболонкою, не проникали за допомогою пасивного транспорту через фосfolіпідні мембрани [3]. Тим не менш, дослідження свідчать, що наночастинки можуть потрапляти у клітину через ендцитоз з формуванням ліпідної транспортної везикули [50].

При адсорбції на поверхні чи проникненні у мембрану наночастинки можуть змінювати такі її макроскопічні властивості, як поверхневий натяг, що у свою чергу може вплинути на функції біомембрани, наприклад, на поділ клітин [34].

Крім гідрофобного ефекту важливу роль у взаємодії з біомембраною також відіграє розмір частинок. Roiter та співавт. [54, 55] провели дослідження впливу на ліпідний бішар полярних наночастинок кремнію різних розмірів. Згідно з отриманими результатами, частинки розміром менше



ніж 1,2 нм не впливали на структуру мембрани. Наночастинки розміром 1,2–22 нм утворювали пори у бішарі. Цей факт пояснювався тим, що наявність гідрофільних наночастинок у біомембрані є термодинамічно невигідною. Щоб ізолювати гідрофобний компонент від полярної частинки бішар був вимушений утворювати пори. Також виявилось, що вплив наночастинок на мембрану залежить від кривизни поверхні нанооб'єктів. Існує критичний розмір частинок, що становить 22 нм для мембрани товщиною 5 нм, при перевищенні якого співвідношення енергії адгезії та пружної деформації ліпідного бішару зумовлює «обгортання» наночастинок мембраною (рис. 5).

Нині увагу вчених світу привертають нанометали – антибактеріальні лікарські засоби нового покоління. Важливим є вивчення впливу цих наноматеріалів на прокаріотні біомембрани – для встановлення механізму протимікробної дії та на еукаріотні біомембрани – для дослідження та оцінки токсичності. Одним з найбільш перспективних антибактеріальних агентів є наносрібло. Достеменний механізм протимікробної дії наночастинок срібла досі не відомий. Нанорозмірні частинки у розчині здатні вивільняти деяку кількість іонів, з чим

може бути пов'язана їх біологічна дія [42].

Завдяки дисоціації великої кількості карбоксильних та фосфатних функціональних груп мембрани при фізіологічних значеннях рН, поверхня бактеріальних та спорових клітин негативно заряджена. Протилежні заряди бактерії та наночастинки зумовлюють накопичення останніх на поверхні мембрани внаслідок електростатичних взаємодій [67]. Але електростатичні взаємодії не в усіх випадках відіграють ключову роль у адгезії частинок на поверхні біомембрани, адже наночастинки можуть бути заряджені негативно [25].

Цікавими є дослідження Wang та співавт. [73], результати яких допомагають встановити зв'язок між видом заряду наночастинок і локальними змінами у щільності фосфоліпідів біомембрани. Цей феномен був досліджений при дії частинок на «голівки» фосфатидилхоліну у мембрані, що закінчуються електричним диполем  $P^-N^+$ . Аніонні наночастинки взаємодіяли з  $N^+$ , спричинюючи місцеве підвищення щільності ліпідів, тоді як позитивно заряджені взаємодіяли з  $P^-$ , зменшуючи щільність (рис. 6). Таким чином, заряджені наночастинки сприяли виникненню ділянок локального фазового переходу у біомембрані.

Після адгезії на поверхні біомембрани

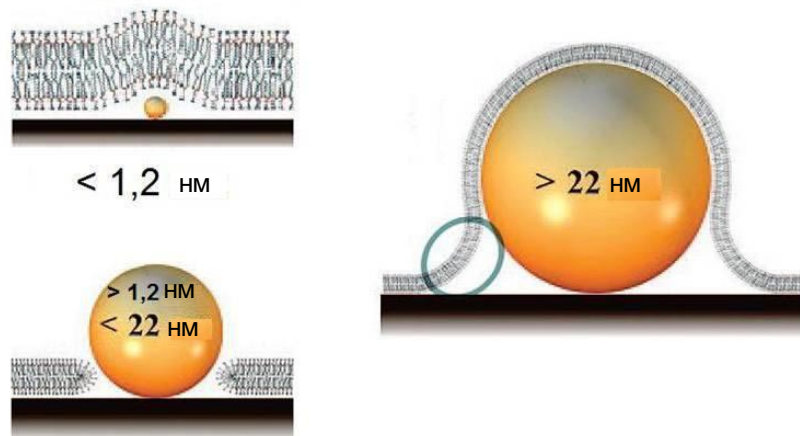


Рис. 5. Вплив наночастинок кремнію різного розміру на цілісність і форму ліпідного бішару: частинки розміром менше ніж 1,2 нм не впливають на структуру, розміром 1,2–22 нм – утворюють пори, розміром більше ніж 22 нм – зумовлюють викривлення бішару [54]

наночастинки срібла зв'язуються з сірко-вмісними та іншими протеїнами мембрани, призводячи до їх денатурації [41, 47]. Порушення морфології мембрани під дією срібла може значно підвищити проникність, призводячи до неконтрольованого транспорту сполук через мембрану і, в решті-решт, до смерті клітини [41, 42]. Аналіз за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії довів факт утворення частинками наносрібла «пор» у біомембрані [66].

Взаємодіючи з протеїнами мембрани, наночастинки срібла порушують функціонування дихального ланцюга бактерії [7, 42, 47], а також внаслідок інактивації антиоксидантних ферментів, запускають утворення вільних радикалів та наступне перекисне ушкодження мембрани [25].

Токсичні властивості наночастинок срібла були досліджені на стовбурових клітинах мишей. Результати показали, що наносрібло має більший токсичний вплив на метаболічні процеси у еукаріотній клітині, менший – на біомембрану [7]. Також

дослідження показали, що чисті наночастинки срібла більш токсичні для еукаріотних клітин, ніж функціоналізовані (нанорозмірні частинки тіопронін-срібло; вкриті шаром бичачого сироваткового альбуміну наночастинки сплаву срібло-платина; наночастинки срібла, захищені натрію поліглутаматом). Це підтримує ідею, що токсичність частинок пов'язана з наявністю відкритих металічних поверхонь, тоді як захищені органічним шаром частинки менш токсичні. Виключення становлять лише наночастинки срібла, функціоналізовані крохмалем, що призводять до порушення функцій мітохондрій, індукції процесів перекисного окиснення ліпідів, ушкодження ДНК та зупинки клітинного циклу [26]. Вплив хімічних властивостей поверхні на токсичність наночастинок також досліджували Wagner та співавт. [72]. У експерименті були застосовані частинки алюмінію та алюмінію оксиду однакових розмірів. Результати показали, що алюміній виявив значно більшу токсич-

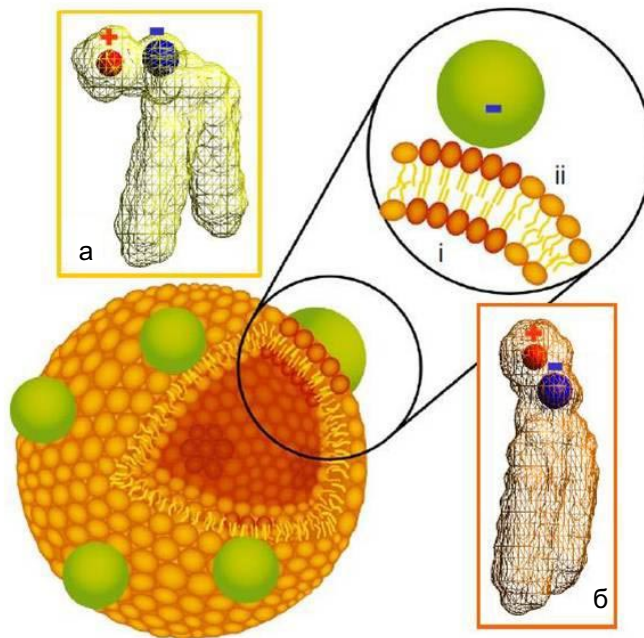


Рис. 6. Зв'язок між видом заряду наночастинок та локальними змінами у щільності фосфоліпідів біомембрани: а – просторова орієнтація молекули фосфатидилхоліну при взаємодії з катіонною наночастинкою; б – з аніонною наночастинкою; і – цитозольна поверхня мембрани; ii – зовнішня поверхня мембрани [73]



ність порівняно з оксидом. Автори дійшли до висновку, що цитотоксичність наночастинок алюмінію безпосередньо залежить від хімічної їх будови – покриття поверхні частинок киснем оксидів зменшувало токсичні ефекти.

Деякі автори вважають, що наночастинки срібла не мають прямого впливу на протеїни біомембрани. Той факт, що антибактеріальна активність наноструктурованого срібла перевищує активність срібла нітрату пояснюється здатністю наносрібла поступово та протягом тривалого часу постійно вивільняти іони срібла у середовище [18, 56].

Отже, наночастинки можуть впливати на такі властивості ліпідного бішару, як цілісність, локальна щільність ліпідів та поверхневий натяг. Але й мембрана, як складна комплексна структура, здатна самостійно адаптуватися до зовнішнього впливу завдяки природним засобам ауторепації [34].

## ВИСНОВКИ

Біомембрана – одна з найважливіших складових живої клітини. Структурною основою біомембрани є ліпідний бішар, що забезпечує цілісність клітини завдяки характерній будові та амфіфільним властивостям компонентів та захищає внутрішній вміст клітини від дії факторів зовнішнього середовища. Важливим компонентом мембрани є білкова складова, що забезпечує виконання сигнальної, транспортної та каталітичної функції.

Погляди на структуру та функції біомембрани еволюціонували разом із розвитком нових засобів та методів дослідження. Відомо, що компонентам мембрани властива аномальна дифузія. Плазматична мембрана поділена на комірки мінімального розміру 10 нм. Для переходу з однієї комірки у іншу молекули повинні здійснити «стрибок». Для пояснення феномену аномальної дифузії були запропоновані модель

мембранного актинового цитоскелетного паркану та модель стовпів із закріплених трансмембранних протеїнів. Отже, нині біомембрана розглядається як розділена на нанокмірки рідина, у якій ліпіди та протеїни підлягають аномальній (стрибокподібній) дифузії.

Біомембранам властива гетерогенність, що пояснюється просторовим обмеженням білків та ліпідів у нанорозмірних ділянках. Зміна рухливості та тимчасове скупчення молекул у цих доменах – ліпідних рафтах – може мати прямий вплив на можливість здійснення таких клітинних процесів, як збудливість, презентація антигенів та міжклітинні взаємодії. Ліпідні рафти розглядаються як нанорозмірні локальні ділянки фазового переходу – місця, щільно укомплектовані сфінголіпідами, у яких дещо втрачаються властивості мембрани як рідини. Ліпідні рафти є місцем накопичення певних мембранних білків, що уможливує їх функціонування у комплексі для перетворення сигналів зовнішнього середовища у внутрішньоклітинну відповідь, а також для участі у процесах екзота-ендоцитозу, клітинної адгезії та мембранного транспорту.

У нормі ліпідний бішар непроникний для гідрофільних та заряджених молекул, для транспортування яких існують спеціалізовані трансмембранні протеїни – іонні канали. Біологічні іонні канали доцільно розглядати як наповнені водою нанорозмірні пори. Просторове обмеження рідини у нанопорі призводить до появи нових властивостей. Феномен зміни властивостей рідини у нанорозмірних каналах є об'єктом великого наукового інтересу, адже лежить у основі біологічних процесів, що відбуваються у природних наноканалах біомембрани. Дослідження даного феномену – завдання нанофлюїдики – нової науки, що вивчає властивості рідин у нанорозмірних структурах. Нанофлюїдика знаходить біотехнологічне застосування у створенні «лабораторій на чипі» – високочутливих аналі-

тичних засобів, що здатні ізолювати та досліджувати окремі макромолекули.

Здобуття глибоких і всебічних знань у сфері взаємодії наночастинок з біологічними системами, зокрема з біомембраною, є важливим завданням при визначенні цитотоксичності наночастинок та напрямків їх потенційного застосування як медикаментів та засобів доставки активних речовин. Специфіка взаємодії наночастинок з біомембраною визначається їх природою, їх розміром, площею вільної поверхні, наявністю покриттів та гідрофобним ефектом.

Цікавим є дослідження принципів взаємодії компонентів біомембрани з нанометалами, що є перспективними антибактеріальними агентами, а також застосовуються у діагностиці захворювань та як засоби терапевтичної доставки активних речовин.

Вичерпні знання зі структури та функцій біомембрани як наноструктури, а також дані щодо впливу на неї наночастинок допоможуть достеменно дослідити її природу та створити нові високоефективні фармакотерапевтичні та діагностичні засоби, а також виявити токсикологічні властивості наноматеріалів.

**И.С. Чекман, П.В. Симонов**

### **СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ БИОМЕМБРАН: ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ**

Обобщены современные взгляды на структуру и функции биомембраны, роли липидного, белкового и углеводного ее компонентов в поддержании жизнедеятельности клетки. Рассмотрена современная модель строения биомембраны – разделенной на наночастицы жидкости, в которой липиды и протеины подвержены аномальной диффузии. Внимание уделено теории существования липидных рафтов – наноразмерных мембранных доменов. Проведен анализ литературы и научных исследований касательно наноприроды ионных каналов, закономерностей влияния наночастиц на биомембрану. Показано, что данные о структуре, функциях биомембраны и характер влияния на нее наночастиц являются необходимыми для создания новых высокоэффективных терапевтических и диагностических средств, а также для исследования токсикологических свойств нанобъектов.

Ключевые слова: биомембрана, липидный бислой, протеин, диффузия, липидный рафт, наночастица.

**I.S. Chekman, P.V. Simonov**

### **STRUCTURE AND FUNCTION OF BIOMEMBRANES: INFLUENCE OF NANOPARTICLES**

The up-to-date view on a biomembrane structure and functions and the role of lipid, protein and carbohydrate biomembrane components in maintenance of a cell vital activity is summarized in this article. The up-to-date model of a biomembrane structure as a nanocompartmentalized fluid in which lipids and proteins undergo anomalous diffusion is examined. An attention is paid to lipid rafts existence as nanoscaled membrane domains. The analysis of literature and research results concerning the nanonature of ion channels and the mechanism of influence of nanoparticles on a biomembrane is carried out. It is shown that the data on structure and functions of a biomembrane and the nature of influence of nanoparticles on it is necessary to create new high-performance therapeutic agents, diagnostic tools and to study nanoobjects' toxicological properties.

Key words: biomembrane, lipid bilayer, protein, diffusion, lipid raft, nanoparticle.

*O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. 5th ed. – New York: Garland Publishing, 2008. – 1601 p.
2. Arolas J.L., Aviles F.X., Chang J.Y., Ventura S. Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle // Trends. Biochem. Sci. – 2006. – **31**, №5. – P. 292–301.
3. Banerji S.K., Hayes M.A. Examination of nonendocytic bulk transport of nanoparticles across phospholipid membranes // Langmuir. – 2007. – **23**, №6. – P. 3305–3313.
4. Bates I.R., Wiseman P.W., Hanrahan J.W. Investigating membrane protein dynamics in living cells // Biochem. Cell. Biol. – 2006. – **84**, №6. – P. 825–831.
5. Beerlink A., Mell M., Tolkiehn M., Salditt T. Hard x-ray phase contrast imaging of black lipid membranes // Appl. Phys. Lett. – 2009. – **95**. – P. 1–3.
6. Bocquet L., Charlaix E. Nanofluidics, from bulk to interfaces // Chem. Soc. Rev. – 2010. – **39**, №3. – P. 1073–1095.
7. Bozhevolnyi S.I. Silver nanoparticles. – Aalborg: Aalborg University, Faculty of physics and nanotechnology, 2005. – 81 p.
8. Bradshaw R.A., Dennis E.A. Handbook of cell signaling. 2nd edition. – Oxford: Acad. Press, 2009. – P. 201–207.

9. Clapham D.E. Symmetry, selectivity, and the 2003 Nobel Prize // *Cell*. – 2003. – **115**, №6. – P. 641–646.
10. De Groot B.L., Grubmuller H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF // *Science*. – 2001. – **294**, №5550. – P. 2353–2357.
11. Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2003. – **4**, №5. – P. 414–418.
12. Eggeling C., Ringemann C., Medda R., Schwarzmann G., Sandhoff K., Polyakova S., Belov V.N., Hein B., Middendorff C., Schonle A., Hell S.W. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell // *Nature*. – 2009. – **457**, №7233. – P. 1159–1162.
13. Eijkel J.C.T., Berg A. Nanofluidics: what is it and what can we expect from it? // *Microfluidics and Nanofluidics*. – 2005. – **1**, №3. – P. 249–267.
14. Elofsson A., Heijne G. Membrane protein structure: prediction versus reality // *Annu. Rev. Biochem.* – 2007. – **76**. – P. 125–140.
15. Engelman D.M. Membranes are more mosaic than fluid // *Nature*. – 2005. – **438**, №7068. – P. 578–580.
16. Fornasiero F., In J.B., Kim S., Park H.G., Wang Y., Grigoropoulos C.P., Noy A., Bakajin O. pH-tunable ion selectivity in carbon nanotube pores // *Langmuir*. – 2010. – **26**, №18. – P. 14848–14853.
17. Ginzburg V.V., Balijepalli S. Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes // *Nano Lett.* – 2007. – **7**, №12. – P. 3716–3722.
18. Gogoi S.K., Gopinath P., Paul A., Ramesh A., Ghosh S.S., Chattopadhyay A. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles // *Langmuir*. – 2006. – **22**, №22. – P. 9322–9328.
19. Gurtovenko A.A., Onike O.I., Anwar J. Chemically induced phospholipid translocation across biological membranes // *Langmuir*. – 2008. – **24**, №17. – P. 9656–9660.
20. Hausteil E., Schwille P. Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2007. – **36**. – P. 151–169.
21. Helms J.B., Zurzolo C. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking // *Traffic*. – 2004. – **5**, №4. – P. 247–254.
22. Hong S., Bielinska A.U., Mecke A., Keszlner B., Beals J.L., Shi X., Balogh L., Orr B.G., Baker J.R., Holl M.M.B. Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – **15**, №4. – P. 774–782.
23. Hou X., Yang F., Li L., Song Y., Jiang L., Zhu D. A biomimetic asymmetric responsive single nanochannel // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2010. – **132**, №33. – P. 11736–11742.
24. Kik R.A. Lipid bilayers and interfaces // Thesis Wageningen University, the Netherlands. – 2007. – P. 1–169.
25. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C., Kim Y., Lee Y., Jeong D.H., Cho M. Antimicrobial effects of silver nanoparticles // *Nanomedicine*. – 2007. – **3**, №1. – P. 95–101.
26. Klippstein R., Fernandez-Montesinos R., Castillo P.M., Zaderenko A.P., Pozo D. Silver nanoparticles. – Vienna: IN-TECH Books, 2010. – P. 309–324.
27. Koopman M. Nanoscale cell membrane organization: a near-field optical view. – Enschede: University of Twente, 2006. – 142 p.
28. Kraszewski S., Tarek M., Treptow W., Ramseyer C. Affinity of C60 neat fullerenes with membrane proteins: a computational study on potassium channels // *ACS Nano*. – 2010. – **4**, №7. – P. 4158–4164.
29. Krishnamurthy V., Monfared S., Cornell B. Ion channel biosensors – part I: construction, operation, and clinical studies // *IEEE Transactions on Nanotechnology*. – 2010. – **9**, №3. – P. 313–322.
30. Kusumi A., Ike H., Nakada C., Murase K., Fujiwara T. Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules // *Semin. Immunol.* – 2005. – **17**, №1. – P. 3–21.
31. Kusumi A., Nakada C., Ritchie K., Murase K., Suzuki K., Murakoshi H., Kasai R.S., Kondo J., Fujiwara T. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2005. – **34**. – P. 351–378.
32. Kusumi A., Shirai Y.M., Koyama-Honda I., Suzuki K., Fujiwara T. Hierarchical organization of the plasma membrane: investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy // *FEBS Lett.* – 2010. – **584**, №9. – P. 1814–1823.
33. Leroueil P.R., Hong S., Mecke A., Baker J.R., Orr B.G., Holl M.M.B. Nanoparticle interaction with biological membranes: does nanotechnology present a Janus face? // *Acc. Chem. Res.* – 2007. – **40**, №5. – P. 335–342.
34. Li Y., Chen X., Gu N. Computational investigation of interaction between nanoparticles and membranes: hydrophobic/hydrophilic effect // *J. Phys. Chem. B*. – 2008. – **112**, №51. – P. 16647–16653.
35. Li-Fries J. Ion channels in mixed tethered Bilayer lipid membranes. – In: Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2007. – P. 6–12.
36. Lipowsky R., Sackmann E. Handbook of biological physics. – Elsevier Science B.V., 1995. – P. 491–519.
37. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L., Darnell J. Molecular cell biology. 5th ed. – New York: W. H. Freeman, 2003. – 973 p.

38. Maxfield F.R. Plasma membrane microdomains // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2002. – **14**, №4. – P. 483–487.
39. Mayor S., Rao M. Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface // *Traffic.* – 2004. – **5**, №4. – P. 231–240.
40. Owen D.M., Williamson D., Rentero C., Gaus K. Quantitative microscopy: protein dynamics and membrane organization // *Ibid.* – 2009. – **10**, №8. – P. 962–971.
41. Pal S., Tak Y.K., Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – **73**, №6. – P. 1712–1720.
42. Parameswari E., Udayasoorian C., Sebastian S.P., Jayabalakrishnan R.M. The bactericidal potential of silver nanoparticles // *Intern. Res. J. Biotechnol.* – 2010. – **1**, №3. – P. 44–49.
43. Parton R.G., Richards A.A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms // *Traffic.* – 2003. – **4**, №11. – P. 724–738.
44. Parton R.G., Hancock J.F. Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras // *Trends Cell. Biol.* – 2004. – **14**, №3. – P. 141–147.
45. Pomorski T., Holthuis J.C., Herrmann A., Meer G. Tracking down lipid flippases and their biological functions // *J. Cell. Sci.* – 2004. – **117**, №6. – P. 805–813.
46. Qiao R., Roberts A.P., Mount A.S., Klaine S.J., Ke P.C. Translocation of C60 and its derivatives across a lipid bilayer // *Nano Lett.* – 2007. – **7**, №3. – P. 614–619.
47. Raffi M., Hussain F., Bhatti T.M., Akhter J.I., Hameed A., Hasan M.M. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224 // *J. Mater. Sci. Technol.* – 2008. – **24**, №2. – P. 192–196.
48. Rayan G., Guet J., Taulier N., Pincet F., Urbach W. Recent applications of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to membrane bio-macromolecules // *Sensors.* – 2010. – **10**. – P. 5927–5948.
49. Reitsma S., Slaaf D.W., Vink H., Zandvoort M.A.M.J., Egbring M.G.A. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization // *Pflugers Arch.* – 2007. – **454**, №3. – P. 345–359.
50. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis // *Biochem. J.* – 2004. – **377**. – P. 159–169.
51. Ries R.S., Choi H., Blunck R., Bezanilla F., Heath J.R. Black lipid membranes: visualizing the structure, dynamics, and substrate dependence of membranes // *J. Phys. Chem. B.* – 2004. – **108**, №41. – P. 16040–16049.
52. Ritchie K., Iino R., Fujiwara T., Murase K., Kusumi A. The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques (Review) // *Mol. Membr. Biol.* – 2003. – **20**, №1. – P. 13–18.
53. Roger M., Peletier M.A. Cell membranes, lipid bilayers, and the elastic functional // *Proc. Appl. Math. Mech.* – 2006. – **6**, №1. – P. 11–14.
54. Roiter Y., Ornatska M., Rammohan A.R., Balakrishnan J., Heine D.R., Minko S. Interaction of nanoparticles with lipid membrane // *Nano Lett.* – 2008. – **8**, №3. – P. 941–944.
55. Roiter Y., Ornatska M., Rammohan A.R., Balakrishnan J., Heine D.R., Minko S. Interaction of lipid membrane with nanostructured surfaces // *Langmuir.* – 2009. – **25**, №11. – P. 6287–6299.
56. Ruparelia J.P., Chatterjee A.K., Duttagupta S.P., Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles // *Acta Biomater.* – 2008. – **4**, №3. – P. 707–716.
57. Salaun C., James D.J., Chamberlain L.H. Lipid rafts and the regulation of exocytosis // *Traffic.* – 2004. – **5**, №4. – P. 255–264.
58. Saxton M.J., Jacobson K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1997. – **26**. – P. 373–399.
59. Scarlata S. Membrane protein structure // *Biophysics Textbook Online.* – 2004. – P. 1–23.
60. Schmuhl R., Nijdam W., Sekulic J., Chowdhury S.R., Rijn C.J.M., Berg A., Elshof J.E. Blank D.H.A. Si-supported mesoporous and microporous oxide interconnects as electrophoretic gates for application in microfluidic devices // *Anal. Chem.* – 2005. – **77**, №1. – P. 178–184.
61. Silvius J.R. Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains: insights from model-membrane studies // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 2005. – **1746**, №3. – P. 193–202.
62. Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes // *Nature.* – 1997. – **387**, №6633. – P. 569–572.
63. Simons K., Vaz W.L. Model systems, lipid rafts, and cell membranes // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2004. – **33**. – P. 269–295.
64. Simons K., Gerl M.J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2010. – **11**, №10. – P. 688–699.
65. Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // *Science.* – 1972. – **175**, №23. – P. 720–731.
66. Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria // *J. Colloid Interface Sci.* – 2004. – **275**, №1. – P. 177–182.
67. Stoimenov P.K., Klinger R.L., Marchin G.L., Klabunde K.J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents // *Langmuir.* – 2002. – **18**, №17. – P. 6679–6686.
68. Streek M., Schmid F., Duong T.T., Ros A. Mechanisms of DNA separation in entropic trap arrays: a Brownian dynamics simulation // *J. Biotechnol.* – 2004. – **112**, №1–2. – P. 79–89.
69. Subczynski W.K., Wisniewska A. Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions // *Acta Biochim. Pol.* – 2000. – **47**, №3. – P. 613–625.
70. Tanford C. The hydrophobic effect and the organization

- of living matter // Science. – 1978. – 200, №4345. – P. 1012–1018.
71. Tas N.R., Mela P., Kramer T., Berenschot J.W., Berg A. Capillarity induced negative pressure of water plugs in nanochannels // Nano Letters. – 2003. – 3, №11. – P. 1537–1540.
72. Wagner A.J., Bleckmann C.A., Murdock R.C., Schrand A.M., Schlager J.J., Hussain S.M. Cellular interaction of different forms of aluminum nanoparticles in rat alveolar macrophages // J. Phys. Chem. B. – 2007. – 111, №25. – P. 7353–7359.
73. Wang B., Zhang L., Bae S.C., Granick S. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – 105, №47. – P. 18171–18175.
74. Yeagle P.L. Cell Membrane Features // Encycloped. Life Sci. – 2001. – P. 1–7.

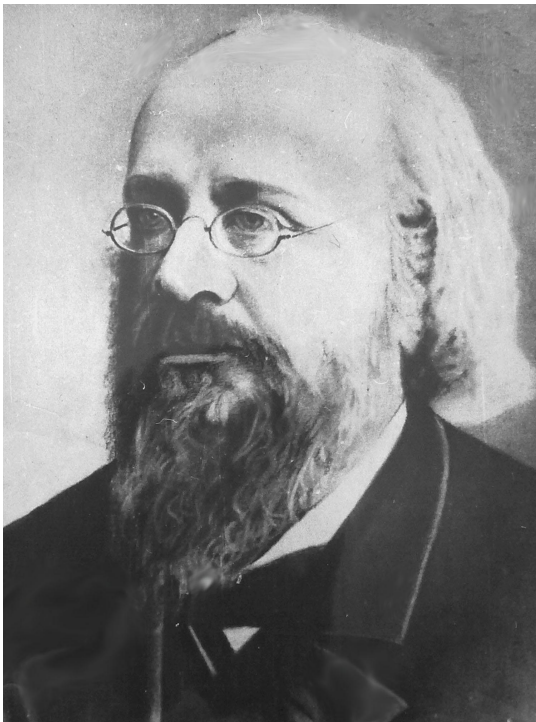
*Нац. мед. ун-т імені О.О. Богомольця*  
*E-mail: simonovpavlo@ukr.net*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 05.04.2011*

О.О. Мойбенко, В.Є. Досенко, В.Л. Гур'янова

## Науковий портрет Никанора Адамовича Тржаска-Хржонщевського

(до 175-річчя від дня народження першого патофізіолога України)



Никанор Адамович Тржаска-Хржонщевський – одна з найбільш яскравих особистостей в історії патофізіології нашої країни і медичної науки в цілому [1, 2, 4–6]. Надзвичайно важко говорити про актуальність і наукову новизну досліджень ученого, який народився 175 років тому (26 липня 1836 р. за старим стилем). Але досягнення Никанора Адамовича навіть через стільки років визначаються значущістю його внеску у формування фундаментальних уявлень, які складають базис медичних знань. Пере-

конливо свідчить про це той факт, що з кінця XIX і до 70-х років XX сторіччя праці Никанора Адамовича постійно цитувались у різноманітних іноземних посібниках з анатомії, гістології та патології [30], а також у багатьох наукових статтях [14, 26, 28].

Наукове зростання Н.А. Тржаска-Хржонщевського почалося в Казанському університеті, де на його формування вплинули такі прогресивні вчені, як анатом і патолог Є.П. Аристов, фізіолог і гістолог П.В. Овсянніков, хімік О.М. Бутлеров, філолог і мовознавець В.І. Григорович, історик і суспільствознавець О.М. Ковалевський. За завданням медичного факультету студент Тржаска-Хржонщевський виконує дві наукові роботи: «Об окостенении» [12], «О дыхании» [10], які були удостоєні золотих медалей. Одразу після закінчення університету Никанор Адамович у 1859 р. захищає докторську дисертацію, що була присвячена практично не вивченому на той час питанню про будову надниркових залоз [2]. Достеменно невідомо, хто з професорів Казанського університету був науковим керівником молодого дослідника, бо жоден з них не займався наднирковими залозами та навіть окремої кафедри гістології ще не було створено. Вже цей факт свідчить про народження самотнього оригінального дослідника, який самостійно може обрати предмет дослідження та здійснити піонерські роботи з його вивчення. Притому, що

© О.О. Мойбенко, В.Є. Досенко, В.Л. Гур'янова

ніхто в світі не мав жодного уявлення про властивості цих залоз, Никанор Адамович фактично вказує на ендокринну їх функцію – здатність виділяти секрет безпосередньо в лімфу та кров [1, 4, 5].

З 1861 по 1864 рр. Никанор Адамович перебуває за кордоном і відвідує низку європейських клінік і лабораторій, одночасно здійснюючи власні дослідження. Науковим керівником молодого вченого в цей період стає славетний німецький патолог Рудольф Вірхов, з яким Никанор Адамович протягом майже всього життя підтримував тісний зв'язок. Він високо цінував Вірхова як засновника нового вчення про целюлярну патологію. Вірхов надзвичайно гарно відзивався про Тржаска-Хржонщевського: «Його дослідження про найтоншу будову легень, нирок, печінки та інших важливих органів велися з такою витримкою, обережністю і оригінальністю, з якими ледве чи може бути поставлене в паралель будь-яке інше дослідження, вони призвели до результатів такої значущості, що деякі з найважливіших анатомічних питань саме за допомогою їх можуть вважатися розв'язаними». Протягом короткого терміну Никанор Адамович досконало оволодів методом сріблення тканин і став його гарячим прихильником, незважаючи на те, що деякі авторитетні вчені заперечували інформативність цієї гістологічної методики. Результатом її застосування стала перша публікація Никанора Адамовича у закордонному виданні [16, 24]. У ній були викладені дані, отримані у Вюртсбургському університеті, в лабораторії професора Ферстера. Дослідження було присвячене вивченню епітеліального шару альвеол легень. Більшість гістологів того часу вважали, що в легеневих пухирцях епітелію немає і судини лежать абсолютно відкрито для доступу атмосферного повітря (Ценкер, Генле). Більше того, вони стверджували, що епітелію тут і не повинно бути, бо він буде перешкоджати обміну кисню при диханні. Никанор Адамович чітко

зрозумів проблему та знайшов шлях для її однозначного вирішення – він поставив експеримент, який на нашу думку має бути наведений повністю, бо прекрасно ілюструє винахідливість і майстерність вченого. Цілу легень малих тварин або окремі її частки великих тварин та людини у стані інспірації він занурював в розчин азотнокислого срібла (ляпісний розчин). Перед зануренням судини легень заповнювалися сумішшю з берлінської лазурі та клею. Потім препарат з розчину срібла переносився у спирт, робилися зрізи, що згодом забарвлювалися карміном та оброблялися гліцерином зі вмістом 1%-ї оцтової кислоти. Розчин срібла, проникаючи через неушкоджену плевру в тканини легень та зустрічаючи на своєму шляху епітелій альвеол, діяв на них в'язучим чином, внаслідок чого епітеліальні елементи щільно утримувалися на своєму місці. Крім того, розчин ляпісу утворював наплення, взаємодіючи з міжклітинною речовиною епітеліальної тканини, який під впливом світла темнішав і дуже чітко розмежовував окремі епітеліальні елементи один від одного. Результати проведених досліджень дали змогу Тржаска-Хржонщевському зробити висновок про наявність цілісного епітеліального вистилу легеневих альвеол. Керівник проведеного дослідження професор Ферстер надав роботі Хржонщевського таку характеристику: «Головна мета цієї роботи полягає в найтоншому дослідженні епітелію, що вистилає легеневі пухирці, і гладенькі м'язові волокна, що знаходяться в їх стінках, і в дослідженні патологічних змін, яких зазнають ці тканини при хворобах легень, особливо туберкульозі та запаленні. Питання, вирішення яких слід чекати від цієї роботи, належить до числа найважливіших, котрі були тільки порушені в нинішній час, і становлять повсюди предмет численних досліджень і протиріч, тому дуже радісно бачити, що вищеназваний (Н.А.Хржонщевський) взяв саме ці питання за тему своєї наукової роботи...» [4].

Оволодіння методологічними підходами і новітніми гістологічними техніками дало можливість Никанору Адамовичу швидко перейти з дослідження легень на вивчення мікроструктури інших органів, зокрема нирки та печінки. Результати цих наукових досліджень викладено у чотирьох працях, надрукованих у найавторитетніших німецьких наукових журналах [19, 20, 21, 22]. Тржаска-Хржонщевський дійшов висновку про необхідність комбінування фізіологічних і власне гістологічних методів (згадайте про дослідження легневих пухирців на інспірації), що врешті-решт допомагає йому відкрити принципово новий метод фізіологічних ін'єкцій барвників. Сутність цього методу, вперше застосованого ним у 1864 р., найбільш чітко сформульована в історичній праці Н.А. Хржонщевського «Про мій метод фізіологічних ін'єкцій кровоносних і лімфатичних судин», опублікованій німецькою [22] та російською мовами [7]. Революційний характер розробленої методики дав змогу молодому вченому обґрунтовано сперечатися з корифеями науки. Так, при введенні барвника в судини нирки він повністю відкидає дані Генле (найбільш відома петля Генле у нефронах), який описував «відкрити» і «замкнену» систему каналців, які нібито не сполучаються між собою. Провівши низку складних оригінальних досліджень, Н.А. Хржонщевський беззаперечно довів, що «прямі і переплетені сечові каналні зв'язані один з одним і, отже, ніякої «замкненої», незалежно від так званої «відкритої» системи каналців, як твердив Генле, не існує». Він також встановив пряму пропорційну залежність між діаметром приносних артеріол і розміром капілярного клубочка. Одним з перших Тржаска-Хржонщевський досліджує кінцеві розгалуження міжчасточкових артерій нирки та вивчає походження так званих прямих артерій нирки.

При дослідженні гістологічної будови печінки Никанор Адамович сміливо всту-

пає в полеміку з вченими відомої Віденської школи Брюкке і Людвіга. В результаті проведених досліджень він зробив висновок, що кожна печінкова часточка являє собою дві різні території відносно розташування кровоносних судин – периферичну та центральну. В першій циркулює переважно кров ворітної вени, а в другій головним чином артеріальної, яка змішується тут з кров'ю ворітної вени. Таким чином, учений робить абсолютно точний висновок: по периферичних судинах печінки тече тільки кров ворітної вени, а по центральних – суміш обох видів крові, в якій переважає кров печінкової артерії. Оразу зрозуміло, що до таких висновків можна було дійти тільки за прижиттєвого введення барвників у різні судини печінки та системну циркуляцію. Як пише сам автор методики: «мені пощастило придумати такий новий спосіб наповнення всієї системи жовчних протоків, в якому мистецтво повністю витісняється природою, спосіб фізіологічної ін'єкції. Він ґрунтується на наступній найбільш простій ідеї: ввести в кров живої тварини таку забарвлюючу речовину (в цій роботі Хржонщевський застосував індиго сірчано-кислий натрій), яка б, виділяючись із жовчю і забарвлюючи її, вказувала б весь шлях цього виділення; примусити таким чином фізіологію печінки прийняти на себе виконання однієї з найбільш складних задач анатомічної техніки» [27, 22]. Висновок з цієї роботи Хржонщевського зрозумілий кожному сучасному студенту: жовчні протоки починаються всередині печінкових часточок сіткою капілярних каналів, які збираються у жовчні протоки, але далеко не всі в ті роки дотримувалися такої думки. У 60-х роках XIX сторіччя в науці домінував погляд Генле, згідно з яким жовчні протоки не мали відношення до печінкових клітин, а знаходилися та закінчувалися в міжчасточковій сполучній тканині. Дані Хржонщевського, що лягли у фундаментальні знання про фізіологію печінки, були



високо оцінені його сучасниками. Класик російської гістології М.Д. Лавдовський прямо вказує, що «... Хржонщевський відкрив великої значущості факт, що виділення жовчі і всіх речовин, здатних виділятися її шляхом, відбувається за обов'язкової участі печінкових клітин» [4, 5]. В одному з найкращих іноземних посібників з анатомії кінця XIX сторіччя (Quain's Elements of Anatomy, London, New York and Bombay, 1896) на праці Хржонщевського посиляються декілька разів [30], підкреслюючи виняткове значення відкритого ним методу природних ін'єкцій для з'ясування структури та функції печінки.

Паралельно з дослідженнями анатомії та фізіології вісцеральних органів Н.А. Хржонщевський, застосовуючи фізіологічні ін'єкції розчином азотнокислого срібла, вивчає тонку гістологічну будову кровоносних судин і капілярів (волосних судин) [18]. Свою статтю, присвячену цьому питанню, він починає так: «Про волосні кровоносні судини стало звичкою думати, що їх будова є надзвичайно простою: безструктурна оболонка та ядра, ось і усе». Як пише Ю.М. Квітницький-Рижов: «Власні спостереження Хржонщевського нанесли цій «звичці» нищівного удару» [5]. Досліджуючи капіляри у стінках розтягнутих повітрям органах, учений встановив: «... стінки волосних судин розділяються... на два шари: зовнішній, що протидіє насиллю, та внутрішній, що розривається в напрямку поперечної осі судини на окремі пластини». Дивовижні за майстерністю гістологічної техніки дослідження спонукають його до категоричного висновку про двошаровість стінок капілярів: «Стінки волосних судин складаються з двох шарів: з безструктурної власної оболонки (membrana propria) та з одношарового епітеліального покриву». Про новітній характер отриманих Хржонщевським результатів свідчить те, що після його відкриття в науці ще довго точилися

суперечки стосовно будови капілярної стінки. Пізніше відомий французький гістолог Л.-А. Ранв'є на основі мікроскопічних досліджень також зробив висновок про наявність у капілярній стінці основної мембрани на підставі утворення двох контурів капілярної стінки.

Одночасно Н.А. Хржонщевський розпочинає дослідження практично невивчених на той час лімфатичних судин і знов таки до нагоди йому стає метод фізіологічних ін'єкцій [11, 17]. Він одним з перших починає вивчення власне походження лімфатичних судин і робить такий висновок: «... тіла сполучної тканини являють собою дійсно самостійні утворення, ... відростки клітин сполучної тканин відмежовують систему живильних капілярів, ... вони відкриваються безпосередньо в лімфатичні судини і, таким чином, зумовлюють початок цих судин». Отримати такі результати було неможливо без застосування методу фізіологічних ін'єкцій. Методи Віденської школи, що були всесвітньо визнані на той час, передбачали штучну ін'єкцію, що не давала чітких результатів. А Никанор Адамович разом зі своїм учнем Іваном Сикорським (батько славетного авіаконструктора Ігоря Сикорського) зробили так: у трахею живої тварини вводили водний розчин кармінокислого аміаку, а потім досліджували шляхи, по яких цей розчин переходив до лімфи, а потім у кров, звідки виділявся з сечею, яка набувала яскравого карміно-червоного кольору. Слід зазначити, що барвник був обраний надзвичайно вдало – кармін не забарвлював ні живі клітини, ні міжклітинну речовину, ні бронхіальний епітелій, а нагромаджувався тільки в певних каналах, які мають усі властивості лімфатичних судин. Ці каналці фізіологічно наповнені карміном, як показано Хржонщевським, утворюють в стінці альвеол сітку червоного кольору, що переплітається з кровоносними судинами, в які попередньо було введено синій барвник [31].

У наступних роботах дослідник уперше отримує докази того, що через лімфатичні судини всмоктуються речовини (барвники) навіть в органах, які вважалися непридатними до цієї функції (діафрагма та шкіра) [9]. Далі Никанор Адамович робить ще один методологічний прорив у гістології – комбінує прижиттєве забарвлення з нанесенням барвників на фіксовану тканину, тобто йдеться про метод подвійного забарвлення.

Стосовно всмоктувальної спроможності шкіри вчений проводить досліди, що однозначно підтверджують здатність неушкодженої шкіри до всмоктування деяких речовин саме через лімфатичні судини. Йому вдалося встановити, що «лімфатичні судини утворюють щільну сітку, що починається у папілярному шарі у вигляді петель, котрі розташовані під петлями кровоносних капілярів; ця поширена сітка лімфатичних капілярів перетворюється глибше у більш великі лімфатичні стовбури». Нині це є основою для введення медичних засобів через шкіру, зокрема застосування такої лікарської форми, як пластирі з фармакологічними засобами, які поступово всмоктуються шкірою протягом тривалого часу [1, 5].

Повертаючись до хронології подій у житті видатного вченого, слід вказати, що після повернення на батьківщину Н.А. Хржонщевський продовжує активну науково-дослідницьку роботу у Харківському університеті. Там він протягом двох років організовує гістологічну лабораторію, результатом роботи якої за період з 1866 по 1869 рр. стає публікація 18 праць у кращих німецьких журналах. Характерно, що практично усі ці роботи виконані учнями Хржонщевського (Гіршман Г., Сакс І., Ясинський П., Дудукалов А., Афанасьєв М. [13], Кисельов І. та ін.), а сам Вчитель друкує узагальнюючу роботу, де звітує перед світовим науковим товариством про створення нової гістологічної школи у Харківському університеті [15].

Після обрання ординарним професором кафедри загальної патології Київського університету (грудень 1868 р.) Н.А. Тржаска-Хржонщевський переїздить до Києва та на новому місці з колосальною енергією береться за створення нової кафедри та нової навчальної дисципліни – загальної патології. Вже з перших років роботи в Києві молодого професора оточує прогресивна студентська молодь, для якої він самотужки намагається створити умови для наукових досліджень. Слід зазначити, що ці умови значно поступалися за можливостями харківській лабораторії Хржонщевського і ефективність роботи значно зменшилася. Протягом багатьох років (після трагічної загибелі свого відданого учня М.С. Афанасьєва) Н.А. Хржонщевський практично самотійно веде на кафедрі і наукову, і педагогічну роботу, бо адміністрація університету не зважає на численні звернення Никанора Адамовича та не надає йому жодної посадової одиниці (кафедра складається з самого професора та лаборанта-прибиральника). Але за цих складних умов, ґрунтуючись виключно на ентузіазмі студентів і молодих лікарів та власній енергії Хржонщевський продовжує активну наукову діяльність. Окрім традиційних для дослідника тем з вивчення крово- та лімфообігу внутрішніх органів, на цьому етапі з'являється новий напрямок – вивчення впливу нервів на різні фізіологічні процеси. Перші дослідження з цієї проблеми з'являються у 70-х роках XIX сторіччя [25, 32]. В останній роботі вивчали класичні фізіологічні об'єкти: язик, брижа та плавальна перетинка жаби. В них Хржонщевський розрізняє три системи регуляції: симпатичного, спинномозкового походження, які пов'язані з центральними нервовими структурами, а також «власні периферичні вазомоторні центри, що містяться, імовірно, в гангліозних клітинах, які закладені в стінці судини».

Не менш значущі дані отримано Хржонщевським стосовно значення судинорухо-

вих нервів на перебіг запалення – типового патологічного процесу. Зазначимо, що вчений використовує вже суто патофізіологічну методику – відтворює патофізіологічний процес та досліджує його механізми. Улюблені гістологічні методи в цьому випадку переходять на другий план. Питання іннервації різних органів активно вивчаються під керівництвом Никанора Адамовича. Студент М. Нестеровський отримує золоту медаль університету за роботу «Про нерви печінки» та згодом публікує отримані результати [29].

Широкий науковий світогляд дозволяє Хржонщевському швидко змінювати напрямки досліджень лабораторії: у 1876 р. під його керівництвом А. Косухін виконує роботу «До вчення про емболічний інфаркт» [27]. Зовсім новий напрямок досліджень, напевно, продиктований розповсюдженням серцево-судинних захворювань та початком вивчення в світі проблеми інфаркту міокарда. В 70-ті роки XIX сторіччя ні в кого і в думках не було, що грудна жаба виникає внаслідок звуження коронарних артерій. До історичного відкриття Образцова та Стражеска (доведення ролі тромбозу коронарних артерій у розвитку інфаркту міокарда) залишалося ще довгих 33 роки. Не виключено, що саме завдяки роботам лабораторії Хржонщевського з вивчення емболічного інфаркту саме київським вченим належить цей світовий пріоритет. Проблеми порушення кровообігу фігурують і у наступних роботах Хржонщевського та його учнів. У 1881 р. Є. Вербицький під керівництвом Никанора Адамовича досліджує порушення кровообігу в нирках та їх секреторної діяльності при перев'язці ниркової артерії [3]. Невідомо скільки наукових робіт ще було б виконано під керівництвом Н.А. Хржонщевського, якби адміністрація університету брутальними методами не звільнилося б від принципового, “незручного”, “неблагонадійного” професора. Никанора Адамовича позбавили лабораторії, учнів, можливості

займатися своєю улюбленою справою протягом останніх майже 20 років життя. Визнаний у всьому світі, але не у власній країні вчений помер 1906 р. у Києві.

Підводячи ризику під коротким аналізом наукової діяльності першого київського патофізіолога, засновника кафедри загальної патології Університету Св. Володимира, професора Никанора Адамовича Тржаска-Хржонщевського, можна виділити наступні загальні закономірності формування видатного вченого наприкінці XIX сторіччя, які, на нашу думку, мало відрізняються від сучасних умов розвитку особистості в науці. По-перше, вже на етапі навчання талановитий студент має отримати підтримку прогресивних учених. Після завершення навчання вельми бажаним продовженням наукової кар'єри має стати наукове відрядження за кордон для оволодіння найсучаснішими методами досліджень. Майбутній видатний вчений протягом короткого часу самостійної наукової роботи має сформувати навколо себе коло однодумців з перспективних молодих вчених і студентів. Разом з ними в дружньому творчому колективі мають ставитися найсміливіші завдання, досягнення яких потребує щоденної самовідданої наполегливої праці. Остаточним і найбільш об'єктивним критерієм ефективності роботи створеної наукової групи мають бути публікації в найбільш авторитетних журналах світу, а останнє практично неможливе без досконалого оволодіння іноземною мовою – науковою мовою свого часу. І, нарешті, портрет справжнього вченого завершується створенням наукової школи, а цей процес потребує поєднання високого професіоналізму із людськими якостями – щирістю, добротою, високою духовністю. Це щасливе поєднання усіх складових трапляється нечасто, саме тому постать Никанора Адамовича Тржаска-Хржонщевського була і лишається взірцем істинного Вченого вже друге сторіччя поспіль.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бенюмов Р.Я., Макаренко І.М. З історії розвитку громадської медичної думки на Україні. Н.А.Хржонцевський (1836-1906) (видатний український вчений і громадський діяч). – Київ: Держ. мед. вид-во УРСР. – 1963. – 163 с.
2. Бенюмов Р.Я., Макаренко І.М. Выдающийся ученый и общественный деятель Н.А. Хржонцевский // Сов. Здравоохранение, 1962, Т.12. – С. 83–86.
3. Вербицкий Е. О кровообращении в почках и секреторной их деятельности при перевязке art. renalis (диссертация) // Университет. известия. – 1881. – №3–4.
4. История кафедры патологической физиологии КМИ имени акад. А.А. Богомольца (под ред. Н.Н.Сиротинина). Рукопись.
5. Квитницкий-Рыжов Ю.Н. Н.А. Хржонцевский (К 90-летию метода физиологической инъекции) // Успехи соврем. биологии. – 1954. – Т.38 (вып.2). – С.251-257.
6. Макаренко І.М. Никанор Адамович Хржонцевський (1836-1906 рр.) // Фізіол. журн. – 1956. – 11, №5. – С.128–130.
7. Тржаска-Хржонцевский Н.А. О моем методе физиологических инъекций кровеносных и лимфатических сосудов – К., 1899.
8. Хржонцевский Н.А. De glandulis suprarenalibus ratione hystologica perbustratis, 1859, рукопись, диссертация.
9. Хржонцевский Н.А. Всасывание кожей // Тр. 2-го съезда рус. естествоиспытателей. – М., 1870. – ч. 2, отд. науч. медицины.
10. Хржонцевский Н.А. О дыхании, 1858, рукопись.
11. Хржонцевский Н.А. О происхождении лимфатических сосудов // Воен.-мед. журн. – 1866. – ч. 95, отд. II. – С. 1–9.
12. Хржонцевский Н.А. Об окостенении, 1856, рукопись.
13. Afanasiev N. Über den Anfange der Lymphgefäße in den serösen Häuten // Virchow's Archiv. – 1869. – Bd. 44.
14. Bertalanffy F.D. Structure of respiratory tissue // The Lancet. – 1955. – 266, № 6905. – P. 1365–1368.
15. Chrzonszczewsky N. Arbeiten aus dem histologischen Institut zu Charkow von akademischen (russisch gerechnet) Jahre 1866–1867 // Virchow's Archiv. – 1868. – 44, № 1. – P. 22–37.
16. Chrzonszczewsky N. Über das Epithel der Lungenbläschen der Säugethiere // Centralblatt f. d. med. Wissenschaft. – 1863. – № 44.
17. Chrzonszczewsky N. Über den Ursprung der Lymphgefäße // Virchow's Archiv. – 1865. – Bd. XXXV.
18. Chrzonszczewsky N. Über die feinere Structur der Blutcapillaren // Virchow's Archiv. – 1865. – Bd. XXXV.
19. Chrzonszczewsky N. Zur Anatomie der Niere // Centralblatt f. d. Med. Wissenschaft. – 1863. – № 48.
20. Chrzonszczewsky N. Zur Anatomie der Niere // Virchow's Archiv. – 1864. – Bd. XXXI.
21. Chrzonszczewsky N. Zur Anatomie und Physiologie der Leber // Centralblatt f. d. med. Wissenschaft. – 1864. – № 38.
22. Chrzonszczewsky N. Zur Anatomie und Physiologie der Leber // Virchow's Archiv. – 1865. – Bd. XXXV.
23. Chrzonszczewsky N. Über meine Methode der physiologischen Injection Blut und Lymphgefäße // Virchow's Archiv. – 1898. – Bd. CLIII.
24. Chrzonszczewsky N. Zur Lehre von Lungenepithel // Virchow's Archiv. – 1866. – 35, № 1. – P.165–168.
25. Chrzonszczewsky N. Zur Lehre von vasomotorischen Nerven // Virchow's Archiv. – 1899. – Bd. CLVII.
26. Elias H., Petty D. Terminal distribution of the hepatic artery // The Anatomical Record. – 1953. – 116, № 1. – P. 9–17.
27. Kossuchin A., Zur Lehre über den embolischen Infarkt // Virchow's Archiv. – 1876. – 67, № 4. – P. 449–491.
28. Livingston Eli Josselyn The nature of the pulmonary alveolar lining // Anatom. Rec. – 1935. – 62, № 2. – P. 147–177.
29. Nesterovsky M., Über die Nerven der Leber // Virchow's Archiv. – 1872. – Bd. 63.
30. Quain's Elements of Anatomy /Ed. by E.A. Schafer, G.D. Thane/. London, New York and Bombay: "Longmans, Green, and Co.", 1896.
31. Sikorsky I. Über die Lymphgefäße der Lungen // Centralblatt f. d. med. Wissenschaft. – 1869. – № 62.
32. Tritschel K. Über die Endigung der Nerven in der schleimhaut des Magens // Centralblatt f. d. Wissenschaft. – 1870. – № 8.

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

## CONTENTS

N.A. Strutynska, O.M. Semenykhina, S.V. Chorna, G.L.Vavilova, V.F. Sagach. Hydrogen sulfide inhibits Ca <sup>2+</sup> -induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart	3
O.M. Paduraru, I.B. Philyppov, O.I. Boldyrev, I.A. Vladymyrova, Ia.M. Shuba. Urothelium-dependent modulation of urinary bladder smooth muscle contractions by menthol	15
K.V. Nesvitalova, O.A. Gonchar, T.I. Drevitskaya, L.P. Arabskaya, M.M. Steshenko, O.M. Bakunovsky, T.V.Serebrovskaya, I.N. Mankovskaya. Changes in mRNA and protein expression of antioxidant enzymes in children with bronchial asthma after interval hypoxic training	23
V. A. Sukach, A.Z. Buta, O.P. Maximyuk, D.B. Kovalskyy, M.V. Vovk, O.O. Krishtal. (3-carboxamidino-2-oxo-2h-chromen-7-yl)-4-guanidinobenzoates are novel blockers of acid sensing ion channels	31
Yu.Goshovska, T.Shimanskaya, V.Sagach. Genipin, an uncoupling proteins inhibitor, reduces the protective effect of ischemic preconditioning	38
O. V. Korkushko, E. O. Asanov, I. A. Dyba. Effect of positive end expiratory pressure on breath test pulmonary gas exchange in elderly people with accelerated aging	46
O.V. Klimyuk, O.V. Bonzik, E.M. Reshetnik, S.P.Veselsky, M.Yu. Makarchuk. Peculiarities of bile formation in rats of different sex in estron influence	52
A.V. Tkachuk. Effect of streptozotocin-induced diabetes and incomplite global brain ischemia on apoptosis in the rats thymus	58
V.A. Berezovskiy, T.M. Zamorska, I.G. Litovka, R.V. Yanko. Normobaric hyperoxia effects on the markers of bone metabolism	65
L.M. Gunina. An influence of sodium succinate on erythrocytes at oxidative stress under physical loading	71
A.M. Manko, T.V. Beregova, K.S. Neporada, D.S. Yankovskyy. The influence of symbiter, an acidiphilic multiprobiotic, on pathological changes in bone periodontal tissue under hypoacidity	80
O.A. Panchenko, V.O. Onishenko, Y.E. Liakh. The reaction of human thermoregulation on the impact of extreme ultra-low temperature	85
L.N. Bogdanova, S.K. Matisheva. Features electrocardiogram in female Black sea bottlenose dolphins ( <i>Tursiops truncatus</i> )	93
<b>REVIEWS</b>	
I.S. Chekman, P.V. Simonov. Structure and function of biomembranes: influence of nanoparticles	99

