

# Фізіологічний журнал

ТОМ 58 № 3 2012

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

## Зміст

<i>Носенко Н.Д., Тарасенко Л.В., Сініцин П.В., Сачинська О.В., Ганжій І.Ю., Резніков О.Г.</i> Гормональні зміни у самиць щурів при дії хронічного стресу та надлишку андрогенів у період статевого дозрівання . . . . .	3
<i>Серебровська Т.В., Нікольський І.С., Тарануха Л.І., Нікольська В.В., Галицька С.М.</i> <i>Ицук В.О.</i> Вміст гемопоетичних стовбурових клітин у крові та особливості імунного статусу людей з різною стійкістю до гіпоксії . . . . .	9
<i>Весніна Л.Е., Мамонтова Т.В., Микитюк М.В., Куценко Л.О., Боброва Н.О.,</i> <i>Куценко Н.Л., Кайдашев І.П.</i> Стан перекисного окиснення ліпідів у мишей та дія фулерену C <sub>60</sub> під час імунної відповіді . . . . .	19
<i>Лісяний М.І., Ключникова А.І.</i> Розвиток імунної відповіді на алогенні клітини ембріонів і дорослих мишей при внутрішньомозковій імунізації . . . . .	27
<i>Хоревін В.І., Горковенко А.В., Верещака І.В.</i> Зміщення центру тиску на опору та зміна кутів у суглобах нижньої кінцівки при присіданні людини . . . . .	32
<i>Березовський В.Я., Янко Р.В., Літовка І.Г., Чака О.Г., Заморська Т.М.</i> Дозована нормобарична гіпоксія – немедикаментозний засіб стимуляції фізіологічної регенерації паренхіми печінки . . . . .	43
<i>Корогод С.М., Кулагіна І.Б.</i> Динамічні електричні стани неоднорідних популяцій іонних каналів у мембранах збудливих клітин . . . . .	50
<i>Єліссєєва О.П., Камінський Д.В., Семен Х.О., Мисаковець О.Г., Челпанова І.В.,</i> <i>Куркевич А.К.</i> Зміни частоти серцевих скорочень під час виконання субмаксимального навантаження . . . . .	60
<i>Гоженко А.І., Москаленко О.М., Сірман В.М., Жижнєвська О.О., Стороженко С.А.</i> Функціональний стан нирок у пацієнтів з онкологічними захворюваннями після введення цисплатину . . . . .	72
<i>Yatsenko K.V., Berezovskii V.A., Deyeva J.V.</i> Effects of intermittent normobaric hypoxia on the state of the CNS and cerebral circulation in children with cerebral palsy . . . . .	77

## **ОГЛЯДИ**

<i>Чехун В.Ф., Демаш Д.В., Налескіна Л.А.</i> Оцінка біологічних ефектів і можливих механізмів дії постійного магнітного поля . . . . .	85
<i>Макогон Н.В., Алексєєва І.М.</i> Фізіологічна та патофізіологічна роль полі(АДФ-рибозо) полімерази-1 . . . . .	95

## **РЕЦЕНЗІЇ**

<i>Ноздрачев А.Д.</i> Отзыв о книге И.И. Коренюк, Т.В. Гамма, Д.Р.Хусаинов, М.Ю. Раваева, А.Е. Кизилов, О.В. Костюченко, О.Т. Колотилова «Нейротропные эффекты химических соединений различных классов и возможные механизмы их действия» .	113
---	-----

## **ПАМ'ЯТНІ ДАТИ**

Неруш Петро Опанасович . . . . .	116
Костюк Олена Платонівна . . . . .	118

Н.Д. Носенко, Л.В. Тарасенко, П.В. Сініцин,  
О.В. Сачинська, І.Ю. Ганжий, О.Г. Резніков

## Гормональні зміни у самиць щурів при дії хронічного стресу та надлишку андрогенів у період статевого дозрівання

*Досліджено зміни базального вмісту кортикостерону, тестостерону та андростендіону в плазмі крові, а також їх реакцію на гострий дозований стрес (30-хвилинна іммобілізація) у самиць щурів віком 35, 40 і 45 діб, які зазнавали впливу хронічного стресу (щодобова 30-хвилинна іммобілізація з 35-ї по 45-ту добу життя) та/або надлишку екзогенних андрогенів (імплантація капсул з тестостероном під шкіру щурам на 33-тю добу життя) в пубертатний період. Контрольні та дослідні самиці всіх вікових груп реагували на гострий стрес вірогідним підвищенням вмісту кортикостерону. При цьому в самиць з гіперандрогенією віком 45 діб наприкінці хронічного стресування ступінь активації надниркових залоз у відповідь на гострий дозований стрес зменшувався, а в стресованих – поступово підвищувався. Вміст тестостерону в плазмі крові після гострого стресу знижувався у 35-добових контрольних самиць і зростав – у тварин з гіперандрогенією того самого віку на тлі десятиразового підвищення базального рівня гормону. У контрольних самиць віком 40 діб, а також в тварин з гіперандрогенією, що зазнавали впливу хронічного стресу впродовж 5 діб, гострий дозований стрес не викликав вірогідних змін вмісту тестостерону в плазмі крові, водночас підвищував вміст андростендіону. У стресованих самиць 40-добового віку на тлі підвищеної базальної секреції андростендіону реакція гормону на гострий стрес не змінювалась, а тестостерону – вірогідно зменшувалася. Наприкінці пубертатного періоду у контрольних і дослідних тварин віком 45 діб вміст тестостерону в плазмі крові у відповідь на гострий дозований стрес не змінювався, проте зменшувався у стресованих самиць і зростав на тлі підвищеної базальної секреції гормону в щурів з гіперандрогенією, що зазнавали впливу хронічного стресу. Зроблено висновок про можливий функціональний зв'язок між змінами гормонального гомеостазу в пубертатний період та розвитком порушень репродуктивної системи у тварин при досягненні статевої зрілості.*  
*Ключові слова: хронічний стрес, надлишок андрогенів, стероїдні гормони, статево дозрівання, самиці щурів.*

### ВСТУП

Період статевого дозрівання характеризується суттєвою гормональною перебудовою організму та формуванням певного статевого фенотипу. В цей час порушення гормонального гомеостазу можуть призвести до розвитку різноманітних розладів репродуктивної системи, в тому числі й синдрому полікістозних яєчників (СПКЯ). Ризик виникнення останнього посилюється фізіологічним підвищенням продукції андрогенів наднирковими залоза-

ми, нестійкістю цирхорального ритму гонадотропінів, гіпопрогестеронемією, гіперінсулінемією та іншими гормональними чинниками [6, 10, 14, 20]. Ці зміни відбуваються на тлі вегетативної лабільності та напруження адаптаційно-компенсаторних можливостей організму, що сприяє підвищенню його чутливості до дії стресу в пубертатний період [7, 16–18]. Натомість питання щодо ролі стресового чинника в механізмах формування СПКЯ досі залишається нез'ясованим. У наших попередніх дослідженнях було показано,

© Н.Д. Носенко, Л.В. Тарасенко, П.В. Сініцин, О.В. Сачинська, І.Ю. Ганжий, О.Г. Резніков

що хронічне стресування самиць шурів пубертатного віку на тлі надлишку екзогенних андрогенів призводить до затримки статевого дозрівання, а також до збільшення кількості оваріальних кіст в яєчниках тварин при його досягненні [3]. Ми припустили, що зазначені порушення репродуктивної функції мають певний зв'язок із змінами гормонального статусу за умов тривалої дії стресу в пубертатний період.

Мета нашої роботи – вивчити зміни базальної та стресової секреції стероїдних гормонів у самиць шурів за умов дії хронічного стресу та/або надлишку андрогенів у період статевого дозрівання.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 100 білих щурах-самицях лінії Вістар з датованим народженням (день народження вважали за першу добу життя). Тварин утримували в однакових умовах віварію, на стандартному раціоні харчування та вільному доступі до питної води. Всі експерименти проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей [4].

Стан гіперандрогенії у самиць шурів пубертатного віку відтворювали описаним раніше способом [5], тобто підшкірною імплантацією силастикових капсул з кристалічним тестостероном ("Fluka", Швейцарія). Імплантацію капсул з тестостероном (5 мг) під шкіру шиї здійснювали тваринам у віці 33 діб (n=50) під легким ефірним наркозом. Перед імплантацією капсули преінкубували у фізіологічному розчині, забуференому 0,15 моль/л фосфатним буфером (рН 7,2) протягом 48 год при 37 °С. Через дві доби після імплантації капсул частина тварин з гіперандрогенією (n=20) була піддана іммобілізаційному стресуванню протягом 30 хв щодобово з 35-ї по 45-ту добу життя, що охоплює пубертатний період у шурів. Окрему групу становили самиці, які у той самий період зазнавали

впливу хронічного стресу (n=20). Контрольну групу формували з псевдооперованих тварин (n=30). Знеживлення тварин у віці 35, 40 і 45 діб проводили швидкою декапітацією під легким ефірним наркозом до та після гострого дозованого стресу (30-хвилинна іммобілізація). Кров збирали у гепаринізовані пробірки, центрифугували для відокремлення плазми і зберігали останню при -18 °С для наступного аналізу вмісту кортикостерону, тестостерону та андростендіону.

Вміст кортикостерону в плазмі крові визначали флюориметричним мікрометодом [1], тестостерону та андростендіону в плазмі крові – радіоімунологічним методом з використанням наборів "RIA Testosterone direct" і "RIA Androstenedione" ("Immunotech", Франція). Радіоактивність зразків вимірювали на γ-лічильнику 5500-B ("Beckman", США). Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента та критерію U Вілкоксона-Манна-Уїтні. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На початку експерименту в самиць контрольної групи віком 35 діб (n=10) після гострого дозованого стресу спостерігалось вірогідне підвищення вмісту кортикостерону в плазмі крові з  $824,4 \pm 24,2$  до  $1069,4$  нмоль/л  $\pm 39,4$  нмоль/л у порівнянні з базальним рівнем ( $P < 0,001$ ). У самиць того самого віку, але з надлишком андрогенів (n=10) на тлі вірогідно нижчого (на 54 %) базального рівня кортикостерону реакція на гострий стрес була ще виразнішою – вміст гормону підвищувався майже втричі: з  $445,1 \pm 39,2$  до  $1299,8$  нмоль/л  $\pm 43,5$  нмоль/л ( $P < 0,001$ ).

Самиці контрольної та усіх дослідних груп віком 40 діб також реагували на гострий стрес вірогідним підвищенням вмісту кортикостерону (табл. 1). При цьому у самиць контрольної групи амплітуда стресової реак-

**Таблиця 1. Зміни вмісту кортикостерону (нмоль/л) у плазмі крові самиць щурів пубертатного віку впродовж хронічного стресування (M ± m; n=5)**

Групи тварин	Вік тварин, доби			
	40		45	
	базальний рівень	після гострого стресу	базальний рівень	після гострого стресу
Контроль	668,3±62,4	1698,8±98,4*	689,7±84,4	1247,9±59,8 *
Щури з гіперандрогенією	1071,2±84,8**	1677,3±30,1*	731,9±46,1	1223,6±122,1*
Стресовані щури	929,9±122,9	1398,9±31,0*,**,***	592,2±56,8	1164,1±25,2*
Щури з гіперандрогенією, що зазнавали дії хронічного стресу	757,6±41,6***	1410,9±46,4*,**,***	979,5±109,1	1442,4±43,4*,**,***

Примітки. Тут і в табл. 2 \*P<0,05 порівняно з базальним рівнем гормону у відповідній групі тварин, \*\*P<0,05 порівняно з контролем, \*\*\*P<0,05 порівняно з групою тварин з гіперандрогенією, \*\*\*\*P<0,05 порівняно з групою стресованих тварин.

ції була суттєво більшою, ніж у тварин усіх інших груп: концентрація кортикостерону в плазмі крові підвищилась у них в 2,5 рази щодо 1,6, 1,5 і 1,9 рази у щурів з гіперандрогенією, стресованих і андрогенізованих, що зазнавали хронічного стресу відповідно.

Майже такі самі закономірності щодо стресової реакції кортикостерону та ступеня її виразності спостерігались і у тварин усіх досліджуваних груп віком 45 діб. Слід відмітити, що впродовж 10-добового стресування самиць щурів ступінь активації надниркових залоз у відповідь на 30-хвилинну іммобілізацію поступово підвищувався на 30, 50 і 96 % у тварин віком 35, 40 і 45 діб відповідно. Ці спостереження свідчать про досить високу реактивність самиць щурів пубертатного віку, яка зумовлена підвищеною чутливістю надниркових залоз до стресових чинників, зокрема до адренкортикотропного гормону (АКТГ) [8]. У самиць з надлишком андрогенів наприкінці хронічного стресування глюкокортикоїдна активність за умов гострого стресу, навпаки, зменшувалася, що може бути пов'язано з пригнічувальною дією тестостерону на функцію гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи (ГГАС) [11].

Показано, що контрольні та дослідні тварини віком 35 діб реагували на гострий дозований стрес вірогідними, проте діа-

метралью протилежними, змінами вмісту тестостерону. Так, якщо у контрольних самиць він знизився в 4 рази з 0,92±0,24 до 0,23 нмоль/л ± 0,05 нмоль/л (P<0,05), то в тварин з гіперандрогенією спостерігалось у середньому 1,4-кратне зростання цього показника з 9,03±2,99 до 13,08 нмоль/л ± 3,08 нмоль/л (P<0,05). Слід також зазначити, що вихідний вміст тестостерону в крові самиць цих двох груп відрізнявся майже вдесятеро і був цілком закономірно вищим у тварин з гіперандрогенією, що пов'язано з надходженням цього гормону з імплантованих капсул до судинного русла.

Гостре стресування контрольних і дослідних, підданих дії хронічного стресу впродовж 5 діб, самиць віком 40 діб не викликало вірогідних змін вмісту тестостерону, водночас підвищувало вміст андростендіону в плазмі крові тварин досліджуваних груп з 0,52±0,09 до 1,24 нмоль/л ± 0,12 нмоль/л та з 1,58±0,02 до 2,43 нмоль/л ± 0,20 нмоль/л відповідно (P<0,05). Як відомо [15], посилена секреція андростендіону у самиць за умов гострого стресу зумовлена стимулювальним впливом АКТГ на сітчасту зону кори надниркових залоз. Варто зазначити, що в самиць з надлишком андрогенів, що зазнавали впливу хронічного стресу, на тлі підвищеного базального вмісту андростендіону в плазмі крові

амплітуда гормональної реакції на гострий дозований стрес була меншою, ніж у контрольних тварин. У стресованих впродовж 5 діб самиць щурів 40-добового віку підвищення базальної секреції андростендіону було цілком очікуваним і пов'язано з активацією біосинтезу андрогенів надниркових залоз під впливом глюкокортикоїдів у статевонезрілих тварин [2]. Разом з тим у самиць цієї групи була відсутня реакція андростендіону на гострий дозований стрес: базальний вміст – 2,87 нмоль/л  $\pm$  0,57 нмоль/л, після гострого стресу – 2,43 нмоль/л  $\pm$  0,20 нмоль/л. Це може свідчити про певне функціональне виснаження надниркових залоз внаслідок хронічного стресу. Базальний вміст тестостерону в плазмі крові цих тварин не змінювався, а стресова реакція гормону – вірогідно зменшувалася (в 3,4 раза;  $P < 0,01$ ; табл.2).

У 45-добових самиць контрольної групи, як і в самиць з гіперандрогенією, вміст тестостерону суттєво не змінювався у відповідь на дозований гострий стрес (табл. 2). На відміну від цього, в стресованих і у тварин з надлишком андрогенів, підданих дії хронічного стресу впродовж 10 діб, вміст досліджуваного гормону в крові вірогідно змінювався: у стресованих самиць зменшувався в 4,5 раза ( $P < 0,01$ ), а в щурів з надлишком андрогенів, підданих хронічному стресу – зростав в 1,8 раза ( $P < 0,05$ ).

Впродовж експерименту у тварин усіх груп відмічено зміни базального вмісту те-

стостерону в крові. У самиць контрольної групи поступово знижувався вміст гормону з досягненням рівня вірогідності на 45-ту добу життя (в 4,4 раза). У тварин з гіперандрогенією цей показник знизився в той самий термін у 4,2 раза. Стресовані самиці та тварини з надлишком андрогенів, піддані хронічному стресу, на 45-ту добу мали підвищений (в 2 і 1,8 раза відповідно) вміст гормону у порівнянні з 40-добовими тваринами цих самих груп, проте ці зміни не сягали ступеня вірогідності.

При аналізі отриманих результатів особливо слід відмітити те, що хронічне стресування самиць з гіперандрогенією додатково підвищує базальний вміст тестостерону на 45-ту добу життя, тобто наприкінці пубертатного періоду. Підвищення після гострого стресу цього показника у тварин з надлишком андрогенів 35-добового віку та віком 45 діб, які зазнавали впливу хронічного стресу, скоріш за все пов'язано зі стресовим гальмуванням метаболізму та елімінації андрогенних стероїдів. Підвищена андрогенна насиченість організму стресованих самиць може пояснити отримані нами раніше дані про посилення утворення кіст в яєчниках та затримку статевого дозрівання у тварин з надлишком андрогенів [3]. Певну роль у розвитку порушень репродуктивної функції можуть також відігравати стресові чинники, насамперед глюкокортикоїди, опіоїди, які вивільнюються внаслідок стресової акти-

Таблиця 2. Зміни вмісту тестостерону (нмоль/л) у плазмі крові самиць щурів пубертатного віку впродовж хронічного стресування ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Групи тварин	Вік тварин, доби			
	40		45	
	базальний рівень	після гострого стресу	базальний рівень	після гострого стресу
Контроль Щури з гіперандрогенією	0,44 $\pm$ 0,10	0,87 $\pm$ 0,18	0,21 $\pm$ 0,05	0,59 $\pm$ 0,31
Стресовані щури Щури з гіперандро- генією, що зазнавали дії хронічного стресу	3,52 $\pm$ 0,66**	8,09 $\pm$ 3,56**	2,12 $\pm$ 0,46**	3,63 $\pm$ 0,68**
Стресовані щури Щури з гіперандро- генією, що зазнавали дії хронічного стресу	1,04 $\pm$ 0,26	0,30 $\pm$ 0,06*, **, ***	2,06 $\pm$ 0,51**	0,46 $\pm$ 0,13*, ***
	2,43 $\pm$ 0,48 **, ****	2,34 $\pm$ 0,33 **, ****, *****	4,41 $\pm$ 0,32 **, ****, *****	7,73 $\pm$ 1,18 *, **, ****, *****



вації ГГАС і здійснюють гальмівний вплив на секрецію ендогенних гонадотропних і оваріальних гормонів [9, 12, 13, 19].

**Н.Д. Носенко, Л.В. Тарасенко, П.В. Сініцин, О.В. Сачинская, И.Ю. Ганжий, А.Г.Резников**

### **ГОРМОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У САМОК КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА И ИЗБЫТКА АНДРОГЕНОВ В ПЕРИОД ПОЛОВОГО СОЗРЕВАНИЯ**

Исследована динамика базального содержания кортикоостерона, тестостерона и андростендиона в плазме крови, а также их реакции на острый дозированный стресс (30-минутная иммобилизация) у самок крыс в возрасте 35, 40 и 45 сут, которые подвергались воздействию хронического стресса (ежедневная 30-минутная иммобилизация с 35-х по 45-е сутки жизни) и/или избытка экзогенных андрогенов (подкожная имплантация капсул с тестостероном крысам на 33-и сутки жизни) в пубертатный период. Контрольные и подопытные самки всех возрастных групп реагировали на острый стресс достоверным повышением содержания кортикоостерона в плазме крови. При этом у самок с гиперандрогенией 45-суточного возраста в конце хронического стрессирования степень активации надпочечных желез в ответ на острый дозированный стресс снижалась, а у стрессированных – постепенно повышалась. Концентрация тестостерона в плазме крови после острого стресса снижалась у контрольных самок 35-суточного возраста и возрастала – у животных с гиперандрогенией того же возраста на фоне десятикратного повышения базального уровня гормона. У контрольных самок в возрасте 40 сут, а также животных с избытком андрогенов, подвергшихся воздействию хронического стресса в течение 5 сут, острый дозированный стресс не вызывал достоверных изменений этого показателя, одновременно повышал содержание андростендиона. У стрессированных самок 40-суточного возраста на фоне повышенной базальной секреции андростендиона реакция гормона на острый стресс не изменялась, а тестостерона – достоверно уменьшалась. В конце пубертатного периода (на 45-е сутки жизни) содержание тестостерона в плазме крови в ответ на острый дозированный стресс не изменялось у контрольных самок и у животных с избытком андрогенов, однако уменьшалось у стрессированных самок и возрастало на фоне повышенной базальной секреции гормона у крыс с гиперандрогенией, испытавших хронический стресс. Сделан вывод о возможной функциональной связи между изменениями гормонального гомеостаза в пубертатный период и развитием нарушений репродуктивной системы у животных при достижении возраста половой зрелости. Ключевые слова: хронический стресс, избыток андрогенов, стероидные гормоны, половое созревание, самки крыс.

**N.D. Nosenko, L.V. Tarasenko, P.V. Sinitsyn, O.V. Sachinskaya, I.Yu. Ganzhiy, A.G. Reznikov**

### **THE DYNAMICS OF HORMONAL CHANGES IN FEMALE RATS EXPOSED TO CHRONIC STRESS AND ANDROGEN EXCESS DURING PUBESCENCE**

The dynamics of blood plasma corticosterone, testosterone and androstenedione levels and their reaction to acute stress (30 min immobilization) in 35-, 40- and 45-day old female rats exposed to chronic stress (daily 30-min immobilization from 35<sup>th</sup> to 45<sup>th</sup> day of life) and/or to excess of exogenous androgens (implantation of capsules with testosterone to 33-day old animals) during pubescence was studied. Both control and experimental females in all age groups responded to acute stress by significant elevation of blood plasma corticosterone levels. At the end of the chronic stress session, the extent of adrenals activation in response to acute dosed stress was lowered in androgenized 45-day old females and increased gradually in stressed ones. After acute stress, the blood plasma testosterone level decreased in control 35-day old females and rose – in androgenized females against 10-fold rising of basal hormonal level. In 40-day old control females as well as in androgenized ones exposed to chronic stress during 5 days, the acute dosed stress did not result in significant changes of blood plasma testosterone and elevated blood plasma androstenedione. Stressed 40-day old females with increased basal androstenedione secretion did not respond to acute stress by the hormone level changes while blood plasma testosterone declined significantly. At the end of pubescence (on the 45<sup>th</sup> day of life), acute stress did not affect the blood plasma testosterone level in control and androgenized animals, while decreased it in stressed females and increased – in androgenized rats exposed to chronic stress against elevated basal level of the hormone. The conclusion is made about possible functional relationship between the changes in hormonal homeostasis during pubescence and development of reproductive system in mature animals.

Key words: chronic stress, androgen excess, pubescence, steroid hormones, female rats.

*V.P. Kommissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;*

*Zaporozhye State Medical Academy for Postgraduate Education, Zaporozhye*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Балашов Ю. Г. Флюориметрический микрометод определения кортикоостерона: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – 76, № 2. – С. 280–283.
2. Бутнев В.Ю., Гончаров Н.П. Стимулирующее действие глюкокортикоидов на биосинтез адриналовых андрогенов у неполовозрелых обезьян // Тез. докл.

- Международ. симп. «Физиология гипофизарно-адрено-кортикальной системы». – 1990. – С. 48–49.
3. Носенко Н.Д., Ганжий І.Ю., Сініцин П.А., Полякова Л.І., Тарасенко Л.В., Лимарева А.А., Чайковська Л.В., Сачинська О.В., Резніков О.Г. Вплив хронічного стресу в пубертатний період на репродуктивну систему самиць щурів з експериментальною гіперандрогенією // Фізіол. журн. – 2011. – **57**, № 2. – Р. 27–34.
  4. Резніков О.Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – **8**, № 1. – С. 142–145.
  5. Резніков О.Г., Сініцин П.В., Тарасенко Л.В., Полякова Л.І. Нейроендокринні механізми розвитку ановуляторного синдрому гіперандрогенного походження у щурів // Фізіол. журн. – 1995. – **41**, № 5-6. – С. 33-37.
  6. Чеботарева Ю.Ю. Механізми формування синдрому поликистозных яичников в періоді полового созрівання, клінічне течення, профілактика і лічення // Міжнар. ендокринол. журн. – 2011. – **38**, № 6. – С. 105–114.
  7. Charmandari E., Kino T., Souvatzoglou E., Chrousos G.P. Pediatric stress: hormonal mediators and human development // Horm. Res. – 2003. – **59**, № 4. – Р. 161–179.
  8. Chrousos G.P., Torpy D.J., Gold P.W. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications // Ann. Intern. Med. – 1998. – **129**, № 3. – Р. 229–240.
  9. Eyvazzadeh A.D., Pennington K.P., Pop-Busui R., Sowers M., Zubieta J.K., Smith Y.R. The role of the endogenous opioid system in polycystic ovary syndrome // Fertil. Steril. – 2009. – **92**, № 1. – Р. 1–12.
  10. Greiner M., Paredes A., Araya V., Lara H.E. Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome // Endocrine. – 2005. – **28**, № 3. – Р. 319–324.
  11. Hani A., Dalle M., Delost P. Role of testosterone in the sexual dimorphism of adrenal activity at puberty in the guinea-pig // J. Endocrinol. – 1980. – **87**, № 3. – Р. 455–461.
  12. Laatikainen T.J. Corticotropin-releasing hormone and opioid peptides in reproduction and stress // Ann. Med. – 1991. – **23**, № 5. – Р. 489–496.
  13. MacFarland L.A., Mann D.R. The inhibitory effects of ACTH and adrenalectomy on reproductive maturation in female rats // Biol. Reprod. – 1977. – **16**. – Р. 306–314.
  14. Marouliss G.B., Triantafyllidis I.K. Polycystic ovarian disease: the adrenal connection // Pediatr. Endocrinol. Rev. – 2006. – Suppl 1. – Р. 205–207.
  15. Moran C., Azziz R. The role of the adrenal cortex in polycystic ovary syndrome // Obstet. Gynecol. Clin. North Am. – 2001. – **28**, № 1. – Р. 63–75.
  16. Romeo R.D. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity // Front. Neuroendocrinol. – 2010. – **31**, № 2. – Р. 232–240.
  17. Romeo R.D., Lee S.J., McEwen B.S. Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats // Neuroendocrinology. – 2004. – **80**, № 6. – Р. 387–393.
  18. Teran Davila J., Terra-Garran A.D. Polycystic ovary syndrome of extra-ovarian origin. Review // Invest. Clin. – 2001. – **42**, №1. – Р. 51–78.
  19. Whirledge S., Cidlowski J. A. Glucocorticoids, stress, and fertility // Minerva Endocrinol. – 2010. – **35**, № 2. – Р. 109–125.
  20. Young E.A., Altemus M. Puberty, ovarian steroids, and stress // Ann N Y Acad Sci. – 2004. – **1021**. – Р. 124–133.

ДУ “Ін-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ;  
 ДУ “Запорізька академія післядиплом. освіти МОЗ України”  
 E-mail: [reprod@i.com.ua](mailto:reprod@i.com.ua)

Матеріал надійшов до редакції 10.01.2012



Т.В. Серебровська, І.С. Нікольський, Л.І. Тарануха, В.В. Нікольська,  
С.М. Галицька В.О.Іщук

## Вміст гемопоетичних стовбурових клітин у крові та особливості імунного статусу людей з різною стійкістю до гіпоксії

*Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) відіграють важливу роль у реакціях імунної системи на гіпоксію, забезпечуючи процеси репарації в тканинах організму, утворення всіх типів клітин крові тощо. Існують значні індивідуальні відмінності в здатності мобілізувати ГСК і клітини-попередники. Нами вивчено дію двотижневого інтервального гіпоксичного тренування (ІТ – вдихання 10% O<sub>2</sub> по 5 хв 4 рази на день) на ГСК і основні гуморальні та клітинні компоненти імунітету в крові здорових людей віком від 25 до 35 років. Критерієм зниженої стійкості до гіпоксії було перевищення допустимих значень артеріального тиску крові, пульсу, хвилинної вентиляції легенів, сатурації крові та/або поява патологічних змін на ЕКГ під час гіпоксичного тесту (дихання 10% киснем, 10 хв). Показано, що для людей з нормальною стійкістю до гіпоксії характерний більш високий вміст гемоглобіну, еритроцитів і ретикулоцитів в крові, знижена кількість лейкоцитів, лімфоцитів, CD8+ клітин, низький вміст імуноглобуліну А; спостерігався підвищений порівняно з особами зі зниженою стійкістю вміст комплементу, індукована та резервна бактерицидність нейтрофілів у них також була значно більшою. Кількість ГСК CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup> у вихідному стані була приблизно однаковою в обох групах, але суб'єкти зі зниженою стійкістю реагували на ІТ двократним зниженням їх вмісту (у осіб з нормальною стійкістю достовірних змін не спостерігалось), більш вираженим підвищенням активності комплементу та резервної бактерицидності нейтрофілів. Зниження циркулюючих ГСК, імовірно, пов'язано зі зміною їх міграційної здатності. Проте залишається незрозумілим, чи є це результатом пригнічення міграції ГСК у кровеносне русло або ж активацією виходу ГСК з нього. В обох випадках у тканинах накопичується більша кількість ГСК, що підвищує загальний регенеративний потенціал, який забезпечується їх здатністю до трансдиференціювання, пластичності та міжклітинної взаємодії. Вміст цитокінів еритропоєтину, фактора некрозу пухлин α (ФНП-α) та інтерферону γ (ІФН-γ) у вихідному стані був однаковий в обох групах, а вміст ІЛ-4 у суб'єктів з нормальною стійкістю до гіпоксії набагато перевищував такий у осіб зі зниженою стійкістю. ІТ різко знизило вміст прозапального цитокіну ФНП-α у всіх пацієнтів і в багато разів збільшило вміст ІЛ-4 в осіб зі зниженою стійкістю; спостерігалася тенденція до збільшення ІФН-γ у всіх суб'єктів дослідження. Концентрація еритропоєтину істотно не змінилася за час тренування. Отримані результати свідчать про можливість використання ІТ для імунотерапії, особливо для хворих зі зниженою стійкістю до гіпоксії.*

*Ключові слова: стовбурові клітини, інтервальна гіпоксія, індивідуальні особливості.*

### ВСТУП

Стійкість людей до будь-якого стресового чинника залежить від природної резистентності та реактивності організму. Активність імунної системи є чутливим показником цієї стійкості. Дія такого стресового фактора, як

гіпоксія супроводжується виразними змінами в роботі імунної системи, що в свою чергу значною мірою залежить від інтенсивності та тривалості впливу. Так, гостра тривала гіпоксія майже завжди спричинює метаболічні зміни, стрес і пригнічення імунної системи. А от розвиток адаптації до помір-

© Т.В. Серебровська, І.С. Нікольський, Л.І. Тарануха, В.В. Нікольська, С.М. Галицька В.О.Іщук

них періодичних гіпоксичних впливів може активувати неспецифічний імунний захист організму. Але глибинні механізми цих змін вивчені недостатньо. Зокрема, немає відомостей про роль циркулюючих гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) у реакції організму на гіпоксію, хоча ці клітини відіграють вирішальну роль у становленні імунної системи, забезпечуючи, серед іншого, тимус своїми прогеніторами. Більше того, встановлено, що для диференціювання та проліферації ГСК обов'язковим елементом мікрооточення "ніш" є гіпоксія [17, 19]. Різний ступінь і час дії гіпоксичного впливу можуть мати важливе значення у продукції ГСК та їх циркуляції в кров'яному руслі. Транскрипційні фактори та цитокіни впливають на ці процеси. Нещодавні дослідження показали, що важливою сполучною ланкою між факторами, які беруть участь у регуляції поведінки стовбурових клітин і клітин-попередників, є фактор, індукований гіпоксією, який забезпечує молекулярну основу гіпоксичного контролю диференціації клітин і подальший їхній розвиток [24]. Деякі автори показали, що кровотворення поліпшується, якщо культивовані клітини піддаються впливу низьких концентрацій кисню [7, 10].

На жаль, свідчення про дію гіпоксії на ГСК людини вкрай обмежені [16]. Практично немає даних стосовно впливу інтервальної гіпоксії на циркулюючі ГСК людини. В дослідженні на моделях клітинних культур виявлено, що інтервальна гіпоксія при певній тривалості та інтенсивності є більш потужним тригером активації транскрипції, ніж постійна гіпоксія [21]. Змінюючи насиченість тканин киснем, можна, певно, впливати й на фізіологію ГСК.

Мета нашої роботи – вивчити вміст ГСК у циркуляторному руслі та особливості імунного статусу людей з різною стійкістю до гіпоксії при проведенні інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ).

## МЕТОДИКА

Обстежено 10 практично здорових чоловіків-добровольців віком від 25 до 35 років (маса

тіла  $76,2 \text{ кг} \pm 2,8 \text{ кг}$ , зріст  $176,9 \text{ см} \pm 1,8 \text{ см}$ ), у яких не було виявлено ознак патології серцево-судинної, дихальної, ендокринної, імунної та будь-яких інших систем і органів.

У літературі немає чітких критеріїв оцінки стійкості людини до гіпоксії. Найчастіше дослідники виходять з певних завдань дослідження. Так, в аерокосмічній медицині стійкими до гіпоксії вважають людей, у яких не розвиваються ознаки висотної хвороби на висоті 6000 м [6]. Виходячи з максимального споживання кисню, запропоновані градації різних рівнів здоров'я (тренуваності) [9]. Прямим методом визначення стійкості до гіпоксії в експерименті є підйом тварин у барокамері на «висоту» 11000 м та реєстрування часу появи першого агонального вдиху. При тестуванні людей проводять проби з диханням гіпоксичними газовими сумішами. Однак при її проведенні не так важлива стійкість до гіпоксії, скільки переносимість людиною процедури, яка залежить як від рівня функціонування кардіореспіраторної системи, так і психоемоційних характеристик.

Враховуючи те, що всі обстежені – молоді здорові люди, які не займалися спортом і не перебували в умовах високогір'я, для дослідження було вибрано гіпоксичний тест із диханням газовою сумішшю з 10 % кисню, що проводився до і після курсу ІГТ і тривав 10 хв. Він міг бути припинений передчасно при появі критеріїв непереносимості проби [4]. Стійкими до гіпоксії ми вважали осіб, у яких протягом 10 хв дихання гіпоксичною сумішшю не було значних відхилень основних фізіологічних показників: збільшення артеріального тиску та частоти серцевих скорочень більше ніж на 30 %, поява патологічних змін на ЕКГ, зниження в динаміці хвилинного об'єму дихання на 20 %, зниження парціального тиску кисню в артеріальній крові нижче ніж 40 мм рт. ст., що відповідає зниженню сатурації крові ( $\text{SaO}_2$ ) за пульсоксиметром нижче від 78–80 % [3]. Інші обстежені вважалися такими, що мають низьку стійкість до гіпоксії. За результатами проби всі чоловіки були умовно розділені на

дві групи. До I групи увійшли 5 осіб з низькою стійкістю до гіпоксії, у яких при диханні гіпоксичною сумішшю спостерігались одна або декілька вищезгаданих ознак, до II – 5 осіб з нормальною стійкістю до гіпоксії, котрі успішно пройшли пробу.

ІГТ проводили на апараті «Гіпокситрон» (Київ, Україна). Двотижневий цикл складався з чотирьох щоденних сеансів. Один сеанс включав дихання гіпоксичною сумішшю з 10 % кисню протягом 5 хв з такими самими інтервалами дихання атмосферним повітрям. Перед і після циклу ІГТ визначали фізичну працездатність за тестом з навантаженням на велоергометрі до досягнення субмаксимальної частоти серцевих скорочень.

Для проведення імунологічних досліджень венозну кров брали до початку ІГТ та наступного дня після завершення курсу тренувань. Концентрацію гемоглобіну в периферичній крові визначали стандартним гемоглобінціанідним методом, число еритроцитів, ретикулоцитів, тромбоцитів і лейкоцитів – за допомогою рутинних методів мікроскопічного аналізу мазків крові. Кількість CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- та CD8<sup>+</sup>-клітин розраховували відповідно до стандартної технології прямої імуофлуоресценції [18] на приладі FACSAria™ (“Becton Dickinson & Co.”).

Фагоцитарну функцію нейтрофілів вивчали за здатністю поглинати клітини *Staphylococcus aureus* [2]. Бактерицидну активність нейтрофілів досліджували в тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) [4].

Концентрацію IgM, IgG, IgA визначали методом радіальної імунодифузії, використовуючи моноспецифічні сироватки проти імуноглобулінів людини [15], циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) – методом преципітації в 3,75%-му поліетиленгліколі (ПЕГ-6000) з наступним фотометричним вимірюванням густини преципітату [13].

Активність комплементу в сироватці крові оцінювали за мінімальним об’ємом досліджуваної сироватки, необхідним для 100%-го лізису еритроцитів барана в гемолітичній системі.

Вміст цитокінів інтерферону  $\gamma$  (ІФН- $\gamma$ ), фактора некрозу пухлин (ФНП- $\alpha$ ), інтерлейкіну (ІЛ-4) у сироватці крові визначали за допомогою імуоферментного методу та наборів Biosours Human ELISA (США), еритропоетину – Biomerica ERO ELISA (США). Вимірювання здійснювали за оптичною густиною отриманого розчину з використанням фотометра для багатофункціонального аналізу SUNRISE (Австрія).

Для статистичного аналізу використовували критерії Стьюдента (t), Вілкоксона–Манна–Уїтні (U), знаків (z) і парний критерій Вілкоксона (T).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як можна побачити з табл. 1, за віком досліджені групи статистично не відрізнялися. Особи II групи мали більшу масу тіла та вищу фізичну працездатність, що можна пояснити більш розвинутою м’язовою системою. У них повільніше знижувалися значення SaO<sub>2</sub> та менше виражалось зниження на 6-й хвилині гіпоксичної проби, ніж у обстежених I групи. Проте саме в цій групі спостерігались найбільш виражені позитивні зміни реакції кардіореспіраторної системи на гіпоксичний тест після курсу ІГТ.

Як видно з табл. 2, для людей з нормальною стійкістю до гіпоксії характерним є суттєво вища концентрація гемоглобіну та гематокриту. Число еритроцитів і ретикулоцитів у їхній крові теж дещо вище, але статистично недостовірне. В осіб з низькою стійкістю до гіпоксії після тренувань відмічено підвищення числа тромбоцитів у межах фізіологічної норми, що може бути пов’язане зі стимулювальним впливом періодичної гіпоксії. Число лейкоцитів, лімфоцитів і CD8<sup>+</sup>-клітин у чоловіків II групи до гіпоксії, навпаки, суттєво менше. Причому у людей з нормальною стійкістю до гіпоксії зменшена і відносна, і абсолютна кількість лімфоцитів. Спостерігається тенденція до збільшення відносної кількості CD4<sup>+</sup>-клітини (42,9±2,6 порівняно 36,0 % ± 3,6 %, P>0,05). Найкраще

Таблиця 1. Вік, антропометричні показники, фізична працездатність та сатурація крові (SaO<sub>2</sub>) при проведенні гіпоксичної проби у молодих людей з різною стійкістю до гіпоксії (M±m)

Показники	Стійкість до гіпоксії	
	низька (n=5)	нормальна (n=5)
Вік, роки	31,5±2,2	27,8±1,8
Маса тіла, кг	69,0±5,5	77,3±4,4*
Зріст, м	173,5±5,3	175,3±2,7
Потужність субмаксимального фізичного навантаження, Вт	135,0±17,0	185,0±17,0*
Швидкість зниження і SaO <sub>2</sub> , %/хв	3,6±0,6	1,4±0,3*
SaO <sub>2</sub> на 6-й хвилині гіпоксичної проби	15,4±2,2	9,0±0,7*

\*P<0,05 порівняно з показниками у людей з низькою стійкістю до гіпоксії.

ці відмінності пояснюють Гаркаві та співавт. [1], які довели тісний кореляційний зв'язок між структурою лейкоцитарної формули периферичної крові та функціонуванням ендокринних залоз, станом гемокоагуляційної та центральної нервової систем. Зокрема, високе відносне число лімфоцитів (більше ніж 40 %) є ознакою напруженого функціонування організму, так званої „переактивації”.

Слід також зазначити, що всі вказані відмінності у кількості різних типів клітин притаманні обстеженим як до проведення ІГТ, так і після нього.

Кількість клітин CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup> у людей з різною стійкістю до гіпоксії приблизно однакова, але пацієнти з низькою стійкістю реагують на ІГТ суттєвим їх зменшенням (табл. 3). Це свідчить про те, що отримані нами раніше дані [20] про зниження кількості CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>-клітин при ІГТ у групі пацієнтів у цілому, сформувалися за рахунок тих, що мають низьку стійкість до гіпоксії.

Зниження циркулюючих ГСК, імовірно, пов'язано зі зміною їхньої міграційної здатності. Проте незрозуміло, чи є це результатом пригнічення міграції ГСК у кровоносне

Таблиця 2. Гематокрит, вміст гемоглобіну, число еритроцитів, ретикулоцитів, тромбоцитів та різних типів лейкоцитів в периферичній крові обстежених осіб (M±m)

Показники	Стійкість до гіпоксії			
	низька		нормальна	
	до тренування	після тренування	до тренування	після тренування
Гемоглобін, г/л	134,6±5,5	140,8±6,5	159,6±1,9*	159,0±2,3*
Гематокрит, %	41,4±2,9	42,8±0,9	49,2±2,7*	50,4±1,0*
Еритроцити, ×10 <sup>6</sup> /мл	4,5±0,3	4,2±0,2	4,7±0,2	4,7±0,3
Ретикулоцити, %	1,18±0,29	1,36±0,15	1,32±0,20	1,16±0,16
Тромбоцити, ×10 <sup>3</sup> /мкл	120±30	170±10**	150±20	170±10
Лейкоцити, мкл	6780±230	5500±550	5240±640*	5630±330
Лімфоцити, %	38,4±4,6	38,0±7,8	31,2±3,0	26,8±4,2
Лімфоцити, мкл	2570±260	1940±250	1640±240*	1490±200*
CD4 <sup>+</sup> -клітини, %	36,0±3,6	39,8±4,5	42,9±2,6	41,5±3,5
CD8 <sup>+</sup> -клітини, мкл	650±40	530±90	380±70*	320±30*

Примітка. Тут і в табл. 3–6: \*P<0,05 порівняно з показниками у людей з низькою стійкістю до гіпоксії;

\*\* P<0,05 вірогідність різниці показників до та після інтервального гіпоксичного тренування

Таблиця 3. Вміст CD45+34+-клітин у периферичній крові обстежених осіб (M±m)

Показники	Стійкість до гіпоксії			
	низька		нормальна	
	до тренування	після тренування	до тренування	після тренування
CD45+34+-клітини, %	0,028±0,003	0,017±0,002**	0,031±0,006	0,036±0,006*
CD45+34+-клітини, мкл	1,833±0,285	0,980±0,190**	1,493±0,226	2,021±0,321*

русло або ж активацією виходу цих клітин з нього. В обох випадках у тканинах накопичується більша кількість ГСК, що підвищує загальний регенеративний потенціал, який забезпечується здатністю ГСК до трансдиференціювання, пластичності та міжклітинної взаємодії.

Поодинокі літературні дані вказують на те, що перебування в середовищі гіпоксії може збільшити кількість стовбурових клітин. За даними Theiss та співавт. [22], однотижневе перебування в середньогір'ї (висота 1700 м) з фізичною активністю підвищує вміст циркулюючих клітин-попередників у здорових дорослих. Ciulla та співавт. [8] повідомили про збільшення клітин-попередників ендотелію й ендотеліальних колонієутворювальних факторів у здорової людини після походу в Гімалаї. Але в іншому дослідженні у здорових дорослих [16] виявлено зниження циркулюючих ГСК, ендотеліальних клітин і клітин-попередників після 12 діб знаходження на висоті 3000 м. Viscog та співавт. [23] повідомили, що після трьох діб підряд експозиції протягом 3 год при барометричному

тиску 405 мм рт. ст. (відповідає висоті 5000 м) не було помітних змін у кількості циркулюючих лейкоцитів або CD34+-клітин. Таким чином, щодо впливу постійної або тривалої переривчастої гіпоксії на циркулюючі ГСК дані літератури суперечливі.

Вміст ЦІК достовірно не відрізнявся у осіб з обох груп як у вихідному стані, так і після курсу ІГТ (табл. 4). Активність комплекменту у пацієнтів I групи значно знижена, вона суттєво підвищується під впливом гіпоксичного тренування і дорівнює такій, що визначається у людей, стійких до гіпоксії, після ІГТ. Таким чином, більш низький рівень комплекменту сполучається з низькою стійкістю до гіпоксії, але вирішальне значення цього показника є в тому, що його активність значно підвищується в результаті ІГТ. Можна вважати, що така направленість реакції на ІГТ може відігравати позитивну роль у підвищенні неспецифічної стійкості організму до ендо- та екзогенних факторів.

Вміст IgA в сироватці крові людей II групи суттєво нижче, він не змінюється після ІГТ, але залишається значно зниженим

Таблиця 4. Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), імуноглобулінів різних класів і комплекменту в сироватці крові обстежених осіб (M±m)

Показники	Стійкість до гіпоксії			
	низька		нормальна	
	до тренування	після тренування	до тренування	після тренування
ЦІК (од.опт.густ.)	40,2±4,8	35,9±3,9	36,1±4,9	29,7±1,9
Комплемент, мл	0,078±0,021	0,032±0,005**	0,040±0,006	0,032±0,005**
Імуноглобуліни, г/л				
G	14,93±2,08	12,05±0,96	10,48±1,14	11,90±1,80
M	1,43±0,20	1,60±0,37	1,29±0,08	1,29±0,12
A	2,82±0,43	2,67±0,41	2,04±0,26*	1,88±0,24*



порівняно з пацієнтами I групи. Слід зазначити, що незалежно від реакції на ІГТ, у пацієнтів з нормальною стійкістю до гіпоксії, крім статистично встановленого зменшеного рівня показників, можна помітити тенденцію до зменшеного вмісту IgM, IgG, ЦІК і комплекменту.

Слід відмітити, що поглинальна активність і спонтанна бактерицидність нейтрофілів майже однакові в обох групах і не змінюються після гіпоксичного тренування (табл. 5). Індукована та резервна бактерицидність нейтрофілів суттєво нижча в людей I групи і стає достовірно вищою після ІГТ. У пацієнтів II групи ці показники практично не змінюються. Тому складається враження, що їх підвищення у людей I групи під впливом ІГТ може поліпшити їх стійкість до гіпоксії.

Міграцію ГСК кровотворної тканини до периферичного кровообігу регулюють хемокіни та цитокіни [14]. Wang та співавт. [24] повідомили, що важка в порівнянні з помірною переривчаста гіпоксія викликає різноспрямовані зміни концентрації інтерлейкінів у плазмі. Серед основних імунорегуляторних функцій ІФН є можливість збільшення активності природних клітин-кілерів, що є істотною частиною механізму раннього захисту від інфекцій або розвитку пухлини [11]. ФНП- $\alpha$  і цитокіни, що утворюються при інфекції, травмі або втручаннях, виявилися ключовими у запуску смертельних наслідків септичного шоку, кахексії й інших системних проявів захворювання.

У нашому дослідженні визначення вмісту цитокінів у сироватці крові обстежених показало, що у вихідному стані кількість ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$  та еритропоєтину у людей обох груп вірогідно не розрізняється (табл. 6). Але спостерігається тенденція до підвищення ФНП- $\alpha$  у людей II групи порівняно з I удвічі. Причому в результаті ІГТ вміст фактора знижується в обох групах десь у 5–15 разів, що при подальших дослідженнях може підтвердити роль цього провідного цитокіну у реакції на ІГТ людей як з низькою, так і з нормальною стійкістю до гіпоксії.

Важливими є також результати, отримані відносно ІЛ-4. Слід відмітити, що вихідне значення ІЛ-4 у обстежених I групи майже у 300 разів менше, ніж у пацієнтів II групи. Як відомо, основними джерелами ІЛ-4 є Т-хелпери 2-го типу [12]. Можна припустити, що в осіб I групи їхня функціональна активність знижена. А от реакція ІЛ-4 на ІГТ в цих групах є різнонаправленою. Якщо у людей I групи вміст ІЛ-4 починає підтягуватися до рівня II групи, то в останній він змінюється у протилежний бік, тобто зменшується. І таким чином концентрація ІЛ-4 стає приблизно однаковою у обстежених обох груп. Не виключено, що така ситуація може бути прикладом регуляторної відповіді гомеостатичного характеру, коли направленість реакції на діючий чинник визначається вихідним значенням досліджуваного показника.

Отже, наведені результати показують, що нормальна стійкість до гіпоксії насамперед

**Таблиця 5. Поглинальна та бактерицидна активність (%) нейтрофілів периферичної крові обстежених осіб (M $\pm$ m)**

Показники	Стійкість до гіпоксії			
	низька		нормальна	
	до тренування	після тренування	до тренування	після тренування
Поглинальна активність	66,6 $\pm$ 5,0	64,4 $\pm$ 5,0	64,4 $\pm$ 1,5	68,4 $\pm$ 2,8
Бактерицидність				
спонтанна	13,8 $\pm$ 1,8	12,2 $\pm$ 2,4	11,4 $\pm$ 2,7	15,6 $\pm$ 1,5
індукована	19,2 $\pm$ 3,0	27,4 $\pm$ 3,4	31,8 $\pm$ 4,5*	39,0 $\pm$ 5,4*
резервна	5,4 $\pm$ 1,5	15,2 $\pm$ 4,4**	20,4 $\pm$ 2,8*	25,4 $\pm$ 3,1*



Таблиця 6. Вміст фактора некрозу пухлин  $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ), інтерлейкіну-4 (ІЛ-4), інтерферону  $\gamma$  (ІФН- $\gamma$ ) та еритропоєтину в сироватці крові обстежених осіб (M $\pm$ m)

Показники	Стійкість до гіпоксії			
	низька		нормальна	
	до тренування	після тренування	до тренування	після тренування
ФНП- $\alpha$ , пг/мл	0,73 $\pm$ 0,34	0,13 $\pm$ 0,03**	1,53 $\pm$ 0,53	0,10 $\pm$ 0,01**
ІЛ-4, пг/мл	0,03 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,41**	2,57 $\pm$ 1,57*	0,50 $\pm$ 0,30
Еритропоєтин, МО/мл	7,98 $\pm$ 1,46	9,23 $\pm$ 2,14	7,68 $\pm$ 1,74	6,31 $\pm$ 1,02
ІФН- $\gamma$ , пг/мл	6,57 $\pm$ 1,29	7,06 $\pm$ 1,56	5,11 $\pm$ 2,05	5,60 $\pm$ 1,44

може бути зумовлена кращим станом червоної крові у цих пацієнтів. Але людям з нормальною стійкістю до гіпоксії притаманний і особливий імунний статус як природженого, так і набутого імунітету, що ставить питання про механізми зв'язку кисневого забезпечення організму з функціонуванням окремих ланок імунної системи.

Наші попередні дослідження на моно- та дизиготних близнюках показали, що стійкість до гіпоксії є природженою конституційною ознакою [5]. Але, з іншого боку, орієнтуючись на суттєві зміни імунного статусу під впливом ІГТ, можна думати, що більшість показників активності імунної системи функціонально залежні та формуються в тісному зв'язку з варіантами відповіді на кисневе забезпечення. Якщо підвищення рівня комплементу і резервної бактерицидності у людей з низькою стійкістю до гіпоксії під впливом ІГТ можна практично однозначно розглядати як свідчення підвищення їх гіпоксичної стійкості й антиінфекційної резистентності безпосередньо на момент визначення, то зменшене у таких людей число лейкоцитів за рахунок лімфоцитів і CD8<sup>+</sup>-клітин, а також ІgA вказує на їх антиінфекційну резистентність.

Як може сполучатися підвищена стійкість до гіпоксії зі зниженими показниками імунного статусу? Насамперед треба пригадати, що стрес, який обов'язково включає лімфоцитопенію як компонент реакції, призводить до підвищення й антигіпоксичної, й антиінфекційної резистентності. Механізми підвищення останньої за таких обставин майже невідомі. Одним із них може бути зниження

кількості CD8<sup>+</sup>-клітин з супресорною активністю внаслідок парціального збільшення кількості CD8<sup>+</sup>-цитотоксичних лімфоцитів, і іншим – механізм ослаблення супресорного контролю за синтезом антитіл через зниження загальної концентрації імуноглобулінів і порушення зворотного зв'язку в системі.

Двократне зменшення кількості циркулюючих ГСК під впливом ІГТ у людей з низькою стійкістю до гіпоксії може свідчити про те, що саме у них ця реакція, як і інші (підвищення рівня комплементу та спонтанної бактерицидності) необхідні для адаптування до гіпоксії. Можна припустити, що депонування при розвитку гіпоксії ГСК, які на цей момент не виконують функції ефекторних клітин, в тканинах, згодом вияляється необхідним резервом завдяки реалізації поповнених репаративних можливостей.

## ВИСНОВКИ

1. Для людей з нормальною стійкістю до гіпоксії характерним є суттєво вищий порівняно з людьми зі зниженою стійкістю вміст гемоглобіну та гематокрит, дещо вища кількість еритроцитів і ретикулоцитів, що загалом свідчить про кращий стан червоної крові.

2. У пацієнтів з нормальною стійкістю до гіпоксії зменшені кількість лейкоцитів, лімфоцитів, CD8<sup>+</sup>-клітин і вміст ІgA, індукована та резервна бактерицидність нейтрофілів суттєво більша.

3. Кількість CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>-клітин у крові людей обох груп приблизно однакова, але пацієнти з низькою стійкістю до гіпоксії ре-

агують на ІГТ зменшенням їх удвічі.

4. Пацієнти з низькою стійкістю до гіпоксії реагують на ІГТ збільшенням активності комплементу і резервної бактерицидності нейтрофілів.

**Т.В. Серебровская, И.С. Никольский,  
Л.И. Тарануха, В.В. Никольская,  
С.М. Галицкая, В.А. Ишчук**

### **СОДЕРЖАНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КРОВИ И ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА ЛЮДЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ**

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) играют важную роль в реакциях иммунной системы на гипоксию, обеспечивая процессы репарации в тканях организма, образование всех типов клеток крови и др. Существуют значительные индивидуальные отличия в способности мобилизовать ГСК и клетки-предшественники. Нами изучено воздействие двухнедельной интервальной гипоксической тренировки (ИГТ – вдыхание 10 % O<sub>2</sub> по 5 мин 4 раза в день) на ГСК и основные гуморальные и клеточные компоненты иммунитета в крови здоровых обследованных 25–35 лет. Критерием сниженной устойчивости к гипоксии было превышение допустимых значений артериального давления крови, пульса, минутной вентиляции легких, SaO<sub>2</sub> и/или появление патологических изменений на ЭКГ во время гипоксического теста (дыхание 10% O<sub>2</sub>, 10 мин). Показано, что для людей с нормальной устойчивостью к гипоксии характерно более высокое содержание гемоглобина, эритроцитов и ретикулоцитов в крови, сниженное количество лейкоцитов, лимфоцитов, CD8<sup>+</sup>-клеток, низкое содержание IgA; наблюдалась повышенная по сравнению с субъектами со сниженной устойчивостью к гипоксии активность комплемента, индуцированная и резервная бактерицидность нейтрофилов была также значительно больше. Количество ГСК CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>-клеток в исходном состоянии примерно одинаково в обеих группах, но люди со сниженной устойчивостью реагируют на ИГТ существенным двукратным уменьшением их содержания (у обследованных с нормальной устойчивостью достоверных изменений не наблюдалось), более выраженным повышением активности комплемента и резервной бактерицидности нейтрофилов. Снижение циркулирующих ГСК, вероятно, связано с изменением их миграционной способности. Однако остается неясным, является ли это результатом угнетения миграции ГСК в кровеносное русло или же активацией их удаления из него. В обоих случаях в тканях будет накапливаться большее число этих клеток, что увеличивает общий регенеративный потенциал, который обеспечивается способностью ГСК к трансдифференцировке, пластичности и межклеточному взаимодействию.

Содержание цитокинов эритропоэтина, ФНП-α и ИНФ-γ было одинаково в обеих группах в исходном состоянии, а уровень ИЛ-4 у субъектов с нормальной устойчивостью к гипоксии многократно превышал таковой у людей со сниженной устойчивостью. ИГТ резко снизила содержание провоспалительного цитокина ФНП-α у всех пациентов и многократно увеличила ИЛ-4 в группе со сниженной устойчивостью; наблюдалась тенденция к увеличению ИНФ-γ у всех обследованных. Концентрация эритропоэтина существенно не изменялась за время исследования. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования ИГТ для иммунотерапии, особенно для больных со сниженной устойчивостью к гипоксии.

Ключевые слова: стволовые клетки, интервальная гипоксия, индивидуальные особенности.

**T.V. Serebrovskaya, I.S. Nikolsky, L.I. Taranukha,  
V.V. Nikolska, S.M. Galytska, V.A. Ishchuk**

### **HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND IMMUNE STATUS OF SUBJECTS WITH DIFFERENT HYPOXIC TOLERANCE**

Intermittent hypoxia treatment (IHT) is gaining attention as a clinical modality due to its capacity to protect cells, tissues, organs, and the whole organism from more intense and/or sustained hypoxia, ischemia and other stresses, to enhance physical and mental capacity. Circulating hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) play an important role in immune response to hypoxia ensuring tissue reparation processes, formation of all types of blood cells etc. There exist considerable individual differences in the capability to mobilize HSPC. This study was designed to compare the effects of IHT on HSPC, various factors of natural resistance and main humoral and cellular components of adaptive immunity in peripheral blood of subjects with normal and reduced tolerance to hypoxic load. Ten healthy male volunteers (age 30,9±0,6 y.o.) participated in the study and were divided into two groups with reduced (RT, 5 subjects) and normal (NT, 5 subjects) hypoxic tolerance. Criterion for reduced hypoxic tolerance detection was the exceeding deviation of arterial blood pressure, minute ventilation, SaO<sub>2</sub> and/or pathological changes in ECG during sustained hypoxia test (breathing with 10% oxygen, 10 min). All subjects were studied before and after a 14 day IHT program consisting of four 5 min bouts/d of breathing 10% O<sub>2</sub>, with intervening 5 min room air exposures. Immunofluorescence detected HSPCs as CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> cells in peripheral blood. Phagocytic and bactericidal activities of neutrophils, circulating immunoglobulins (IgM, IgG, IgA), immune complexes, complement, and cytokines (EPO, TNF-α, IL-4, IFN-γ) were measured. It was shown that NT subjects had higher hemoglobin and erythrocytes level, hematocrit and physical working capacity, but leukocytes, lymphocytes, CD8<sup>+</sup>-cells contents and level of IgA were lower than in RT. These differences were preserved after IHT course. CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>cells content was the same in both groups before IHT, but RT subjects demonstrated twice decrease in HSPCs

content after IHT as opposed to NT who did not show distinct reactions. A decrease in HSPCs is probably associated with the change of their migration capacity. However, it remains unclear whether there is an inhibition of HSPCs migration into circulation or an activation of HSPCs escape from circulation. In both cases tissues could accumulate more HSPCs which in turn could enhance hematopoiesis and general regenerative potential. RT group also had lower complement, induced and reserve bactericidal activities of neutrophils which were significantly increased after IHT reaching the level of NT. The level of cytokines EPO, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  did not differ in both groups before IHT but considerably reduced level of IL-4 was registered in RN patients. IHT sharply lowered pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  in both groups, significantly increased IL-4 in RT subjects; increasing behavior of IFN- $\gamma$  was observed in both groups. EPO was not affected considerably during the study. The findings support the potential for eventual application of IHT for immunotherapy, especially for patients with reduced hypoxic tolerance.

*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
Institute of Genetic and Regenerative Medicine, Academy of Medical Sciences, Kyiv, Ukraine;  
State Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences, Kyiv, Ukraine*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гаркави Л.Х., Квакина В.Б., Кузьменко Т.С. Анти-стрессорные реакции и активационная терапия. – М.: Имедис, 1998. – 565 с.
2. Дугласс С.Д., Куи П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике. – М.: Медицина, 1983. – 193 с.
3. Коркушко О.В., Серебровська Т.В., Шатило В.Б., Ішук В.О., Лопата В.О. Вибір оптимальних режимів для проведення інтервальних нормабаричних гіпоксичних тренувань у медичній практиці та спортивній медицині: Метод. рекомендації. – К., 2010. – 30 с.
4. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. – Новосибирск: Наука, 1983. – 343 с.
5. Серебровская Т.В. Оценка степени генетической обусловленности реакций кардио-респираторной системы человека на гипоксию и гиперкапнию // Косм. биология и авиакосм. медицина. – 1982. – **16**, №6. – С. 54–58.
6. Ушаков И.Б., Усов В.М., Дворников М.В., Бухтияров И.В. Современные аспекты проблемы гипоксии в теории и практике высотной физиологии и авиационной медицины. – В кн.: Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. – М.; Воронеж: Истоки, 2004. – С. 170–200.
7. Cipolleschi M.G., Dello Sbarba P., Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells // Blood. – 1993. – **82**. – P. 2031–2037.
8. Ciulla M.M., Giorgetti A., Lazzari L., Cortiana M., Silvestris I., Annoni G., De Asmundis C., Fiore A.V., Montelatici E., Paliotti R., Magrini F., Rebullia P., Cortelezzi A. High-altitude trekking in the Himalayas increases the activity of circulating endothelial cells // Amer. J. Hematol. – 2005. – **79**. – P. 76–78.
9. Cooper K.H. The new aerobics. M. Evans and Company, Inc., 1970. – 192 p.
10. Danet G.H., Pan Y., Luongo J.L., Bonnet D.A., Simon M.C. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions // J. Clin. Invest. – 2003. – **112**. – P. 126–135.
11. Djeu J.Y., Stocks N., Zoon K., Stanton G.J., Timonen T., Herberman R.B. Positive self regulation of cytotoxicity in human natural killer cells by production of interferon upon exposure to influenza and herpes viruses // J. Exp. Med. – 1982. – **156**. – P. 1222–1234.
12. Gilmour J., Lavender P. Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells // Immunology. – 2008. – **124**. – P. 437–444.
13. Haskova V., Kaslik L., Malejerwa M. A new method of the determination of the circulating immune complexes in liquor (in Russian) // Gasopis Lekarů Ceskych. – 1977. **116** (14). – P. 436–437.
14. Krstić A., Vlaski M., Hammoud M., Chevaleyre J., Duchez P., Jovčić G., Bugarski D., Milenković P., Bourin P., Boiron J.M., Praloran V., Ivanović Z. Low O<sub>2</sub> concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34+ and mesenchymal stem cells // Eur Cytokine Netw. – 2009. – **20**. – P. 10–16.
15. Manchini G., Vaerman J.-P., Carbonera A.O., Heremans J.F. A simple radial-diffusion method for the immunological quantitation of protein. – In: Proceedings of the biological fluids. – Amsterdam, London, N.Y.: Elsevier, 1964. – P. 370–379.
16. Mancuso P., Peccatori F., Rocca A., Calleri A., Antoniotti P., Rabascio C., Saronni L., Zorzino L., Sandri M.T., Zubani A., Bertolini F. Circulating endothelial cell number and viability are reduced by exposure to high altitude // Endothelium. – 2008. – **15**. – P. 53–58.
17. Nikolsky I., Serebrovska T.V. Role of hypoxia in stem cell development and functioning. Review // Фізіол. журн. – 2009. – **55**, № 4. – С. 116–130.
18. Ojeda-uribe M., Sovalat H., Bourderont D., Brunot A., Marr A., Levwandowski H., Chaboute V., Peter P., Henon P. Peripheral blood and BM CD34+ CD38-cells show better resistance to cryopreservation than CD34+ CD38+ cells in autologous stem cell transplantation // Cytotherapy. – 2004. – **6**, № 6. – P.571–583.
19. Olive P.L., Luo C.M., Banath J.P. Local hypoxia is produced at sites of intratumour injection // Brit. J. Cancer. – 2002. – **86**. – P. 429–435.
20. Serebrovska T., Nikolsky I., Ishchuk V. Human adaptation to intermittent hypoxia: effects on hematopoietic stem cells and immune function. – In: Adaptation Biology and Medicine, Vol. 6: Cell Adaptations and Challenges, Eds: P.Wang, C.-H. Kuo, N.Takeda and P.K.Singal, Canada: Narosa Publisher. – 2010. – P. 181–191.

21. Tang Y.L., Zhu W., Cheng M., Chen L., Zhang J., Sun T., Kishore R., Phillips M.I., Losordo D.W., Qin G. Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression // *Circulat. Res.* – 2009. – **104**. – P. 1209–1216.
22. Theiss H.D., Adam M., Greie S., Schobersberger W., Humpeler E., Franz W.M. Increased levels of circulating progenitor cells after 1-week sojourn at moderate altitude (Austrian Moderate Altitude Study II, AMAS II) // *Respirat Physiol Neurobiol.* – 2008. – **160**. – P. 232–238.
23. Viscor G., Javierre C., Pagès T., Ventura J.L., Ricart A., Martin-Henaó G., Azqueta C., Segura R. Combined intermittent hypoxia and surface muscle electrostimulation as a method to increase peripheral blood progenitor cell concentration // *J. Transl Med.* – 2009. – **7**. – P. 91.
24. Wang J.S., Lin H.Y., Cheng M.L., Wong M.K. Chronic intermittent hypoxia modulates eosinophil- and neutrophil-platelet aggregation and inflammatory cytokine secretion caused by strenuous exercise in men // *J. Appl. Physiol.* – 2007. – **103**. – P. 305–314.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Ин-т генет. і регенерат. медицини НАМН України, Київ;  
Ин-т геронтології НАМН України, Київ  
E-mail: sereb@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов  
до редакції 02.12.2011*

Л.Е. Весніна, Т.В. Мамонтова, М.В. Микитюк, Л.О. Куценко, Н.О. Боброва,  
Н.Л. Куценко, І.П. Кайдашев

## Стан перекисного окиснення ліпідів у мишей та дія фулерену $C_{60}$ під час імунної відповіді

*Досліджено вплив фулерену  $C_{60}$  на процеси перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту за умов розвитку імунної відповіді на гетероантиген. Для індукції імунної відповіді мишей імунізували введенням суспензії еритроцитів барана. Водну дисперсію фулерену  $C_{60}$  вводили внутрішньоочеревинно у дозі 50 нг одноразово в першу добу і протягом 3 і 6 діб після імунізації. Індукція імунної відповіді в тканинах печінки, нирок і серця супроводжувалася підвищенням приросту концентрації малонового діальдегіду. У латентну фазу первинної імунної відповіді фулерен  $C_{60}$  сприяв індукції перекисного окиснення, у фазу розвитку імунної відповіді – відіграв роль антиоксиданта. Введення фулерену  $C_{60}$  інтактним тваринам збільшувало активність супероксиддисмутази і каталази в печінці та селезінці. На тлі імунізації в печінці збільшувалася активність антиоксидантних ферментів, знижувався збільшений коефіцієнт маси. У селезінці введення фулерену  $C_{60}$  зменшувало активність супероксиддисмутази та каталази. Результати свідчать про позитивний вплив фулерену  $C_{60}$  на процеси перекисного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів, що, можливо, зумовлено його мембраностабілізуючою дією чи здатністю самостійно зв'язувати вільні радикали.*

*Ключові слова: фулерен  $C_{60}$ , перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантний захист, імунна відповідь на гетероантиген.*

### ВСТУП

Окисно-відновні реакції лежать в основі метаболічних процесів, що забезпечують сталість внутрішнього середовища організму. Особливого значення набувають вільнорадикальні реакції, при яких утворюються перекисні сполуки. Вільнорадикальне окиснення (ВРО) відіграє важливу роль у функціонуванні імунної системи. Воно генерує внутрішньоклітинні бактерицидні та вірусцидні фактори [2]. Основна частина вільних радикалів утворюється фагоцитами, Т-лімфоцитами та є захисною функцією при запальних реакціях, лізуючи патогени й онко-трансформовані клітини. Продукція вільнорадикальних метаболітів кисню посилюється в період фагоцитозу, формуючи так званий «респіраторний вибух», що є важливим механізмом неспецифічної резистентності.

Але надмірна активація ВРО формує цілу низку негативних реакцій, що призводить до розвитку патологічних станів [4], тому потрібно шукати нові перспективні засоби його корекції.

В останні роки увагу науковців привертають наноматеріали, зокрема алотропні форми вуглецю фулерени. Дослідження показали, що фулерен має унікальні властивості: досить легко проникає через мембрану, здатний до взаємодії з вільними радикалами кисню, потужний антиоксидант [9, 15, 17]. На думку Wang і співавт. [18], фулерену  $C_{60}$  властива навіть більша антиоксидантна активність, ніж природному антиоксиданту вітаміну Е ( $\alpha$ -токоферол), він може надавати потужний гепатопротекторний ефект, захищаючи печінку від токсичних пошкоджень [10].

На наш погляд, фулерен  $C_{60}$  може виявитися ефективним імуномодулювальним засобом, в основі дії якого лежить здатність

© Л.Е. Весніна, Т.В. Мамонтова, М.В. Микитюк Л.О. Куценко, Н.О. Боброва, Н.Л. Куценко, І.П. Кайдашев



пригнічувати ВРО через реалізацію свого антиоксидантного потенціалу.

Метою нашого дослідження стало вивчення впливу фулерену  $C_{60}$  на стан процесів ВРО та антиоксидантного захисту на тлі розвитку імунної відповіді на гетероантигени в експерименті.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на самцях мишей лінії Balb/c ( $n = 36$ ) масою 19,3–23,9 г, віком від 10 до 12 тиж. Тварини перебували на стандартному раціоні віварію та мали вільний доступ до питної води. Маніпуляції з тваринами здійснювали з дозволу комісії з біоетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія».

Для індукції імунної відповіді на гетероантигени мишей імунізували внутрішньоочеревинним введенням суспензії еритроцитів барана (ЕБ) (НВЛ «Гранум», Харків, Україна) в 0,15 М розчині хлориду натрію, з розрахунку  $2 \cdot 10^8$  клітин на тварину [5].

Для отримання водної дисперсії фулерену  $C_{60}$  за основу був узятий метод Dhavan та співавт. [14]. Фулерен  $C_{60}$  (“Sigma”, США) перемішували в асептичних умовах із стерильною деіонізованою водою на магнітній мішалці протягом 2 міс [8]. Мишам вводили внутрішньоочеревинно його водну дисперсію в дозі 50 нг у 100 мкл стерильного фосфатно-сольового буфера.

Тварини були розділені на 6 груп по 6 особин. Інтактні миші склали 1-шу групу. До 2-ї – контрольної увійшли миші, імунізовані ЕБ. Тваринам 3-ї, також контрольної групи, вводили фулерен  $C_{60}$  протягом 3 діб. Мишам – 4-ї, 5-ї та 6-ї груп через 1 год після імунізації його вводили одноразово протягом 1, 3 та 6 діб відповідно. Евтаназію проводили методом цервікальної дислокації. Для дослідження були відібрані серце, печінка, селезінка, нирки та тимус. У гомогенатах відібраних тканин серця, печінки, селезінки та нирок визначали показники вільнорадикального окиснення

ліпідів і антиоксидантного захисту.

Основним показником вільнорадикальних процесів може бути перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), що проходить у біомембранах. Стан ПОЛ оцінювали за приростом малонового діальдегіду (МДА) під час 1,5-годинної інкубації в прооксидантному буфері, антиоксидантний захист – за зміною активності антиоксидантних ферментів першої лінії захисту від вільних радикалів – супероксиддисмутази – СОД (КФ 1.15.1.1) та каталази (КФ 1.11.1.6). Активність каталази оцінювали за кількістю пероксиду водню, який розщеплюється під дією ферменту, СОД – за зміною швидкості пригнічення продукції супероксидного аніон-радикала в реакції аутоокиснення адреналіну, результат виражали в умовних одиницях [1]. Для вивчення загальносоматичного впливу фулерену  $C_{60}$  розраховували коефіцієнти маси тимуса, селезінки, печінки та нирок.

Статистичну обробку матеріалу проводили за допомогою програми STATISTICA 6.0 (StatSoft, США) з обчисленням середнього ( $M$ ) і стандартної помилки ( $m$ ). Достовірними результати вважали при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У використаній експериментальній моделі індукції первинної імунної відповіді на ЕБ можна виділити три основні етапи. Латентна фаза – інтервал від введення антигена до появи перших антитіл – становить близько 3 діб. Максимум вироблення антитіл до чужорідних еритроцитів сягає на 5-ту добу. Тому строки введення фулерену  $C_{60}$  були визначені виходячи з динаміки накопичення антитіл – у першу добу імунізації (відсутність антитіл), в перші три доби – розвиток імунної відповіді, шість діб – в організмі спостерігається найбільш високий її рівень.

На першому етапі було досліджено вплив фулерену  $C_{60}$  на накопичення продуктів ПОЛ у гомогенатах тканин. Приріст МДА в період інкубації в гомогенаті печінки інтактної групи становив 13 % (рисунок, а). Гетеро-



імунізація тварин 2-ї групи призводила до підвищення приросту МДА в 3,4 раза ( $44,88\% \pm 3,08\%$ ,  $P < 0,05$ ), водночас у 3-й групі цей показник став дещо нижче, ніж в інтактній.

Одноразове введення тваринам фулерену  $C_{60}$  на тлі імунізації достовірно збільшувало приріст МДА в 2,9 раза ( $130,83\% \pm 19,12\%$ ). Введення фулерену  $C_{60}$  імунізованим тваринам протягом 3 і 6 діб знижувало цей показник до  $57,62 \pm 3,72$  і  $31,57\% \pm 5,7\%$  відповідно. У порівнянні з 2-ю групою вміст МДА був достовірно нижчим при його введенні протягом 6 діб.

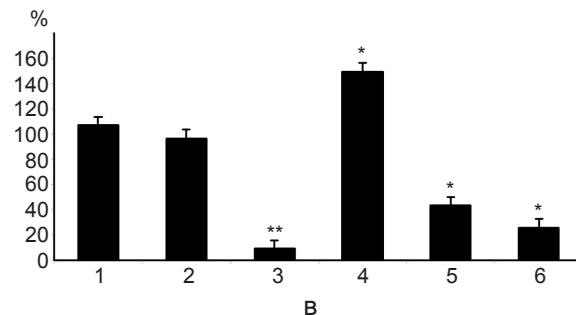
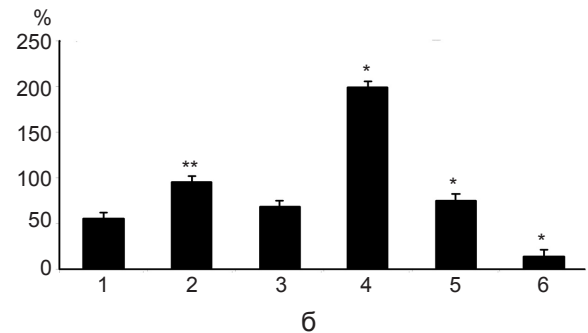
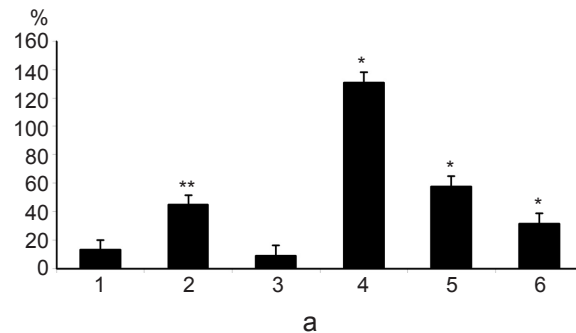
При інкубації в прооксидантному буфері гомогенатів нирок приріст концентрації МДА у інтактних тварин становив  $32,55\% \pm 11,89\%$  ( $P < 0,05$ ). Було виявлено тенденцію до його збільшення у імунізованих тварин і в 3-й групі порівняно з інтактною. Введення тваринам фулерену  $C_{60}$  на тлі імунізації показало недостовірні зміни.

Приріст концентрації МДА в гомогенатах тканин серця 1-ї групи тварин був  $55,49\% \pm 3,52\%$  (див. рисунок, б). У тварин 2-ї групи цей показник вірогідно збільшився в 1,7 раза ( $95,43\% \pm 0,13\%$ ), у 3-й групі – практично не змінювався. Одноразове введення фулерену

$C_{60}$  імунізованим тваринам достовірно збільшувало приріст концентрації МДА в тканинах серця до  $199,24\% \pm 10,55\%$ . Введення фулерену  $C_{60}$  імунізованим тваринам протягом 3 і 6 діб достовірно знижувало показник приросту порівняно з контрольною групою імунізації до  $75,57 \pm 1,47$  і до  $14,5\% \pm 0,28\%$  відповідно.

У разі інкубації гомогенатів тканин селезінки в прооксидантному буфері приріст концентрації МДА становив  $106,95\%$  (див. рисунок, в). Імунізація тварин 2-ї групи практично не впливала на цей показник, в 3-й групі приріст достовірно знижувався в 11,7 раза. Одноразове введення фулерену  $C_{60}$  імунізованим тваринам сприяло достовірному приросту концентрації МДА в тканинах селезінки в 1,6 раза, його введення протягом 3 і 6 діб зменшувало показник в 2,2 і 3,7 раза ( $P < 0,05$ ) порівняно з контрольною групою імунізації.

Таким чином, при гетероімунізації в гомогенатах тканин печінки, нирок і серця активізуються процеси ПОЛ, що виражається підвищенням приросту концентрації МДА. Введення фулерену  $C_{60}$  інтактним тваринам практично не впливало на зміну приросту, тільки для гомогенатів селезінки отримано



Вплив фулерену  $C_{60}$  на приріст концентрації малонового діальдегіду (%) в тканинах печінки (а), серця (б), селезінки (в): 1 – інтактна група, 2 – контрольна група, імунізація еритроцитами барана, 3 – контрольна група, введення фулерену  $C_{60}$  протягом 3 діб, 4, 5, 6 – імунізація еритроцитами барана та введення фулерену  $C_{60}$  протягом 1, 3, 6 діб відповідно. \* $P < 0,05$  порівняно з контрольною групою імунізації еритроцитами барана, \*\* $P < 0,05$  порівняно з інтактною групою

достовірне зниження його рівня порівняно з інтактною групою зі значно завищеним вихідним значенням. Виявлено загальну для тканин печінки, серця та селезінки тенденцію збільшення приросту концентрації МДА при введенні тваринам фулерену  $C_{60}$  в день імунізації. Його введення на тлі розвитку імунної відповіді сприяє стабілізації процесів пероксидації, особливо виражено для гомогенатів серця та селезінки.

На наступному етапі було вивчено вплив фулерену  $C_{60}$  на стан активності показників антиоксидантної системи в тканинах печінки, нирок, серця та селезінки. Імунізація тварин 2-ї групи достовірно знижувала активність СОД у тканинах нирок в 1,2 раза, серця в 1,4 раза і підвищувала в тканинах селезінки в 4,1 раза (табл. 1).

У 3-й групі достовірно знижувалася активність СОД у тканинах нирок в 1,2 раза і серця в 2,2 раза. У тканинах печінки та селезінки, навпаки, активність ферменту збільшувалась в 1,3 і 3,6 раза відповідно порівняно з інтактною групою.

Одноразове введення фулерену  $C_{60}$  на тлі гетероімунізації призводило до достовірного зниження активності СОД у тканинах нирок і селезінки та підвищення – у тканинах серця. Його введення протягом 3 діб імунізованим тваринам достовірно знижувало активність ферменту в печінці в 1,5 раза, нирках в 1,4 раза, в селезінці в 1,2 раза і підвищувало в тканинах серця в 1,7 раза порівняно з контрольною групою. У тварин, які отримували фулерен  $C_{60}$  протягом 6 діб достовірно збільшувалась активність СОД у тканинах печінки і нирок і зменшувалася в селезінці.

Таким чином, фулерен  $C_{60}$  на тлі імунізації сприяв активації СОД у тканинах печінки і нирок при максимальній тривалості введення, в тканинах серця – при одноразовому та трикратному введенні.

Згідно з отриманими результатами, при імунізації тварин 2-ї групи достовірно збільшувалась активність каталази в тканинах печінки в 1,8 раза, нирок в 2,7 раза, серця в 1,6 раза і селезінки в 4,4 раза порівняно з показниками інтактних тварин (див. табл. 1).

Таблиця 1. Вплив фулерену  $C_{60}$  на активність каталази та супероксиддисмутази (ум. од.)

Схема досліджу	Печінка	Нирки	Серце	Селезінка	Печінка	Нирки	Серце	Селезінка
	Каталаза				Супероксиддисмутаза			
Вихідний стан	7,22±0,15	3,33±0,22	0,99±0,09	0,73±0,11	18,81±0,48	9,09±0,54	3,22±0,04	1,1±0,04
Імунізація еритроцитами барана (контроль 1)	12,7±0,17**	8,86±0,05**	1,96±0,15**	3,18±0,09**	20,33±0,47	7,76±0,22**	2,3±0,03**	4,56±0,1**
Введення фулерену $C_{60}$ протягом 3 діб (контроль 2)	14,64±0,20**	10,08±0,08**	1,62±0,07**	1,58±0,07**	23,56±0,79**	7,36±0,22**	1,45±0,06**	3,91±0,05**
Імунізація еритроцитами барана і введення фулерену $C_{60}$ протягом								
1 доби	14,79±0,14*	10,84±0,16*	5,2±0,12*	2,0±0,07*	19,69±0,75	6,85±,2*	3,35±0,04*	2,63±0,02*
3 діб	14,57±0,09*	6,89±0,17*	1,4±0,08	0,69±0,04*	13,7±1,04*	5,61±0,08*	3,89±0,07*	3,91±0,02*
6 діб	13,64±0,2*	9,1±0,18	1,28±0,07*	2,68±0,08*	25,6±1,42*	9,17±0,61*	2,32±0,04	2,51±0,04*

Тут і в табл. 2. \*  $P < 0,05$  порівняно з контролем 1, \*\*  $P < 0,05$  порівняно з вихідним станом (інтактна група)

У мишей 3-ї групи вміст каталази був достовірно вище в усіх досліджуваних органах. Одноразове введення фулерену  $C_{60}$  на тлі гетероімунізації призвело до достовірного підвищення активності каталази в печінці та нирках в 1,2 раза, у серці в 2,7 раза і зниження в тканинах селезінки в 1,6 раза. Введення фулерену  $C_{60}$  протягом 3 і 6 діб достовірно збільшувало активність каталази в печінці і знижувало в нирках, серці та селезінці порівняно з 2-ю групою.

Отримані результати свідчать, що введення фулерену  $C_{60}$  імунізованим тваринам у різні терміни має різноспрямований вплив на активність каталази в тканинах внутрішніх органів.

У відповідь на імунізацію ЕБ коефіцієнт маси тимуса достовірно зменшувався у 1,3 раза, печінки збільшувався в 1,6 раза і нирок в 1,4 раза (табл. 2).

У контрольній групі тварин, яким вводили фулерен  $C_{60}$ , відзначено достовірне зниження коефіцієнта маси тимуса в 1,8 раза і збільшення – нирок в 1,2 раза. При його введенні на тлі розвитку імунної відповіді достовірно знижувався коефіцієнт маси печінки (див. табл. 2).

У цілому, згідно з результатами, при індукції імунної відповіді в тканинах печінки, нирок і серця активізувалися процеси ПОЛ, що спричинило підвищення приросту

концентрації МДА. Введення фулерену  $C_{60}$  інтактним тваринам не стимулювало його в печінці і селезінці, а протягом 3 і 6 діб при розвитку первинної імунної відповіді – стабілізувало процеси ПОЛ і знижувало приріст концентрації МДА в тканинах печінки, селезінки та серця порівняно з імунізованою групою.

Слід зазначити протилежний вплив фулерену  $C_{60}$  на активність антиоксидантних ферментів у тканинах печінки та селезінки. Його введення інтактним тваринам достовірно збільшувало активність СОД і каталази в цих органах. У печінці на тлі імунізації активність антиоксидантних ферментів переважно збільшувалася, знижувався також збільшений коефіцієнт маси, що загалом свідчило про протективний ефект. У селезінці незалежно від строків введення активність СОД і каталази пригнічувалася.

ЕБ, що застосовувалися нами як гетерологічний антиген, найбільш повно моделюють різні варіанти чужорідного агента (корпускулярний, Т-залежний, що містить безліч антигенних детермінант) і є оптимальним вибором для стимуляції антитілоутворення серед існуючих активаторів. Антигени ЕБ відносяться до тимусзалежних, імунна відповідь на які здійснюється за участю Т-лімфоцитів.

Первинна імунна відповідь на імунізацію ЕБ супроводжується підвищенням кількості

Таблиця 2. Вплив фулерену  $C_{60}$  на коефіцієнти мас внутрішніх органів тварин

Схема досліджу	Печінка	Нирки	Селезінка	Тимус
Вихідний стан	3,50±1,19	1,05±0,05	0,59±0,11	0,36±0,07
Імунізація еритроцитами барана (контроль 1)	5,72±0,45**	1,42±0,30**	0,81±0,41	0,27±0,03**
Введення фулерену $C_{60}$ протягом 3 діб (контроль 2)	4,92±0,52	1,24±0,16**	0,80±0,36	0,20±0,07**
Імунізація еритроцитами барана і введення фулерену $C_{60}$ протягом				
1 доби	4,99±0,50*	1,64±0,13	0,72±0,15	0,22±0,07
3 діб	5,06±0,44*	1,32±0,24	0,77±0,34	0,21±0,13
6 діб	4,98±0,51*	1,65±0,14	0,71±0,16	0,21±0,06

спленокаріоцитів, вмісту клітин-антитілопродукентів і продукції антиеритроцитарних антитіл (гемолізінів) IgM [7], а також зрушеннями в системі ВРО. Клітини імунної системи особливо чутливі до змін в про-антиоксидантній системі внаслідок більш високого вмісту поліненасичених жирних кислот в їхніх мембранах. Баланс окисних процесів важливий не тільки для підтримки цілісності та функціональності мембранних ліпідів, білків і нуклеїнових кислот, а також для збереження і реалізації імунних функцій, контролю передачі та експресії генів у клітинах імунної системи [12].

Активация ВРО, зокрема ПОЛ, є одним із факторів патогенезу запального процесу. Надлишкова активация ВРО, пов'язана зі збільшеною продукцією активних форм кисню – супероксидного аніон-радикала, гідроксильного та гідропероксильного радикалів, пероксиду водню або виснаженням антиоксидантної системи, супроводжується істотним порушенням репаративних процесів і розцінюється як «окисний стрес» [2].

Процеси ПОЛ проходять у всіх клітинах, однак найбільш потужні генератори вільних радикалів – лейкоцити, тромбоцити та гепатоцити. Це обґрунтовано тим, що печінка має один із найвищих в організмі рівнів метаболічних процесів, що знаходить своє відображення і у вільнорадикальному окисненні. Селезінка – багатофункціональний орган, який відіграє важливу роль у контролі та підтримці гомеостазу, особливо в екстремальних станах – під час крововтрати, гіпоксії, сепсису. У макрофагах селезінки в період фагоцитозу різко посилюється ПОЛ, що супроводжується утворенням синглетного кисню [3].

Згідно з даними Moussa та співавт. [13], при внутрішньовенному введенні фулерен  $C_{60}$  насамперед накопичується в печінці та селезінці, а також здатний проникати через гематоенцефалічний бар'єр. Надалі, завдяки своїй ліпофільності він досить легко проникає через мембрану клітини, що може в

перспективі бути використано для адресної доставки лікарських препаратів у цитоплазму клітини. Агрегати фулерену  $C_{60}$  можуть «прилипати» до поверхні клітин, після чого окремі його молекули (або невеликі агрегати) дифундують всередину мембрани [19]. Здатність фулеренів вбудовуватися, занурюватися в мембрану припускає можливість впливу на її властивості, фізико-хімічні зміни і, тим самим, стабілізацію на тлі активного перебігу реакцій ПОЛ.

Вибір фулеренів для впливу на процеси ПОЛ не випадковий. Унікальні електрохімічні властивості дають їм змогу діяти як окисники або антиоксиданти, залежно від функціоналізації їх поверхні та навколишнього середовища [6]. Можливо, підвищення ПОЛ при імунній відповіді є відображенням активації метаболізму. Згідно з нашими результатами, в латентну фазу первинної імунної відповіді фулерен сприяв індукції перекисного окиснення, а у фазу розвитку імунної відповіді – навпаки, відіграв роль антиоксиданта.

Можливість фулеренів брати участь у різних реакціях приєднання пояснюється зв'язаністю одинарних і подвійних зв'язків у молекулі, що надає їм псевдоароматичних властивостей. Уперше здатність фулеренів та їх похідних інактивувати вільні радикали кисню було описано Krustic та співавт. [11], коли фулерен  $C_{60}$  був охарактеризований як «губка, здатна збирати вільні радикали» завдяки електрооакцепторним властивостям його псевдоароматичної структури. Одна його молекула здатна приєднувати до 34 метильних радикалів [6]. Тобто, фулерени можуть інгібувати вільнорадикальні процеси та фактично виступати в ролі антиоксидантів. Є відомості, що фулерен  $C_{60}$  та його похідні локалізуються в мітохондріях, проявляючи дію, подібну до антиоксидантного ферменту СОД [16].

Антиоксидантна ефективність фулеренів залежить від числа нерозірваних подвійних зв'язків у їх вуглецевому каркасі. Приєднання до них різних хімічних груп супроводжується

розривом цих зв'язків, зниженням електроноакцепторних і антиоксидантних властивостей. Найбільш активні – нативні, хімічно не модифіковані молекули фулеренів.

На наш погляд, відмінність у реалізації ефектів фулеренів можна пояснити, враховуючи функцію органів. Печінка пристосована до роботи різних ферментних систем, і вихідний вміст СОД і каталази у інтактних тварин значно перевищує ці значення в селезінці. Така особливість захищає печінку від постійної наявності високореактивних метаболітів кисню. Для селезінки не характерний високий рівень метаболізму та активності ферментних систем, тому, вірогідно, активація антиоксидантних ферментів у цьому разі не є ефективним механізмом зниження ПОЛ. Ефект зниження приросту концентрації МДА під дією фулерену  $C_{60}$  скоріш за все відбувається виключно внаслідок або зв'язування вільних радикалів, коли сам фулерен відіграє роль пастки, або його мембранотропного впливу, коли вбудовування в мембрану призводить до її фізико-хімічних змін і стабілізації.

Таким чином, результати дослідження свідчать про позитивний вплив фулерену  $C_{60}$  на процеси ПОЛ та активність антиоксидантних ферментів у різних органах під час розвитку імунної відповіді на гетерологічний антиген. Водночас потрібне більш детальне вивчення його впливу на процеси ПОЛ при різних патологічних станах імунної системи, що дасть можливість використання фулеренів як імуномодулювальних препаратів з абсолютною особливою точкою докладання своєї дії.

**Л.Э. Веснина, Т.В. Мамонтова, М.В. Микитюк, Л.А. Куценко, Н.А. Боброва, Н.Л. Куценко, И.П. Кайдашев**

#### **СОСТОЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У МЫШЕЙ И ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНА $C_{60}$ ВО ВРЕМЯ ИМУННОГО ОТВЕТА**

Исследовано влияние фуллерена  $C_{60}$  на состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной

защиты при развитии иммунного ответа на гетероантиген. Для индукции иммунного ответа мышей иммунизировали внутрибрюшинным введением суспензии эритроцитов барана. Водную дисперсию фуллерена  $C_{60}$  вводили внутрибрюшинно в дозе 50 нг однократно в первые сутки и в течение 3 и 6 сут после иммунизации. Индукция иммунного ответа в тканях печени, почек и сердца сопровождалась повышением прироста концентрации малонового диальдегида. В латентную фазу первичного иммунного ответа фуллерен  $C_{60}$  способствовал индукции перекисного окисления, в фазу развития иммунного ответа – выступал в роли антиоксиданта. Введение фуллерена  $C_{60}$  интактным животным увеличивало активность супероксиддисмутазы и каталазы в печени и селезенке. На фоне иммунизации в печени активность антиоксидантных ферментов увеличивалась, снижался увеличенный коэффициент массы. В селезенке введение фуллерена  $C_{60}$  снижало активность супероксиддисмутазы и каталазы. Результаты свидетельствуют о позитивном воздействии фуллерена  $C_{60}$  на процессы перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов, что, возможно, обусловлено его мембраностабилизирующим действием или способностью самостоятельно связывать свободные радикалы. Ключевые слова: фуллерен  $C_{60}$ , перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, иммунный ответ на гетероантиген.

**L.E. Vesnina, T.V. Mamontova, M.V. Mikityuk, L.A. Kutsenko, N.A. Bobrova, N.L. Kutsenko, I.P. Kaidashev**

#### **THE CONDITION OF LIPID PEROXIDATION IN MICE AND THE EFFECT OF FULLERENE $C_{60}$ DURING IMMUNE RESPONSE**

The aim of this study was to assess the influence of fullerene  $C_{60}$  on lipid peroxidation (POL) and antioxidant protection during the induction of the immune response to heteroantigen. Balb/c mice were immunized intraperitoneal (i.p.) with sheep erythrocytes for the primary immunization. Water dispersion of fullerene  $C_{60}$  was injected i.p. once at the dose 50 ng to mice on first, third and sixth days after immunization. During immune response, the increment of malonic dialdehyde (MDA) was enhanced in liver, kidneys and heart tissues. Fullerene  $C_{60}$  induced POL during the latent phase of immune response, but inhibited this process during progression of immune response. Activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase in liver and spleen tissues were induced after injection of fullerene  $C_{60}$  to intact mice. After immunization, high level of activity of antioxidant enzymes and low level of organs mass factor were determined. Injection of fullerene  $C_{60}$  reduced the activities of SOD and catalase in spleen tissues. The results of our study indicate that fullerene  $C_{60}$  can display positive effect on POL processes and antioxidant enzymes activity which is probably due to membrane's stabilization action or the ability of fullerene  $C_{60}$  to bind free radicals independently.



Key words: fullerene C<sub>60</sub>, lipid peroxidation, antioxidant protection states, immune response to heteroantigen.

*Research Institute for Genetic and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics, Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.А., Гейко О.О., Кайдашев І.П., Куценко Л.О., Ножинова О.А., Рябенко В.В., Соколенко В.В., Шинкевич В.І. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Під ред. І.П. Кайдашева. – Полтава: Полімет, 2003. – 320 с.
2. Кохан С.Т., Кривошеєва Е.М. Экспериментальное исследование антиоксидантных свойств растительных адаптогенов // Вестн. фармации. – 2010. – №4(50). – С. 29–33.
3. Ланкин В.З. Тихадзе А. К., Беленков Ю.Н. Свободно-радикальные процессы в норме и при патологических состояниях. – М.: Медицина, 2001. – 78 с.
4. Маханова Р.С. К вопросу изучения перекисного окисления липидов // Изв. Оренбург. гос. аграр. ун-та. – 2011. – № 1(29), ч.2. – С. 231–234.
5. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вихоть Н.Е. Иммунология: Практикум. – К.: Вища школа, 1989. – 326 с.
6. Пиотровский Л.Б. Фуллерены в дизайне лекарственных веществ // Рос. нанотехнологии. – 2007. – 2, № 7–8. – С. 6–18.
7. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
8. Dhavan A., Taurozzi J.S., Pandey A.K. Shan W., Miller S.M., Hasham S.A., Tarabara V.V. Stable colloidal dispersion of C<sub>60</sub> fullerenes in water: evidence for genotoxicity // Environ. Sci. Technol. – 2006. – 40. – P. 7394–7401.
9. Dugan L.L., Gabrielsen J.K., Yu S.P., Lin T.S., Choi D.W. Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons // Neurol. Dis. – 1996. – 3(2). – P. 129–135.
10. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Moussa F. C<sub>60</sub> Fullerene Prevents Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. [Electronic resource] / F. The Electrochemical Society Interface (205-th Meeting, May 9-14, 2004, San Antonio, TX, USA), Spring 2004, #581 <http://www.electrochem.org/meetings>.
11. Krusic P.J., Wasserman E., Kaiser P.N. Radical reaction of C<sub>60</sub> // Science. – 1991. – 254. – P. 1183–1185.
12. Meydani S.N., Wu D., Santos M.S., Hayek M.G. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence // Amer. J. Clin. Nutr. – 1995. – 62. – P. 1462–1476.
13. Moussa F., Pressac M., Genin E., Roux S., Trivin F., Rassat A., Ceolin R., Szwarc H.H. Quantitative analysis of C-60 fullerene in blood and tissues by high-performance liquid chromatography with photodiode-array and mass spectrometric detection // J. Chromatog. B-Analyt. Technol. in the Biomed. and Life Sci. – 1997. – 696(1). – P. 153–159.
14. Ryan J.J., Bateman H.R., Stover A., Gomez G., Norton S. K., Zhao W., Schwartz L.B., Lenk R., Kepley C.L. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response // J. Immunol. – 2007. – 179. – P. 665–672.
15. Ros T. Twenty Years of Promises: Fullerene in Medicinal Chemistry // Med. Chem. and Pharmacol. Potential Fulleren. and Carbon Nanotubes. – 2008. – 1. – P. 1–21.
16. Sameh S.Ali, Hardt J. I., Quick K. L., Kim-Han J. S., Erlanger B. F., Huang T., Epstein C. J., Dugan L. L. A biologically effective fullerene (C<sub>60</sub>) derivative with superoxide dismutase mimetic properties // Free Rad. Biol. and Med. – 2004. – 37(8). – P. 1191–1202.
17. Torres V.M., Posa M., Srdjenovic B., Simplicio A.L. Solubilization of fullerene C<sub>60</sub> in micellar solutions of different solubilizers // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2011. – 82(1). – P. 46–53.
18. Wang I.C., Tai L.A., Lee D.D., Kanakamma P.P., Shen C.K.-F., Luh T.-Y., Cheng C.H., Hwang K.C. C<sub>60</sub> and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation // J. Med. Chem. – 1999. – 42, Is. 22. – P. 4614–4620.
19. Scrivens W.A., Tour J.M., Creek K.E., Pirisi L. Synthesis of <sup>14</sup>C-labeled C<sub>60</sub>, its suspension in water, and its uptake by human keratinocytes // J. Amer. Chem. Soc. – 1994. – 116. – P. 4517–4518.

*Наук.-досл. ін-т генет. та імунол. основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого держ. навчальн. закладу України «Українська медична стоматологічна академія», Полтава  
E-mail: [congres2007@yandex.ru](mailto:congres2007@yandex.ru)*

*Матеріал надійшов до редакції 04.04.2011*



М.І. Лісяний, А.І. Ключникова

## Розвиток імунної відповіді на алогенні клітини ембріонів і дорослих мишей при внутрішньомозковій імунізації

*Вивчали цитотоксичну активність лімфоцитів селезінки та клітин лімфатичних вузлів, накопичення антитіл у сироватці крові реципієнта у відповідь на внутрішньомозкове введення антигена. Клітинна та гуморальна імунна відповідь у мишей розвивалася при введенні алогенних клітин селезінки як дорослих тварин, так і на ембріональні клітини, проте в останньому випадку реакція була менш інтенсивною. Це дає змогу говорити про те, що ізоляції головного мозку немає, оскільки антигени, введені в мозок, здатні індукувати реакцію імунної відповіді, а ембріональні клітини вже на 13–15-ту добу гестації експресують достатню для індукції імунної відповіді кількість молекул головного комплексу гістосумісності.*

*Ключові слова:* імунна відповідь у мозку, алогенні клітини, внутрішньомозкова імунізація.

### ВСТУП

Відомо, що головний мозок відноситься до імунологічно ізольованих тканин організму завдяки наявності гематоенцефалічного бар'єра та відсутності лімфатичних судин, що передбачає особливості розвитку імунної відповіді на різні антигени при їх потраплянні в мозок, у тому числі на алогенні клітини [2, 5, 7, 8].

Недостатньо вивченою є роль клітин головного мозку в індукції та регуляції клітинної, а також гуморальної імунної відповіді – процесу, який розвивається після взаємодії різних типів клітин (Т- і В-лімфоцитів, макрофагів, дендритних клітин) [1, 9–11]. Суперечливим є питання про приживлення та відторгнення алогенних ембріональних клітин, оскільки не до кінця досліджена експресія антигенів нейротрансплантатів, оскільки в мозку запускається специфічна імунна відповідь, гістосумісності цих клітин [6, 12, 13].

Для з'ясування можливості розвитку імунної відповіді організму на внутрішньомозкове введення суспензії алогенних клітин

дорослих тварин та ембріонів були проведені дослідження клітинної та гуморальної імунної відповіді при введенні алогенних клітин селезінки дорослих тварин або селезінки чи клітин головного мозку ембріонів 13–15-ї доби гестації.

Метою нашої роботи було дослідження розвитку імунної відповіді на 6, 12 та 18-ту добу при внутрішньомозковому введенні алоантигенів – свіжевиділених алогенних спленоцитів дорослих мишей і спленоцитів і суспензії клітин головного мозку ембріонів 13–15-ї доби гестації.

### МЕТОДИКА

Дослідження проведено на безпородних мишах масою 13–15 г, яким у праву скроневу ділянку мозку, за 1–2 мм від брегми, на глибину 1,5–2 мм вводили 0,05 мл суспензії клітини у концентрації  $1 \cdot 10^6$ . Тваринам першої групи – суспензію спленоцитів дорослих мишей лінії C<sub>57</sub>BL, другої – суспензію спленоцитів ембріонів мишей 13–15-ї доби гестації, третьої групи – суспензію клітин

мозку ембріонів мишей 13–15-ї доби гестації. На 6, 12 та 18-ту добу досліджували розвиток імунної відповіді.

Усі експерименти над тваринами проводили відповідно до норм Європейської Конвенції із захисту хребетних тварин при їх використанні в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р. ETS N 123).

У мишей під ефірним наркозом видаляли селезінку, у вагітних мишей 13–15-ї доби гестації – ембріони, в яких вилучали мозок і селезінку. Суспензії клітин отримували гомогенізацією та відмиванням за допомогою дворазового центрифугування і наступним підрахунком у камері Горяєва з 3%-ю оцтовою кислотою.

Цитотоксичну активність (ЦА) імунно-компетентних клітин визначали колориметричним методом із застосуванням барвника – нейтрального червоного. Ефекторами були лімфоцити лімфовузлів мишей-реципієнтів (не лінійних мишей). Як клітини-мішені використовували лімфоцити лімфовузлів мишей-донорів лінії C<sub>57</sub>BL. Цитотоксичний тест проводили за протоколом [3]. Метод визначення цитотоксичності за вивільненням із клітин вітального барвника, нейтрального червоного, як відомо з багатьох джерел, оснований на тому, що сенсibiliзована цитотоксична клітина викликає руйнування цитоплазматичної мембрани клітини-мішені, що призводить до виходу вітального барвника із клітини. Чим більше руйнується клітин-мішеней, тим більше виходить барвника, і відповідно вища цитотоксична дія клітин ефекторів, а саме цитотоксичних лімфоцитів і макрофагів. При цьому реєструють як природне пошкодження мішеней, так і примусовий лізис. Цитотоксичність натуральних кілерів виражали цитотоксичним індексом (ЦІ) у відсотках :

$$\text{ЦІ} = \frac{(T_d - T_k \cdot 100)}{T_d} \%,$$

де T<sub>d</sub> – значення оптичної густини в дослідних лунках ефектори і мішені; T<sub>k</sub> – значення оптичної густини в контрольних лунках з мішенями.

Рівень алоантитіл у сироватці крові оцінювали в мікролімфоцитотоксичному тесті [4] з лімфоцитами селезінки донорів і комплементом морської свинки при забарвленні загиблих клітин розчином трипанового синього (“Merk”, Німеччина) через 1,5 год після реакції, визначали ЦА лімфоцитів за різницею кількості мертвих клітин у сироватці крові реципієнтів і таких при дії сироватки на алогенні клітини донора.

Обробку результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 97 SR-2 (© Microsoft Corporation, США) на персональному комп’ютері з процесором Intel® Pentium® Pro з операційною системою Microsoft Windows 98 (© Microsoft Corporation, США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні ЦА лімфоцитів у тесті з нейтральним червоним імунна відповідь розвивалась з 6-ї по 18-ту добу, пік якої спостерігався на 12-ту добу. Так, при введенні спленоцитів дорослих мишей ЦА клітин селезінки на 6-ту добу становила 32,3 ум.од. ± 4,65 ум.од., на 12-ту добу зросла до 54,3 ум.од. ± 9,1 ум.од., на 18-ту добу знизилася до 34,4 ум.од. ± 7,01 ум.од. ЦА клітин лімфовузлів мала аналогічну тенденцію підвищення на 12-ту добу до 56,2 ум.од. ± 11,6 ум.од., і на 18-ту добу стрімко знижувалася до 33,0 ум.од. ± 4,08 ум.од.

При введенні суспензії клітин селезінки ембріонів мишей 13–15-ї доби гестації імунна відповідь була менш інтенсивною порівнянно з дорослими мишами. Так, ЦА лімфоцитів селезінки на 6-ту добу становила 33,4 ум.од. ± 2,6 ум.од., на 12-ту зростала до 39,5 ум.од. ± 9,1 ум.од., на 18-ту добу знизилася до 28,9 ум.од. ± 8,0 ум.од. ЦА клітин лімфовузлів на 6-ту добу після введення в мозок ембріональних спленоцитів становила 32,8 ум.од. ± 1,6 ум.од., на 12-ту добу підвищувалася до 40,0 ум.од. ± 7,2 ум.од., і на 18-ту її значення було 36,0 ум.од. ± 2,0 ум.од.

Тоді як при введенні суспензії клітин

мозку ембріонів мишей 13–15-ї доби гестації ЦА була значно меншою. Так, ЦА лімфоцитів селезінки на 6-ту добу становила  $24,0 \text{ ум.од.} \pm 6,2 \text{ ум.од.}$ , на 12-ту добу підвищувалася до  $29,4 \text{ ум.од.} \pm 2,03 \text{ ум.од.}$ , і на 18-ту добу знизилася до  $22,6 \text{ ум.од.} \pm 4,2 \text{ ум.од.}$  ЦА клітин лімфовузлів на 6, 12 і 18-ту добу становила  $26,0 \pm 1,8$ ;  $32,0 \pm 3,27$  і  $28,0 \text{ ум.од.} \pm 2,4 \text{ ум.од.}$  відповідно.

Таким чином, дослідження ефекторної клітинної ланки імунної відповіді на алогенні спленоцити показало: по-перше, спленоцити несумісні за системою гістосумісності антигенів при внутрішньомозковому введенні викликають досить інтенсивну імунну відповідь, динаміка якої проявляється на 6–18-ту добу з найбільшим рівнем цитотоксичності на 12-ту добу. Водночас введення ембріональних клітин мозку індукувало вірогідно менш виражену імунну відповідь.

Клітинна відповідь імунної системи на алоантигени більш значна в лімфоцитах, що збігається з кількістю Т- і В-лімфоцитів у лімфоїдних органах.

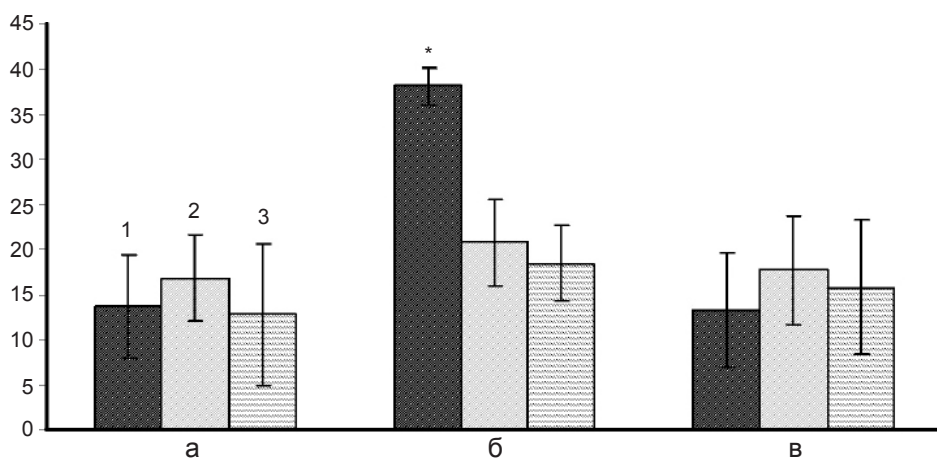
У разі вивчення гуморальної ланки імунної відповіді на алогенні клітини, спостерігалася наступна динаміка розвитку імунної відповіді: вірогідна різниця рівня алоантитіл зафіксована тільки на 12-ту добу після вве-

дення алогенних клітин з різною експресією антигенів гістосумісті. На 6-ту добу ЦА антитіл у сироватці крові мишей-реципієнтів, у розведенні 1: 10, проти алогенних клітин селезінки дорослих мишей при введенні в мозок становила  $13,7 \% \pm 5,7 \%$ , на 12-ту добу підвищувалася до  $38,2 \% \pm 2,1 \%$  і на 18-ту добу знизилася до  $13,3 \% \pm 6,3 \%$  (рисунок).

При дослідженні цитотоксичного індексу алоантитіл у сироватці крові мишей-реципієнтів в комплементзалежному тесті з трипановим синім, при введенні суспензії клітин селезінки ембріонів мишей 13–15-ї доби гестації, максимальний рівень алоантитіл спостерігався на 12-ту добу після імунізації і був вірогідно нижчим, ніж при введенні спленоцитів дорослих мишей.

При введенні суспензії клітин головного мозку ембріонів 13–15-ї доби гестації, рівень алоантитіл був невисокий і лише на 12-ту добу спостерігалася невірогідне підвищення. На 6-ту добу після імунізації рівень алоантитіл становив  $12,8 \% \pm 7,8 \%$ , на 12-ту зріс до  $18,5 \% \pm 4,2 \%$  і на 18-ту добу знизився до  $15,8 \% \pm 7,5 \%$ .

Таким чином, ембріональні клітини на 13–15-ту добу гестації мають певні особливості в індукції імунних реакцій, а саме більшу клітинну відповідь і меншу продукцію



Рівень цитотоксичних антитіл у мікролімфоцитотоксичному тесті з трипановим синім при введенні спленоцитів дорослих мишей (1), спленоцитів ембріонів (2) і мозку ембріонів (3): на 6-ту (а), 12-ту (б) і 18-ту (в) добу після імунізації. \* $P < 0,05$  різниця достовірна між групами введення спленоцитів дорослих мишей і суспензії спленоцитів, а також клітин мозку ембріонів 13–15-ї доби гестації

алоантитіл, що можна пояснити як різною експресією алоантигенів, так і спектром цих антигенів.

Наведені результати вказують на те, що імунологічна ізольованість головного мозку є «умовною». Тому при внутрішньомозковому введенні алоантигенної клітин селезінки та нейроклітин спостерігається специфічна імунна відповідь. Це може підтверджувати припущення, що клітинні антигени з мозку потрапляють у загальний кровотік, на що організм реагує активацією гуморальної ланки імунітету.

Виходячи з отриманих результатів, можна припустити, що індукція імунної відповіді в головному мозку мишей-реципієнтів на введення алогенних клітин можлива двома шляхами: активацією клітин місцевої астроглії та мікроглії або прямим потраплянням введеного антигена в кровотік і лікворообіг, що зумовлює розвиток системної імунної відповіді організму цих тварин [7, 11–14].

Динаміка імунної відповіді в наших дослідках мала аналогічну тенденцію розвитку класичної імунної реакції, пік якої спостерігався на 12-ту добу після введення алогенних клітин різного цитогенезу.

## ВИСНОВКИ

1. Внутрішньомозкова імунізація мишей-реципієнтів алогенними клітинами селезінки дорослих тварин викликає розвиток як клітинної, так і гуморальної імунної відповіді з появою специфічних цитотоксичних лімфоцитів у тканині селезінки та лімфовузлів і алоантитіл у крові на 6-ту добу після введення із наступним зростанням до 12-ї доби та подальшим (на 18-ту добу) зниженням рівня антитіл і цитотоксичної активності лімфоцитів і спленоцитів.

2. Ембріональні клітини селезінки та мозку мишей 13–15-ї доби гестації також здатні індукувати імунну відповідь організму, на що вказує підвищення цитотоксичної активності лімфоцитів у цитотоксичному тесті, а також невисокі рівні цитотоксичних алоантитіл.

3. Ембріональні клітини селезінки та головного мозку мишей за умов 13–15-ї доби гестації в порівнянні з клітинами селезінки дорослих мишей викликали менш інтенсивну клітинну та низьку гуморальну алоімунну відповіді. Це свідчить про достатню для індукції імунної відповіді експресію алоантигенів на ембріональних клітинах селезінки та головного мозку.

**Н.И. Лисяный, А.И. Ключникова**

## РАЗВИТИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ НА АЛЛОГЕННЫЕ КЛЕТКИ ЭМБРИОНОВ И ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ ПРИ ВНУТРИМОЗГОВОЙ ИММУНИЗАЦИИ

Изучено цитотоксическую активность лимфоцитов селезенки и клеток лимфатических узлов, накопление антител в сыворотке крови реципиента в ответ на внутримозговое введение антигена. Клеточный и общий иммунный ответ у мышей развивался при введении аллогенных клеток селезенки, как взрослых животных, так и на эмбриональные клетки. Хотя в последнем случае реакция была менее интенсивной. Это позволяет говорить о том, что изоляции головного мозга нет, так как антигены, введенные в мозг, способны индуцировать реакцию иммунного ответа, а эмбриональные клетки 13-15-х суток гестации эспрессируют достаточное количество молекул главной системы гистосовместимости.

Ключевые слова: иммунный ответ в мозге, аллогенные клетки, внутримозговая иммунизация.

**M.I. Lisyany, A.I. Kluchnikova**

## IMMUNE ANSWER OF MICE'S IN CASE OF INTRABRAIN INJECTION OF THE ALOHENIC SPLEEN CELLS OR BRAIN

Cytotoxic activity of spleen lymphocytes and lymphatic knots was studied. Accumulation of antibodies in blood serum of recipient in response to intrabrain injection of the antigen was investigated. Cellular and humoral immune response of mice developed with the intrabrain injection of alogenetic cells. The data obtained suggest that there is no isolation of the brain, because antigen injection to the brain is able to induce the immune reaction.

Key words: the immune answer in a brain, a brain, allogenic cells, intrabrain immunization.

*A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery NAMN of Ukraine, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кузовкова Н.А. Оценка активности естественных кил-

- леров колориметрическим методом // Иммунология. – 1991. – №4. – С. 59–61.
2. Лісяний Н.І., Любич Л.Д. Особенности развития иммунных реакций при нейротрансплантации клеток фетального мозга // Нейроиммунология. – 2009. – 7, № 3–4. – С. 4–14.
  3. Морозов С.Г., Магаева С.В., Грибова И.Е. Иммунологический надзор в ЦНС // Там же. – 2005. – 3, № 3–4. – С. 5–9.
  4. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Микроцитотоксический метод // Иммунол. методы исследования в клинике. – 1998. – 410 с.
  5. Csern H.F., Knopf P.M. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain : A new view // Immunol. Today. – 1992. – 13. – P. 507–512.
  6. Drukker M., Katz G., Urbach A. Characterization of the expressjn of MHC proteins in human embryonic stem cells // PNAS USA. – 2002. – 99, № 15. – P. 9864–9869.
  7. Harling-Berg C.J. Role of cervical lymphatics in the T2-type hierarchy of CNS immune regulation // J. Neuroimmunol. – 1999. – 101. – P. 111–127.
  8. Huang F.P., Plantt N., Wykes M. Discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes // J. Exp. Med. – 2000. – 191. – P. 435–444.
  9. Jonston M. Cerebrospinal fluid transport : a lymphatic perspective // Cerebrospin. Fluid Res. –2004. – 2. – P. 1–12.
  10. Nagata K., Tanaka K., Ogawa K. Selective ecpresion of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo // J. Immunol. – 1999. – 162. – P. 1278–1286.
  11. Neumann H., Wekerle H. Neuronal control of the immune response in the central nervous system:linking brain immunity to neurodegeneration // J. Neuropathol. Exp. Neurol. — 1998. —57, № 1. – P. 1–9.
  12. Papaiconomou C., Zakharov A, Azizi N. Reassessment of the pathways responsible for cerebrospinal fluid absorption in the neonate // Child. Nerv. Syst. – 2004. – 20. – P. 29–36.
  13. Schmitt A.B., Brook G.A., Buss A. Dynamics of microglial activation in the spinal cord after cerebral infarction are reveled by expression of MHC class II antigen // Neuropathol. Appl. Neurobiol. – 1998. –24, № 3. – P. 167–176.

*ДУ «Ін-т нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромаданова  
НАМН України», Київ  
E-mail: goga-dp@ukr.net*

*Матеріал надійшов  
до редакції 24.01.2012*



В.І. Хорєвін, А.В. Горковенко, І.В. Верещака

## Зміщення центру тиску на опору та зміна кутів у суглобах нижньої кінцівки при присіданні людини

*Взаємозв'язок рухів та їх постуральних коригувань вивчали на підставі співвідношення зміщень центру тиску (ЦТ) на стабілографічну платформу в передньо-задньому напрямку та кутових змін відносно вихідного стану в гомілковостопному та кульшовому суглобах при довільному присіданні у шести здорових осіб. Встановлено, що при присіданні зі зміщенням ЦТ вперед у положенні фіксації суглобних кутів більше згинався гомілковостопний суглоб, ніж кульшовий, а при зміщенні ЦТ назад кути згинання в гомілковостопному суглобі мали менші значення, а в кульшовому суглобі – більші. Лінійний зв'язок між зміщенням ЦТ та кутами згинання частіше спостерігався в гомілковостопному суглобі, ніж в кульшовому, що може вказувати на те, що при присіданні згинання в гомілковостопному суглобі в положенні фіксації суглобних кутів визначається переважно біомеханікою скелета, тоді як можна припустити, що а в кульшовому суглобі формування рухів присідання визначаються поєднанням біомеханічних факторів з центральними процесами регуляції пози.*

*Ключові слова:* біомеханіка, нижня кінцівка, суглобні кути, стабілографія.

### ВСТУП

Присідання – це складний рух багатьох суглобів, який призводить до змін кута в суглобах нижніх кінцівок і опускання та наступного підйому тулуба. Його вивчення має не тільки теоретичне значення для розуміння організації багатосуглобних рухів, але й важливе для розробки деяких практичних засад реабілітації рухового контролю [1, 2, 6, 7, 17]. Присідання виконується внаслідок складних програм активації значної частини м'язів тіла, що призводить до відповідних рухів і змін у взаємному розташуванні його сегментів. Рухи присідання призводять до змін в позі, що необхідно для підтримання рівноваги, тому відбувається постійна взаємодія рухових реакцій та відповідної постуральної перебудови. Це вперше описав ще Бабинський [5], вказуючи на постуральну регуляцію нахилів тулуба вперед і назад і підкреслюючи участь нервової системи в цих процесах. За Гесом [12], у кожному ру-

ховому акті, який супроводжується змінами в просторовому розташуванні частин тіла, можна виділити два компонента – рух, який спрямований на певну ціль, та його постуральну корекцію. Дослідження присідання має кілька аспектів, один з яких полягає в з'ясуванні його постуральних компонентів, що визначається за допомогою стабілографії. Їх оцінювали за допомогою показників т.з. центру тиску (ЦТ) на опору або середнього положення рівнодіючої тиску тіла на опору суб'єкта дослідження в межах площі опори [1, 2]. У людини без відповідних патологічних станів, проекція центру опори, що потрібна для підтримання рівноваги, знаходиться між п'ятковими буграми та головками плюсневих кісток. Середнє положення ЦТ знаходиться на відстані  $45,5\text{мм} \pm 0,8\text{мм}$  спереду до лінії, що проходить через центр гомілковостопних суглобів [1].

Незважаючи на велику кількість робіт, присвячених дослідженню присідання, дотепер мало з'ясованими залишаються спів-

відношення характеристик постуральних реакцій і змін у суглобах нижніх кінцівок при виконанні цього складного руху. Крім того, в літературі існують доволі суперечливі уявлення щодо організації присідання як руху, при якому потрібно підтримання рівноваги тіла [9, 17].

Мета роботи – визначити співвідношення постуральних і рухових реакцій при присіданні за допомогою встановлення зв'язку між зміщеннями ЦТ і змінами кутів у трьох суглобах нижньої кінцівки (колінному, гомілковостопному та кульшовому) при виконанні довільних рухів присідання.

## МЕТОДИКА

В роботі брали участь 6 чоловіків-добровольців віком  $39,1 \text{ рік} \pm 5,2 \text{ років}$ , зростом  $176,7 \text{ см} \pm 2,8 \text{ см}$ , масою  $79,2 \text{ кг} \pm 4,2 \text{ кг}$ , які погодилися виконувати тестові завдання відповідно до умов морально-етичного комітету Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Всі обстежені були правшами і не мали захворювань з боку нервової та кістково-м'язової систем. Під час експерименту треба було вертикально стояти, впираючись обома ступнями на стабілографічну платформу, та виконувати довільні рухи присідання, відслідковуючи перебіг змін кута в колінному суглобі (рис. 1). Для самоконтролю вертикального положення тіла в просторі, як і в роботі Діонісію та співавт. [7], перед суб'єктом обстеження на відстані 1 м стояла вертикальна штанга та передбачалось, що у вихідному стані і під час присідання відстань між головою обстеженого і штангою була приблизно однаковою. Вимірювання величин суглобних кутів здійснювали за допомогою накладних гоніометрів. Вони склалися з двох шарнірно з'єднаних металевих лінійок, які фіксували з латерального боку суглоба таким чином, що вісь шарніра збігалася з віссю згинання в суглобі. Гоніометри були механічно з'єднані з потенціометрами типу ДЛП (дротяний лінійний потенціометр), на-

пруга на виході яких лінійно відтворювала зміни в кутах гоніометра. Перед початком кожного експерименту проводили калібрування всіх гоніометрів. Сигнали від датчиків гоніометрів і стабілографа після відповідного підсилювання пропускали крізь пристрій вхід-вихід PCI 6071E ("National Instruments", США) з частотою опитування  $2 \times 10^3 \text{ с}^{-1}$  і реєстрували на комп'ютері. Для цифрової фільтрації використовували низькочастотні фільтри Баттерворта четвертого порядку з частотою зрізу 15 Гц.

Траєкторія змін кута в колінному суглобі та її відтворення суб'єктом дослідження були виведені на монітор, розташований на відстані 2 м від обстежуваного (див. рис. 1). Завдання дослідження полягало у встановленні зв'язку між зміщеннями ЦТ та відповідних змінах у колінному, гомілковостопному та кульшовому суглобах у положенні фіксації суглобних кутів при присіданні, коли суглобний кут у коліні змінювався на  $20^\circ$  (мала глибина присідання),  $40^\circ$  (середня глибина) і  $60^\circ$  (значна глибина). Присідання повторювали по 10 разів для кожного з трьох зазначених значень змін кута в колінному суглобі при загальній тривалості тесту до 16 с. На початковому етапі, який відповідав вихідному стану, особи спокійно стояли на стабілографічній платформі, утримуючи тіло в вертикальному положенні протягом 2 с. На другому етапі потрібно було присісти, дотримуючись заданої швидкості зміни кута в колінному суглобі до певної величини, тобто  $20^\circ$ ,  $40^\circ$  або  $60^\circ$ , після чого потрібно було утримувати це положення, сидячи напочіпки та фіксуючи суглобні кути протягом 8 с. На третьому етапі обстежуваний повинен був піднятися до вертикального положення тулуба, відслідковуючи тестовий сигнал, швидкість змін якого була такою самою, як при русі тулуба вниз. На останньому, четвертому етапі виконання тесту особи спокійно стояли на платформі упродовж 2–6 с. Рухові завдання потрібно було виконувати в швидкому та повільному темпах присідання. При швидкому темпі обстежуваний повинен

був присісти якомога швидше, відслідковуючи тестовий сигнал на моніторі, який мав форму прямокутника з горизонтальними боками, що відповідали тривалості (8 с) фіксації кута в колінному суглобі в положенні сидячи напочіпки, а вертикальні боки показували динаміку заданої зміни кута в колінному суглобі. Після повернення до вертикального положення тулуба особи повинні були перебувати в спокійному стані протягом 2–6 с. При повільному темпі виконання рухів досліджені повинні були присідати, змінюючи величину кута в колінному суглобі протягом 2 с. При такому темпі присідання тестовий сигнал був у вигляді трапеції, висота якої відповідала необхідним змінам кута в колінному суглобі, а більша основа показувала загальну тривалість тесту (12 с), тоді як менша основа дорівнювала тривалості (8 с) фіксації кута в колінному суглобі, сидячи напочіпки. Правильність виконання тестів контролювали після кожної спроби і у разі помилок невдалі спроби не враховували, а тести повторювали. Постуральні реакції в роботі оцінювали за допомогою змін проєкції ЦТ на стабілографічну платформу або зміщення середнього положення рівнодіючої тиску тіла на платформу в межах площі опори. Для реєстрації змін ЦТ при присіданні був використаний стабілограф, який складався з квадратної опори, розміром 35x35 см, яка впиралась на 4 круглі опори, що були датчиками сили. В свою чергу ці опорні датчики сили впирались на масивну металеву плиту. У вихідному стані, тобто в положенні вертикальної стійки, сила тиску на датчики була приблизно однаковою, відображаючи стандартну стабілограму. При присіданні змінювалась співвідношення між сегментами тіла, що призводило до різниці в силі тиску на опорні датчики і стабілографічна платформа давала змогу визначати зміни ЦТ в фронтальній і сагітальній площинах. Стопи обстеженого були розташовані на платформі симетрично до її середини. Було прийнято, що у вихідному стані, коли людина спокійно стоїть вертикально, змін кутів у всіх суглобах не було, а зміщення ЦТ у фронталь-

ній та сагітальній площинах становили 0 мм.

Отримані результати оцінювали з використанням програми Origin 7 і представляли як середні значення з їх похибкою. Статистичну обробку проводили за допомогою програми Statistica 6 з використанням двофакторного дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями (two way ANOVA with repeated measures, один внутрішньогруповий фактор – різні особи, а другий міжгруповий фактор – умови досліджу) з наступним попарним порівнянням для кожного з факторів з використанням критерію Тьюкі. Відмінності вважали достовірними при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Багатосуглобний рух присідання змінює взаємовідношення частин нижньої кінцівки та тулуба, внаслідок чого перерозподіляються сили, що виникають при скороченні м'язів і під впливом моментів маси різних сегментів тіла. Для підтримання рівноваги при присіданні відбувається її постуральна корекція, яка в цій роботі характеризується тільки змінами в сагітальній та фронтальній площинах. Дані щодо змін у фронтальній площині не аналізувалися через те, що в більшості випадків вони були незначними порівняно зі змінами у сагітальній площині. На рис. 2 та рис.3 наведені дані для трьох осіб (1, 2, 3), які виконували повільні рухи присідання з вертикальним переміщенням тулуба, не відриваючи стоп від стабілографічної платформи при зміні кута в колінному суглобі на 20, 40 та 60°. Зміщення ЦТ в передньо-задньому напрямку для окремих осіб при певних глибинах присідання могли суттєво відрізнятись ( $F(4, 36) = 5,3754$ ;  $P = 0,00169$ ). Так, при повільному присіданні, коли кут в колінному суглобі змінювався на 20°, не встановлено достовірних відмінностей між середніми значеннями зміщення ЦТ у окремих осіб. При такому темпі присідання, коли кут в колінному суглобі змінювався на 40°, середні значення зміщення ЦТ у двох осіб, ЦТ яких зміщувався вперед ( $2,6 \pm 0,43$  та  $2,9 \text{ мм} \pm 0,4 \text{ мм}$ ) були вірогідно

більшими ( $P < 0,05$ ), ніж відповідні значення у третьої особи ( $-0,72\text{мм} \pm 0,35\text{ мм}$ ), у якої він зміщувався назад. При глибині повільного присідання, коли коліно згиналося на  $60^\circ$ , у двох зазначених вище осіб середні значення зміщень ЦТ ( $4,3 \pm 0,6$  та  $2,2 \text{мм} \pm 0,68\text{ мм}$ ) достовірно відрізнялися ( $P < 0,05$ ) від відповідних значень ( $-0,98\text{мм} \pm 0,07\text{ мм}$ ) у тієї особи, ЦТ якої зміщувався назад.

Кут згинання в гомілковостопному суглобі достовірно збільшувався ( $F(2, 18) = 603,73$ ;  $P = 0,0000$ ) для всіх трьох осіб при виконанні повільного присідання зі зміною

кута в коліні на  $20, 40$  та  $60^\circ$ , складаючи в середньому  $11,5 \pm 0,5, 20,4 \pm 0,5$  та  $30,2 \pm 2,5^\circ$  відповідно. Однак не встановлено достовірних відмінностей між середніми значеннями для окремих осіб при певних глибинах повільного присідання ( $F(4, 36) = 0,92114$ ;  $P = 0,40235$ ).

Зміни кута в кульшовому суглобі при повільному присіданні зі збільшенням його глибини були статистично значущими для окремих осіб при певних глибинах присідання ( $F(4, 36) = 79,994$ ;  $P = 0,0000$ ). Так, при порівнянні середніх значень кута в кульшо-

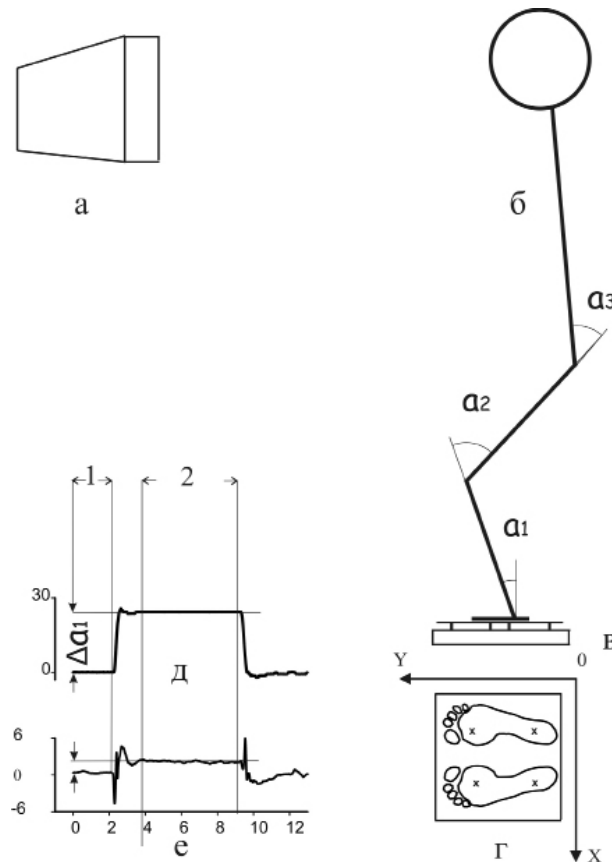


Рис. 1. Схема експерименту: а – монітор, на якому були показані як тестовий сигнал, за яким обстежувані повинні були виконувати присідання, так і відповідні зміни в колінному суглобі. б – схема вимірювання кутів в гомілковостопному ( $\alpha_1$ ), колінному ( $\alpha_2$ ) та кульшовому ( $\alpha_3$ ) суглобах при виконанні довільних рухів присідання з розташуванням суб'єкта дослідження на стабілографічній платформі (в). г – розташування стоп обстежуваного і центрів датчиків сили (х) на стабілографічній платформі, зразок вимірювання зміщення центру тиску (ЦТ) на стабілографічну платформу в сагітальній площині (е) та змін кута ( $\Delta\alpha_1$ ) в гомілковостопному суглобі (д) у однієї особи при виконанні відслідковуючого швидкого руху присідання, коли кут в колінному суглобі змінювався на  $20^\circ$ . За віссю абсцис – зміщення ЦТ в сагітальній площині в міліметрах, за віссю ординат – зміни в суглобних кутах в градусах. 1 – перебування в вертикальній стійці у вихідному стані, 2 – утримання суглобного кута після руху тулуба вниз

вому суглобі у особи, ЦТ якої зміщувався назад, для середньої ( $19,3^{\circ} \pm 0,9^{\circ}$ ) та великої ( $41,2^{\circ} \pm 1,4^{\circ}$ ) глибин присідання встановлені достовірні відмінності ( $P < 0,001$ ) між відповідними значеннями для осіб, ЦТ яких зміщувався вперед. Для цих двох осіб значення змін кульшового суглоба становили  $9,6^{\circ} \pm 0,32^{\circ}$  та  $6,2^{\circ} \pm 0,74^{\circ}$  для середньої глибини присідання, і  $11,9 \pm 1,1$  та  $13,1^{\circ} \pm 1,7^{\circ}$  для великої глибини присідання відповідно. Лінійний зв'язок між зміщенням ЦТ у сагітальній площині та кутами згинання в гомілковостопному суглобі спостерігався в 1,6 раза частіше, ніж у кульшовому при повільному присіданні (див. рис. 3) і не залежав від напрямку зміщень ЦТ.

Відомо, що виконання відстежуваних рухів у повільному та швидкому темпі забезпечується різними центральними моторними командами і має дещо іншу організацію [3]. За нашими результатами, швидкі рухи присідання були більш стереотипними, ніж повільні. Про це може свідчити менша варіабельність змін кутів у двох досліджених

суглобах при швидкому присіданні порівняно з повільним, що було встановлено у більшості тестів при певній глибині у всіх обстежених. Зміщення ЦТ в сагітальній площині були дещо меншими при виконанні швидких рухів, ніж повільних у одних і тих самих осіб (див. рис.2 і 4). Для різних осіб при певних глибинах швидкого присідання встановлені достовірні відмінності між значеннями зміщень ЦТ ( $F(4, 36) = 5,8120$ ;  $P = 0,00103$ ). При швидкому присіданні зі зміною кута в коліні на  $20^{\circ}$  не встановлено достовірних відмінностей між значеннями зміщень ЦТ, які в середньому не перевищували 1 мм. При середній глибині швидкого присідання встановлені достовірні відмінності ( $P < 0,01$ ) між зміщеннями ЦТ тільки в одному випадку між особами, ЦТ однієї з яких зміщувався вперед ( $1,89 \text{ мм} \pm 0,27 \text{ мм}$ ), а у другої – назад ( $0,96 \text{ мм} \pm 0,46 \text{ мм}$ ). Подібна ситуація простежувалася і при великій глибині швидкого присідання, коли достовірні відмінності ( $P < 0,001$ ) встановлені тільки для тих осіб, зміщення ЦТ

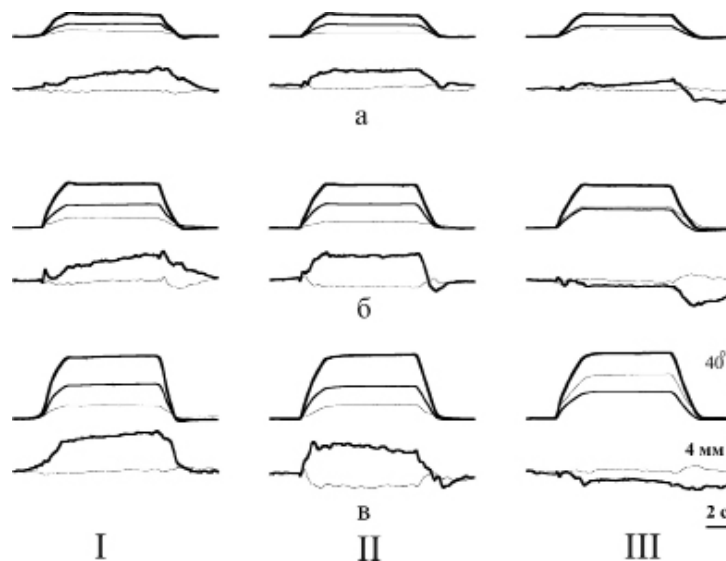


Рис. 2. Зміни кутів у суглобах нижньої кінцівки та зміщення центру тиску на стабілографічну платформу у сагітальній і фронтальній площинах у трьох осіб (I-III) з вертикальним рухом тулуба при повільному присіданні з відстеженням довільних змін кута в колінному суглобі на  $20^{\circ}$  (а),  $40^{\circ}$  (б) та  $60^{\circ}$  (в). Для сукупності з однаковими змінами кута в колінному суглобі верхній рядок кривих – гоніограми суглобів, нижній – стабілограми. Гоніограми колінного суглоба надані у вигляді товстих чорних ліній, гомілковостопного суглоба – чорних ліній середньої товщини, кульшового суглоба – тонких чорних ліній. Стабілограми у фронтальній площині надані як тонкі, а у сагітальній – як товсті чорні лінії. Кожна крива є усередненням за 10 присіданнями. Калібровка часу – 2 с, амплітуд гоніограм –  $40^{\circ}$  та стабілограм – 4 мм



яких було  $3,00 \pm 0,34$  та  $0,197 \text{ мм} \pm 0,274$  мм відповідно. В усіх інших випадках не встановлено вірогідно значущих відмінностей між значеннями, отриманими у кожної з осіб при різних глибинах швидкого присідання, та у двох осіб, ЦТ яких зміщувався вперед при середній і великій глибинах присідання.

Зміни кута в гомілковостопному суглобі достовірно збільшувалися в цілому у трьох осіб при порівнянні результатів, отриманих як при всіх глибинах швидкого присідання ( $F(2, 18) = 874,2$ ;  $P = 0,0000$ ), так у окремих осіб при певній глибині присідання ( $F(4, 36) = 9,9705$ ;  $P = 0,0000$ ). При швидкому присіданні, коли кут в коліні змінювався на  $20^\circ$ , не

встановлено вірогідно значущих відмінностей між особами ( $P > 0,05$ ) при середньому значенні кута згинання в гомілковостопному суглобі для трьох осіб в  $12^\circ \pm 0,1^\circ$ . При виконанні швидких присідань середньої глибини у особи, ЦТ якої зміщувався назад при повільних рухах, середні значення кута згинання гомілковостопного суглоба ( $17,3^\circ \pm 0,38^\circ$ ) були достовірно меншими ( $P < 0,001$ ) в порівнянні з відповідними значеннями двох інших осіб ( $21,05^\circ \pm 0,39$  та  $22,9^\circ \pm 0,48^\circ$ ). Подібна ситуація була і при швидких глибоких рухах присідання, при виконанні яких у особи, ЦТ якої при повільних рухах зміщувався назад, кут згинання в гомілковостопному суглобі

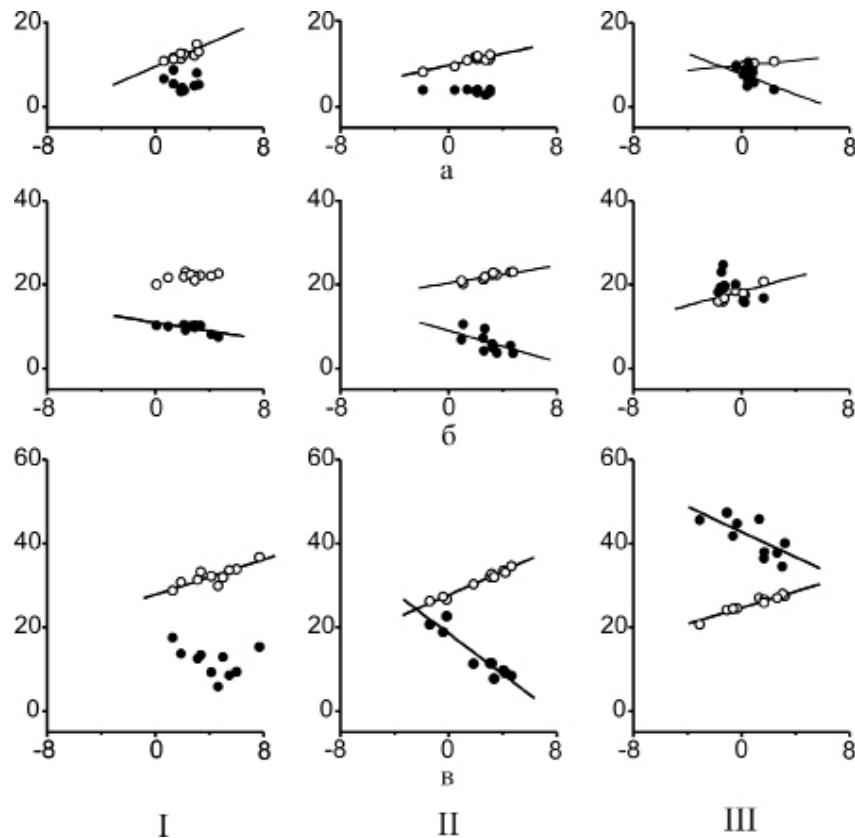


Рис. 3. Співвідношення зміщень центру тиску (ЦТ) на стабілографічну платформу у сагітальній площині та змін кутів в двох суглобах нижньої кінцівки в окремих реалізаціях у трьох осіб (I-III) з вертикальним рухом тулуба при повільному присіданні з відстеженням довільних змін кута в колінному суглобі на  $20^\circ$  (а),  $40^\circ$  (б) та  $60^\circ$  (в). За віссю абсцис – зміщення ЦТ у сагітальній площині в міліметрах, за віссю ординат – зміни в суглобних кутах в градусах. Значення за осями координат відповідають різниці величин тих самих параметрів у вихідному стані та в положенні фіксації колінного суглоба при присіданні. Білі кружечки – дані для гомілковостопного суглоба, чорні – для кульшового. Прямі на графіках вказують на лінійний зв'язок між значеннями, коли коефіцієнт кореляції був статистично значущий ( $P < 0,05$ )

( $26,3^{\circ} \pm 0,32^{\circ}$ ) був достовірно менше ( $P < 0,05$ ) порівняно з відповідними значеннями, отриманими у двох інших осіб ( $31,5 \pm 0,64$  та  $31,0^{\circ} \pm 0,45^{\circ}$ ).

Кут згинання в кульшовому суглобі також вірогідно збільшувався як у спробах всіх трьох осіб ( $F(2, 18) = 940,04$ ;  $P = 0,0000$ ), так у окремих осіб при певних глибинах присідання ( $F(4, 36) = 38,961$ ;  $P = 0,0000$ ). Однак зміни кута в кульшовому суглобі при швидких рухах у тієї особи, ЦТ якої зміщувався назад при виконанні повільних рухів, перевищували в 1,6 – 2 рази відповідні значення, отриманими у двох інших осіб і були достовірно більші за них ( $P < 0,05$ ).

При порівнянні співвідношень величин зміщень ЦТ в сагітальній площині та кутів змінами в гомілковостопному та кульшовому суглобах у одних и тих самих осіб при повільних і швидких рухах (див. рис. 3 та рис. 5 відповідно) встановлено, що наявність лінійного зв'язку між вказаними величинами

для гомілковостопного суглоба практично не залежить від швидкості присідання. В той же час для кульшового суглоба такий зв'язок був встановлений в більшості спроб (6 з 9 випадків) для повільних рухів, тоді як при швидкому присіданні він був знайдений тільки в одному випадку і у однієї особи.

У однієї особи, яка могла присісти, не відриваючи стоп від платформи, але для збереження рівноваги їй необхідно було нахилитися вперед, також простежувалось, що зміщенням в передньо-задньому напрямку відповідають вказані вище зміни в гомілковостопному та кульшовому суглобах. Встановлені достовірні відмінності для всієї сукупності значень кутів згинання в двох суглобах при різних глибинах присідання ( $F(6, 54) = 597,0$   $P = 0,000$ ), однак для повільних і швидких рухів, а також для різних глибин присідання ймовірність відмінностей була різною. При малій глибині присідання значення зміщень ЦТ при повільних ( $-0,95 \text{ мм} \pm 0,32 \text{ мм}$ ) і швид-

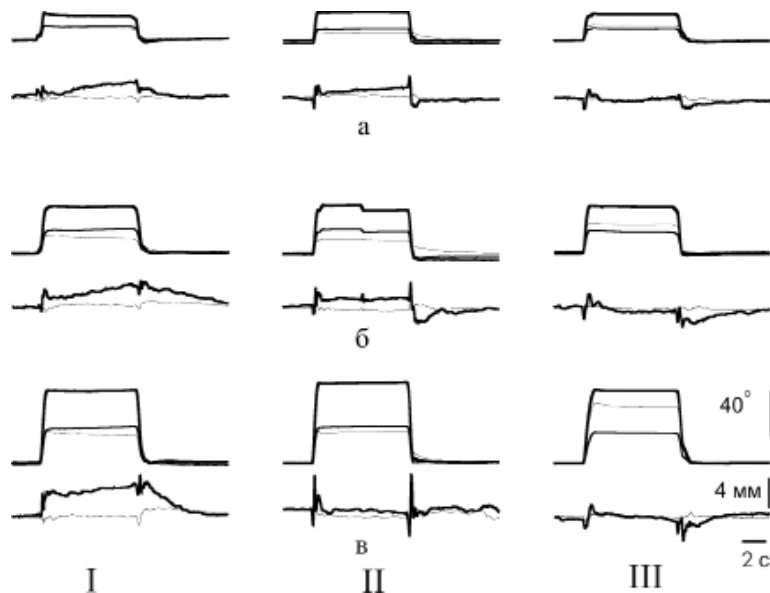


Рис. 4. Зміни кутів у суглобах нижньої кінцівки та зміщення центру тиску на стабілографічну платформу (ЦТ) у сагітальній і фронтальній площинах при швидкому присіданні для трьох осіб (I–III) з вертикальним рухом тулуба з відстеженням довільних змін кута в колінному суглобі на  $20^{\circ}$  (а),  $40^{\circ}$  (б) та  $60^{\circ}$  (в). Для сукупності з однаковими змінами кута в колінному суглобі верхній рядок кривих – гоніограми суглобів, нижній – стабілограми. Гоніограми колінного суглоба надані у вигляді товстих чорних ліній, гомілковостопного суглоба – чорних ліній середньої товщини, кульшового суглоба – тонких чорних ліній. Стабілограми у фронтальній площині надані як тонкі, а у сагітальній – як товсті чорні лінії. Кожна крива є усередненням за 10 присіданнями. Калібровка часу – 2 с, амплітуд гоніограм –  $40^{\circ}$  та стабілограм – 4 мм

ких ( $-0,19 \text{ мм} \pm 0,1 \text{ мм}$ ) рухах достовірно не відрізнялись, що супроводжувалося приблизно однаковими змінами суглобних кутів, які в двох суглобах не перевищували в середньому  $10^\circ$ . Виконання присідань при зміні кута в колінному суглобі на  $40^\circ$  мало дещо іншу організацію, ніж в рухах малої і великої глибини. Так, у половині спроб середньої глибини повільного присідання ЦТ зміщався вперед, а в решті спроб – назад. В результаті цього при повільному присіданні ЦТ в середньому майже не змістився ( $-0,08 \text{ мм} \pm 0,67 \text{ мм}$ ), тоді як при швидкому присіданні тільки в одній реалізації ЦТ змістився вперед, однак в середньому зміщення ЦТ було назад ( $-1,3 \text{ мм} \pm 0,5 \text{ мм}$ ). Зміни в гомілковостопному суглобі

в присіданнях зі зміною кута в колінному суглобі на  $40^\circ$  достовірно не відрізнялись для повільних рухів ( $14,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ) в порівнянні зі швидкими ( $12,6^\circ \pm 0,4^\circ$ ), тоді як зміни кульшовому суглобі були достовірно більшими ( $P=0,000122$ ) в порівнянні з відповідними значеннями в гомілковостопному суглобі, а також при швидких рухах ( $56,1^\circ \pm 1,4^\circ$ ), ніж в повільних присіданнях ( $37,5^\circ \pm 1,4^\circ$ ).

При великій глибині присідання ЦТ в усіх спробах зміщувався тільки назад і становив  $-4,8 \pm 0,67 \text{ мм}$  при повільних рухах і  $-4,1 \pm 0,4 \text{ мм}$  – при швидких. Це відповідало дещо меншим змінам в гомілковостопному суглобі при повільних ( $10,7^\circ \pm 0,37^\circ$ ) і швидких ( $10,5^\circ \pm 0,3^\circ$ ) рухах, однак ці значення достовірно не

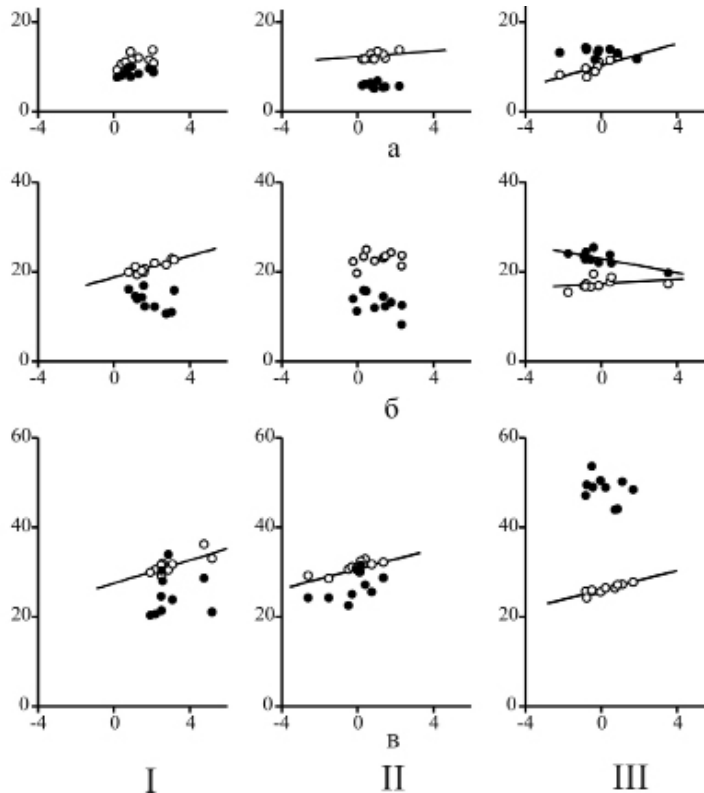


Рис. 5. Співвідношення зміщень центру тиску (ЦТ) на стабілографічну платформу у сагітальній площині та змін кутів в двох суглобах нижньої кінцівки в окремих реалізаціях у трьох осіб (I-III) з вертикальним рухом тулуба при швидкому присіданні з відстеженням довільних змін кута в колінному суглобі на  $20^\circ$  (а),  $40^\circ$  (б) та  $60^\circ$  (в). За віссю абсцис – зміщення ЦТ у сагітальній площині в міліметрах, за віссю ординат – зміни в суглобних кутах в градусах. Значення за осями координат відповідають різниці величин тих самих параметрів у вихідному стані та в положенні фіксації колінного суглоба при присіданні. Білі кружечки – дані для гомілковостопного суглоба, чорні – для кульшового. Прямі на графіках вказують на лінійний зв'язок між значеннями, коли коефіцієнт кореляції був статистично значущий ( $P < 0,05$ )

відрізнялися між собою та від відповідних змін у цьому суглобі при середній глибині присідання. Кут в кульшовому суглобі достовірно збільшувався ( $P=0,000122$ ) відносно змін в цьому суглобі при середній глибині присідання, складаючи в середньому  $71,7^{\circ} \pm 1^{\circ}$  при повільних рухах та  $83,8^{\circ} \pm 0,9^{\circ}$  - при швидких. Лінійний зв'язок між зміщенням ЦТ і зміною кута в гомілковостопному суглобі встановлений для всіх видів спроб у цієї особи, крім швидкого глибокого присідання, для якого достовірний зв'язок встановлений тільки між зміщенням ЦТ та змінами кута в кульшовому суглобі.

У роботі досліджено взаємовідношення характеристик довільних рухів присідання та відповідних постуральних реакцій. Встановлено зв'язок між зміщенням ЦТ у сагітальній площині та кутами згинання в гомілковостопному і кульшовому суглобах при фіксації суглобних кутів під час присідання. Показано, що якщо ЦТ відхилявся вперед від вихідного стану, то відбувалися більші зміни в гомілковостопному суглобі, ніж в кульшовому, а у випадку зміщення ЦТ назад кути згинання в гомілковостопному суглобі зменшувались, а в кульшовому суглобі – збільшувались і могли перевищувати зміни в гомілковостопному суглобі. Ці співвідношення простежені як у повільних, так і швидких рухах у всіх шести осіб, у п'яти з яких тулуб рухався відносно вертикально під час присідання, а у однієї особи він нахилився вперед, особливо при глибоких присіданнях, що було необхідно для підтримання рівноваги. На існування залежності між змінами кутів у гомілковостопному і кульшовому суглоба від зміщення ЦТ вказують також інші автори [14, 17, 18].

Відомо, що у здорових людей, які стоять вертикально на стабілографічній платформі, тулуб коливається в усіх трьох площинах [1, 2, 10]. Передбачається, що коливання в сагітальній площині формуються ЦНС за кількома стратегіями [13, 16]. Вважається, що за гомілковостопною стратегією тулуб і нижні кінцівки рухаються як єдине ціле переважно

навколо гомілковостопного суглоба, а при кульшовій стратегії тулуб і кінцівки коливаються як дві складові переважно навколо кульшового суглоба. У реальних умовах людина використовує комбінацію цих двох стратегій для формування відповідних постуральних реакцій [13]. Можливо, у 4 з 5 осіб, у яких ЦТ на стабілографічну платформу зміщувався вперед при виконанні присідань з вертикальним положенням тулуба з більшим згинанням у гомілковостопному суглобі, ніж в кульшовому, ЦНС використовувала переважно гомілковостопну стратегію з деякими елементами кульшової. У іншій з 5 осіб, яка присідала, утримуючи тулуб вертикально, зі зміщенням ЦТ назад в сагітальній площині, зареєстровано більше кутових змін у кульшовому суглобі, ніж в гомілковостопному. Можна припустити, що у цьому разі ЦНС використала комбінацію гомілковостопної та кульшової стратегій руху з домінуванням останньої. У шостій особі, яка для того щоб виконати присідання без відриву стоп від опори, повинна була нахилитись уперед для дотримання рівноваги, а ЦТ зміщався назад, зміни в кульшовому суглобі в кілька разів перевищували зміни в гомілковостопному суглобі, тобто домінувала кульшова стратегія виконання присідання. Передбачається, що формування довільних рухів, у тому числі і присідання, є результатом взаємодії моторних компонентів, які зумовлені як фізичними показниками (силами, що генерують м'язи, масою тіла та його окремих складових тощо), так довільними факторами, внаслідок чого можуть вибиратись різні групи м'язів для виконання однакових рухів [9, 11]. Нами встановлений лінійний зв'язок між зміщенням ЦТ у сагітальній площині та змінами кута в гомілковостопному суглобі у всіх осіб в більшості серій присідань. За даними інших авторів, гравітаційний момент мас тіл при вертикальній стійці збільшується при збільшенні кута згинання в гомілковостопному суглобі [15, 18]. Відомо, що на рівні гомілковостопного суглоба контроль рівноваги більш важливий,

ніж контроль над рухами [8], а активні зміни кута в гомілковостопному суглобі забезпечується переважно двома найбільшими м'язами гомілки: литковим і великим гомілковим [4]. Можливо, одним з чинників забезпечення рівноваги при присіданні є відповідність між силами у вигляді зміщення ЦТ і силами, які виникають у гомілковостопному суглобі при його згинанні. Ці процеси зумовлені біомеханічними факторами при мінімальних довільних впливах на рівні гомілковостопного суглоба через обмеження, пов'язані з дотриманням рівноваги. За нашими результатами, лінійний зв'язок між зміщенням ЦТ і змінами кута в кульшовому суглобі при присіданні траплявся в 1,6 раза рідше порівняно з гомілковостопним суглобом у тих самих осіб. Відомо, що згинання у кульшовому суглобі забезпечується участю м'язів стегна, таза, живота та спини [4]. Ймовірно, баланс сил, які виникають у кульшовому суглобі при зміщенні ЦТ внаслідок присідання тільки частково компенсуються силами, які виникають у результаті м'язового скорочення при певному куті згинання в цьому суглобі. Повний же баланс може сформуватися за участю інших м'язів, скорочення яких прямо не пов'язано зі зміною кута у кульшовому суглобі. Тому ми вважаємо, що формування багатосуглобного руху присідання на рівні кульшового суглоба може відбуватися за участю як біомеханічних, так і довільних факторів. Передбачається, що деякі питання постурального контролю довільних рухів присідання будуть з'ясовано в наступних роботах, присвячених дослідженню довільних рухів присідання з використанням електроміографічної реєстрації активності м'язів нижньої кінцівки в поєднанні з кінематичними результатами.

**В.И. Хоревин, А.В. Горковенко, И.В. Верещака**

**СМЕЩЕНИЯ ЦЕНТРА ДАВЛЕНИЯ  
НА ОПОРУ И ИЗМЕНЕНИЯ УГЛОВ  
В СУСТАВАХ НИЖНЕЙ КОНЕЧНОСТИ  
ПРИ ПРИСЕДАНИИ**

Взаимосвязь движений и их постуральной коррекции

изучали на основании соотношения смещения центра давления (ЦТ) на стабилографическую платформу в передне-заднем направлении и угловых изменений относительно исходного состояния в голеностопном и тазобедренном суставах при произвольном приседании у шести здоровых лиц. Установлено, что при приседании со смещением ЦТ вперед в положении фиксации суставных углов больше сгибался голеностопный сустав, чем тазобедренный, а при смещении ЦТ назад углы сгибания в голеностопном суставе имели меньшие значения, а в тазобедренном – большие. Линейная связь между смещением ЦТ и углами сгибания чаще наблюдалась в голеностопном суставе, что может указывать на то, что при приседании в положение фиксации суставных углов сгибание в этом суставе определяется преимущественно биомеханикой скелета, тогда как в тазобедренном суставе, возможно, биомеханические факторы в значительной мере сочетаются с центральными процессами регуляции позы.

Ключевые слова: биомеханика, нижняя конечность, суставные углы, стабилография.

**V.I. Khorevin, A.V. Gorkovenko, I.V. Vereschaka**

**DISPLACEMENT OF CENTER  
OF PRESSURE ON THE SUPPORT  
AND CHANGES OF THE JOINT ANGLES OF  
THE LOWER EXTREMITY AT SQUATTING**

The relationship between movements and their postural adjustments was studied on the basis of the relation between the displacement of center of pressure (CoP) on grand force platform in the anterior-posterior direction and angular changes in the ankle and hip joints during squat in six healthy individuals. It was shown that during the fixation of the joint angles at the squatting the ankle joint more flexed than the hip joint when the CoP shifted forward, while the back displacement of the CoP resulted in more prominent changing of angular joint at the hip joint than at the ankle joint. A linear relationship between the displacement of CoP and the flexion angles more frequently observed at the ankle joint than at the hip, which may indicate that during squatting at the locked position of the joint angles the flexion of the ankle joint was determined mainly by the biomechanics of the skeleton, while in the hip joint biomechanical factors could largely combined with the central processes controlling posture.

Key words: biomechanics, lower extremity, joint angles, stabilography.

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

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Гурфинкель В.С., Коц Я. М., Шик М. Л. Регуляция позы человека. – М.: Наука, 1965. – 256 с.
2. Скворцов Д.В. Диагностика двигательной патологии инструментальными методами: анализ походки, стабилметрия. – М.: МБН. – 2007. – 640 с.



3. Шапков Ю.Т., Анисимова Н.П., Герасименко Ю.П., Романов С.П. Регуляция следящих движений. – Ленинград: Наука. – 1988. – 276 с.
4. Синельников Р. Д. Атлас анатомии человека. – М.: Гос. издат-во мед. литературы. – Том 1. 1963. – 477 с.
5. Babinski J. De l'asynergie cerebelleuse//Rev. Neurol. Paris. – 1899. –7. – 806816. цит. за Frank J.S., Earl M. Coordination of posture and movement//Phys. Therap. – 1990. – **70**, №12. – P. 855–863.
6. Błaszczyk J.W., Hansen P.D., Lowe D.L. Evaluation of the postural stability in man: movement and posture interaction//Acta. Neurobiol. Exp. (Wars). 1993. – **53**, №1. – P.155–160.
7. Dionisio V.C., Almeida G.L., Duarte M., Hirata R.P. Kinematic, kinetic and EMG patterns during downward squatting//J. Electromyogr. Kinesiol. – 2008. – **18**, №1. – P. 134–143.
8. Doorenbosch C.A., Harlaar J., Roebroeck M.E., Lankhorst G.J. Two strategies of transferring from sit-to-stand; the activation of monoarticular and biarticular muscles//J. Biomech. – 1994. –**27**, № 11. – P. 1299–1307.
9. Frank J.S., Earl M. Coordination of posture and movement//Phys. Therap. – 1990. – 70, №12. – P. 855–863.
10. Goodworth A.D., Peterka R.J. Influence of stance width on frontal plane postural dynamics and coordination in human balance control//J. Neurophysiol. – 2010. – **104**, №2. – P.1103–1118.
11. Hase K., Sako M., Ushiba J., Chino N. Motor strategies for initiating downward-oriented movements during standing in adults//Exp. Brain Res. – 2004. – **158**, №1. – P. 18–27.
12. Hess W.R. Teleokinetisches und ereismatisches Kraftesystem in Biomotorik//Helv. Physiol. Pharm. Acta – 1943. – **1**.– С.62-63. цит. за Błaszczyk J.W., Hansen P.D., Lowe D.L. Evaluation of the postural stability in man: movement and posture interaction//Acta. Neurobiol. Exp. (Wars). 1993. – **53**, №1. – P.155–160.
13. Horak F.B., Nashner L.M. Central programming of postural movements: adaptation to altered support-surface configurations// J. Neurophysiol. – 1986. – **55**, № 6. – P.1369–1381.
14. Hwang S., Kim Y., Kim Y. Lower extremity joint kinetics and lumbar curvature during squat and stoop lifting//BMC Musculoskelet. Disord. – 2009. – **10**. – 15 p.
15. Morasso P. G., Schieppati M. Can muscle stiffness alone stabilize upright standing?//J. Neurophysiol. – 1999. –82, №3. – P. 1622–1626.
16. Runge C.F., Shupert C.L., Horak F.B., Zajac F.E. Ankle and hip postural strategies defined by joint torque//Gait Posture. – 1999. – **10**, №2. – P. 161–170.
17. Schoenfeld B. J. Squatting kinematics and kinetics and their application to exercise performance//J. Strength. Cond. Res. – 2010. – **24**, №12. – P. 3497–3506.
18. Winter D. A., Patla A. E., Rietdyk S. Ishac, M. Ankle muscle stiffness in the control of balance during quiet standing//J. Neurophysiol. – 2001. – **85**, № 3. – P. 2630–2633.

*Ин-т фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України*  
*E-mail: vkhor@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до редакції 06.12.2011*

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

## Дозована нормобарична гіпоксія – немедикаментозний засіб стимуляції фізіологічної регенерації паренхіми печінки

*Досліджували зміни цитоморфометричних показників функціональної активності та фізіологічної регенерації паренхіми печінки під впливом різних режимів дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня. Показано, що у щурів, які дихали гіпоксичною газовою сумішшю (10% кисню), збільшується кількість ядерець в ядрах гепатоцитів і двоядерних клітин, ядерно-цитоплазматичне і ядерцево-ядерне співвідношення. Зміна цих показників інтенсивніше проявляється при дозованій нормобаричній гіпоксії переривчастих режимів з чергуванням періодів деоксигенації і реоксигенації. Зроблено висновок, що дозована нормобарична гіпоксія підвищує функціональну активність і фізіологічну регенерацію паренхіми печінки.*

*Ключові слова:* дозована нормобарична гіпоксія, фізіологічна регенерація, паренхіма печінки.

### ВСТУП

Паренхіма печінки (гепатоцити) являє собою велику клітинну систему, яка виконує різноманітні метаболічні функції. До головних з них відносять детоксикаційну – знешкодження всіх шкідливих речовин [14]. Печінка активно бере участь в обміні речовин, лімфоутворенні, згортанні, зберіганні та регуляції кількості крові.

На жаль, забруднення навколишнього середовища, неякісне харчування, дія гепатотропних вірусів призводять до виникнення різних патологій печінки. За статистикою ВООЗ, 30% дорослого населення Землі страждає тими чи іншими захворюваннями печінки. Проблема полягає в тому, що відсоток поширення патологій печінки та смертності від них надто високий, а ефективність медикаментозного лікування значно нижча, ніж того хотілося б. Пошук немедикаментозних методів, які б могли підвищувати функціональну та регенераторну активність паренхіми печінки та запобігання її патології є вельми актуальним. Одним із таких методів може бути дихання

гіпоксичними газовими сумішами.

Показано, що використання дозованої нормобаричної гіпоксії (ДНГ) (чи «інструментальної оротерапії») позитивно впливає на кінетику кисневого метаболізму і кислотно-основного складу крові, нормалізує показники вуглеводного, жирового, білкового та електролітного спектрів крові, підвищує протизапальний потенціал, активізує діяльність життєво важливих систем організму та підвищує резистентність організму до різноманітних патогенних факторів [2, 8, 15]. Проте, незважаючи на численні літературні дані про позитивний вплив ДНГ на різні системи організму, серед учених не існує єдиної точки зору стосовно ефективності використання короткотривалого чи тривалого режиму подачі гіпоксичних газових сумішей, співвідношенням періодів деоксигенації та реоксигенації тощо.

Метою нашої роботи було дослідити вплив ДНГ різних режимів на цитоморфометричні показники функціональної та регенераторної активності паренхіми печінки.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 60 щурах-самцях лінії Вістар віком 3 міс, яких утримували на стандартному харчовому раціоні. Стан гіпоксії у тварин відтворювали розташуванням їх у герметичній камері, в яку за допомогою мембранного газорозподільного елемента подавали газову суміш, що містила 10% кисню в азоті. На основі власних досліджень було обрано 4 режими подачі гіпоксичної газової суміші. Тварин було поділено на контрольну і 4 дослідні групи. Щури дослідних груп зазнавали впливу ДНГ: I група – протягом 30 хв (I режим), II – 1 год (II режим, 60 хв деоксигенації), III – 4 год у режимі 10 хв деоксигенація / 10 хв реоксигенація (III режим, 120 хв деоксигенації), IV – 2 год в режимі 10 хв деоксигенація / 30 хв реоксигенація (IV режим, 30 хв деоксигенації).

Гіпоксичну газову суміш подавали щодня. Тварин з експерименту виводили через 28 діб під ефірним наркозом, з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин [11].

Функціональну активність, фізіологічну регенерацію та стан сполучної тканини в паренхімі печінки оцінювали за допомогою фізіологічних, цитоморфометричних і морфологічних методів. Для досліджень брали зразки тканини з правої та лівої частки печінки, з яких виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою [1]. На цифрових зображеннях мікропрепаратів здійснювали цитоморфометрію за допомогою комп'ютерної програми «IMAGE J».

На гістологічних препаратах робили загальний аналіз зрізів печінки, підраховували кількість гепатоцитів у полі зору мікроскопа, вимірювали площу гепатоцитів, їх ядер і цитоплазми, відстані між суміжними ядрами клітин. Також підраховували кількість ядерць на 100 ядер гепатоцитів. Ознаками збільшення функціональної активності та фізіологічної регенерації паренхіми печінки насамперед вважали збільшення площі ядра, числа двоядерних гепатоцитів і ядерць в

ядрах, ядерно-цитоплазматичного та ядерцево-ядерного співвідношень [9]. За ознаки пригнічення функціональної активності паренхіми печінки приймали зниження значень вищеперерахованих показників і збільшення відстані між ядрами суміжних клітин.

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за критерієм *t* Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними серіями досліду при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загальна маса тіла у щурів після впливу ДНГ мала тенденцію до зменшення порівняно з контрольною групою. Маса печінки у тварин, що дихали гіпоксичною газовою сумішшю вірогідно не відрізнялася від контрольних значень. У щурів, після впливу ДНГ II і III режимів, було відмічено лише тенденцію до зниження маси печінки на 9 і 8 % відповідно порівняно з контролем (табл. 1). Зниження маси тіла і печінки можна пояснити тим, що ДНГ є м'яким стресогенним фактором. А як відомо, при будь-якому стресі відбувається мобілізація і активація всіх функціональних систем організму, спрямована на адаптацію до нових умов існування. Це в першу чергу супроводжується зменшенням загальної маси тіла та органів.

При загальному аналізі гістологічних зрізів печінки було відмічено, що тварини дослідних груп мають фізіологічну структуру паренхіми печінки. Структурні межі часточок слабо виражені (що притаманне певному виду тварин), трабекули рівні, некрозів не виявляли. Кровоносні судини різного кровонаповнення. Місцями зустрічаються скупчення макрофагів. Гепатоцити неправильної форми, середнього та дрібного розміру, з добре вираженою мембраною. Ядра округлої форми, середніх розмірів, переважно займають центральне положення в клітині. Ядерна мембрана збережена і має чіткі контури. Іноді

Таблиця. 1. Маса тіла та печінки щурів, що зазнавали впливу дозованої нормобаричної гіпоксії – ДНГ (M±m, n=12)

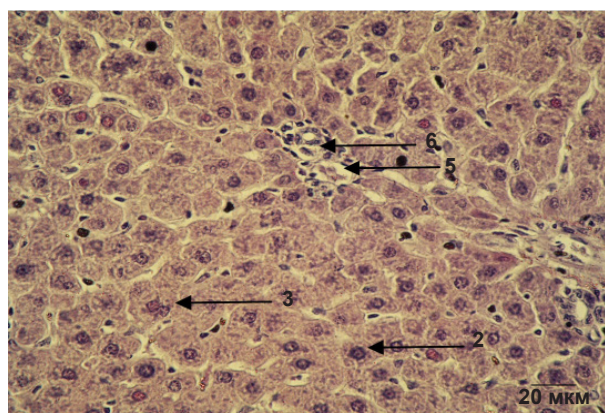
Показники	Маса, г		Печінковий індекс, %
	тіла	печінки	
Контроль	321±9,1	10±0,59	3,1
ДНГ I режиму	308±7,2	10±0,6	3,2
ДНГ II режиму	293±5,1	9,1±0,58	3,1
ДНГ III режиму	315±8,7	9,2±0,34	2,9
ДНГ IV режиму	295±6,3	10,3±0,4	3,5

зустрічаються гепатоцити в яких ядро займає більшу частину площі цитоплазми (рис. 1).

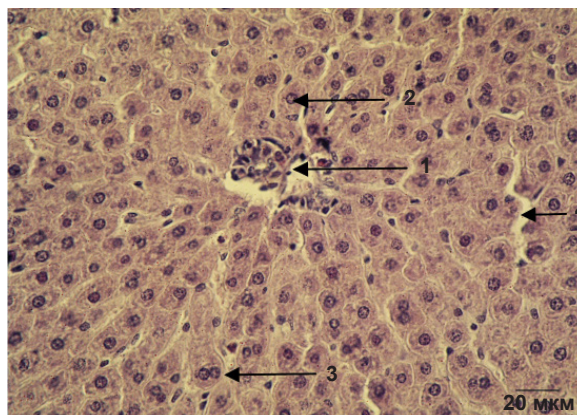
Площа поперечного перерізу гепатоцитів у дослідних груп тварин, що зазнавали впливу ДНГ, була меншою ніж у контролі. Найбільше зниження площі клітин відмічено при впливі ДНГ III режиму (на 41 %;  $P<0,05$ ) та меншою мірою після впливу II (на 15 %;  $P<0,05$ ), IV (на 11 %) та I режимів (10 %) порівняно з контролем. Відповідно відбувалось і зниження площі поперечного перерізу цитоплазми гепатоцитів, а саме – на 11, 17 ( $P<0,05$ ), 45 ( $P<0,05$ ) і 14 % після впливу ДНГ I, II, III і IV режимів відповідно порівняно з контрольними значеннями. Середня площа поперечного перерізу ядра гепатоцитів у тварин, що дихали гіпоксичною газовою сумішшю в III режимі, знижувалася вдвічі менше (на 20 %), ніж площа клітини і цитоплазми. При інших режимах гіпоксії

площа ядра залишалася на рівні контрольних значень. Тобто з отриманих результатів можна припустити, що гепатоцити є найбільш чутливими до переривчастої ДНГ у режимі 10 хв деоксигенація / 10 хв реоксигенація протягом 4 год щодобово (табл. 2).

Зниження середньої площі поперечного перерізу гепатоцита і його цитоплазми та сталість площі ядра при впливі ДНГ (за винятком гіпоксії III режиму) призводять до збільшення ядерно-цитоплазматичного співвідношення (ЯЦС) – відношення середньої площі ядра до середньої площі цитоплазми. Це морфологічний показник, який дає змогу виявити прояви компенсаторних реакцій, оцінити рівень метаболізму. Найбільше ЯЦС підвищилось при диханні гіпоксичними газовими сумішами з чергуванням періодів деоксигенації / реоксигенації, а саме: на 33 % ( $P<0,05$ ) – після впливу ДНГ III режиму



а



б

Рис. 1. Мікрофотографія печінки 3-місячного щура контрольної групи (а) та щура, який зазнавав впливу дозованої нормобаричної гіпоксії III режиму (б): 1 – центральна вена; 2 – одноядерний гепатоцит; 3 – двоядерний гепатоцит; 4 – синусоїди; 5 – вена; 6 – жовчний протік. Фарбування гематоксилін-еозин.  $\times 400$



**Таблиця. 2. Площа гепатоцитів, їхніх ядер і цитоплазми клітин 3-місячних щурів після впливу дозованої нормобаричної гіпоксії – ДНГ ( $M \pm m$ ,  $n=12$ )**

Показники	Площа, $\mu\text{m}^2$			Ядерно-цитоплазматичне співвідношення
	гепатоцита	цитоплазми	ядра	
Контроль	354±17,8	311±17,2	44±2,4	0,14±0,005
ДНГ I режиму	319±7,8	276±7,1	43±1,6	0,16±0,007
ДНГ II режиму	300±16,3*	257±16,9*	43±2,76	0,17±0,01
ДНГ III режиму	209±21,6*	172±30,5*	35±1,1*	0,2±0,006*
ДНГ IV режиму	315±13,9	269±13,2	46±1,6	0,17±0,001*

Примітка. Тут і в табл. 3 \* $P < 0,05$  – вірогідність порівняно з контролем.

(пов'язано з більш інтенсивним зниженням площі цитоплазми, ніж площі ядра) та 13 % – після впливу ДНГ IV режиму порівняно з контролем. При впливі ДНГ в I і II режимі значення ЯЦС суттєво не відрізнялося від контролю. Однак площа поперечного перерізу ядра (порівняно з цим показником контрольної групи) мала тенденцію до збільшення (на 5%) лише у тварин, що зазнавали впливу ДНГ IV режиму. Збільшення розміру ядра в першу чергу свідчить на підвищення функціональної активності клітини, а також може вказувати про підготовку клітини до мітозу ( внаслідок посилення синтезу нуклеїнових кислот, білків тощо) [16]. Найбільш ефективним у підвищенні ЯЦС є ДНГ IV режиму (10 хв деоксигенація / 30 хв реоксигенація протягом 2 год; див. табл. 2).

Вірогідне збільшення кількості гепатоцитів (на 11 %) в полі зору мікроскопа (при збільшенні в 400 разів) виявлено лише після впливу ДНГ III режиму порівняно з контролем. Підвищення кількості гепатоцитів у полі зору мікроскопа в цьому разі пов'язано

зі зменшенням розмірів останніх. При інших режимах ДНГ цей показник залишався на рівні контрольних значень (табл. 3).

Переважає більшість гепатоцитів є одноядерними, рідше двоядерними та багатоядерними. Достовірне збільшення кількості одноядерних гепатоцитів на 10 % від контролю спостерігали теж лише після впливу ДНГ III режиму. Більш чутливим виявився показник кількості двоядерних гепатоцитів. Так, було відмічено підвищення кількості двоядерних гепатоцитів на 50 % після впливу ДНГ II і III режимів та 25 % – після впливу ДНГ IV режиму порівняно з контролем. Гіпоксична газова суміш в I режимі не змінювала чисельність двоядерних клітин. Зі збільшенням кількості двоядерних гепатоцитів спостерігали підвищення співвідношення двоядерні / одноядерні гепатоцити на 6, 48 ( $P < 0,05$ ), 36 ( $P < 0,05$ ) і 30 % ( $P < 0,05$ ) після впливу ДНГ I, II, III і IV режимів відповідно порівняно з контролем (див. табл. 3). Таким чином, кількість двоядерних гепатоцитів найбільша після впливу ДНГ II і III режимів, менша – після впливу

**Таблиця. 3. Кількість гепатоцитів у полі зору мікроскопа тварин, що зазнавали впливу дозованої нормобаричної гіпоксії – ДНГ ( $M \pm m$ ,  $n=12$ )**

Показники	Кількість гепатоцитів			Співвідношення двоядерні / одноядерні гепатоцити
	загальна	одноядерних	двоядерних	
Контроль	138±2,8	134±2,9	4±0,5	0,03±0,0006
ДНГ I режиму	129±3,1	126±3,1	4±0,5	0,032±0,0007
ДНГ II режиму	141±2,8	135±3,2	6±0,6*	0,044±0,0005*
ДНГ III режиму	153±4,6*	147±4,7*	6±0,7*	0,041±0,0008*
ДНГ IV режиму	134±4,3	129±4,7	5±0,5*	0,039±0,0004*



IV режиму і не змінюється при I режимі. За більшістю літературних джерел збільшення кількості двоядерних гепатоцитів свідчить про посилення інтенсивності регенерації паренхіми печінки на внутрішньоклітинному рівні [3, 6].

До одного з головних показників морфофункціональної оцінки стану клітини відносять зміну ядерць та ядерцево-ядерного співвідношення (ЯЯС). З ядерцями пов'язані процеси транскрипції і трансформації рибосомальної РНК. Розміри і структура ядерць знаходяться в тісній кореляції з об'ємом клітинного білкового синтезу [9].

У всіх дослідних групах тварин, що зазнавали впливу ДНГ різних режимів, ядерця добре візуалізуються, переважно середнього та дрібного розміру (лише при впливі ДНГ III режиму вони мали великий розмір відносно площі ядра), мають округлу форму та чіткі межі. У щурів, що дихали гіпоксичною газовою сумішшю, було виявлено збільшення числа ядерць (ампліфікація) в ядрах гепатоцитів. Так, ампліфікація ядерць (на 100 ядер) після впливу ДНГ I режиму збільшилася на 25 % ( $P<0,05$ ), II режиму – на 12 % ( $P<0,05$ ), III режиму – на 9 % та IV режиму – на 35 % ( $P<0,05$ ) порівняно з контрольною групою тварин. При порівнянні режимів ДНГ було

виявлено, що найбільша кількість ядерць при ДНГ IV режиму. Цей показник був більшим на 25 % ( $P<0,05$ ) від ДНГ III режиму, на 21 % ( $P<0,05$ ) – II режиму та на 8 % – I режиму (рис. 2).

Зі збільшенням числа ядерць в ядрах гепатоцитів дослідних груп тварин спостерігали підвищення ЯЯС – відношення загальної суми площ ядерць в ядрі до його площі. Однак у цьому разі ЯЯС було найбільшим після впливу ДНГ III режиму (на 39% порівняно з контролем). Після впливу ДНГ I, II та IV режимів воно збільшилось на 31, 17 і 33 % відповідно порівняно з контролем. Найбільше ЯЯС підвищилось при впливі переривчастої ДНГ в III і IV режимі (див. рис. 2).

Збільшення кількості ядерць в ядрах та ЯЯС свідчить про посилення функціональної активності клітин, а саме – на активацію білоксинтетичної функції, що призводить до накопичення пластичного матеріалу, активації ферментів тощо. Ампліфікація ядерць може бути одним із проявів фізіологічної регенерації на внутрішньоклітинному рівні [6]. ДНГ у переривчастих режимах з чергуванням періодів деоксигенація / реоксигенація (III і IV режим) здійснює більш виражений ефект у підвищенні транскрипційної активності в ядрі, ніж нормобарична гіпоксія I і II режимів.

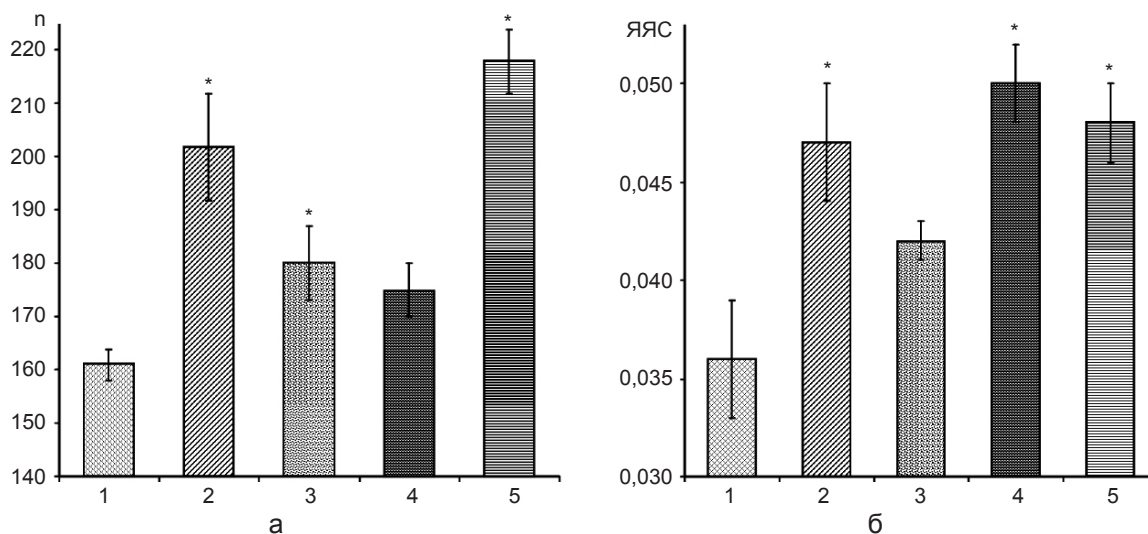


Рис. 2. Кількість ядерць на 100 ядер (а) та ядерцево-ядерне співвідношення (б) гепатоцитів щурів: 1 – контроль, 2–5 – дозована нормобарична гіпоксія I, II, III і IV режимів відповідно. \* $P<0,05$  – вірогідність порівняно з контролем

При вимірюванні відстані між ядрами суміжних гепатоцитів не було виявлено достовірної різниці як між контрольною і дослідними групами тварин, так і між різними режимами ДНГ. У шурів, яких піддавали впливу ДНГ I та IV режимів спостерігали тенденцію до зниження відстані між ядрами суміжних гепатоцитів на 9 і 8 % відповідно порівняно з контролем. Зниження значень цього показника свідчить про зменшення площі цитоплазми гепатоцитів та меншою мірою може вказувати на зменшення кількості основної речовини сполучної тканини. Так, Солопаєвим [7] та його школою була висунута теорія кореляції взаємовідносин інтенсивності процесів регенерації паренхіматозних елементів і трофічної функції сполучної тканини.

Про більшу ефективність коротких періодів деоксигенації / реоксигенації, на відміну від тривалої подачі гіпоксичної газової суміші, відмічали і інші дослідники. Так, Powell [13] показав, що ДНГ у переривчастому режимі є більш потужним фактором активації транскрипції, ніж у режимі тривалої подачі. Показано, що ДНГ підвищує фізичну витривалість спортсменів. Однак найкращі спортивні результати дає саме методика тренувань за допомогою переривчастої ДНГ [5].

Досліджуючи вплив ДНГ в переривчастому режимі (5 хв деоксигенація / 5 хв реоксигенація протягом 2 год, тривалістю 10 діб) з 10%-м вмістом кисню в азоті, автори [4] виявили активізацію пластичних процесів у печінці шурів. Збільшувалася насиченість клітин структурами з якими пов'язано звільнення енергії органічних субстратів – мітохондріями. Водночас підвищувалася кількість пероксисом, мембран ендоплазматичного ретикула, лізосомних і ліпофусцинових утворень. Ядра гепатоцитів набирали більших розмірів, що може бути ознакою підвищеної функціональної активності. Виявлено гіперплазію та гіпертрофію агранулярного ендоплазматичного ретикула. Відмічено

повнокрів'я синусоїдів і підвищення адгезії клітинних елементів зі стінкою останніх [4].

Michael [12] при дослідженні дії ДНГ спостерігала посилення експресії гіпоксиндуцибельних транскрипційних факторів HIF-1 $\alpha$  і HIF-2 $\alpha$  в печінці. Показано, що при короткотерміновому періодичному впливі кисневої депривації посилюється система захисту клітинних мембран гепатоцитів, що вказує на підвищення активності антиоксидантної системи [10].

З отриманих цитоморфометричних результатів можна зробити висновок, що ДНГ саногенного рівня посилює функціональну і регенераторну здатність паренхіми печінки. Це проявляється у збільшенні кількості ядерця в ядрах та двоядерних гепатоцитів, ЯЦС і ЯЯС, зниженні відстані між ядрами суміжних гепатоцитів. Максимальний прояв стимулювальної дії ДНГ відбувається в режимі 10 хв деоксигенація / 10 хв реоксигенація протягом 4 год щодобово та в режимі 10 хв деоксигенація / 30 хв реоксигенація протягом 2 год щодобово. Найменш ефективними, серед досліджуваних режимів, є I та II режими, тобто тривале дихання гіпоксичною газовою сумішшю протягом 30 та 60 хв.

## ВИСНОВКИ

1. Після впливу ДНГ (10 % O<sub>2</sub> від 30 до 120 хв) відмічено збільшення кількості ядерця в ядрах гепатоцитів та двоядерних клітин, ЯЦС та ЯЯС.

2. Порівняльний аналіз впливу різних режимів гіпоксичної газової суміші показав, що зміна значень досліджуваних показників інтенсивніше проявляється при ДНГ переривчастих режимів (III і IV) з чергуванням коротких періодів деоксигенації і реоксигенації.

3. Цитоморфометричні зміни стану паренхіми печінки дають змогу констатувати, що ДНГ саногенного рівня активує процеси функціональної активності та фізіологічної регенерації паренхіми печінки на внутрішньоклітинному рівні.

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

**ДОЗИРОВАННАЯ НОРМОБАРИЧЕСКАЯ  
ГИПОКСИЯ – НЕМЕДИКАМЕНТОЗНЫЙ  
СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ  
ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ  
ПАРЕНХИМЫ ПЕЧЕНИ**

Исследовали изменение цитоморфометрических показателей функциональной активности и физиологической регенерации паренхимы печени под влиянием разных режимов дозированной нормобарической гипоксии саногенного уровня. Показано, что у крыс, которые дышали гипоксической газовой смесью (10 % кислорода), увеличивается количество ядрышек в ядрах гепатоцитов и двуядерных клеток, возрастает ядерно-цитоплазматическое и ядрышко-ядерное соотношение. Изменение данных показателей интенсивней проявляется при дозированной нормобарической гипоксии прерывистых режимов с чередованием периодов деоксигенации и реоксигенации. Сделан вывод, что дозированная нормобарическая гипоксия повышает функциональную активность и физиологическую регенерацию паренхимы печени.

Ключевые слова: дозированная нормобарическая гипоксия, физиологическая регенерация, паренхима печени.

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

**DOSED NORMOBARIC HYPOXIA  
AS NON-MEDICAMENTAL APPROACH  
OF STIMULATION OF PHYSIOLOGICAL  
REGENERATION OF LIVER PARENCHIMA**

The investigation was devoted to studying the effects of different modes of dosed normobaric hypoxia on the changes in morphometric indexes of functional activity and physiological regeneration of liver parenchima in young rats. It was shown, that in rats exposed to hypoxic gas mixture (10% O<sub>2</sub>), the amount of karyonucleus and binuclear hepatocytes, nucleocytoplasmic and nucleolar-nuclear correlation increased. The changes in these indexes appeared to be more intensive when dosed normobaric intermittent hypoxia was administered with alternation of *deoxygenation* and *reoxygenation* periods. We believe that dosed normobaric hypoxia increases the functional activity and physiological regeneration of liver parenchima. Key words: dosed normobaric hypoxia, physiological regeneration, liver parenchima.

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

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ  
E-mail: biolag@ukr.net*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 385 с.
2. Березовский В.А., Левашов М.И. Введение в оротерапию. – М.: Изд-во Академии проблем гипоксии РФ., 2-е изд., 2000. – 76 с.
3. Гурьев Д.В. Особенности регенерации печени млекопитающих при лучевом воздействии. – В кн.: Сочетанное действие факторов радиационной и нерадикационной природы на растительные и животные организмы. – Сыктывкар, 2002. – С. 127–130.
4. Лебкова Н.П., Чижов А.Я., Бобков Ю.И. Адаптационные внутриклеточные механизмы регуляции энергетического гомеостаза при прерывистой нормобарической гипоксии // Рос. физиол. журн. им. Сеченова. – 1999. – **85**, № 3. – С. 403–411.
5. Радзиевский П.А., Закусило М.П., Полищук Н.В., Баканьчев А.В., Шпак Т.В., Шахлина Л.Г. Комбинированная гипоксическая тренировка как метод повышения работоспособности спортсменов // Гіпоксія: деструктивна та конструктивна дія. – К.: Принт Експрес, 1998. – С. 165–166.
6. Саркисов Д.С., Втюрин Б.В. Электронная микроскопия деструктивных и регенераторных внутриклеточных процессов. – М.: Медицина, 1967. – 224 с.
7. Солопаев Б.П. О коррелятивных взаимоотношениях между интенсивностью регенерации паренхиматозных элементов и состоянием соединительной ткани // Сб. трудов по исследованию обратимости острых и хронических изменений органов. – М., 1962. – С. 172–180.
8. Стрелков Р.Б. Перспективы применения метода прерывистой нормобарической гипокситерапии в медицинской практике // Курорт. ведомости. – 2006. – № 5. – С. 37–40.
9. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. – 495 с.
10. Arkhipenko Y., Sazontova T., Zhukova A. Periodic hypoxia and hyperoxia improves resistance of membrane structures in heart, liver and brain // Bull. of Exp. Biol. and Med. – 2005. – 140, № 3. – P. 278–281.
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and others scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasburg, 1986. – 52 p.
12. Michael S.W., Jan S.J., Christian R., Charlotte K.S., Jan H.H. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2a in distinct cell populations of different organs // Faseb J. – 2003. – 17. – P. 271–273.
13. Powell F.L., Garcia N. Physiological effects of intermittent hypoxia // High. It. Med. Biol. – 2002. – № 1. – P. 125–136.
14. Pratt D.S., Kaplan M.M. Evaluation of Liver Function // Harris. Princip. Int. Med., New York, McGraw-Hill. – 2008. – P. 17.
15. Yanko R.V. Physiological regeneration and functional activity of hepatocytes at normobaric hypoxia // Int. J. Physiol. Pathophysiol. – 2011. – 2, № 1. – P. 35–42.
16. Zimmermann A. Liver regeneration: the emerge of new pathways // Med. Sci. Monit. – 2004. – **8**. – P. 53–63.

*Матеріал надійшов  
до редакції 22.12.2012*

С.М. Корогод, І.Б. Кулагіна

## Динамічні електричні стани неоднорідних популяцій іонних каналів у мембранах збудливих клітин

*На комп'ютерних моделях досліджували миттєві, змінні у часі, вольт-амперні характеристики (мВАХ) популяцій іонних каналів, характерних для мембрани збудливих клітин різних типів, чії відповіді на електричні стимули суттєво відрізняються – гігантського аксона кальмара (модель Ходжкіна–Хакслі), кардіоміоцита, дендритів пірамідального нейрона зони СА3 гіпокампа та нейрона Пуркінє мозочка. Згідно зі стандартним протоколом ступінчастої фіксації, мембранний потенціал від початкового рівня спокою стрибком змінювали до певного тестового деполяризаційного рівня, який фіксували протягом якогось часу, та вимірювали сумарний струм у різні моменти часу від початку стрибка. Для кожної мВАХ визначали точки (потенціали) нульового струму. Множину таких точок, що були на ділянках позитивного нахилу мВАХ і відповідали стану високої деполяризації мембрани (стану збудження, upstate) у різні моменти від початку зрушення мембранного потенціалу, використовували як характеристики динаміки збудженого стану у часі. За такими ознаками мембрана аксона характеризувалася поодиноким станом збудження, що швидко виникав (0,25 мс) і був короткотривалим (за час життя 5,5 мс зменшувався від 45 до -40 мВ). У мембрани кардіоміоцита таких станів було два. Перший – ранній, який швидко виникав і був короткоживучим (такий, що швидко релаксує). Він виникав одразу після деполяризаційного поштовху та тривав 14,5 мс. Другий – пізній, повільно зростає, був довготривалим (виникав із затримкою у 7,5 мс, підвищувався від 11 до 46 мВ за 39 мс і далі релаксував, загалом триваючи близько 623 мс). Дендритна мембрана СА3 нейронів мала один довготривалий стан збудження, що виникав недовзі після деполяризаційного зсуву, спочатку швидко релаксував за 3 мс від початкового значення 30 мВ до -10 мВ і далі повільно стабілізувався на рівні -20 мВ за 80 мс. У мембрани нейронів Пуркінє виявлено два короткотривалих і один дуже довготривалий стани збудження. Перший стан дуже високої деполяризації (понад 100 мВ) релаксував до 4 мВ за 0,8 мс. Незадовго до його зникнення, на 0,7 мс виникав другий, короткотривалий стан, який за 1 мс релаксував від -22 до -48 мВ. На 1,8 мс виникав новий стан збудження, який після перехідного процесу релаксації, починаючи з 88-ї мілісекунди, стабілізувався на рівні -29,65 мВ. Отже, мВАХ дали змогу розкрити тонку організацію станів електричного збудження мембран, виявити у різних за складом популяцій іонних каналів існування різної кількості згаданих станів, що суттєво відрізняються один від одного за часом виникнення та тривалістю життя.*

*Ключові слова:* миттєва вольт-амперна характеристика, гігантський аксон кальмара, кардіоміоцит, пірамідальний нейрон гіпокампа, нейрон Пуркінє.

### ВСТУП

Проблема електричної збудливості клітин є однією з фундаментальних у галузі фізіології та біофізики. Незважаючи на більше ніж сторічну історію досліджень, певні важливі аспекти цієї проблеми залишаються нез'ясованими. Зокрема, це стосується й

характеристик стану збудження клітин, що проявляється у регенеративній деполяризації плазматичної мембрани, викликаній електричним подразником – імпульсом струму або напруги відповідної полярності. Така самопідтримувана деполяризація, зокрема у вигляді потенціалу дії (ПД), що триває й після виключення подразника, може істотно



відрізнитися за часовим перебігом у клітинах різних типів (нейрони, м'язові волокна) і навіть у різних частинах певної клітини (аксон і дендрити одного й того самого нейрона). Вочевидь, ці відмінності пов'язані зі складом і властивостями іонних каналів, наявних у мембрані тих чи інших клітин або їх частин. Найбільш узагальненим і поширеним представленням електричних властивостей як однорідних, так і неоднорідних за складом популяцій іонних каналів є вольт-амперні характеристики (ВАХ). Так, для цієї популяції каналів стаціонарні ВАХ визначають кількість і стабільність стаціонарних електричних станів – рівнів мембранного потенціалу, яким відповідає баланс вхідних і вихідних трансмембранних струмів, а, отже, нульовий загальний трансмембранний струм. За цими ознаками розрізняють, наприклад, моно- і бістабільні ВАХ. З останніми, що графічно є N-подібними, асоціюються певні особливості клітинних електрофізіологічних процесів. Такими, наприклад, є генерація осциляторних деполяризаційних плато-потенціалів або пачок ПД у мотонейронах, що є важливим фактором забезпечення стереотипних періодичних рухів [11], або наявність плато-фази у ПД шлуночкових кардіоміоцитів на відміну від міоцитів передсердь, у яких ВАХ не є N-подібною, а ПД не мають деполяризаційного плато [6, 5]. Оскільки функціонування клітин пов'язане головним чином зі змінами мембранного потенціалу у часі, найбільший інтерес викликають динамічні, або миттєві ВАХ (мВАХ), котрі відображають змінний у часі баланс струмів через іонні канали. Проте саме такі ВАХ залишаються поки що майже недослідженими, це стосується мВАХ неоднорідних за складом популяцій іонних каналів у різних типах клітин. Це і стало метою нашої роботи.

## МЕТОДИКА

Обчислювальні експерименти виконані на створених у програмному середовищі NEURON [8] моделях мембран з чотирма

популяціями (наборами, “коктейлями”) різнотипних іонних каналів, характерними для різних збудливих клітин. 1. Мембрана гігантського аксона кальмара містила канали натрієвого струму, що швидко інактивується, калієвого, що не інактивується, та неспецифічного струму пасивного витоку з такими самими параметрами, як у класичній моделі Ходжкіна–Хакслі [10]. 2. Мембрана кардіоміоцита (волокна міокарда серцевого шлуночка) містила такі канали: натрієвого струму, що інактивується, кальцієвого струму L-типу та калієвих струмів двох типів – незалежного від часу зворотного випрямлення та такого, що не інактивується. Всі ці канали описані так само, як у моделі Білера та Рейтера, адаптованій Ганьє до середовища NEURON [3], що була отримана нами з бази даних ModelDB (номер доступу 97863) [9, 14]. 3. Мембрана дендрита пірамідального нейрона зони CA3 гіпокампа містила канали таких струмів: натрієвого, що інактивується; чотирьох потенціалзалежних калієвих струмів – затриманого випрямлення, чутливого до мускарину, та таких, що швидко й повільно інактивуються – А- та D-типу; двох калієвих струмів, залежних від  $Ca^{2+}$  (високо- і низькопороговий); трьох кальцієвих струмів (N-, L- та T-типів); а також неспецифічного катіонного струму (h-типу), що активується гіперполяризацією. Ці струми були ідентичними щодо використаних у моделі Хемонда і співавт. [7] (номер доступу 101629 у базі даних ModelDB). 4. Мембрана дендрита нейрона Пуркінє мозочка містила канали таких типів: кальцієвого струму P-типу; калієвих струмів затриманого випрямлення та А-типу, а також кальційзалежного калієвого струму та неспецифічного струму витоку. Такий склад струмів та їх параметри були ідентичними використаним у моделях, що описані у літературі [13, 15]. У останніх двох моделях урахувували зміни концентрації  $Ca^{2+}$  у примембранному шарі цитоплазми, котрі були спричинені дією кальцієвих насосів, депо та дифузією іона у глибинні шари цитозолу [7, 13, 15], а також включали дію збуджуваль-



ного синапсу. Остання полягала у внесенні змінної у часі синаптичної провідності, пов'язаної з потенціалом рівноваги 0 мВ [12]. Миттєві (змінні у часі) вольт-амперні характеристики сумарного трансмембранного струму отримували, використовуючи стандартний протокол ступінчастої фіксації потенціалу [2, 4]. Мембранний потенціал від початкового рівня утримання (holding potential), близького до потенціалу спокою або більш негативного, стрибком змінювали до певного тестового деполяризаційного рівня, який фіксували протягом деякого часу, та вимірювали сумарний струм у різні моменти часу від початку згаданого стрибка. Для кожної мВАХ визначали потенціали, при яких струм дорівнював нулю – точки нульового струму, або квазістаціонарні точки. Множину таких точок, що знаходилися на ділянках позитивного нахилу мВАХ і відповідали стану високої деполяризації мембрани (upstate) у різні моменти часу від початку зрушення мембранного потенціалу, використовували як характеристику змін збудженого стану мембрани у часі.

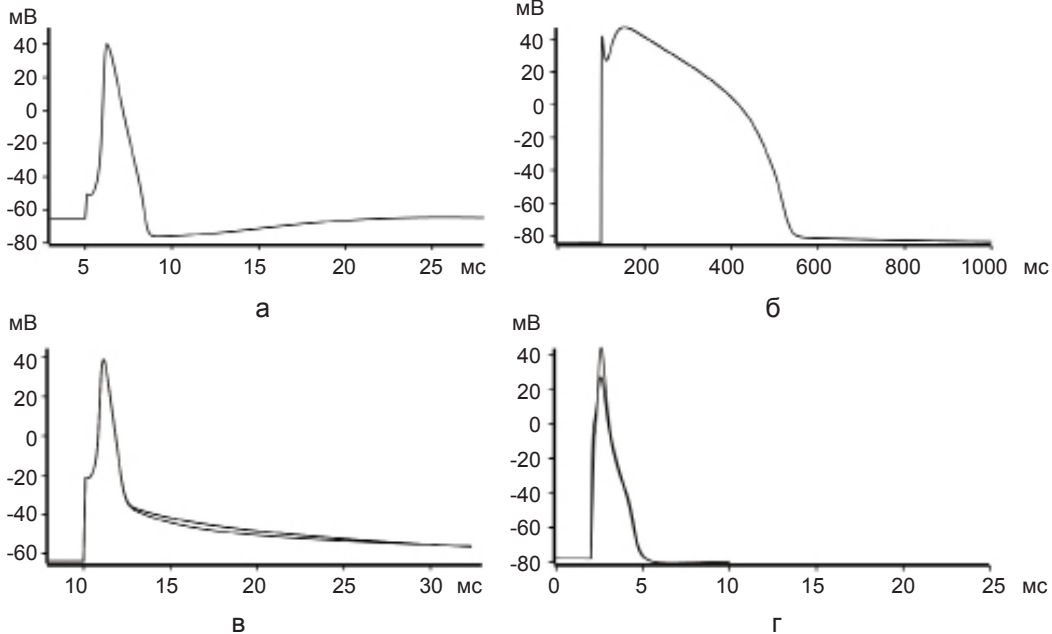


Рис. 1. Регенеративні деполяризаційні потенціали, викликані у збудливих мембранах з різними за складом популяціями іонних каналів під дією імпульсу деполяризаційного струму від зовнішнього генератора (а–г) або збуджувального синапсу (в, г – тонкі лінії). Склад іонних каналів відповідає описаному у гігантському аксоні кальмара (а), кардіоміоциті (б), а також у дендритах пірамідальних нейронів зони СА3 гіпокампа (в) та нейронів Пуркінє мозочка (г)

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати першої серії обчислювальних експериментів, представлені на рис. 1, продемонстрували здатність використаних нами моделей відтворювати основні риси регенеративних відповідей на електричний подразник, які притаманні клітинам відповідних типів. Так, мембрана гігантського аксона кальмара генерувала короткотривалий (близько 2 мс) деполяризаційний імпульс ПД зі слідовою гіперполяризацією (див. рис. 1, а). Відповідь мембрани кардіоміоцита на аналогічний стимул суттєво відрізнялася. Тут за початковою фазою швидкозростаючого та короткотривалого піка слідувала довготривала (понад 400 мс) платоподібна деполяризація майже така, як і початковий пік (див. рис. 1, б). Деполяризаційна відповідь дендритної мембрани гіпокампальних пірамідальних нейронів була також двофазною. За швидким високоамплітудним піком (ПД) розвивалася слідова деполяризація, яка від початку була у декілька разів меншою, ніж пік і повільно знижувалася протягом десятків мілісекунд

(див. рис. 1, в, товста лінія). Відповідь на коротке синаптичне збудження була дещо меншою (тонка лінія), що зумовлено певним збільшенням мембранної провідності при активації відповідних синапсів. Дендритна мембрана нейронів Пуркінє реагувала на аналогічні деполяризаційні стимули генерацією швидкого піка (дещо меншої амплітуди у разі синаптичного збудження), на низхідній фазі якого спостерігалася деполяризаційна “полічка” певної тривалості (див. рис. 1, г). Виникає питання щодо електричних станів

мембрани під час генерації таких різних відповідей: чи існує при цьому поодинокий стан, якому притаманний “аналоговий”, безперервний перехід до стану спокою, або спостерігаються послідовні переходи між декількома дискретними станами? Відповідь мали дати мВАХ, отримані у наступних обчислювальних експериментах.

Динаміка електричних станів мембрани аксона – відомої моделі Ходжкіна–Хакслі показана на рис. 2. Ця поширена та досконало вивчена модель зручна для порівняння. Ви-

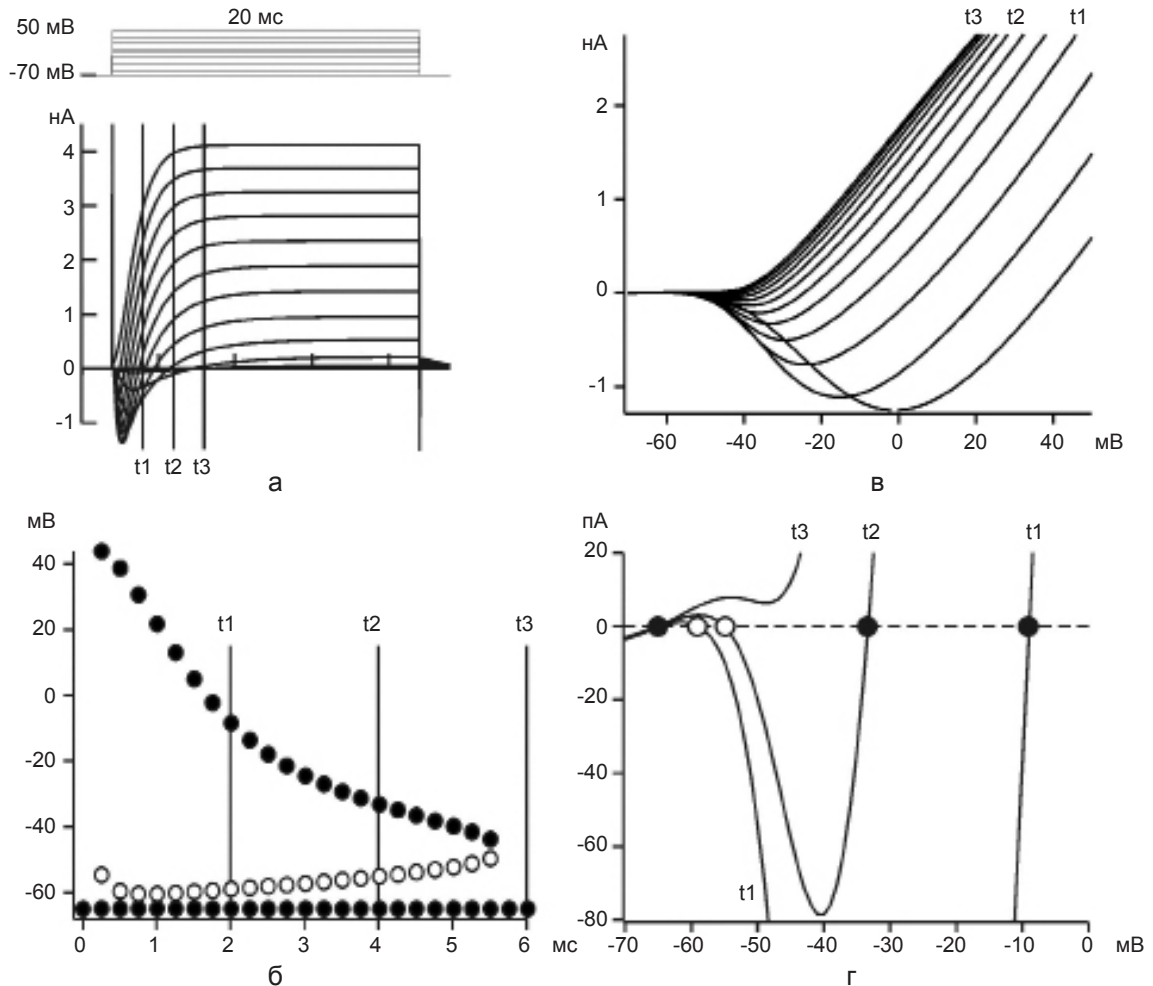


Рис. 2. Динаміка поодинокого короткотривалого стану збудження мембрани гігантського аксона кальмара (модель Ходжкіна–Хакслі): а – зміни у часі сумарного трансмембранного струму, викликаного показаними на вставці угорі ступінчастими стрибками командної напруги (тривалість 20 мс, амплітуда – від початкового рівня -70 до 50 мВ, крок приросту – 5 мВ); б – зміни у часі напруги, що відповідає нульовому струму на а; в, г – миттєві вольт-амперні характеристики (мВАХ) сумарного струму. Чорні та білі кружечки – точки нульового струму на ділянках позитивного та негативного нахилу мВАХ відповідно.  $t_1$ ,  $t_2$  і  $t_3$  – моменти часу (2, 4 та 6 мс), для яких за даними, показаними на а, виміряні мВАХ, позначені товстими лініями на в і г, а також відповідні точки нульового струму на б і г

користовуючи записи загального трансмембранного струму, викликаного східчастим 20-мілісекундним зсувом мембранного потенціалу від рівня спокою до певного деполяризаційного рівня (а), кожні 0,25 мс від початку східця вимірювали мВАХ (в, г) і визначали її точки нульового струму (б–г). Починаючи з 0,25 мс, мВАХ була N-подібною з трьома точками нульового струму. Дві такі точки були розташовані на ділянках позитивного нахилу мВАХ (чорні кола), одна з яких відповідала низькому рівню мембранного потенціалу спокою (-65 мВ), а друга – більш або менш високій деполяризації. Електричні стани, що відображаються такими точками мВАХ, у англійській літературі позначаються як downstate та upstate відповідно. Саме точка, що відповідала високій деполяризації (upstate), розглядалася як індикатор збудженого стану. Інша точка нульового струму була на ділянці негативного нахилу мВАХ (білі кола) та відповідала проміжному рівню мембранної деполяризації. З плином часу мВАХ еволюціонувала таким чином, що висока мембранна деполяризація, якій відповідала точка нульового струму на ділянці позитивного нахилу мВАХ, знижувалася від 45 мВ до -40 мВ, і до цього самого значення наближалася точка нульового струму, яка відповідала проміжному рівню деполяризації.

Нелінійна мВАХ залишалася N-подібною до моменту 5,5 мс, після чого у неї була лише одна точка нульового струму, яка відповідала мембранному потенціалу спокою -65 мВ. Практично з цього моменту мВАХ збігалася із добре відомою стаціонарною ВАХ мембрани Ходжкіна–Хакслі, яка є нелінійною з позитивним нахилом і єдиною точкою нульового струму при мембранному потенціалі спокою [1]. Таким чином, визначені на основі мВАХ динамічні електричні властивості мембрани аксона можна охарактеризувати як здатність до утворення короткоживучого (близько 5 мс) стану збудження у вигляді деполяризації, що прагне самопідтримуватися. Відповідно генерація швидкого мембранного ПД може

розглядатися як перехід мембрани зі стану спокою у цей короткотривалий швидкорелаксуючий стан збудження і наступне повернення до стану спокою після закінчення терміну життя цього збудження.

На рис. 3 показано мВАХ і виявлені за їх допомогою динамічні стани збудження мембрани кардіоміоцита. У цьому разі застосовувалися деполяризаційні східці тестової напруги тривалістю 2 с. Зміни у часі загального трансмембранного струму були більш складними (а), що позначалося й на більш складні мВАХ (г–е), які істотно відрізнялися за кількістю та динамікою точок нульового струму (б, в) порівняно з мВАХ мембрани аксона (див. рис. 2). Так, починаючи з першого моменту реєстрації (0,25 мс від початку деполяризаційного східця), мВАХ з трьома точками нульового струму спостерігалися протягом 7 мс, після чого їх кількість стрибком збільшувалася до 5, а через наступні 7,5 мс також стрибком зменшувалася до 3. З 630-ї мілісекунди від початку східця у всіх наступних мВАХ зберігалася лише поодинокі точка нульового струму на рівні потенціалу спокою, близького до -84 мВ. Відповідно динамічні електричні властивості мембрани кардіоміоцита характеризувалися вже не одним, а двома станами збудження. Першим таким станом був ранній, короткоживучий, такий, що швидко виникав і швидко релаксував. Він виникав після деполяризаційного поштовху практично миттєво та тривав протягом 14,5 мс. Другий стан збудження – пізній, довготривалий (виникав із затримкою приблизно у 7,5 мс і тривав близько 623 мс), повільно зростаючий (підвищення відповідного рівня високої деполяризації від 11 до 46 мВ протягом 39 мс). Релаксація довготривалого стану збудження у часі відбувалася з різною швидкістю у різних діапазонах деполяризації. Так, деполяризація, що відповідала цьому станові, знижувалася (релаксувала) у діапазоні від максимуму 46,75 до 6 мВ, тобто приблизно на 40 мВ за 200 мс. Її релаксація у діапазоні від 6 до -14 мВ, тобто на 20 мВ, проходила

швидше майже на порядок – за 20 мс. Нарешті, у діапазоні від -14 до -30 мВ цей процес відбувався приблизно на півтора порядки повільніше (за 360 мс на 16 мВ). Відповідно типова реакція мембрани кардіоміоцита на деполяризаційний стимул (див. рис. 1, б)

може бути охарактеризована у термінах динаміки станів збудження таким чином. Генерація раннього швидкого деполяризаційного піка ПД кардіоміоцита розглядатиметься як швидкий перехід мембрани зі стану спокою у перший, короткотривалий стан збудження з

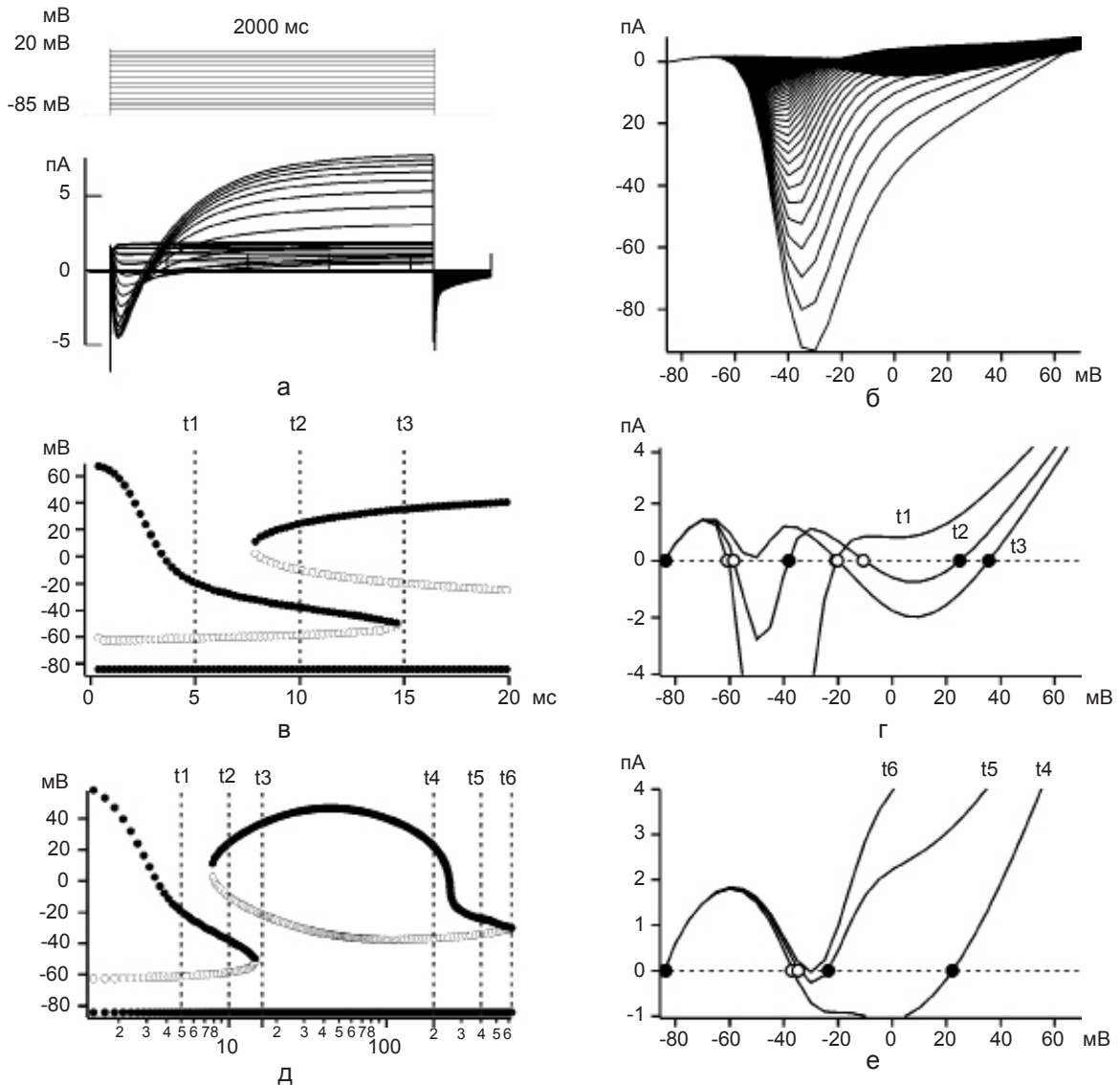


Рис. 3. Динаміка коротко- та довготривалого станів збудження мембрани кардіоміоцита: а – зміни у часі сумарного трансмембранного струму, викликаного показаними на вставці вгорі ступінчастими стрибками командної напруги (тривалість 2 мс, амплітуда – від початкового рівня -85 до 65 мВ); б і в – зміни у часі (мс) напруги (мВ), що відповідає нульовому струму на а – для діапазонів часу 0–20 і 0–600 мс відповідно (шкала абсциси на в – логарифмічна); г, е – миттєві вольт-амперні характеристики (мВАХ) сумарного струму. Чорні та білі кружечки – точки нульового струму на ділянках позитивного та негативного нахилу відповідно, t1–t6 – моменти часу для яких за даними, показаними на а, виміряні мВАХ представлені на д і е. Графіки на д і е відповідають позначеним вертикальними лініями на б і в моментам часу t1–t6, коли існують різні кількості станів збудження, що відповідають високій деполяризації

відносно швидкою релаксацією. Виникнення на низхідній фазі швидкого піка плато-деполяризації та її повільне зростання відповідає переходу мембрани у новоутворений пізній, довготривалий стан збудження. Розвиток плато, що нешвидко спадає, відповідає першій фазі повільної релаксації довготривалого збудженого стану. Пришвиджене зменшення плато та перехід до довготривалої слідової депольоризації відповідають другій (швидкій) і третій (надповільній) фазам релаксації зазначеного довготривалого стану збудження.

Різні зміни збудження населеної неоднорідними популяціями каналів дендритної мембрани різнотипних нейронів можна бачити на рис. 4. Так, дендритна мембрана гіпокампальних пірамідальних нейронів у цьому прикладі від самого початку характеризувалася наявністю одного довготривалого стану збудження. Цей стан виникав невдовзі після депольоризаційного зсуву та спочатку швидко релаксував, за 3 мс від початкового рівня 30 до -10 мВ, а далі – повільно стабілізувався (на рівні близько -20 мВ приблизно за 80 мс). Така динаміка поодинокого стану збудження відповідала представленій на рис. 1, у реакції досліджуваної мембрани на депольоризаційні стимули, а саме швидкому спаду дендритного ПД відповідала фаза швидкої релаксації збудженого стану, а тривалій слідовій депольоризації – фаза повільної довготривалої релаксації та стабілізації.

Дендритна мембрана нейронів Пуркінє мозочка характеризувалася двома короткотривалими і одним дуже довготривалим станами збудження (див. рис. 4, б і в). Перший стан дуже високої депольоризації (понад 100 мВ) виникав менше ніж за 0,1 мс від початку депольоризаційного зсуву та релаксував до рівня, близько 4 мВ за 0,8 мс. Незадовго до повної релаксації (зникнення) цього стану у момент 0,7 мс виникав інший, короткотривалий депольоризаційний стан, який за наступну 1 мс релаксував від початкового рівня -22 до -48 мВ. Далі мембрана короткочасно (протягом 0,25 мс) перебувала у незбудженому

стані (мембранний потенціал був близько до -78 мВ – рівня спокою). Після цього у момент 1,8 мс від початку депольоризаційного схида виникав новий стан збудження, який після певного перехідного процесу (підвищення депольоризації від початкового рівня 6 мВ до максимуму 76,4 мВ і подальшого спаду), починаючи з 88-ї мілісекунди стабілізувався на рівні -29,65 мВ. Таким чином, мембрана ставала електрично бістабільною, тобто характеризувалася двома стабільними станами -29,65 мВ (upstate) і -78,28 мВ (downstate) та одним нестабільним (-47,69 мВ). Саме першому короткотривалому стану збудження

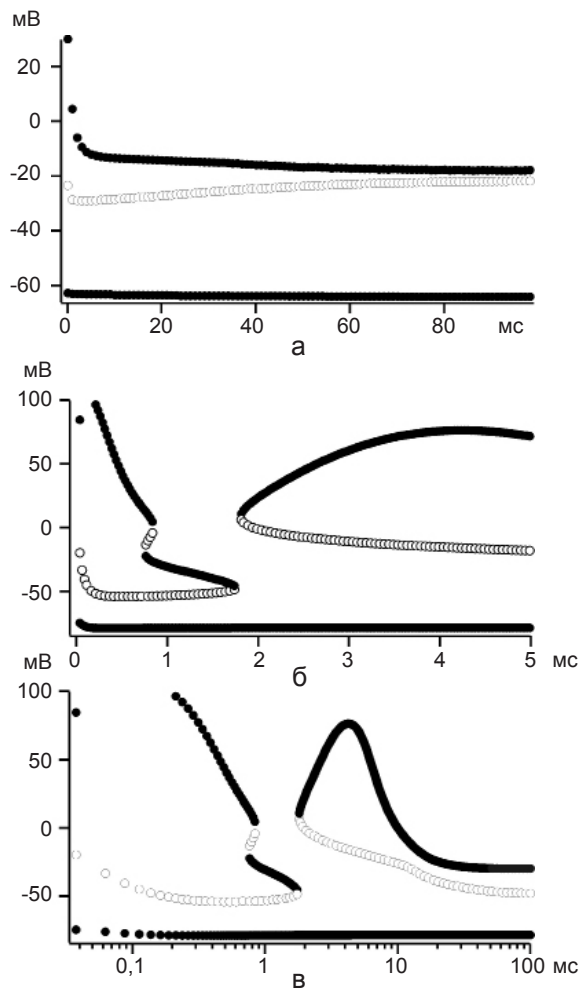


Рис. 4. Динамічні електричні стани неоднорідних популяцій каналів збудливої мембрани дендритів пірамідальних нейронів зони СА3 гіпокампа (а) та нейронів Пуркінє мозочка (б, в)



відповідає швидке зростання і швидке зниження дендритного потенціалу дії, а другому, короткотривалому стану відповідає певне уповільнення спаду мембранної деполяризації, яка врешті переходить у слідову гіперполяризацію, лише трошки нижчу за потенціал спокою. Оскільки цей стан, у якому опинялася мембрана по закінченні дендритного потенціалу дії, також є стабільним, мембранний потенціал після слідової гіперполяризації повертається до спокою.

Отже, дослідження мВАХ розкрили доволі тонку динамічну організацію збуджених електричних станів населеної різними за складом популяціями іонних каналів мембрани у клітин різних типів. На відміну від стаціонарних ВАХ, точки нульового загального струму миттєвих (динамічних) мВАХ не є, по суті, стаціонарними, оскільки баланс вхідних і вихідних струмів є динамічним. Іншими словами, він досягається у різні моменти часу при неоднакових значеннях мембранної напруги. Принципово важливою є електрична поведінка популяції іонних каналів поблизу точок нульового струму, що розташовані на вітках ВАХ з позитивним нахилом. У разі стаціонарних ВАХ такі точки є стабільними, тобто будь-яке відхилення мембранного потенціалу від рівня нульового струму (балансу вхідного та вихідного струмів) спричиняє посилення струму такого напрямку, котрий повертає мембранний потенціал назад, доки це відхилення не зникне. Теоретично такий стан може існувати нескінченно довго, доки не буде змінений зовнішньою дією (наприклад, гіперполяризаційним поштовхом). Подібні ж точки динамічної мВАХ можна охарактеризувати як квазістабільні. Відхилення мембранного потенціалу від такої точки породжує подібні “компенсаторні” струми, які намагаються ліквідувати відхилення. Проте повернення точно у ту саму точку неможливе через таку зміну станів іонних каналів, яка спричиняє зміну рівня мембранного потенціалу, відповідну новому балансу струмів крізь ці канали. Як наслідок,

через нездатність “компенсаторних” струмів забезпечити нескінченно довге підтримання (стабілізацію) мембранного потенціалу на такому рівні, можна говорити лише про більш або менш тривале перебування мембранного потенціалу у певному діапазоні значень. Саме таке його перебування у зазначеному діапазоні деполяризаційних значень протягом обмеженого відрізка часу і може визначати (характеризувати) перебування мембрани у динамічному стані збудження. Тривалість же цього обмеженого відрізка, відповідно, визначає час життя збудженого стану.

У загальному підсумку можна зазначити, що миттєві динамічні ВАХ показали себе адекватним інструментом дослідження тонкої організації станів електричного збудження мембрани, який дав змогу виявити у різних за складом (неоднорідних) популяціях іонних каналів існування різної кількості таких станів, котрі суттєво відрізняються один від одного за часом виникнення та тривалістю. Згідно із цими ознаками, можна певним чином класифікувати мембранні електричні властивості клітин різних типів і різних структурних частин клітин того чи іншого типу.

**С.М. Корогод, І.Б. Кулагіна**

#### **ДИНАМИЧЕСКИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ НЕОДНОРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ИОННЫХ КАНАЛОВ В МЕМБРАНАХ ВОЗБУДИМЫХ КЛЕТОК**

На компьютерных моделях исследовали мгновенные, изменяющиеся во времени, вольт-амперные характеристики (мВАХ) популяций ионных каналов, характерных для мембраны возбудимых клеток разных типов, чьи ответы на электрические стимулы существенно отличаются – гигантского аксона кальмара (модель Ходжкина–Хаксли), кардиомиоцита, дендритов пирамидального нейрона зоны СА3 гиппокампа и нейрона Пуркинье мозжечка. В соответствии со стандартным протоколом ступенчатой фиксации, мембранный потенциал от начального уровня покоя скачком изменяли до определенного тестового деполяризованного уровня, который фиксировали в течение определенного времени, и измеряли суммарный ток в разные моменты времени от начала скачка. Для каждой мВАХ определяли точки (потенциалы) нулевого тока. Множество

таких точек, расположенных на участках положительного наклона мВАХ и соответствующих состоянию высокой деполяризации мембраны (состоянию возбуждения, upstate) в разные моменты после начала смещения мембранного потенциала, использовали как характеристику динамики возбужденного состояния во времени. По этим признакам мембрана аксона характеризовалась одиночным состоянием возбуждения, которое быстро возникало (0,25 мс) и было кратковременным (за время жизни 5,5 мс спадало от 45 до -40 мВ). У мембраны кардиомиоцита таких состояний было два. Первое – раннее, быстро возникающее и короткоживущее (быстро релаксирующее). Оно возникало сразу же после деполяризационного толчка и длилось 14,5 мс. Второе – позднее, медленно нарастающее, долго длящееся (возникало с задержкой 7,5 мс, нарастало от 11 до 46 мВ за 39 мс и далее релаксировало, длясь в общей сложности около 623 мс). Дендритная мембрана CA3 нейронов имела одно длительное состояние возбуждения, которое возникло вскоре после деполяризационного смещения, вначале быстро релаксировало за 3 мс от начального уровня 30 мВ до -10 мВ и далее медленно, за 80 мс стабилизировалось на уровне -20 мВ. У мембраны нейронов Пуркинью выявлено два кратковременных и одно очень длительное состояния возбуждения. Первое состояние очень высокой деполяризации (свыше 100 мВ) релаксировало до 4 мВ за 0,8 мс. Незадолго до его исчезновения, на 0,7 мс возникало второе кратковременное состояние, которое за 1 мс релаксировало от -22 мВ до -48 мВ. На 1,8 мс возникло новое состояние возбуждения, которое после переходного процесса релаксации, начиная с 88-й мс, стабилизировалось на уровне -29,65 мВ. Таким образом, мВАХ позволили раскрыть тонкую организацию состояний электрического возбуждения мембран, выявить у разных по составу популяций ионных каналов существование разного числа названных состояний, которые существенно отличаются друг от друга по времени возникновения и продолжительности жизни.

**S.M. Korogod, I.B. Kulagina**

### **DYNAMICAL ELECTRICAL STATES OF HETEROGENEOUS POPULATIONS OF ION CHANNELS IN THE MEMBRANES OF EXCITABLE CELLS**

In computer models, we studied instantaneous (time-varying) current-voltage relationships (iIVs) of populations of ion channels characteristic of the membrane of different type excitable cells, of which the responses to electrical stimuli essentially differ: giant squid axon (Hodgkin-Huxley model), cardiomyocyte, dendrites of CA3 hippocampal pyramidal neurons and Purkinje neurons of the cerebellum. The membrane potential was stepped from the rest level to a certain depolarization test level that was clamped for a certain time, and the total current was measured at different moments after the step onset. For each iIV zero-current points (potentials) were determined. A set of such points, which were situated on the limb of iIV positive slope and corresponded to the state

of high membrane depolarization (excitation state, upstate) at different time moments, were used to characterize the dynamics of the excitation state in time. With these indicators the axon membrane was characterized by a single excitation state that rapidly occurred (0.25 ms) and was short-lasting (decayed from -45 to 40 mV during life-time of 5.5 ms). There were two such states of the membrane of cardiomyocyte. The first one was early, rapidly occurring and short-living (rapidly relaxing). It occurred shortly after the depolarization start and lasted for 14.5 ms. The second one was late, slowly rising and long-lasting (occurred with a 7.5-ms delay, increased from 11 to 46 mV in 39 ms and then relaxed lasting for 623 ms in total). The dendritic membrane of CA3 neurons had one long-lasting excitation state that occurred shortly after the depolarization shift, first rapidly relaxed during 3 ms from initial 30 mV level to -10 mV and then slowly, in 80 ms, stabilized at the level of -20 mV. In the Purkinje neuron membrane two short-lasting and one very long-lasting excitation states were revealed. The first state of very high (>100 mV) depolarization relaxed to 4 mV in 0.8 ms. Shortly before its vanishing, at 0.7 ms, the second short-lasting state emerged, which relaxed in 1 ms from -22 mV to -48 mV. At 1.8 ms a new excitation state emerged, which after a transient relaxation stabilized at -29.65 mV starting from 88 ms. Thus, iIVs allowed disclosing a fine organization of the states of electrical excitation of the membrane and revealing, in populations of ion channels of different content, existence of different number of the mentioned states, which differ from each other in occurrence time and life-time.

*International Center for Molecular Physiology  
(Dnipropetrovsk Division), National Academy of Sciences  
of Ukraine*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Ходоров Б.И. Общая физиология возбудимых мембран. – М.: Наука, 1975. – 405 с.
2. Armstrong C.M. Time course of TEA(+)-induced anomalous rectification in squid giant axons // *J. Gen. Physiol.* – 1966. – **50**, №2. – P. 491–503.
3. Beeler G.W., Reuter H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres // *J. Physiol.* – 1977. – **268**, №1. – P. 177–210.
4. Dodge F.A. A study of ionic permeability changes underlying excitation in myelinated nerve fibres of the frog. – New York: The Rockefeller University, 1963. – 120 p.
5. Furukawa T., Kimura S., Furukawa N., Bassett A.L., Myerburg R.J. Potassium rectifier currents differ in myocytes of endocardial and epicardial origin // *Circulat. Res.* – 1992. – **70**, №1. – P. 91–103.
6. Giles W.R., Imaizumi Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells // *J. Physiol.* – 1988. – **405**, Nov. – P. 123–145.
7. Hemond P., Epstein D., Boley A., Migliore M., Ascoli G.A., Jaffe D.B. Distinct classes of pyramidal cells exhibit mutually exclusive firing patterns in hippocampal

- area CA3b // Hippocampus. – 2008. – **18**, №4. – P. 411–424.
8. Hines M.L., Carnevale N.T. The NEURON simulation environment // Neural Computation. – 1997. – **9**, №6. – P. 1179–1209.
  9. Hines M.L., Morse T., Migliore M., Carnevale N.T., Shepherd G.M. ModelDB: A Database to support computational neuroscience // J. Comp. Neurosci. – 2004. – **17**, №1. – P. 7–11.
  10. Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // J. Physiol. – 1952. – **117**, №4. – P. 500–544.
  11. Kiehn O., Eken T. Functional role of plateau potentials in vertebrate motor neurons // Curr. Opin. Neurobiol. – 1998. – **8**, №6. – P. 746–752.
  12. Korogod S.M., Novorodovskaya T.S. Impact of Geometrical Characteristics of the Organellar Store and Organelle-Free Cytosol on Intracellular Calcium Dynamics in the Dendrite: a Simulation Study // Neurophysiology/Neirofiziologiya. – 2009. – **41**, №1. – P. 16–27.
  13. Kulagina I.B., Korogod S.M., Horcholle-Bossavit G., Batini C., Tyc-Dumont S. The electro-dynamics of the dendritic space in Purkinje cells of the cerebellum // Arch. Ital. Biol. – 2007. – **145**, №. 3/4. – P. 211–233.
  14. Migliore M., Morse T.M., Davison A.P., Marengo L., Shepherd G.M., Hines M.L. ModelDB: making models publicly accessible to support computational neuroscience // Neuroinformatics. – 2003. – **1**, №1. – P. 135–139.
  15. Miyasho T., Takagi H., Suzuki H., Watanabe S., Inoue M., Kudo Y., Miyakawa H. Low-threshold potassium channels and a low-threshold calcium channel regulate Ca<sup>2+</sup> spike firing in the dendrites of cerebellar Purkinje neurons: a modeling study // Brain Res. – 2001. – **891**, №1–2. – P. 106–115.

*Міжнарод. центр молекуляр. фізіології  
(Дніпропетров. відділення) НАН України  
E-mail: dnipro@biph.kiev.ua, kulagina\_iryana@yahoo.com*

*Матеріал надійшов до  
редакції 26.12.2011*

О.П. Єлісеєва, Д.В. Камінський, Х.О. Семен, О.Г. Мисаковець,  
І.В. Челпанова, А.К. Куркевич

## Зміни частоти серцевих скорочень під час виконання субмаксимального навантаження

*У роботі продемонстровано ефект зниження частоти серцевих скорочень (ЧСС) та сатурації крові ( $SaO_2$ , насичення гемоглобіну киснем) коливного характеру, виявлений під час виконання субмаксимального велоергометричного навантаження (ВЕМ-тест) атлетами високої кваліфікації та волонтерами, які практикують активний фізичний спосіб життя. Аналізуються досліджувані показники (ЧСС,  $SaO_2$ , амплітуда коливань, час відновлення після ВЕМ-тесту) з позицій сучасних уявлень про механізми підтримання  $pO_2$  під час активації аеробного метаболізму у високорезистентних організмів в екстремальних умовах. Стверджується, що оптимізація кардіореспіраторної системи реалізується за умови синхронізації лабільних коливань показників цієї системи на різних рівнях функціональної ієрархії, які підтримуються вищою інтенсивністю редокс-реакцій, покращеною утилізацією недоокислених продуктів обміну, більшою інтенсивними флуктуаціями ендogenous кисню, тонкою регламентацією участі гемопротейнів у вільнорадикальних реакціях, що забезпечує тривале існування адаптаційної реакції активації на високих рівнях реактивності. Подальші дослідження числових характеристик виявлених коливань можуть дати змогу використовувати їх як нові функціонально-діагностичні критерії оцінки механізмів реактивності та резерву адаптації у спортивній і профілактичній медицині.*

*Ключеві слова:* субмаксимальне навантаження, велоергометрія, частота серцевих скорочень, насичення гемоглобіну киснем, атлети, волонтери, функціональний резерв, нові діагностичні критерії.

### ВСТУП

Адаптація у спорті – сукупність вроджених і набутих пристосувальних реакцій організму (на клітинному, органному, системному рівнях, управління функціями та поведінкою), направлених на підтримання гомеостазу, цілеспрямованого підвищення спеціальної працездатності та якнайповнішої реалізації резервів організму. На етапах тренування, у кожному новому функціональному стані спортсмена ступінь виснаження буде ефективним стимулом лише у тому разі, якщо відповідає адаптивним можливостям [9]. При цьому відбувається інтенсифікація пластичних процесів, адекватна досягнутому ступеню виснаження. Однак як недостатня, так і

надмірна активація катаболічних процесів не стимулює анаболічні процеси тією мірою, яка необхідна для формування тренувального ефекту [9, 12, 21]. Тому до ефективної адаптації можна віднести лише ті засоби цілеспрямованої стимуляції резервів організму, які забезпечують активацію «надмірного» анаболізму і формують «суперкомпенсаторний слід» [12, 25, 26]. Але питання – яким чином реалізується узгодження і зв'язок різних фаз обміну, якими критеріями оцінити реакцію-відповідь організму на екстремальні та коригувальні впливи – і нині залишаються відкритими і потребують залучення сучасних фундаментальних знань і нових підходів.

У процесі тренування спортсменів адаптація оцінюється за динамікою приросту їх

працездатності, одним із критеріїв якої є частота серцевих скорочень (ЧСС) при суб- або максимальному навантаженні, тісно пов'язана з максимальним споживанням кисню (МСК), що відображає максимальну аеробну потужність організму [1, 8, 9, 14]. Остання, на сьогодні, визначається в основному киснетранспортними можливостями систем дихання і кровообігу. Але деякі дані свідчать про існування фізіологічних і біохімічних механізмів, що здатні забезпечити підвищення працездатності і без збільшення МСК під час адаптації до виснажливої м'язової роботи [8, 9, 13, 14]. Низьке значення ЧСС здебільшого також асоціюється із більшим ударним об'ємом серця, вищим серцевим викидом і потужнішими аеробними можливостями. Однак, незважаючи на численні дослідження автономної регуляції, щільності рецепторів, внутрішніх змін у серці, тону судин тощо, немає єдиної думки щодо механізмів, які зумовлюють зниження ЧСС у спокої та під впливом тренування.

З іншого боку, ефект тренування на витривалість викликає зниження чутливості кардіореспіраторної системи до гіпоксії. Під час значної гіпоксії чутливість до неї у високотренованих індивідів у декілька разів менша, ніж у малотренованих і механізми цього ефекту не мають єдиного трактування [8, 9, 13, 15, 27]. Існують спостереження про випадки зниження сатурації ( $\text{SaO}_2$ , %) – насичення гемоглобіну крові киснем – із 98–96 % у спокої до 85 % під час фізичного навантаження [9, 13], причому така особливість характерна для добре тренованих на витривалість спортсменів, особливо стаєрів, і може бути індивідуальною рисою адаптації. Гіпоксемія у таких випадках не є наслідком недостатності газообміну у легенях, а, навпаки, виникає як прояв гіповентиляційного типу реагування. Загалом, в теорії і практиці спорту ціла низка «незрозумілих» фактів не знаходить пояснення навіть із позицій оптимізації функцій кардіореспіраторної системи, що обмежує подальший розвиток аеробного потенціалу та фізичної працездатності. Тому

метою нашої роботи було проаналізувати суб-максимальне велоергометричне навантаження за динамікою ЧСС та  $\text{SaO}_2$  та визначити нові діагностичні інформативні критерії для оцінки функціональних резервів організму, загального напруження адаптації і тренувального ефекту.

## МЕТОДИКА

У дослідженні брали участь 24 атлети високого рівня майстерності (кандидати в майстри спорту, майстри спорту та майстри спорту міжнародного класу) віком 20–24 роки та 22 волонтери, які практикують активний фізичний спосіб життя віком 20–26 роки. Оцінку функціональних резервів та фізичної працездатності проводили велоергометрично (велоергометр ВЕ-02, Київ, Україна) (ВЕМ-тест). Субмаксимальний рівень навантажень (швидкість педалювання – 50 об/хв, тривалість 300 с) встановлювали залежно від віку, статі і маси тіла [1]. Моніторинг ЧСС та  $\text{SaO}_2$  (% насичення гемоглобіну киснем) під час виконання ВЕМ-тесту та протягом наступних 300 с проводили кожні 10–15 с пульсоксиметрично (пульсоксиметр ЮТАС-ОКСИ-201, пальцевий датчик, НВО «ЮТАС», Київ, Україна). Фіксували час відновлення ( $t_{\text{відн}}$ , секунди) – період, протягом якого ЧСС поверталася до вихідних значень плюс 15 серцевих скорочень після завершення ВЕМ-тесту. Аналізували такі показники:  $\text{ЧСС}_{\text{max}1}$  – максимальне значення ЧСС під час ВЕМ-тесту;  $\text{ЧСС}_{\text{min}}$  – мінімальне значення ЧСС після досягнення  $\text{ЧСС}_{\text{max}1}$  і протягом періоду коливань;  $\text{ЧСС}_{\text{max}1} - \text{ЧСС}_{\text{min}}$  – різниця між  $\text{ЧСС}_{\text{max}1}$  та  $\text{ЧСС}_{\text{min}}$ ;  $\text{ЧСС}_{300}$  – значення ЧСС на момент завершення тесту (300-та секунда);  $\text{ЧСС}_{\text{max}1} - \text{ЧСС}_{300}$  – різниця  $\text{ЧСС}_{\text{max}1}$  та  $\text{ЧСС}_{300}$ ;  $\text{SaO}_{2\text{min}}$  – мінімальне значення  $\text{SaO}_2$  під час ВЕМ-тесту;  $\text{ЧСС}_{\text{max}2}$  – максимальне значення ЧСС під час періоду відновлення;  $\text{ЧСС}_{\text{max}2} - \text{ЧСС}_{300}$  – приріст ЧСС на момент завершення тесту; Кф.р. – коефіцієнт функціональної реактивності ( $\text{ЧСС}_{\text{max}2} / t_{\text{відн}}$ ). Статистичне опрацювання результатів



здійснювали за допомогою STATISTICA 6,0: оцінка нормальності розподілу – тест Шапіро-Уїлка; порівняння змінних із нормальним розподілом – t-тест для залежних і незалежних змінних. Робота узгоджена з Етичною комісією ЛНМУ, згоду отримано від усіх обстежуваних осіб перед початком дослідження.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що під час виконання ВЕМ-тесту із субмаксимальним навантаженням організм реагує підвищенням ЧСС, яке утримується або наростає протягом навантаження та знижується до нормальних значень у період відновлення (рис. 1). Зазвичай контроль ЧСС проводиться на певних етапах виконання навантаження, причому, моніторинг через короткотривалі інтервали (5–15 с) протягом усього тесту застосовується рідко. Час відновлення після тесту є різним і залежить від функціонально-метаболічного резерву, тренуваності тощо. Виконання субмаксимального навантаження дає можливість оцінити стан і реактивність серцево-судинної системи, функціональний резерв організму, проте не всі обстежувані можуть повністю виконати такий тест (відмова в процесі виконання). В

нашому дослідженні також частина обстежених із групи волонтерів (5 чоловік, 22,7 %) на 2–3-й хвилині виконання відмовилася від тесту; усі атлети та решта волонтерів виконали ВЕМ-тест з ЧСС у межах вікової норми.

У більшості обстежених як спортсменів, так і волонтерів, виявлено неочікувану реакцію. Під час 5-хвилинного навантаження спостерігали зниження ЧСС та  $\text{SaO}_2$  коливого характеру (рис. 2), причому частота та глибина цих коливань була індивідуальною. Таке зниження спостерігали переважно після 60–120 с від початку тесту, після досягнення максимального значення ЧСС (загальноприйнятий «вихід на плато (steady state)», рис. 1). У зв'язку з цим усі обстежені були поділені на групи: група 1 – волонтери, які виконали ВЕМ-тест з ефектом коливань (15 чоловік, 68,2 %); група 2 – атлети, які виконали ВЕМ-тест з ефектом коливань (19 чоловік 79,2 %); група 3 – атлети, які виконали ВЕМ-тест без ефекту коливань досліджуваних показників, або цей ефект виявлявся незначно (5 чоловік, 20,8 %; табл. 1). Результати 2 волонтерів (9,1 %), які виконали ВЕМ-тест без ефекту коливань, не аналізувалися.

Зіставлення змін ЧСС та  $\text{SaO}_2$  не дало змоги встановити певної закономірності, хоча частіше спостерігали синхронізований харак-

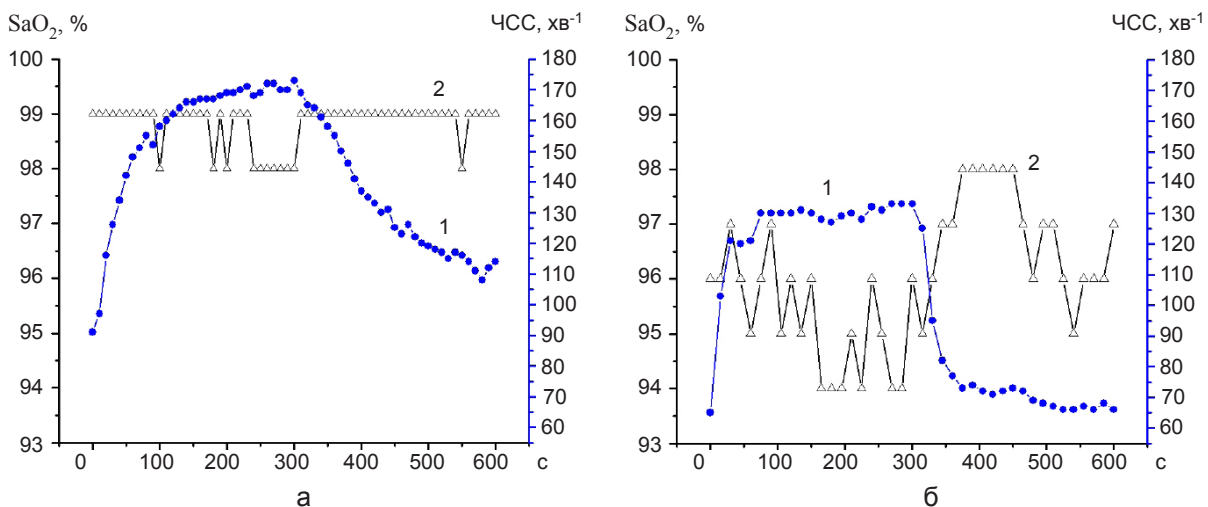


Рис 1. Приклад «класичної» динаміки частоти серцевих скорочень та насичення гемоглобіну киснем ( $\text{SaO}_2$ ) при виконанні велоергометричного (ВЕМ) тесту із субмаксимальним навантаженням: а – волонтер, б – атлет; 1 – ЧСС; 2 –  $\text{SaO}_2$

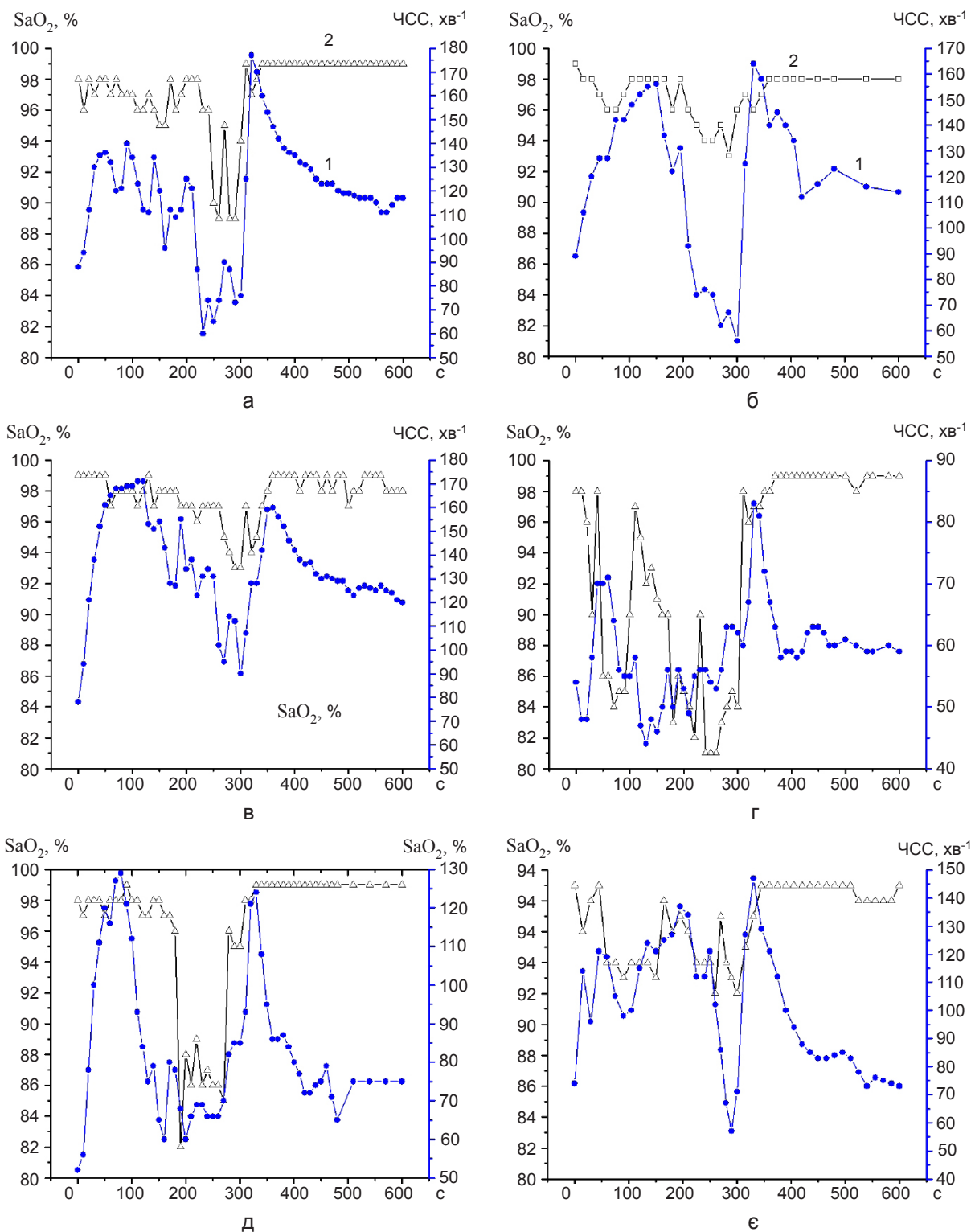


Рис. 2. Приклади коливань частоти серцевих скорочень (ЧСС) та насичення гемоглобіну киснем (SaO<sub>2</sub>) при виконанні велоергометричного (ВЕМ) тесту (субмаксимальне навантаження): а, б, в – волонтери (група 1); г, д, є – атлети (група 2); 1 – ЧСС; 2 – SaO<sub>2</sub>

тер коливань (див. рис. 2). Після завершення ВЕМ-тесту у осіб з ефектом зниження/коливання ЧСС та  $\text{SaO}_2$  (групи 1 та 2) спостерігали стрибкоподібне збільшення зазначених показників, навіть вище від таких, відмічених на момент завершення тесту (див. табл. 1, рис. 2). Таке збільшення нагадує фазу компенсації [8,9], котра асоціюється з ліквідацією кисневого боргу. Однак у осіб з ефектом коливань її природа, очевидно, є іншою, оскільки ЧСС на момент завершення тесту була значно нижчою від максимальних значень ( $\text{ЧСС}_{\text{max}1}$ ) фази плато. Ця фаза була менш вираженою у атлетів групи 2 (порівняно з групою 1), що може свідчити про ефективніше виконання роботи. Майже повна відсутність такої фази у атлетів групи 3 є позитивним моментом за-

галом, однак енергетична вартість виконаної ними роботи (особливо порівняно з атлетами групи 2) значно вища, і, відповідно, фізична працездатність нижча, судячи зі значень  $\text{ЧСС}_{\text{max}1}$ , які практично не змінювалися протягом проведення ВЕМ-тесту. Слід відмітити, що суб'єктивно в групах з ефектом коливань ВЕМ-тест супроводжувався відчуттям полегшення виконання навантаження – так званий ефект «другого дихання», спортсмени швидко відновлювали ЧСС після ВЕМ-тесту – від 2 до 4 хв. У волонтерів час відновлення становив переважно 6-8 хв (див. табл. 1).

Аналіз значень ЧСС дав змогу нам виокремити фазу суперкомпенсації ( $\text{ЧСС}_{\text{max}1} - \text{ЧСС}_{\text{min}}$ ), яка, на нашу думку, інформує про ефективність підтримання напруження кис-

**Досліджувані параметри при виконанні субмаксимального навантаження (велоергометрично) та під час відновлення ( $M \pm m$ )**

Показник	Волонтери з ефектом коливань ЧСС (група 1, n=15)	Атлети	
		з ефектом коливань ЧСС (група 2, n=19)	без ефекту коливань ЧСС (група 3, n=5)
Субмаксимальне навантаження (300 с)			
Максимальне значення частоти серцевих скорочень (ЧСС) під час навантаження ( $\text{ЧСС}_{\text{max}1}$ )	152,3 ± 4,35	136,3 ± 5,50**	150,6 ± 7,95
Мінімальне значення ЧСС після досягнення $\text{ЧСС}_{\text{max}1}$ і протягом періоду коливань ( $\text{ЧСС}_{\text{min}}$ )	78,7 ± 6,43	78,79 ± 5,29	130,8 ± 7,09*
$\text{ЧСС}_{\text{max}1} - \text{ЧСС}_{\text{min}}$	73,5 ± 5,44	57,6 ± 4,23**	19,8 ± 3,50*
Значення ЧСС на момент завершення тесту (300-та секунда) ( $\text{ЧСС}_{300}$ )	102,9 ± 8,30	111,3 ± 7,26	147,6 ± 6,72*
$\text{ЧСС}_{\text{max}1} - \text{ЧСС}_{300}$	49,33 ± 7,49	25,11 ± 5,81	3,00 ± 2,28
Мінімальне значення сатурації під час навантаження ( $\text{SaO}_{2\text{min}}$ )	92,0 ± 1,00	90,0 ± 1,46	96,4 ± 0,93*
Період відновлення (600 с)			
Час відновлення, с ( $t_{\text{відн}}$ )	369,7 ± 19,65	184,7 ± 24,67**	177,0 ± 48,00
Максимальне значення ЧСС під час періоду відновлення ( $\text{ЧСС}_{\text{max}2}$ )	163,5 ± 1,71	134,1 ± 5,92**	143,8 ± 8,48
$\text{ЧСС}_{\text{max}2} - \text{ЧСС}_{300}$	60,6 ± 8,51	22,8 ± 3,25**	3,8 ± 4,02*
Коефіцієнт функціональної реактивності, $K_{\text{фр}}$	0,465 ± 0,031	0,913 ± 0,081**	1,044 ± 0,228

\* Достовірність між групами 2 і 3; \*\* достовірність між групами 1 і 2 ( $P < 0,05$ ).

ню ( $pO_2$ ) під час фізичного навантаження за рахунок, в тому числі, кисню метаболічного (ендогенного) генезу (детальніше механізми цього процесу розглянемо нижче). Середнє значення амплітуди  $ЧСС_{max} - ЧСС_{min}$  було вищою у групі волонтерів.

Важливими, на нашу думку, можуть бути значення фази прихованої декомпенсації ( $ЧСС_{max} - ЧСС_{300}$ ), яка відображає потенційний резерв і можливості інтенсифікації зовнішнього дихання і кровообігу для збереження гомеостазу під час навантаження. Вищі значення цього резерву у волонтерів порівняно з атлетами інформують, вважаємо, про «ціну адаптації» організму спортсменів. Числові значення такої амплітуди можуть бути критерієм ефективності активації механізмів генерації ендogenous кисню і миттевої узгодженої реакції кардіореспіраторної системи.

Аналіз динаміки  $SaO_2$  під час ВЕМ-тесту дав змогу виявити наступні важливі аспекти. Достовірна різниця зниження  $SaO_2$  у атлетів (група 2) і волонтерів (група 1) порівняно з групою 3 може відображати ступінь залучення гемоглобіну (Hb) до вільнорадикальних (ВР) реакцій у гіпоксичних умовах (або впливах, які призводять до клітинної/тканинної гіпоксії, в т.ч. інтенсивна фізична робота) та свідчити про перерозподіл лігандних форм Hb на користь тих (HbCO, HbS, метHb, HbNO), які беруть участь у ВР реакція [5–7, 17, 19, 22, 26]. Активація лабільних трансформцій Hb і збільшення реактивності регуляторних механізмів переключення функції гемопротейнів крові від транспортної до участі у ВР реакціях можуть ефективно модулювати інтенсивність локальних окисних процесів, а також аферентну імпульсацію від хеморецепторів залежно від поточних функціональних потреб. Той факт, що гемопротейни є важливими учасниками Red/Ox реакцій всіх субклітинних структур, особливо мітохондрій, можна припустити, що модуляція ВР реакцій через гемопротейни крові може бути вагомим механізмом спряження активних аеробних перетворень

і підтримання про- та антиоксидантної рівноваги організму на всіх рівнях функціональної ієрархії. З іншого боку, скоротлива функція м'язів супроводжується активацією Red/Ox реакцій [16, 21], тому спроможність організму утилізувати підвищену кількість продуктів окисної деструкції без зриву комплексної системи антиоксидантного захисту (АОЗ) буде відображати вищий функціонально-метаболічний резерв та ефективнішу реакцію-відповідь на навантаження. Вагомим механізмом, який уможливорює формування такого функціонального стану організму, є флуктуації молекулярного кисню під час активації Red/Ox реакцій, наслідком чого є підвищення здатності підтримувати гомеостатичні константи (насамперед,  $pO_2$ ), та модулювати спорідненість гемопротейнів до кисню в умовах високого кисневого запиту [6, 12, 13]. Саме ґрунтуючись на цих підходах, ми вважаємо зміни  $SaO_2$  важливим критерієм адекватної оцінки потужності та реактивності функціонально-метаболічного резерву під час впливів.

Ще однією важливою ознакою потужнішого функціонально-метаболічного резерву є підвищення стійкості мембранних структур до окисного пошкодження, яка формується за умови ефективного контролю за зростаючим потоком вільних радикалів комплексною системою АОЗ. Це особливо важливо для ендотеліоцитів, міоцитів, фібробластів, клітин крові, оскільки тільки окисно непошкоджені клітини є джерелом утворення багатьох біологічно активних речовин, які регулюють адекватні скоротливу функцію, тонус судин і забезпечують їх тромборезистентні властивості [10, 11, 24]. У цьому контексті надзвичайно ваговою є здатність метаболічної системи модулювати продукцію NO, яка має, окрім цГМФ-залежного, прямий вплив на чутливість скоротливих білків міоцитів до  $Ca^{2+}$ , регулює спорідненість дихальних гемопротейнів до  $O_2$  та споживання його тканинами (в т.ч. міокардом) [10, 18]. Отже, інтенсивніші флуктуації супероксиду, пероксиду водню, оксиду азоту тощо під

час активації ВРР і не менш інтенсивніша їх утилізація формують надійну метаболічну основу для тонкої модуляції механізмів судинного тонуусу та вагосимпатичних кардіогенних рефлексів як локально, так і на рівні організму.

Зазначимо, що виявлений нами ефект спостерігали переважно у атлетів і волонтерів із високою варіабельністю серцевого ритму (ВСР), загальна потужність спектра перевищувала  $4000 \text{ мс}^2$ , що описано нами раніше [4, 6, 26]. Причому у внутрішній структурі спектра відсоток високочастотних коливань, які відображають активність парасимпатичної регуляції, перевищував 40 % у фоновій пробі, що забезпечувало ефективні показники ВСР під час ортостатичної реакції. Оскільки ВСР відображає неспецифічну стійкість і функціонально-метаболічний резерв, сформовані певною інтенсивністю окисно-відновних процесів, то вища ВСР свідчить про інтенсивніші аеробні процеси, які детермінують активність автономної нервової системи (АНС) з переважанням тонуусу парасимпатичного відділу в організмі таких осіб. І, навпаки, знижений функціонально-метаболічний резерв асоціюється із низькою інтенсивністю окисно-відновних процесів, проявами окисного стресу, напруженням регуляторних механізмів, що супроводжується зниженою ВСР [4, 6, 23, 26].

Усі впливи на регуляцію серцевого ритму зводяться до зміни тривалості спонтанної діастолічної деполяризації пейсмекерних міоцитів синусового вузла та, значно меншою мірою, впливу на швидкість проведення збудження по провідній системі серця [11, 20]. Серед внутрішньосерцевих впливів, що регулюють ЧСС, у контексті аналізу наших результатів важливим є аспект, пов'язаний із гетерогенною структурою синусового вузла і зміщенням в ньому ключового пейсмекерного місця – групи клітин, які на даний момент задають ритм. Окрім того, на міграцію ритму в межах синусового вузла впливає велика кількість регуляторних пептидів, які виділяються кардіоміоцитами, ендотеліоцитами

і нейронами кардіальної метасимпатичної нервової системи на клітини, що генерують серцевий ритм [11, 20]. Вважаємо, що зміна співвідношень цих регуляторних субстанцій в результаті модуляції їх синтезу, залежного від інтенсивності ВР реакцій, а, тому, продукції супероксиду, пероксиду водню, оксиду азоту, може реактивно зміщувати ведуче пейсмекерне місце. Таким чином, зміни ЧСС є інтегральним результатом модуляції функції синусового вузла чутливими і руховими нейронами АНС та нейропептидами, які продукуються у серці локально і впливають прямо і/або опосередковано разом із класичними нейротрансмітерами. Окрім зміни ЧСС, вони можуть регулювати також і скоротливість, мікроциркуляцію, коронарний кровообіг, пре-і постнавантаження на серце. Таким чином, за умов високого адаптаційного потенціалу, АНС реалізує точне налаштування діяльності міокарда до потреб клітинного метаболізму, що проявляється підвищенням ВСР.

Слід відмітити, що появи ефекту коливань ЧСС та  $\text{SaO}_2$  можна досягти, цілеспрямовано формуючи підвищення адаптації (реакцію активації) через стимуляцію аеробного метаболізму при використанні слабких активуючих впливів. Так, наприклад, тривалий, 4-місячний тренінг індивідуально-дозованою інтервальною гіпоксією (ІГТ) особи з вихідною низькою варіабельністю (загальна потужність спектра менша ніж  $1500 \text{ мс}^2$ ), уже через 2 міс забезпечив зниження ЧСС під час ВЕМ-тесту (від 180 до  $134\text{--}140 \text{ хв}^{-1}$ ). Ще через 1,5 міс тренування виконання ВЕМ-тесту відбувалося з ефектом коливань ЧСС і  $\text{SaO}_2$ , причому зниження першого було більш значущим (рис. 3), що супроводжувалося підвищенням ВСР (загальна потужність спектра понад  $3000 \text{ мс}^2$ ). Сеанси ІГТ проводили в нормобаричних умовах у закритій системі дихання (Зл) з поверненням повітря; щоденно, 5 разів на тиждень, під пульсоксиметричним контролем. Сеанс ІГТ включав 2-5 гіпоксичних циклів, тривалість кожного визначалася часом, за який  $\text{SaO}_2$  знижувалася до 94%. Перерва між циклами дорівнювала одній хвилині плюс



час, за який  $\text{SaO}_2$  поверталася до вихідних значень. Сеанс вважався завершеним, якщо різниця між тривалістю останнього циклу і попереднього була не меншою ніж 10 с [4, 23]. Оскільки функціонально-метаболический резерв цієї особи на початку тренування відображав стійку адаптацію на низькому рівні реактивності, то індукція перехідного періоду і формування нового адаптативного стану (рис. 3) слабкими дозованими впливами ІГТ (для недопущення переактивації аеробного метаболізму) потребувало тривалого періоду.

Аналіз результатів нашої роботи та даних літератури дав нам змогу по-новому підійти до пояснення механізмів, що забезпечують оптимізацію функцій кардіореспіраторної системи, та сформувати орієнтири на вироблення сучасної якісно нової тактики тренувального процесу без «ціни адаптації», чи, принаймні, її суттєвого зменшення.

Найважливішим аспектом, вважаємо, є розуміння ключової ролі високої інтенсивності окисно-відновних реакцій і підтримання  $\text{pO}_2$  за рахунок кисню, що генерується під час ВР реакцій – так званого ендогенного [5, 6, 12, 13, 23]. Це дає можливість оптимізувати транспорт кисню та метаболічних субстанцій до інтенсивно працюючих органів, запобігти надмірному напруженню адаптаційних реакцій, покращити адаптогенний ефект. Тоді кількість кисню, необхідна для інтенсивної роботи м'язів, буде забезпечуватися не тільки транспортною функцією серцево-судинної системи, екстракцією його із капілярів і дифузією до клітин, але й часткою  $\text{O}_2$  метаболічного (ендогенного) генезу. Звідси, у механізмах підтримання кисневого гомеостазу слід враховувати три складові забезпечення  $\text{pO}_2$ : кисень, доставлений системою кровообігу, утилізований функціонуючими структурами,

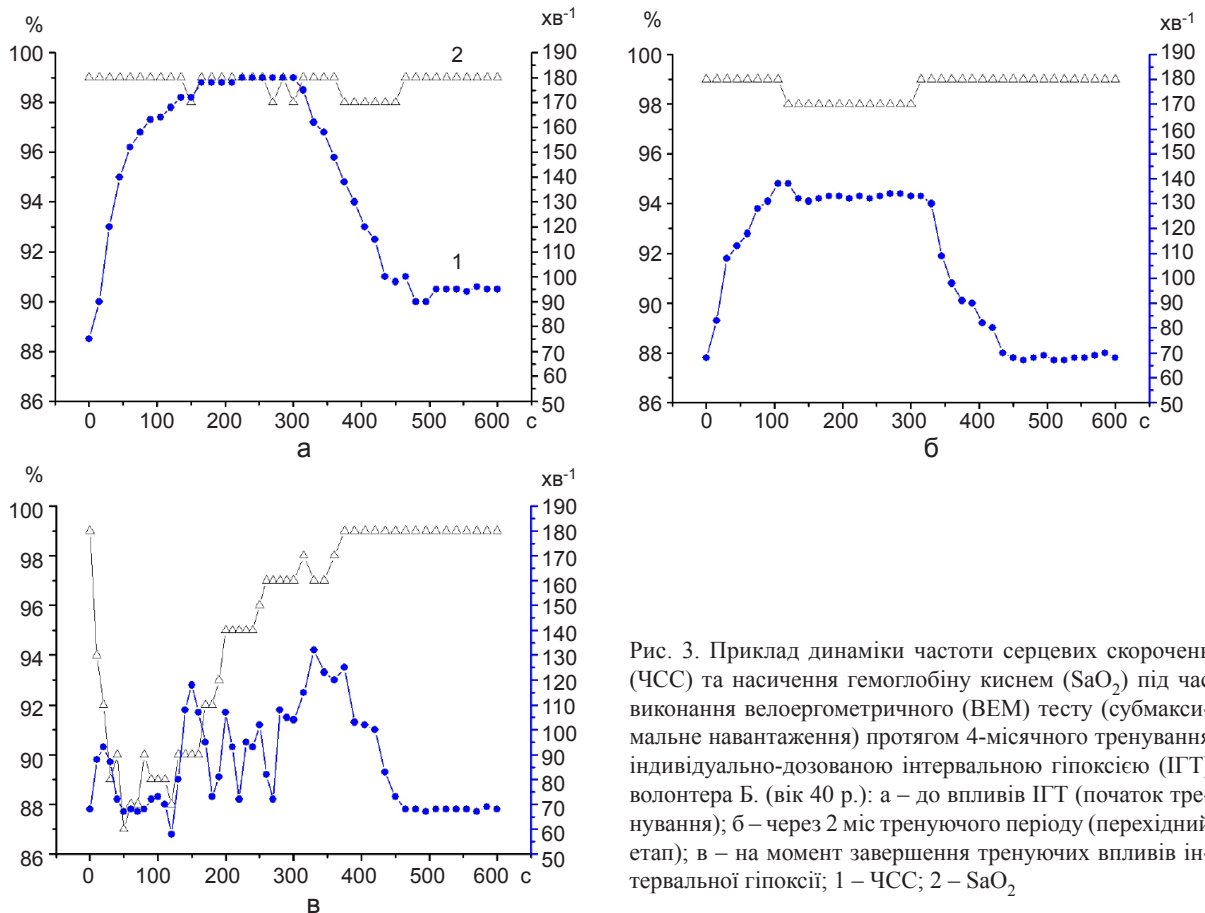


Рис. 3. Приклад динаміки частоти серцевих скорочень (ЧСС) та насичення гемоглобіну киснем ( $\text{SaO}_2$ ) під час виконання велоергометричного (ВЕМ) тесту (субмаксимальне навантаження) протягом 4-місячного тренування індивідуально-дозованою інтервальною гіпоксією (ІГТ) волонтера Б. (вік 40 р.): а – до впливів ІГТ (початок тренування); б – через 2 міс тренуючого періоду (перехідний етап); в – на момент завершення тренуючих впливів інтервальної гіпоксії; 1 – ЧСС; 2 –  $\text{SaO}_2$

а також генерований ними за умови інтенсивних, ефективно спряжених, узгоджених, а тому, потужних окисно-відновних процесів. Активація аеробного обміну, яка супроводжується флуктуаціями молекулярного кисню, формує надійну основу для оптимальнішої роботи серця навіть в умовах максимальних навантажень. Це дає можливість організму виконувати більшу роботу при нижчій ЧСС, віддаляє період настання кисневого боргу та МСК і тим самим суттєво знімає лімітування фізичної працездатності спроможністю фізіологічних систем доставки кисню. Також, в умовах активного аеробного метаболізму утилізація недоокислених проміжних продуктів істотно покращується, що пролонгує настання біохімічної втоми м'язів [1, 9, 21, 27]. На рівні організму такий метаболічний стан забезпечує тривале підтримання адаптаційної реакції активації з високим рівнем реактивності функціонуючих систем [2, 3, 12, 15, 25]. Прояви такої реакції активації, вважаємо, були виявлені нами (див. таблицю, рис. 2, 3) під час виконання субмаксимального ВЕМ-тесту волонтерами та атлетами. Причому, коливний характер досліджуваних показників підтверджує виконання роботи у стані реакції активації або незначної переактивації (про що, ймовірно, свідчить значення амплітуди коливань) на вищих рівнях реактивності, яка є найефективнішою адаптаційною реакцією, здатною синхронізувати активну роботу функціонуючих систем на всіх ієрархічних рівнях без виникнення надмірного резонансу і дезадаптаційних зривів [2, 3, 12].

Звичайно, виявлені ефекти коливань ЧСС та  $\text{SaO}_2$  не завжди добре узгоджувались, амплітуда коливань мала різко відмінні значення, більше це стосувалося групи волонтерів (рис. 2), але ми акцентуємо увагу на реальності такого ефекту, по-перше, а, по-друге, саме характер коливань, можливо, може бути новим діагностичним критерієм оцінки функціонального стану організму. Біологічними передумовами цього є той факт, що коливні процеси характеризують активність, ступінь напруження певних регуляторних механізмів

[2, 3, 12, 14, 25]. Так, збільшення амплітуди коливань, не виключено, означає, що затрати енергії та інформації на управління функціональними системами збільшуються і це може сигналізувати про реакцію переактивації та можливість її зриву із переходом до стану стресу чи адаптаційної реакції нижчих рівнів реактивності.

Будь-яка сформована адаптаційна реакція характеризується стійким станом фізіологічних функцій, однак розрізняють справжній і несправжній стійкі стани під час роботи [1, 9, 21, 27], а наявність коливань, на нашу думку, є відображенням саме справжнього стійкого стану. Йому притаманна висока узгодженість скоротливої функції серця і АНС, а показники кардіореспіраторної системи не сягають своїх максимальних значень під час навантажень. Споживання  $\text{O}_2$ , як правило, нижче від максимального рівня, молочна кислота майже не накопичується в м'язах. Основою такого метаболічного стану є активація аеробного метаболізму з ефективним залученням механізмів генерування ендogenous кисню в його підтриманні. Про це свідчать давно виявлені факти підвищеної спорідненості дихальних гемопротейнів до  $\text{O}_2$  у високотренованих та високорезистентних до гіпоксії організмів [7, 9, 13, 19], що дає змогу їм ефективно підтримувати гомеостаз за умов дії різних екстремумів. На противагу, під час несправжнього стійкого стану кисневий запит вищий і споживання  $\text{O}_2$  або близьке до максимального, або навіть дорівнює йому, однак, потреба м'язів до кисню задовольняється не повністю, поступово утворюється кисневий борг. За цих умов легенева вентиляція, ЧСС і хвилинний об'єм кровообігу збільшуються і сягають максимально можливих значень. Дефіцит кисню спричинює посилення участі анаеробних процесів (зсув до анаеробної фази обміну), зсув рН крові у кислу сторону та критичне зниження  $\text{pO}_2$  (наростає клітинна гіпоксія). Тоді відносна стабільність фізіологічних функцій під час роботи зумовлена неможливістю їх подальшої активації, хоча насправді невідповідність

цих функцій і потреб організму для забезпечення роботи відповідної потужності уже є. Окрім того, зниження рН і  $pO_2$  зумовлює пригнічення активності багатьох ферментів, в т.ч. фосфорилази і фосфофруктокінази гліколізу, окисно-відновних дихального ланцюга мітохондрій, АОЗ та антигіпоксичного захисту [12, 17, 18, 25]. Оскільки виснажлива м'язова робота стимулює підвищений потік активних кисневих метаболітів, уже незабаром недостатня функція АОЗ стає причиною виникнення значного дисбалансу у системі про- та антиоксиданти. Це далеко не повний перелік відхилень біохімічних і фізіологічних параметрів гомеостазу, тривала відсутність компенсації яких неминуче призводить до розвитку стресової реакції, в т.ч. найважчої її форми – на низьких рівнях реактивності, сформованої і підтримуваної низькою інтенсивністю окисно-відновних процесів із глибокими і важко компенсованими проявами метаболічного окисного стресу (синдрому). Безумовно, персистенція навіть незначних ознак такого стану є причиною високої «ціни адаптації» у спортсменів, зниження імунітету, неможливості покращувати свої спортивні результати. Однак, вважаємо, активація окисно-відновних процесів та своєчасна корекція відхилень основних гомеостатичних констант ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ , рН) із врахуванням особливостей механізмів генерації ендogenous  $O_2$  може запобігти формуванню несправжнього стійкого стану, або значно зменшити його наслідки в умовах фізичних і/чи психоемоційних навантажень. У свою чергу, така постійна корекція може сприяти формуванню адаптації як справжнього стійкого стану, що характерно для частини «елітних» атлетів, які виконують більшу роботу при менших МСК, ЧСС, легеневої вентиляції, ніж можна було очікувати. Варто зазначити, що узгоджений характер варіабельності багатьох показників, за сучасними даними, є необхідним для вищої стійкості і відображається на рівні організму оптимізацією кардіореспіраторної функції [2, 3, 5, 6, 12, 25, 26]. З цього погляду, реальна нестационарна робота серця (відобража-

ється високою ВСР) є доцільною, оскільки визначає постійну зміну фази коливань і, тим самим, автоматично виключає постійне частотне резонування системи, як стану перенапруження [2, 3, 14]. Впорядкованість і гармонійність коливної системи підтримується, в основному, синхронізованими процесами, що сприяє стійкості біосистеми, оптимізує процеси переносу речовин, енергії, інформації і вважається одним із найважливіших факторів самоорганізації складних систем. Однак живі системи відносяться до відносно синхронізованих, тобто їм притаманні і нерегулярні, неритмічні процеси. Саме тому характер змін і взаємовідношень у коливній системі визначає тип адаптаційної реакції та рівень реактивності чи стан арреактивності [2, 3]. У здоровому організмі підтримується відносна узгодженість різних коливних процесів – складових гомеостазу, в той час як при патологічних станах спостерігається той чи інший ступінь десинхронозу. Відхилення в інший бік – надмірна синхронізація, або гіперсинхронізація – також не є бажаною і вимагає корекції. Тому ступінь відповідності між електро-фізіологічними і біохімічними показниками (збалансування зв'язків між підсистемами) може розглядатися як інформаційний і відігравати роль нових діагностичних ознак функціонального стану організму.

## ВИСНОВКИ

1. Виявлено ефект зниження ЧСС та  $SaO_2$  коливного характеру при виконанні велоергометричного тесту з субмаксимальним навантаженням у атлетів та волонтерів, що може бути пов'язане з активацією аеробного метаболізму, механізмів генерації ендogenous кисню, підтриманням  $pO_2$  та оптимізацією функції кардіо-респіраторної системи під час навантаження у індивідів з підвищеним функціонально-метаболічним резервом і високою активністю автономної нервової системи.

2. Амплітуда коливань досліджуваних показників мала дещо відмінний характер для волонтерів і спортсменів, часто була

вищою у групі волонтерів (для ЧСС), чи у групі атлетів (для  $\text{SaO}_2$ ) і, очевидно, свідчила про реакцію активації у атлетів чи реакцію переактивації у волонтерів, судячи за часом відновлення ЧСС після ВЕМ-тесту. Різні числові характеристики коливань, які, ймовірно, говорять про певну фазу адаптації і/чи рівень її реактивності, можуть, надалі, бути новими діагностичними критеріями оцінки функціонального стану організму.

3. Важливо, що вищий адаптативний стан, з реалізацією коливного ефекту ЧСС та  $\text{SaO}_2$  під час виконання субмаксимального ВЕМ-тесту, можна цілеспрямовано формувати, навіть у осіб з невисоким функціональним резервом, використовуючи індивідуальний підхід. Найбільшою проблемою для такої стратегії нині є недостатність або неадекватність інформації про перехідні періоди чи/або новий рівень адаптації за типом зворотного зв'язку. Тому нові інтегральні параметри оцінки реакції-відповіді організму та підходи до їх інтерпретації можуть сприяти формуванню вищого адаптативного потенціалу.

**О.П. Елисеєва, Д.В. Каминский, Х.О. Семен,  
О.Г. Мысаковец, И.В. Челпанова, А.К. Куркевич**

### **ИЗМЕНЕНИЯ ЧАСТОТЫ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ ПРИ ИСПОЛНЕНИИ СУБМАКСИМАЛЬНОЙ НАГРУЗКИ**

В работе продемонстрирован эффект снижения частоты сердечных сокращений (ЧСС) и сатурации крови ( $\text{SaO}_2$ , насыщение гемоглобина кислородом) колебательного характера, обнаруженный во время выполнения субмаксимальной велоэргометрической нагрузки (ВЭМ-тест) атлетами высокой квалификации и волонтерами, которые практикуют активный физический уровень жизни. Анализируются исследуемые параметры (ЧСС,  $\text{SaO}_2$ , амплитуда колебаний, время восстановления после ВЭМ-теста) с позиций современных представлений о механизмах поддержания  $\text{pO}_2$  при активации аэробного метаболизма высокорезистентных организмов в экстремальных условиях. Утверждается, что оптимизация кардиореспираторной системы реализуется при условии синхронизации лабильных колебаний параметров этой системы на различных уровнях функциональной иерархии, которые поддерживаются более высокой интенсивностью Red/Ox реакций, улучшенной утилизацией недоокисленных продуктов обмена, интенсивными флуктуациями

эндогенного кислорода, тонкой регламентацией участия гемопротеинив в свободнорадикальных реакциях, что обеспечивает длительное существование адаптационной реакции активации на высоких уровнях реактивности. Дальнейшие исследования числовых характеристик обнаруженных колебаний могут способствовать применению их в качестве новых функционально-диагностических критериев оценки механизмов реактивности и резерва адаптации в спортивной и профилактической медицине. Ключевые слова: субмаксимальная нагрузка, велоэргометрия, частота сердечных сокращений, насыщение гемоглобина кислородом, атлеты, волонтеры, функциональный резерв, новые диагностические критерии.

**O.P. Yelisyeyeva, D.V. Kaminsky, K.O. Semen,  
O.H. Mysakovets, I.V. Chelpanova,  
A.K. Kurkevych**

### **TO THE QUESTION OF THE HEART RATE FLUCTUATIONS DURING SUBMAXIMAL WORKLOAD**

The effect of oscillatory decrease in the heart rate and hemoglobin oxygen saturation ( $\text{SaO}_2$ ) during the submaximal workload (bicycle ergometry test) was demonstrated in high-performance athletes and volunteers practicing healthy life style. The obtained parameters (heart rate,  $\text{SaO}_2$ , amplitude of oscillation, and recovery time) were analyzed taking into account modern notions about the mechanisms of  $\text{pO}_2$  maintenance during activation of aerobic metabolism in high-resistance organisms under extreme conditions. It is concluded that optimal functioning of cardio-respiratory system can be achieved only when its labile oscillatory parameters are synchronized at the various levels of functional hierarchy, which are maintained by the higher intensity of redox reactions, improved utilization of oxidative destruction products, more intensive fluctuations of endogenous oxygen, and fine regulation of hemoproteins' role in the free radical reactions. This, in turn, promotes long-term adaptive activation reaction at the higher levels of reactivity. Further studies of the described oscillations could facilitate their use as the new functional diagnostic criteria for the estimation of reactivity and adaptive reserve mechanisms in sports and preventive medicine. Key words: submaximal workload, bicycle ergometry, heart rate, hemoglobin oxygen saturation, athletes, volunteers, functional reserve, new diagnostic criteria.

*Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv,  
Ukraine;*

*Ukrainian Children's Cardiac Center, Kyiv, Ukraine*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Аулик И.В. Определение физической работоспособности в клинике и спорте. – М.: Медицина, 1990. – 191 с.
2. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Е.С., Шихлярова



- Ф.И. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Реакция активации как путь к здоровью через процессы самоорганизации. Часть 1. – Екатеринбург: Филантроп, 2002. – 196 с.
3. Дмитриева Н.В., Глазачев О.С. Электрофизиологические и информационные аспекты развития стресса // Физиология человека. – 2005. – **36**, №4. – С. 57–74.
  4. Єлісеєва О.П., Семен Х.О., Черкас А.П., Камінський Д.В., Куркевич А.К. Особливості механізмів індивідуально дозованого інтервального гіпоксично-гіперкапічного впливу на варіабельність ритму серця у спортсменів // Фізіол. журн. – 2007. – **53**, №4. – С. 77–85.
  5. Єлісеєва О.П., Семен Х.О., Камінський Д.В., Мисаковець О.Г., Рибальченко В.К., Куркевич А.К., Луцик О.Д. Дослідження механізмів взаємозв'язків аеробного метаболізму і варіабельності серцевого ритму у пацієнтів з різних функціональних груп: коригуючий ефект олії амаранту. Частина 1 // Експер. та клін. фізіологія і біохімія. – 2011. – **2**. – С. 48–67; Частина 2. – 2011. – **2**. – С. 44–53.
  6. Єлісеєва О.П., Сергієнко О.О., Черкас А.П., Семен Х.О., Камінський Д.В., Куркевич А.К. Варіабельність серцевого ритму у хворих на цукровий діабет: спроба метаболічної інтерпретації // Пробл. ендокрин. патології. – 2005. – **1**. – С. 95–110.
  7. Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // Успехи физиол. наук. – 2003. – **34**, №2. – С. 33–45.
  8. Иванов А.О., Сапова Н.И., Александров М.В., Косенков Н.И. Использование нормобарической гипоксической тренировки для повышения физической работоспособности здоровых лиц // Физиология человека. – 2001. – **27**, №3. – С. 95–99.
  9. Мищенко В.С. Функциональные возможности спортсменов. – К.: Здоровье, 1990. – 200 с.
  10. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Коркушко О.В., Безруков В.В., Кульницький О.К., Стефанов О.В., Соловйов А.І., Мала Л.Т., Фролькіс В.В. Фундаментальні механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему як основи патогенетичного лікування її захворювань // Фізіол. журн. – 2004. – **50**, №1. – С. 11–30.
  11. Ноздрачев А.Д., Котельников С.А., Мажара Ю.П., Наумов К.М. Один из взглядов на управление сердечным ритмом: интракардиальная регуляция // Физиология человека. – 2005. – **31**, №2. – С. 116–129.
  12. Тимочко М.Ф., Єлісеєва О.П., Кобилінська І.Л., Тимочко І.Ф. Метаболічні аспекти формування кисневого гомеостазу в екстремальних станах. – Львів: Місіонер, 1998. – 142 с.
  13. Тимочко М.Ф., Куркевич А.К., Тимочко І.Ф. Принципи оцінки параметрів кисневого гомеостазу при гіпоксичних впливах та фізичному навантаженні у людей з різною резистентністю // Львів. мед. часопис (Acta Medica Leopoliensia). – 1999. – **5**, №4. – С. 5–11.
  14. Bosquet L., Gamelin F.-X., Berthoin S. Is aerobic endurance a determinant of cardiac autonomic regulation? // Eur. J. Appl. Physiol. – 2007. – **100**. – P. 363–369.
  15. Del Rio R., Moya E.A., Iturriaga R. Carotid body and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia: the oxidative link // Eur. Respir. J. – 2010. – **36**. – P. 143–150.
  16. Jackson M.J. Redox regulation of adaptive responses in skeletal muscle to contractile activity // Free Rad. Biol. Med. – 2009. – **47**. – P. 1267–1275.
  17. Kim Y.M., Pae H.O., Park J.E., Lee Y.C., Woo J.M., Kim N.H., Choi Y.K., Lee B.S., Kim S.R., Chung H.T. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities // Antioxid. Redox Signal. – 2011. – **14**, №1. – P. 137–167.
  18. Kuster G.M., Hauselmann S.P., Rosc-Schluter B.I., Lorenz V., Pfister O. Reactive oxygen/nitrogen species and the myocardial cell homeostasis: an ambiguous relationship // Antioxid. Redox Signal. – 2010. – **13**. – P. 1899–1910.
  19. Lahiri S., Roya A., Babya S.M., Hoshia T., Semenza G.L., Prabhakar N.R. Oxygen sensing in the body // Progr. Biophys. Mol. Biol. – 2006. – **91**. – P. 249–286.
  20. Mangoni M.E., Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity // Physiol. Rev. – 2008. – **88**, №3. – P. 919–982.
  21. Radak Z., Chung H.Y., Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise // Free Rad. Biol. Med. – 2008. – **44**, №2. – P. 153–159.
  22. Ryter S.W., Tyrrell R.M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme Oxygenase has Both Pro- and Antioxidant Properties // Ibid. – 2000. – **28**, №2. – P. 289–309.
  23. Semen K.O., Yelisyyeva O.P., Kaminsky D.V., Cherkas A.P., Zarkovic K., Lutsyk O.O., Cipak A., Jaganjac M., Zarkovic N. Interval hypoxic training in complex treatment of Helicobacter pylori-associated peptic ulcer disease // Acta Biochim. Pol. – 2010. – **57**, №2. – P. 199–208.
  24. Trayhurn P., Drevon C.A., Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle – adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk // Arch. Physiol. Biochem. – 2011. – **117**, №2. – P. 47–56.
  25. Voeikov V.L., Del Giudice E. Water Respiration - The Basis of the Living State // WATER. – 2009. – **1**. – P. 52–75.
  26. Yelisyyeva O., Cherkas A., Semen K., Kaminsky D., Lutsyk A. Study of Aerobic Metabolism Parameters and Heart Rate Variability and Their Correlations in Elite Athletes: a Modulatory Effect of Amaranth Oil // CEMED. – 2008. – **3**, №2. – P. 293–307.
  27. Zupet P., Princi T., FINDERLE Z. Effect of hypobaric hypoxia on heart rate variability during exercise: a pilot field study // Eur. J. Appl. Physiol. – 2009. – **107**. – P. 345–350.

Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького;  
 ДУ «НПМЦДКК МОЗ України», Київ  
 E-mail: yelisol@gmail.com

Матеріал надійшов до редакції 19.10.2011



А.І. Гоженко, О.М. Москаленко, В.М. Сірман, О.О. Жижнівська, С.А. Стороженко

## Функціональний стан нирок у пацієнтів з онкологічними захворюваннями після введення цисплатину

*У дослідженні функціонального стану нирок при хіміотерапії цисплатином у пацієнтів з онкологічними захворюваннями підтверджена нефротоксичність. Встановлено, що через 24 год після його введення у дозі 50 мг/м<sup>2</sup> поверхні тіла більш як удвічі збільшується діурез, а також екскреція креатиніну, натрію, калію, осмотично активних речовин і хлоридів, що свідчить про порушення осмо-, волюмо- та іонорегулювальних функцій нирок. Виявлені особливості є наслідком пошкодження нирок, що підтверджено зростанням еритро- та лейкоцитурії. Показано, що порушення гомеостатичних функцій нирок зумовлено пошкодженням ниркових канальців при одночасному підвищенні швидкості клубочкової фільтрації. Обґрунтована необхідність нефропротекції при проведенні хіміотерапії цисплатином протягом усього курсу лікування.*

*Ключові слова: цисплатин, нефротоксичність, ниркові функції, нефропротекція.*

### ВСТУП

Відомо, що цисплатин – досить ефективний протипухлинний хіміопрепарат, який успішно використовується в онкології вже понад тридцять років [6, 7]. Однак також відомо, що всі сполуки платини мають нефротоксичність внаслідок переважного пошкодження проксимальних звивистих канальців [2, 3, 5, 8, 9]. У зв'язку з цим була розроблена та використовується у клініці методика нефропротекції з введенням препарату на тлі інфузії 0,9%-го розчину хлориду натрію, яка попереджає розвиток ускладнень, і в першу чергу гострої ниркової недостатності [6, 7]. Разом з тим встановлено, що ушкоджувальна дія важких металів, до яких відноситься і платина, на канальцевий відділ нефрону на тлі застосування хлориду натрію частково зберігається [4, 5]. До того ж, напівперіод виведення платини з організму коливається в межах від 2 до 72 год у здорових людей і від 1 до 240 год у пацієнтів з вираженою нирковою недостатністю [6], що передбачає можливість надходження металу в нирку протягом до 10

діб. А до цього часу нефропротекторна дія хлориду натрію практично завершується, в основному вже у перші 12 год. Водночас відомостей про функціональний стан нирок через 24 год і пізніше після введення цисплатину немає, а нефропротекторні технології для цього періоду не розробляються, хоча раніше нами показано наявність віддалених патологічних наслідків з боку нирок при лікуванні цисплатином [5].

Мета нашої роботи – вивчити функціональний стан нирок через 24 год після введення цисплатину на тлі загальноприйнятої нефропротекції – інфузії 0,9%-го розчину хлориду натрію і осмотичного діуретика маніту.

### МЕТОДИКА

Функціональний стан нирок вивчено у 10 пацієнтів (5 чоловіків і 5 жінок), які проходили лікування в Одеському онкологічному диспансері в 2010–2011 рр. Вік чоловіків був від 54 до 60 років, жінок – від 64 до 52 років.

© А.І. Гоженко, О.М. Москаленко, В.М. Сірман, О.О. Жижнівська, С.А. Стороженко

Усі пацієнти проходили лікування цисплатином з приводу основного захворювання – раку легенів III–IV стадії. Нефропротекцію здійснювали пре- та постгідратацією з введенням осмотичного діуретика (маніт). Прегідратацію забезпечували внутрішньовенним крапельним введенням 800 мл 0,9%-го розчину NaCl, 400 мл розчину Рінгера, після чого вводили 200 мл 15%-го розчину маніту. Цисплатин, розведений у 200 мл 0,9%-го розчину NaCl у дозі 50 мг/м<sup>2</sup> поверхні тіла одноразово вводили внутрішньовенно крапельно. При постгідратації внутрішньовенно крапельно вводили 400 мл 5%-го розчину глюкози. За добу до і через 24 год після введення цисплатину вивчали функцію нирок в умовах сольового індукованого діурезу: протягом 1–2 хв в положенні сидячи пацієнт випивав 0,5%-й розчин NaCl у кількості 0,5 % від маси тіла у середньому 0,358 л ±0,023 л. При цьому кількість введених іонів натрію у середньому становила 30,3 ммоль ±2,20 ммоль, а кількість введених осмотично активних речовин (ОАР) – 60,63±4,40 моосмоль як до, так і після застосування цисплатину. Визначали об'єм сечі, що виділився за 1 год з розрахунком відсоткового відношення діурезу стосовно випитого розчину. У сечі визначали концентрацію креатиніну, білка, осмотично активних речовин (ОАР), натрію, калію, хлору, число еритроцитів і лейкоцитів,

у плазмі крові – концентрацію креатиніну з подальшим розрахунком швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) за формулою Реберга–Тареева.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У пацієнтів після введення цисплатину прийом 0,5%-го розчину NaCl різко збільшував діурез – виведення сечі перевищувало 3 мл/хв, тобто значення показників були в 3 рази більшими, ніж ті, що характерні для добового сечовиділення. Це зумовило виведення більше половини випитої рідини за годину (табл. 1).

У сечі практично не визначався білок, проте виявлялись еритроцити та лейкоцити. Через добу після введення цисплатину на тлі нефропротекції з внутрішньовенним введенням ізотонічного розчину NaCl виявлено особливості функціонального стану нирок щодо вихідних значень. Як свідчать результати, наведені у табл. 1, через 24 год нирки зберігають здатність ефективно регулювати водно-сольовий гомеостаз – діурез навіть збільшився за цей період удвічі – в результаті чого з організму виводилося води значно більше, ніж було випито. Причому сечовиділення було більшим, ніж у пацієнтів до введення препарату. Одночасно підвищувалась екскреція креатиніну, що свідчить про

Таблиця 1. Показники сечовиділення, фільтрації та реабсорбції через 24 год після введення цисплатину (M ± m, n = 10)

Показник	До введення препарату	Після введення препарату
Діурез, л/60 хв	0,219±0,022	0,450±0,023 *
Виділення води, %	63,75±5,27	128,70±11,21 *
Концентрація креатиніну у сечі, мкмоль/л	3127±287,25	2024,5±405,33
Креатинін у плазмі крові, мкмоль/л	88,66±5,31	77,55±4,99
Відношення концентрації креатиніну у сечі до його концентрації у плазмі	37,61±4,54	26,51±4,79
Екскреція креатиніну, ммоль/ хв	0.0117±0.0012	0,0174±0.0027 *
Швидкість клубочкової фільтрації за кліренсом креатиніну, мл/хв	151,85±23,19	245,62±41.12 *
Реабсорбція води, %	96,78±0,53	94,80±1,22

Примітка. Тут і в табл. 2 \*P<0,05.

посилену здатність екскретувати кінцеві продукти азотного обміну, тобто про активацію екскреторної функції нирок. Дійсно, концентрація креатиніну в плазмі крові як міра азотемії через добу після введення цисплатину, практично не змінилась, і навіть дещо зменшилася, становила порівняно з вихідними значеннями  $77,5$  мкмоль/л  $\pm 4,9$  мкмоль/л. Підвищення сечовиділення насамперед було зумовлено зниженням реабсорбції води, виходячи з достовірного зменшення концентрації креатиніну в сечі і відношення концентрації креатиніну до його концентрації у плазмі, і нарешті зниженням каналцевої реабсорбції води при збільшенні ШКФ за кліренсом ендогенного креатиніну. Крім того, цілу низку відмінностей було виявлено з боку осмо- та іонорегулювальних функцій нирок (табл. 2).

Так, хоча осмолярність сечі знижувалася, проте виведення ОАР достовірно і значимо збільшувалося майже вдвічі і після введення цисплатину становило  $300$  % від випитої їх кількості з розчином NaCl. Підвищена екскреція ОАР, безумовно, пов'язана зі збільшенням діурезу і, головне, зниженням їх реабсорбції. Одночасно з ОАР збільшувалася екскреція натрію та калію в абсолютних величинах, а виведення натрію за 1 год перевищило на  $20$  % кількість іонів натрію, що надійшли в організм. Однак виведення хлору практично не змінилося, що дало нам

підставу припустити збільшення екскреції інших аніонів, найімовірніше фосфатів. З іншого боку, значне збільшення екскреції ОАР порівняно з підвищенням загального виведення натрію та калію дає нам підстави стверджувати про те, що переважно збільшується екскреція неіонного компонента ОАР, швидше за все сечовини. Виявлені особливості осмо-, волюмо- та іонорегулювальної функції нирок можна розглядати або як наслідок змін у системах регуляції гомеостазу, або які виникають у нирках після введення цисплатину. Отримані результати дають змогу стверджувати, що значне збільшення виведення ОАР, натрію, калію і, мабуть, фосфатів, мабуть, зумовлено пошкодженням проксимального відділу нефронів, внаслідок чого збільшена кількість ультрафільтрату надходить у дистальні відділи нефрону. В ньому підвищується транспорт натрію в обмін на секрецію калію, проте реабсорбційна потужність цього відділу недостатня, до того ж тут не реабсорбуються фосфати, в результаті чого розвивається осмотичний діурез із втратою ОАР (у тому числі й електролітів) з сечею. Наявність пошкоджень нефронів доводять показники виведення еритроцитів і лейкоцитів (табл. 3).

Їх кількість у мілілітрі сечі і загалом збільшується в кілька разів, хоча їх співвідношення змінюється мало. Важливо, що

Таблиця 2. Показники осмо- та іонорегулювальні функції нирок після введення цисплатину ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Показник	До введення препарату	Після введення препарату
Концентрація $Na^+$ у сечі, ммоль/л	$115,35 \pm 14,50$	$96,02 \pm 13,62$
Екскреція $Na^+$ , ммоль/60 хв	$27,76 \pm 3,56$	$36,84 \pm 3,74$ *
Концентрація $K^+$ у сечі, ммоль/л	$33,89 \pm 5,13$	$22,44 \pm 1,91$ *
Екскреція $K^+$ , ммоль/60 хв	$6,44 \pm 0,60$	$10,05 \pm 1,08$ *
Виведення $Na^+$ , %	$90,17 \pm 6,96$	$122,19 \pm 21,11$
Кількість введених осмотично активних речовин (ОАР), моосмоль	$60,63 \pm 4,40$	$60,63 \pm 4,40$
Концентрація ОАР у сечі, моосмоль/л	$482,2 \pm 24,69$	$391,56 \pm 27,90$ *
Екскреція ОАР з сечею, моосмоль/60 хв	$97,32 \pm 8,13$	$178,4 \pm 11,98$ *
Виведення ОАР, %	$178,15 \pm 14,30$	$305,95 \pm 25,77$ *
Концентрація хлоридів у сечі, ммоль/л	$135,9 \pm 12,66$	$97,44 \pm 11,17$ *
Екскреція хлоридів, ммоль/60 хв	$29,45 \pm 2,59$	$42,96 \pm 3,37$ *

Таблиця 3. Показники еритроцитурії та лейкоцитурії після введення цисплатину (  $M \pm m$ ,  $n = 10$  )

Показник	До введення препарату	Після введення препарату
Кількість еритроцитів у сечі, мл	2328±384,79	7357±2480
Виділення еритроцитів/60 хв	139750±24068	1099211±264537 *
Кількість еритроцитів в 1 мл клубочкового фільтрату	54,7±11,44	258,71±66,16 *
Кількість лейкоцитів у сечі/1 мл	2378,6±353,6	7659,2±813,8 *
Екскреція лейкоцитів/60 хв	156032±19248	3556441±1010917 *
Кількість лейкоцитів в 1 мл клубочкового фільтрату	94,81±14,85	345,80±72,39 *
Співвідношення еритроцити/лейкоцити у сечі	0,788±0,12	1,014±0,211

\*  $P < 0,05$ .

еритроцитів і лейкоцитів виділяється більше і в перерахунку на 1 мл фільтрату, тобто їх виведення не пов'язане зі збільшенням клубочкової фільтрації. Те, що в наших дослідженнях не реєструвалася протеїнурія, зумовлено, на нашу думку, недостатньою чутливістю лабораторних методик і високим діурезом, тобто ефектом розведення. Слід зазначити, що ушкодження проксимальних каналців не супроводжується зменшенням клубочкової фільтрації за механізмом активації каналцево-клубочкового зворотного зв'язку тому, що введення натрію за схемою при нефропротекції і пиття розчину NaCl при проведенні досліджень через 24 год забезпечували позитивний його баланс в організмі. Внаслідок цього системні механізми регуляції об'єму рідини та натрію в організмі викликають зменшення активності ниркової ренін-ангіотензинової системи, що на рівні ниркових судин призводить до вазодилатації привідної артеріоли, яка зумовлює збільшення ниркового кровотоку та запобігає її звуженню у ниркових клубочках, що було показано раніше [2].

Отже, нефропротекція, що використовується в сучасних схемах введення цисплатину, дійсно попереджає розвиток азотемії та гострої ниркової недостатності. Більше того, позитивний баланс натрію є механізмом стимуляції синтезу внутрішньониркових простагландинів і оксиду азоту, що збільшує нирковий кровотік і ШКФ. В результаті ця схема нефропротекції запобігає зниженню клубочкової фільтрації. Проте протягом пер-

шої доби лікування значно пошкоджується каналцевий, швидше проксимальний відділ нефрону, і, як наслідок, з сечею втрачається натрій, калій і ОАР, які зумовлюють порушення іоно- і осморегулювальної функції нирок, які збільшуються через 24 год. Таким чином, слід урахувати, що при хіміотерапії цисплатином з повторним його призначенням, а також у віддаленому періоді після проведення лікування можливе пошкодження каналцевого відділу нефрону, яке передбачає необхідність розробки нефропротекторних засобів, що будуть захищати каналцевий епітелій нефрону від впливу цисплатину та попереджати зменшення клубочкової фільтрації. За механізмом впливу це мають бути препарати цитопротекторної дії, здатні захистити епітелій каналцевого відділу нефрону протягом усього періоду проведення хіміотерапії.

## ВИСНОВКИ

1. Через 24 год після введення цисплатину на тлі нефропротекторної терапії в умовах сольового діурезу зростають діурез, екскреція ОАР,  $Na^+$ ,  $K^+$ , еритроцитів і лейкоцитів при нормальних значеннях ШКФ, креатинінемії та зменшення каналцевої реабсорбції води.

2. Виявлені особливості іоно- і осморегулювальної функцій нирок свідчать про пошкодження ниркових каналців, переважно на рівні проксимального відділу.

3. Для профілактики нефротоксичності цисплатину у пацієнтів з онкологічними захворюваннями слід застосовувати нефропротекторні

препарати цитопротекторного механізму дії протягом усього періоду лікування.

**А.И. Гоженко, А.М. Москаленко, В.М. Сирман,  
А.А. Жижневская, С.А. Стороженко**

### **ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК У ПАЦИЕНТОВ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЦИСПЛАТИНА**

При исследовании функционального состояния почек во время химиотерапии цисплатином у пациентов с онкологическими заболеваниями подтверждена нефротоксичность препарата через 24 часа после его введения. Установлено, что через 24 ч после введения цисплатина в дозе 50 мг/м<sup>2</sup> поверхности тела более чем в два раза увеличивается диурез, экскреция креатинина, натрия, калия, осмотически активных веществ и хлоридов, что свидетельствует о нарушении осмо-, волюмо- и ионорегулирующих функций почек. Выявленные особенности являются следствием повреждения почек, что подтверждается возрастом эритро- и лейкоцитурии. Показано, что нарушения гомеостатических функций почек обусловлено повреждением почечных канальцев, что подтверждается наличием мочевого синдрома. Обоснована необходимость нефропротекции при проведении химиотерапии цисплатином на протяжении всего курса лечения.

Ключевые слова: цисплатин, нефротоксичность, почечная функция, нефропротекция.

**A.I. Gozhenko, A.M. Moskalenko, V.M. Sirman,  
A.A. Zhizhnevskaya, S.A. Storozhenko**

### **KIDNEY FUNCTION IN ONCOLOGIC PATIENTS AFTER CISPLASTIN CHEMOTHERAPY**

During examination of kidney function under cisplatin chemotherapy in oncologic patients the nephrotoxicity of the drug have been shown during 24 hours after administration. We found that in 24 hours after injection of cisplatin in the dose 50 mg/m<sup>2</sup> of the surface of the body, the excretion of creatinine, sodium, potassium, osmotic active compounds and chlorides is increased more than two times, indicating for disorder in

*ДП Укр.наук.-досл. ін-т медицини транспорту, Одеса;  
Координ. центр трансплантації органів, тканин і  
клітин МОЗ України, Київ;  
Одеськ. обл. онкол. диспансер  
E-mail: medtrans2@rambler.ru: dasboot001@gmail.com*

osmolality, volume and ionic regulation of kidney function. The determined peculiarities are consequences of kidney injuries, which are confirmed by an increase in erythrocyte- and leucocyteuria. We showed that alterations in homeostatic kidney function is due to damage of renal tubules. Our study necessitates a need for renal protection during the whole period of cisplatin chemotherapy.

Key words: cisplatin, nephrotoxicity, kidney function, renal protection.

*DP Ukrainian scientific Institute of Medicine of Transport,  
Odesa*

*The Center of transplantation of organs, tissues and cells,  
Ministry of Public Health of Ukraine, Kyiv.  
Odesa Region Oncological Center.*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Возіанов О.Ф., Гоженко А.І., Федорук О.С. Гостра ниркова недостатність. – Одеса: Вид-во Одеськ. мед. ун-ту, 2003. – 280 с.
2. Гершанович М.Л. Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей. – М.: Медицина, 1982. – 153 с.
3. Гоженко А.И. Энергетическое обеспечение основных почечных функций и процессов в норме и при повреждении почек: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Черновцы, 1987. – 30 с.
4. Гоженко А.И., Москаленко А.М., Стебловский В.В., Жуков В.А. О нефротоксичности цисплатина у онкобольных // Актуал. пробл. транспорт. медицины. – 2010. – 19, № 1. – С. 81–86.
5. Гоженко А.І., Пішак В.П., Роговий Ю.Є. Тубуло-інтерстиціальний синдром. – Чернівці: Медакадемія, 2002. – 221 с.
6. Компендіум 2010 – лікарські препарати. Ред. В.М. Коваленка, О.П. Вікторова. – К.: Моріон, 2010. – 229 с.
7. Переводчикова Н.И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. – М.: Практ. медицина, 2005. – С. 155, 601–603.
8. Cynthia A. Naughton. Drug-Induced Nephrotoxicity // Amer. Fam. Physician. – 2008. – 78(6). – P. 743–750.
9. Morgan K.P., Buie L.V., Savage S.W. The role of mannitol as a nephroprotectant in patients receiving cisplatin therapy // Ann Pharmacother. – 2012, 46(2). – P. 276–281.
10. Perazella MA. Drug-induced nephropathy: an update // Exp. Opin Drug Saf. – 2005. – 4(4). – P. 689–706.

*Матеріал надійшов  
до редакції 06.09.2011*



K.V. Yatsenko, V.A. Berezovskii, J.V. Deyeva

## Effects of intermittent normobaric hypoxia on the state of the CNS and cerebral circulation in children with cerebral palsy

*We studied the effects of intermittent normobaric hypoxia (INH) on the processes of CNS functions and cerebral circulation recovery in children with cerebral palsy (CP). Altogether, 87 patients (from 8.5 months to 12 years) with CP were examined and received the course of treatment. Clinico-neurophysiological examination was performed before the treatment and immediately after termination of the therapeutic course. Patients were divided into two groups; age and sex distributions and clinical manifestations of CP were randomized. The comparison group was formed from 34 children who received the course of the generally accepted complex therapy (medicamental treatment, massage, Bobat-therapy, Vojta-therapy at al).. The main group included 53 patients who, in addition to the same therapy, were exposed to INH using an individual apparatus for artificial mountain air, Borey-M, made in the Scientific Medico-Engineering Center NORT (Ukrainian National Academy of Sciences, Kyiv). Children of the main group were exposed to the dosed normobaric sanogenetic level hypoxia intermittently once per day. For this purpose, we used a normobaric gas hypoxic mixture (12% O<sub>2</sub> + 88% N<sub>2</sub>). Each cycle included a 15-min-long episode of breathing with the gas mixture alternated by a 5-min-long episode of breathing an ambient atmospheric air. The number of hypoxic cycles was gradually increased (from one to three). The entire course of treatment included, on average, 10 sessions. After complex therapy the stable positive effects on the motor status were observed in 94% of patients of the main group (exposed to INH) and in 74% of patients of the comparison group (unexposed to INH). EEG examination showed that positive dynamics of spectral EEG components were in 70% of patients of the main group and in 56% of children of the comparison group. Doppler examination showed that brain hemodynamics was normalized in 85% of patients of the main group and in 59% of children of the comparison group. In the course of ophthalmoscopic examination, we found that the dynamics of indices of the state of the eye fundus were expressed more clearly in children of the main group than in patients of the comparison group (in 32 and 12% of patients, respectively).*

*Key words: cerebral palsy, intermittent normobaric hypoxia, adaptation.*

### INTRODUCTION

There are some outstanding questions in the functioning of the CNS of animals and humans that remain to be answered. The question of the recovery of CNS functions impaired by congenital abnormalities remains open and deserves special attention. In the course of embryogenesis, there are periods when the embryo is highly sensitive to different factors that can disturb the genetic program of development; there are also critical periods for different organs. The brain and skeleton are sensitive to injurious influences

permanently, beginning from the 3rd week of impregnation to the end of pregnancy. In the current state of nosology, syndromes resulting from the abnormal development of the brain or its damage within the pre-, intra-, and early postnatal periods are grouped and defined as CP. The incidence and prevalence rates from CP in children vary from 1.5 to 2.6 per 1.000 population. Diseases of the CNS (in particular CP) are main reasons for childhood disability [18-19]. As the published data indicate, the effects of pathogenic factors on the formation of the nervous system of a child within the pre-,

intra-, and postnatal periods play a crucial role in the development of CP. Specific pathological changes in the motor sphere (disorders of elementary movements via spasticity, rigidity, dystonia, or hypotonia of separate muscles or muscles functionally combined in muscular synergism) are leading manifestations of CP [8].

The existing methods for the recovery of physiological functions impaired by CP are aimed at pharmacological and reflectory stimulation of physiological regeneration of the CNS cells capable of differentiating. It was demonstrated that neurogenic stem units exist in certain regions of the brain and spinal cord and can migrate and develop; these fully differentiated cells restore the quantitative composition of the injured neuronal networks [5]. In modern medicine, more and more attention is being paid to the problem of physiological regeneration and also to the search for pathways of stimulation of this regeneration in the human organism. The search for novel pathways of activation of the processes of recovery of disturbed CNS functions, which can intensify the effectiveness of therapy via stimulation of natural mechanisms underlying sanogenesis and, at the same time, can be combined with other conventional techniques (but cannot induce undesirable consequences), is urgent. The method of intermittent normobaric hypoxia (INH) based on the activation of defensive mechanisms and physiological reserves of the human organism can be one of the above pathways [1-3, 10, 17].

Intensification of the processes of regeneration of the cells under conditions of training to moderate hypoxia seems to be the most promising technique for treatment and rehabilitation of children with CP. The recovery of the neuronal pool can become the basis for sanogenic effect of a dosed decrease in the partial pressure of oxygen on the pathogenesis of CP.

## METHODS

To estimate the effectiveness of rehabilitation of children with CP (who received the complex therapy combined with sessions of INH), we studied

the dynamics of clinico-neurophysiological picture using clinico-neurological, neurophysiological (EEG), transcranial Doppler (TCD), ophthalmoscopic, and statistical techniques.

Altogether, 87 patients (from 8.5 months to 12 years) with CP were examined and received the course of treatment. Clinico-neurophysiological examination was performed before the treatment and immediately after termination of the therapeutic course.

Patients were divided into two groups; age and sex distributions and clinical manifestations of CP were randomized. The comparison group was formed from 34 children who received the course of the generally accepted complex therapy (medicamental treatment, massage, Bobat-therapy, Vojta-therapy at al). The main group included 53 patients who, in addition to the same therapy, were exposed to INH. All studies were ratified and done with the observance of international ethic norms [11].

In the Ukrainian Medical Center for rehabilitation of children with organic lesion of the nervous system (Ministry of Public Health of Ukraine, Kyiv), where we carried out a clinical examination, reasonably healthy children of the corresponding ages are not examined using the techniques applied in our work. To estimate the level of deviation of the studied indices from the physiological norm, we referred to the respective data published by other researchers [6-7, 13-14].

To diagnose CP, we used the clinical classification of CP proposed by Semenova [9]. The level of development of gross motor functions was evaluated in each child according to the Gross Motor Function Classification System (GMFCS) for cerebral palsy [20].

The initial motor status of children with CP was evaluated by seven articles of the five-point scale. The following indices of the motor status were taken into account: paresis, hypertonus, limitation of the range of active movements, pathological purposes, pathological reflexes, hyperkineses, and discoordinated disorders. Each index was estimated in points (from one to five) depending on the degree of pathological manifestations; one point corresponded to

the norm, while five points corresponded to the maximal motor dysfunction [12].

Taking into account a trend toward formation of EEG variants in children, we analyzed EEG using the respective classification proposed by Zhirmunskaya [4]. To examine the spectral power densities (SPDs) of EEG frequency ranges, we used the data of spectrum-amplitude mathematical transformation of the analog EEG (results of Fourier analysis of initial EEG data).

To reveal objective signs of pathology of cerebral hemodynamics in children with CP, the analysis of results of transcranial Doppler (TCD) examination was performed using isolated specific Doppler patterns. For evaluating the level of disturbance of cerebral hemodynamics and the state of cerebral blood flow through the main arteries and veins, we used the asymmetry coefficient (AC) of blood flow velocities in the middle and anterior cerebral arteries (MCA and ACA, respectively). In the course of examination of patients with CP, we also used a velocity TDC parameter (mean flow velocity, MFV) for evaluating the cerebral arteries (basilar artery, BA, as well as the MCA and ACA) [15].

Ophthalmologic examination of patients with CP was performed using the conventional technique [16].

Children of the main group were exposed to the dosed normobaric sanogenetic level hypoxia intermittently once per day. For this purpose, we used a normobaric gas hypoxic mixture (12% O<sub>2</sub> + 88% N<sub>2</sub>). Each cycle included a 15-min-long episode of breathing with the gas mixture (12% O<sub>2</sub> + 88% N<sub>2</sub>) alternated by a 5-min-long episode of breathing an ambient atmospheric air. The number of hypoxic cycles was gradually increased (from one to three). The entire course of treatment included, on average, 10 sessions.

The course of INH was performed using an individual device for artificial mountain air, Borei-M, made in the Scientific Medico-Engineering Center NORT (National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine).

To estimate individual sensitivity, each patient was asked to perform a test session of breathing a 14% O<sub>2</sub>-containing gas mixture be-

fore the treatment using a helmet. The duration of the test session was 10 min long. Control measurements were performed prior to and after each session. Results of test sessions were evaluated according to the step scale. Based on the obtained data, individual regime of INH was prescribed to hypoxic loading.

To evaluate the objective effectiveness of the above-described therapy for each group under examination, we used the technique for estimation of significant differences of means of independent samplings with the help of Student's t-test. Significance of differences was estimated using the t-test at P < 0.05.

## RESULTS AND DISCUSSION

According to our clinico-neurophysiological examination of children with CP, which was performed after the course of generally used complex therapy combined with the course of INH, the stable positive effects on the motor status were observed in 94% of patients of the main group (exposed to INH) and in 74% of patients of the comparison group (unexposed to INH).

In children of the main group, we observed a significant increase in the range of active movements, decreases of clinical manifestations of paresis and pathological purposes, reduction of hypertonus, and decreases of manifestations of hyperkineses and dis-coordinated disorders. In patients of the comparison group, differences between some indices of the motor status before and after treatment were significant (expression of hypertonus decreased, range of active movements increased, and dis-coordinated disorders decreased).

The comparison of clinical findings showed that the therapeutic effects were significantly higher in children of the main group. In this group, some indices of the motor status demonstrated significant differences (we found decreases in the degree of manifestation of paresis, pathological purposes, hyperkineses, and dis-coordinated disorders). In patients of the comparison group, changes in the motor status were insignificant (Tab. 1).

TABLE 1. Comparative characteristics of the effectiveness of rehabilitation of children with cerebral palsy

Studied groups	Indices of the motor status (points)							
	paresis	hypertonus	limitation of the range of active motions	pathological purposes	pathological reflexes	hyperkineses	discoordinated disorders	
Children who received the course of generally used complex therapy (comparison group, $n = 34$ ):								
before treatment	3.0±0.12	3.35±0.16	3.18±0.16	2.97±0.12	2.59±0.16	2.59±0.16	3.35±0.12	
after treatment	2.88±0.12	2.70±0.12*	2.70±0.16*	2.97±0.12	2.59±0.16	2.53±0.16	3.10±0.12	
Δ%	-4.0	-19.4	-15.0	0.00	0.00	-2.30	-7.50	
Children who received the course of generally used complex therapy combined with the course of intermittent normobaric hypoxia (main group, $n = 53$ ):								
before treatment	3.43±0.09	3.77±0.12	3.20±0.12	3.15±0.09	3.0±0.09	2.75±0.09	2.77±0.12	
after treatment	2.94±0.09*	2.92±0.12*	2.58±0.09*	2.88±0.09*	3.0±0.09	2.22±0.09*	2.15±0.09*	
Δ%	-14.3	-22.6	-19.4	-8.6	0.00	-19.3	-22.4	

Footnote. Asterisks show cases of significant ( $P < 0.05$ ) differences of the studied indices in children after therapeutic treatment in compare with before treatment

Therefore, the used combined complex therapy promotes the positive clearly pronounced dynamics of the motor status of children with CP. Positive changes were manifested in an increase in the range of active movements (in 66 and 50% of patients of the main and comparison groups, respectively), overcoming of pathological synergies (32 vs 9%), and reduction of the muscle tone of spastic muscles (76 vs 52%).

As EEG examination showed, the used course of INH resulted in decreases in the pathologically disorganized and hypersynchronized EEG patterns by 12 and 4%, respectively. The comparison group demonstrated no such trend (Fig. 1).

In children exposed to INH, the SPD of the alpha rhythm significantly increased by 23%, while the comparison group demonstrated a significant rise in the SPD of this rhythm only by 13%. In both the examined groups, we also observed a significant increase in the SPD of the beta range (by 26% in patients of the main group and only by 19% in children of the comparison group). In children of the main group, SPDs of delta and theta rhythms significantly decreased by 35%, while the comparison group, according to the data of Fourier analysis, demonstrated no significant changes in these EEG ranges (Tab. 2).

The comparison of the obtained data showed that positive dynamics of spectral EEG

components were expressed more clearly in children of the main group than in patients of the comparison group. The main group demonstrated a significant rise in the SPD of the alpha rhythm and a significant decrease in the SPD of delta waves, while changes in the EEG characteristics observed in the comparison group were insignificant.

Doppler examination showed that brain hemodynamics was normalized in 85% of patients of the main group and in 59% of children of the comparison group. The AC of blood flow velocity in the MCA decreased 3.4 times in children of the main group, while in patients of the comparison group this index decreased only 1.3 times (Tab. 3). In the ACA, the above coefficient decreased 2.7 and 1.1 times in children of the main and comparison groups, respectively.

In patients of the main group, high flow velocities in the BA, MCA, and ACA demonstrated significant decreases (20, 14, and 6%, respectively). In the comparison group, we also observed positive dynamics of these indices, but changes were insignificant.

In children exposed to INH, low flow velocities in the BA, MCA, and ACA demonstrated significant increases (27, 19, and 9%, respectively), while in patients of the comparison group, only the MCA velocity increased significantly (10%).

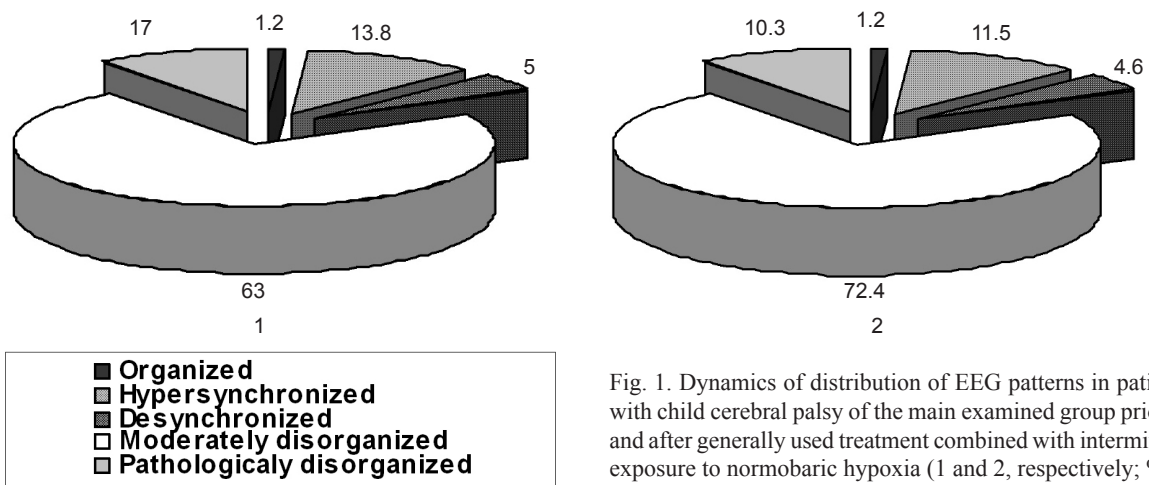


Fig. 1. Dynamics of distribution of EEG patterns in patients with child cerebral palsy of the main examined group prior to and after generally used treatment combined with intermittent exposure to normobaric hypoxia (1 and 2, respectively; %)



**TABLE 2. Results of Fourier analysis of EEG recorded from children with cerebral palsy**

Examined children	Spectral power densities of EEG frequency ranges ( $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ )			
	alpha	beta	delta	theta
Main group (n = 53)				
before treatment	55.0±3.34	14.5±0.95	196±7.4	202±12.4
after treatment	71.0±2.86*	19.6±0.95*	128±8.0*	132±5.7*
$\Delta\%$	+22.5	+26	-34.7	-34.7
Comparison group (n = 34)				
before treatment	45.0±2.5	16.3±1	194.5±11.4	169±9.98
after treatment	51.8±2.5*	20.0±1*	173±10.3	145±8.98
$\Delta\%$	+13	+18.5	-11	-14.2

Footnote. Asterisks show cases of significant ( $P < 0.05$ ) differences prior to and after treatment

The comparison of the data obtained in the course of TCD examination showed that positive dynamics of Doppler patterns suggestive of mean flow velocities in the studied cerebral arteries were expressed more clearly in patients exposed to INH than in patients of the comparison group. In patients of the main group, both increases and decreases in the MFV in the BA, MCA, and ACA were significant. At the same time, the comparison group demonstrated a significant rise in the MFV only in the BA and MCA (Fig. 2).

In the course of ophthalmoscopic examination, we found that the dynamics of indices of the state of the eye fundus were expressed more clearly in children exposed to INH (main group) than in patients of the comparison group (in 32 and 12% of patients, respectively). Positive changes were manifested in (i) a decrease in the number of cases of stenosis of retinal vessels (5 times in children of the main group and only 1.4 times in patients of the comparison group), (ii) a

2-fold decrease of manifestations of angiospasm of the retina observed in the main group (while the comparison group demonstrated no changes in this index), and (iii) an increase in the number of vessels at the periphery of the retina (4.5 and 1.6 times in the respective groups) (Fig. 3).

## CONCLUSION

After complex therapy the stable positive effects on the motor status were observed in 94% of patients of the main group (exposed to INH) and in 74% of patients of the comparison group (unexposed to INH). EEG examination showed that positive dynamics of spectral EEG components were in 70% of patients of the main group and in 56% of children of the comparison group. Doppler examination showed that cerebral hemodynamics was normalized in 85% of patients of the main group and in 59% of children of the comparison group. In the course of ophthalmoscopic examination,

**TABLE 3. Results of transcranial Doppler examination of children with cerebral palsy**

Examined children	Asymmetry coefficient of blood flow velocities	
	in the middle cerebral artery (%)	in the anterior cerebral artery (%)y
Comparison group (n = 34)		
before treatment	16.2	11.7
after treatment	12.5	11.0
$\Delta\%$	3.7	0.7
Main group (n = 53)		
before treatment	18.5	15.3
after treatment	5.4	5.5
$\Delta\%$	13.1	9.8

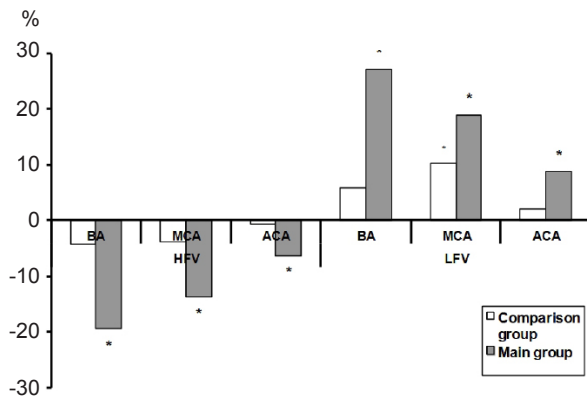


Fig. 2. Changes in cerebral hemodynamics observed in two groups of children with cerebral palsy after the corresponding treatments. Vertical scale mean flow velocity in cerebral arteries, %. HFV and LFV are, respectively, high and low flow velocities basilar artery (BA), middle and anterior cerebral arteries (MCA, ACA) respectively. Asterisks show cases of significant ( $P < 0,05$ ) differences from the corresponding values of flow velocities before treatment

we found that the dynamics of indices of the state of the eye fundus were expressed more clearly in children of the main group than in patients of the comparison group (in 32 and 12% of patients, respectively).

Neurophysiological, EEG, TCD, ophthalmoscopic, CNS state indices and cerebral circulation indicate that intermittent exposure to the dosed normobaric sanogenetic level hypoxia combined with the generally accepted therapy (used for rehabilitation of children with CP) results in a significant intensification of the processes the brain deficiency reparation and also in the improvement of the CNS-controlled motor and mental functions in these patients.

**Е.В. Яценко, В.А. Березовский, Ю.В. Деева**

### ДЕЙСТВИЕ ПРЕРЫВИСТОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ ЦНС И МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ У ДЕТЕЙ С ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ ПАРАЛИЧОМ

Исследовали эффективность действия прерывистой нормобарической гипоксии (ПНГ) на состояние ЦНС и мозгового кровообращения у детей с церебральным параличом (ДЦП). Проведено комплексное обследование и лечение 87 детей с ДЦП в возрасте от 8,5 мес до 12 лет.

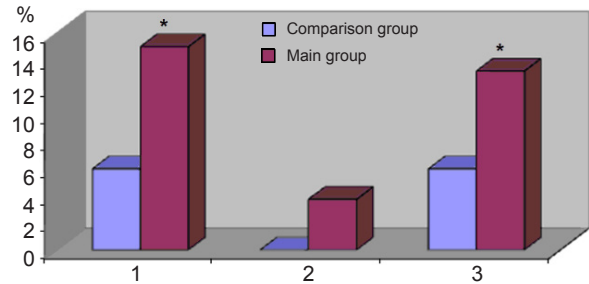


Fig. 3. Dynamics of indices of the state of the eye fundus in children with cerebral palsy of the examined main and comparison groups. Vertical scale: changes in the number of cases where positive dynamics were observed, %. 1-3: decreases of manifestations of stenosis of retinal vessels (1) and angiospasm of the retina (2), and increase in the number of vessels at the periphery of the retina (3). Asterisks show cases of significant ( $P < 0,05$ ) differences from the corresponding indices before treatment

Клинико-нейрофизиологическое обследование проводилось до лечения и сразу же по окончании терапевтического курса. Пациенты были разделены на две группы рандомизированные согласно возрасту, полу, клинической форме ДЦП. Первая группа (сравнения) состояла из 34 детей, которым проводили традиционную комплексную терапию (медикаментозное лечение, массаж, Бобат-терапия, Войта-терапия и др.). Основная группа (53 пациента) на фоне общепринятой комплексной терапии дополнительно проходила курс ПНГ с помощью индивидуального аппарата горного воздуха типа «Борей-М» (производства Научно-исследовательского медико-инженерного центра НОРТ НАН Украины, г. Киев). Для ПНГ использовали нормобарическую газовую гипоксическую смесь (ГС-12), которая состояла из 12 % кислорода и 88 % азота. Сеансы проводились один раз в день в интермиттирующем режиме: 15 мин – дыхание ГС-12, 5 мин – атмосферным воздухом (один цикл). Количество циклов увеличивалось от одного до трех. Курс ПНГ в среднем состоял из 10 сеансов. После проведенного комплексного лечения положительная динамика в двигательном статусе отмечалась у 94 % детей основной (с применением ПНГ) группы и у 74 % группы сравнения. Электроэнцефалографическое обследование пациентов обеих групп выявило позитивные изменения у 70 % детей основной группы и у 56 % группы сравнения. Транскраниальная доплерография сосудов головного мозга установила наличие положительной динамики у 85 % детей основной группы и у 59 % группы сравнения. При проведении офтальмоскопического исследования позитивные изменения в состоянии глазного дна отмечались у 32 % пациентов основной группы и у 12 % группы сравнения.

Ключевые слова: детский церебральный паралич, прерывистая нормобарическая гипоксия, адаптация.

**К.В. Яценко, В.Я. Березовський, Ю.В. Дєєва**

## **ДЛЯ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ НОРМОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ НА СТАН ЦНС І МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ У ДІТЕЙ З ЦЕРЕБРАЛЬНИМ ПАРАЛІЧЕМ**

Досліджували ефективність дії переривчастої нормобаричної гіпоксії (ПНГ) на стан ЦНС та мозкового кровообігу у дітей хворих на церебральний параліч (ДЦП). Обстежено та комплексно проліковано 87 хворих на ДЦП віком від 8,5 міс до 12 років. Клініко-нейрофізіологічне обстеження проводили до лікування та по закінченні курсу терапії. Пацієнти були розподілені на дві групи, рандомізовані за віком, статтю, клінічною формою ДЦП. Першу (порівняльну) групу склали 34 особи, яким проводили традиційну комплексну терапію (медикаментозне лікування, масаж, Бобат-терапія, Войта-терапія тощо). Основна група (53 пацієнта) на тлі загальноприйнятої комплексної терапії додатково отримувала курс ПНГ за допомогою індивідуального апарата гірського повітря типу «Борей-М» (виробництва наукового медично-інженерного центру НОРТ НАН України, м. Київ). Для проведення ПНГ використовували нормобаричну газову гіпоксичну суміш (ГГС-12), яка складалась з 12 % кисню та 88 % азоту. Сеанси проводили один раз на добу в інтермітуючому режимі: 15 хв – дихання ГГС-12, 5 хв – атмосферним повітрям (один цикл). Кількість циклів збільшилася від одного до трьох. Курс ПНГ у середньому складав 10 сеансів. Після проведеного комплексного лікування відзначали позитивну динаміку стану рухового статусу у 94 % хворих основної (з використанням ПНГ) групи та у 74 % групи порівняння. Електроенцефалографічне дослідження пацієнтів обох груп виявило позитивні зміни у 70 % пацієнтів основної групи та у 56 % групи порівняння. Транскраніальна доплерографія судин головного мозку встановила наявність позитивної динаміки у 85 % дітей основної групи та у 59 % групи порівняння. При проведенні офтальмоскопічного дослідження позитивні зміни у стані очного дна відзначали у 32 % пацієнтів основної групи та у 12 % групи порівняння.

Ключові слова: дитячий церебральний параліч, переривчаста нормобарична гіпоксія, адаптація.

### **REFERENCES**

1. Агаджанян А.Н., Миррахимов М.М. Горы и резистентность организма. – М.: Наука, 1970. – 182 с.
2. Березовский В.А. Аллопатический и гомеопатические принципы в лечении заболеваний, связанных с кислородным голоданием / Молекулярные аспекты адаптации к гипоксии. – К.: Изд-во Наук. думка, 1979. – С. 224–231.
3. Березовский В.А., Дейнега В.Г. Физиологические механизмы саногенных эффектов горного климата. – Там же, 1988. – 224 с.

4. Жирмунская Е.А. Система описания и классификация энцефалограмм человека. – М. Медицина, 1984. – 234 с.
5. Зайко М.Н., Биць Ю.В., Бутенко Г.М. Патолофізіологія: підручник. – К.: Медицина, 2008. – 703 с.
6. Зенков Л.Р., Карлов В.А., Ронин М.А. Спектральный анализ ЭЭГ у детей и подростков, страдающих эпилепсией: общие характеристики и патофизиологическая интерпретация данных / Журн. неврологии и психиатрии. – 1989. – 89, № 1. – С. 15–19.
7. Кравчук В.С., Мартинюк В.Ю., Зінченко С.М. Допплероцефалографія у дітей / Основи медико-соціальної реабілітації дітей з органічним ураженням нервової системи. – К.: Інтермед, 2005. – С. 140–146.
8. Лобов М.А. Коррекция мышечного тонуса и дизартрии при детском церебральном параличе / Журн. мед. консилиум («Consilium medicum»). – 2001. – 3, №14. – С. 34–38.
9. Семенова К.А. Методические рекомендации по применению рабочей классификации детского церебрального паралича. – М., 1973. – 20 с.
10. Березовський В.Я., Горбань С.М., Левашов М.І., Сутковий А.Д. Методичні рекомендації Мінздраву України: Технологія підвищення резистентності організму за допомогою гіпокситерапії. – К., 2000. – 34 с.
11. Березовський В.Я., Яценко К.В. Методичні рекомендації Міністерства охорони здоров'я України: інструментальна оротерапія в комплексній реабілітації дітей з органічним ураженням нервової системи. – К., 2009. – 23 с.
12. Михайленко В.Е. Клинико-нейрофизиологическое обоснование применения физических факторов в реабилитации детей с ДЦП: автореф. дис. на присвоение науч. степени канд. мед. наук: спец. 14.03.04 «Патологическая физиология». – Ялта. – 2005. – 23 с.
13. Надоненко О.М., Мартинюк В.Ю., Зінченко С.М. Електроенцефалографічні характеристики у дітей від народження до 3-х років в стані сну і неспання / Основи медико-соціальної реабілітації дітей з органічним ураженням нервової системи. – К.: Інтермед, 2005. – С. 120–134.
14. Панасюк Л.О., Мартинюк В.Ю., Зінченко С.М.. Обстеження неврологічного статусу у новонароджених / Основи медико-соціальної реабілітації дітей з органічним ураженням нервової системи. – Там же. – С. 47–53.
15. Росин Ю. А. Допплерография сосудов головного мозга у детей. – С.-Петербургское мед. изд-во, 2004. – 110 с.
16. Сидоренко Е.И. Офтальмология. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 408 с.
17. Сіротинін М. М. Життя на висотах і хвороба висоти. – К.: Вид-во АН УССР, 1939. – 225 с.
18. Статистичний бюлетень: заклади охорони здоров'я та захворюваність населення України у 2007 р. / Держкомстат України. – К., 2008. – 96 с.
19. Осауленко О.Г. Статистичний щорічник України: за 2006 р. / Держкомстат України. – К.: Консультант, 2007. – 575 с.
20. Palisano R., Rosenbaum P., Bartlett D., Livingston M. Content validity of the Expanded and Revised Gross Motor Function Classification System / Developmental Medicine and Child Neurology. – 2007. – №9. – P. 57–68.

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

*Received 02.12.2012*

В.Ф. Чехун, Д.В. Демаш, Л.А. Налескіна

## Оцінка біологічних ефектів і можливих механізмів дії постійного магнітного поля

*Розглянуто сучасні уявлення про механізми взаємодії постійного магнітного поля (ПМП) з клітинами та клітинними структурами, а також проаналізовані дані щодо можливих біотропних ефектів цього фактора. Зроблено акцент на аналізі результатів досліджень, у яких використовувались середні (0,1–1 Тл) ПМП, оскільки поля з такими характеристиками застосовуються для адресної доставки магнітокерованих наноконструкцій під час таргетної терапії злоякісних новоутворень. Зроблено висновок про те, що першопричиною індукованих зовнішнім ПМП змін у клітинах є порушення обміну вільних радикалів і зростання їх кількості, що призводить до розвитку оксидативного стресу, порушення функціонування іонних каналів, зміни морфології клітин, експресії деяких генів і білків, а також викликає зміни у процесах апоптозу і проліферації.*

*Ключові слова: постійне магнітне поле, вільнорадикальні процеси, кальцій, іонні канали.*

### ВСТУП

Однією з основних проблем сучасної онкології, які перешкоджають ефективному лікуванню хворих, є пошук шляхів подолання резистентності пухлин до цитостатиків [56]. Традиційні підходи до рішення цього завдання не виправдали очікуваних сподівань [9, 42]. Створення нових лікарських форм на основі нанотехнологій, які стрімко розвиваються, відкриває перспективу підвищення ефективності лікування онкологічних хворих внаслідок використання біодоступних нанорозмірних матеріалів [42, 54], а також за рахунок їх адресної доставки в організм. Як показали результати досліджень останніх років, підвищення біодоступності наночастинок можна досягти застосуванням як носія ліпосом [18, 54, 69], завдяки яким вони розглядаються як векторна система доставки цитостатика до мішені. Однак для забезпечення безпосереднього надходження в пухлину наноконструкції, до складу якого

будуть входити феромагнетики та протипухлинний препарат, необхідний зовнішній вплив магнітного поля [24]. І це є найбільш складним завданням, яке стоїть перед дослідниками.

Питання взаємодії живих систем на різному рівні організації з ПМП було і залишається актуальним, що підтверджується низкою систематизованих матеріалів, які опубліковані протягом останніх років [4, 6, 33, 67]. В наш час, коли активно створюються та досліджуються можливості застосування векторних систем транспорту протипухлинних препаратів, які керуються зовнішнім ПМП, з'ясування особливостей взаємодії пухлинних клітин і ПМП набуває ще більшого значення та потребує цілеспрямованих досліджень щодо розкриття механізмів впливу цього фізичного фактора на пухлинні клітини, а також визначення особливостей накопичення цитостатиків у пухлинному вогнищі.



## КЛАСИФІКАЦІЯ РЕЧОВИН ЗА ЇХ МАГНІТНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Установлено, що будь-який об'єкт на Землі тією чи іншою мірою підпадає під вплив ПМП [2, 67]. Також відомо, що до складу живих організмів, у тому числі і мікроорганізмів (бактерій, дріжджів, грибів і тощо), входять сполуки, які характеризуються різними магнітними властивостями та належать до різних класів речовин: діа-, пара- або феромагнетиків [36]. Слід зазначити, що феромагнетики є магнітоструктурованими речовинами [5].

Діамагнетики – речовини, які намагнічуються проти напрямку зовнішнього ПМП і без нього не проявляють магнітних властивостей. Під дією зовнішнього магнітного поля кожен атом діамагнетика набуває магнітного моменту, який є пропорційним до величини магнітної індукції та направлений назустріч полю. Через це магнітна сприйнятливість ( $\chi$ ) діамагнетиків завжди від'ємна, а за абсолютними значеннями – мала та слабко залежить як від напруженості магнітного поля, так і від температури [36]. До діамагнетиків належать інертні гази, азот, водень, кремній, фосфор, вісмут, цинк, мідь, золото, срібло, а також багато інших органічних і неорганічних сполук. Людина у магнітному полі поводить себе як діамагнетик [5]. Однак відомо, що у тканинах організму дорослої людини масою 70 кг міститься близько 3,7 г заліза, переважно у формі гемоглобіну, феритину та гемосидерину, які характеризуються слабкими парамагнітними властивостями й активно не взаємодіють із зовнішніми магнітними полями. Концентрація цих парамагнітних речовин не є достатньою для того, щоб перетворити загальну сприйнятливість будь-якої тканини (включно з кров'ю) з діамагнітної на парамагнітну [11, 57].

Парамагнетики — речовини, які намагнічуються у напрямку зовнішнього ПМП. Вони належать до слабкомагнітних речовин і їх магнітна проникність незначно відрізняється від одиниці. Без зовнішнього ПМП парамагнетик не є намагніченим, оскільки через

тепловий рух власні магнітні моменти атомів орієнтовані абсолютно невпорядковано [16]. До парамагнетиків належить алюміній, платина, лужні та лужно-земельні метали, кисень, оксид азоту (II), хлорне залізо тощо.

Феромагнетики – речовини, у яких при температурі нижче точки Кюрі встановлюється певний порядок магнітних моментів атомів або іонів, завдяки якому речовина набуває магнітних властивостей (значення магнітної сприйнятливості речовини може складати десятки і сотні тисяч). При температурах, які не перевищують 300°C, феромагнетики мають самочинну (спонтанну) намагніченість, яка значно змінюється під зовнішнім впливом [22]. Феромагнітні властивості мають такі хімічні елементи, як залізо, кобальт, нікель (3d-метали), а також рідкоземельні метали.

Таким чином, проведений аналіз характеристик хімічних речовин і елементів з різними магнітними властивостями надає підстави для припущення, що наявність і співвідношення цих складових у біологічних об'єктах є визначальними у їх реакції на вплив зовнішнього магнітного поля.

## ВИДИ МАГНІТНИХ ПОЛІВ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ У БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Питання доцільності застосування магнітних полів у медико-біологічних дослідженнях не є новим, але у зв'язку із зростаючими потребами клініки і нещодавніми досягненнями науки, набуло гострої нагальності. Останнім часом стало зрозумілим, що сучасний напрямок досліджень в онкології необхідно спрямувати на впровадження новітніх напрацювань нанотехнологій, оскільки така позиція сприятиме відкриттю нових горизонтів не тільки для своєчасної діагностики пухлинної хвороби, але і для створення унікальних лікарських наноконструкцій керованої фармакокінетики, які дадуть змогу підвищити ефективність медикаментозного лікування [8].

Великого значення набуває створення керованих наносистем, до складу яких будуть



входити протипухлинні препарати, зокрема доксорубіцин, похідні платини та наноферромагнетики, дія яких як векторів таргетної доставки лікарських засобів безпосередньо у зону пухлини повинна підсилюватися впливом зовнішнього магнітного поля [1, 21, 28]. Така стратегія біотехнологій в онкології, з одного боку, зумовлена відсутністю вибіркової дії та високою токсичністю багатьох існуючих препаратів як самостійних лікарських засобів, що обмежує їх широке використання у клініці [48], з іншого, – природною та набутою резистентністю злоякісних новоутворень до цитостатиків [7].

У роботі з біологічними об'єктами використовуються різні типи магнітних полів: постійне (значення індукції та напруженості магнітного поля не змінюються з часом), змінне (значення індукції змінюється за гармонічним законом з певною частотою), імпульсне (значення індукції змінюється за негармонічним принципом), рухоме імпульсне (джерело магнітного поля рухається у просторі), а також комбінований вплив різних видів магнітних полів [60].

Установлено, що ступінь впливу магнітного поля на організм тварини і людини визначається набором біотропних параметрів цього поля, до яких відносять:

- інтенсивність (значення напруженості магнітного поля и магнітної індукції);
- градієнт (залежність інтенсивності поля від відстані до полюса магніта);
- вектор (напрямок силових ліній поля);
- експозиція (тривалість впливу на живий організм);
- частота (кількість коливань поля за одиницю часу);
- форма імпульсу [25].

У цьому огляді ми зупинимось на описі взаємодії ПМП з біологічними об'єктами, оскільки для їх характеристики, на відміну від змінних, імпульсних і змішаних, не потрібні частота та форма імпульсу, що дає змогу більш об'єктивно оцінити зв'язок між параметрами поля і виявленими ефектами.

Згідно з класифікацією, запропонованою

ВООЗ, залежно від магнітної індукції, ПМП умовно поділяють на три групи [67]: слабкі (значення індукції менше від 0,1 Тл), середні (значення індукції від 0,1 Тл до 1 Тл) і сильні (понад 1 Тл).

Оскільки у роботах, присвячених адресній доставці лікарських препаратів або наночастинок у біологічні об'єкти, використовували середні ПМП [6, 24, 55], у нашому огляді акцентовано увагу на аналізі ефектів і механізмів дії ПМП зі значеннями індукції порядку сотень мілітесла на клітинному рівні.

### **НАЯВНІ ГІПОТЕЗИ ЩОДО МЕХАНІЗМІВ ВЗАЄМОДІЇ ПМП З ЖИВИМИ ОБ'ЄКТАМИ**

Останнім часом більшість досліджень було присвячено об'єктивізації змін, які виникають у клітинах під впливом ПМП. Експериментатори спостерігали зміни форми клітин, концентрації іонів кальцію [64], активних форм кисню, експресії деяких генів і білків [31, 32], а також порушення процесів проліферації і апоптозу [43]. Водночас у багатьох дослідженнях не вказується чи викликані такі зміни безпосереднім впливом ПМП, чи вони є наслідком перебудов, спричинених цим фактором на молекулярному рівні.

Нині, на жаль, немає єдиної точки зору щодо природи акцептора або мішені дії магнітного поля на біологічні об'єкти. Виходячи з природи ПМП, авторами оглядів [41] було запропоновано твердження про те, що існує декілька теоретичних механізмів його дії на біологічні об'єкти:

- взаємодія з чутливими до магнітного поля компонентами тканин;
- взаємодія з тканинами і органами, які рухаються в ПМП;
- порушення руху іонів через мембранні канали;
- зміна константи рівноваги хімічних реакцій, продуктами яких є парамагнітні речовини;
- підвищення концентрації вільних радикалів;

зміна просторової орієнтації фосфоліпідів мембран.

Однак не всі з запропонованих механізмів взаємодії знаходять своє експериментальне підтвердження.

ПМП за своєю природою повинне взаємодіяти з зарядженими частинками, які рухаються. Проте в результаті математичного моделювання структури іонного каналу, який перебуває у ПМП [15], було показано, що для того, щоб чинити суттєвий вплив на рух іонів через канал, слід застосовувати поля, які за індукцією значно перевищують ті, що використовуються в медицині та біології. Це пов'язано з тим, що рух іонів через мембрану характеризується дуже короткими проміжками вільного пробігу (близько  $1\text{\AA}$ ) і часу між зіткненнями ( $10^{-12}$  с) [67].

Водночас існує інша гіпотетична мішень впливу ПМП на клітину – гідратовані фосфоліпіди цитоплазматичної мембрани [39]. Вважається, що ПМП може змінювати просторову орієнтацію фосфоліпідів, а також впливати на ступінь гідратації їх гідрофільних ділянок, тим самим впливаючи на функціонування трансмембранних білків і, зокрема іонних каналів.

Існують гіпотези про те, що іншим можливим механізмом взаємодії ПМП з клітинами є його вплив на швидкість хімічних реакцій у ситуації, якщо продукти хімічної реакції є більш парамагнітними, ніж реагенти. У цьому разі вплив ПМП має зсунути рівновагу компонентів реакції в бік утворення кінцевих продуктів. Дисоціація комплексу кисень–гемоглобін (діамагнетик) на молекулу кисню та гемоглобін (обидва – парамагнетики) є прикладом такої реакції. Тепер зовнішнє ПМП повинно знизити енергетичний бар'єр дисоціації комплексу та дати перевагу утворенню парамагнітних продуктів реакції. Але розрахунки показали, що навіть при застосуванні поля з індукцією 4 Тл енергетичний бар'єр дисоціації ( $64$  кДж/моль) для цієї реакції знизиться лише на  $1$  Дж/моль, а це менше, ніж при зміні температури на  $0,01^\circ\text{C}$  [61].

*Вплив ПМП на реакції за участі вільних*

*радикалів.* На нашу думку, найбільш вірогідним пусковим механізмом ефекту дії ПМП є порушення балансу обміну вільних радикалів у процесі хімічних реакцій. Наприклад, якщо молекула АВ спонтанно дисоціює на радикали А і В, кожен з них протягом короткого періоду часу може бути оточений молекулами розчинника, що перешкоджає їх повному розходженню. Якщо А і В рекомбінують між собою перед остаточною сепарацією, знову відновлюється молекула АВ. У іншому разі, якщо вони встигають дифундувати, утворюються вільні радикали А і В. Застосування зовнішнього ПМП може ініціювати перехід з синглетного в триплетний стан [2, 26]. При цьому знижується ймовірність повторного утворення зв'язку та підвищується можливість розходження продуктів реакції, і, відповідно, підвищення концентрації вільних радикалів [49], які суттєво впливають на прояв багатовекторних реакцій у клітині.

Таким чином, механізм, за допомогою якого ПМП викликає зміни у клітинах, пов'язані з порушенням кінетики утворення та рекомбінації вільних радикалів, зокрема активних форм кисню й азоту, які відіграють важливу роль у імунному захисті, передачі міжклітинних сигналів і міжклітинних взаємодіях [48].

Відомо, що використання ПМП у комплексі з хіміотерапією злоякісних новоутворень може сприяти посиленню продукції вільних радикалів, які утворюються в результаті впливу хіміопрепаратів. Крім того, є дані про те, що ПМП може чинити вплив на ферментативні процеси за участі вільних радикалів як проміжних продуктів [45]. Зокрема, деякі дослідники показали, що ПМП з індукцією від  $50$  до  $850$  мТл змінює швидкість рекомбінації вільних радикалів і розкладу перекису водню каталазою, а також димерним комплексом  $\text{Fe}^{3+}$ -ЕДТО, який має каталазну активність [3, 19]. У вказаному діапазоні значень індукції ПМП Nossol та співавт. [47] спостерігали посилення відновної активності цитохром С-оксидази до  $90\%$ . Це підтверджується нашими результатами щодо

достовірного підвищення вмісту пероксидів у клітинах асцитної карциноми Ерліха (АКЕ), починаючи з 3-ї години після початку впливу ПМП.

*Генотоксичний ефект ПМП.* Продукція вільних радикалів, що викликає розвиток оксидативного стресу, призводить до появи мутацій, і, як наслідок, індукції апоптотичної програми клітини та явищ некрозу. При цьому загальноприйнятою є думка про те, що магнітні поля з індукцією менше ніж 1 Тл не є генотоксичними [32, 41, 63].

Мутагенний ефект було продемонстровано лише для сильних ПМП на штаммах *E. coli*, які характеризувалися порушеннями системи репарації ДНК [35, 70]. Водночас в результаті досліджень на клітинах АКЕ ми спостерігали збільшення уражень ДНК, починаючи з 3-ї години впливу ПМП з індукцією 160 мТл.

Показано, що при одночасному впливі на лімфоцити і ПМП з індукцією 7 мТл, і розчину  $FeCl_2$  спостерігалось збільшення до 20 % кількості клітин з ураженнями ДНК [58], що достовірно перевищувало значення цього показника у разі впливу цих факторів окремо. Оскільки хлорид заліза (II) є окисником, ураження ДНК, імовірно, пов'язані з посиленням продукції вільних радикалів всередині клітини та подальшим їх впливом на ДНК. Однак при дії на лімфоцити лише ПМП з індукцією 7 мТл кількість клітин з ураженнями ДНК, які виявляються за допомогою методу ДНК-комет, не змінювалася [43].

*Вплив ПМП на клітинну мембрану і рух іонів.* Відомо, що клітинна мембрана є бар'єром між внутрішньоклітинними органами та навколишнім середовищем, і, таким чином, безпосередньо задіяна в регуляції внутрішньоклітинного гомеостазу.

Клітинна мембрана підтримує негативний (близько 70 мВ) потенціал між зовнішньою та внутрішньою поверхнями мембрани ("потенціал спокою") і регулює проходження молекул у клітину, наприклад, через потенціал-залежні або лігандзалежні іонні канали або такі білки-переносники, як  $Na^+K^+$ -АТФази.

Наявні в літературі дані про вплив ПМП

на клітинну мембрану не є однозначними. У експерименті з короткотривалим впливом ПМП Rosen та співавт. [58] не виявили відхилень потенціалу дії у постсинаптичній мембрані нерва миші після впливу ПМП з індукцією 120 мТл, який тривав 50 с.

Carson та співавт. [17] не спостерігали змін концентрації  $Ca^{2+}$  у цитоплазмі після дії на клітини HL-60 ПМП з індукцією 150 мТл протягом 23 хв. Miyamoto та співавт. [44] не відмітили змін у активному і пасивному транспорті  $K^+$  в клітинах HeLaS3 людини, на які впливали ПМП. Аналогічні результати було отримано і на клітинах нейробластоми SH-Sy5Y [62].

Водночас деякі дослідники показали підвищення вмісту  $Ca^{2+}$  у цитоплазмі клітин. Причиною цього може бути те, що іонні канали не є безпосередньою мішенню ПМП, а порушення у їх роботі пов'язані з реакцією на внутрішньоклітинні зміни під впливом ПМП, зокрема – на розвиток окисного стресу [12–14].

Найбільш близькою до істини є гіпотеза Rosen та співавт. [59], згідно з якою орієнтаційний ефект при впливі магнітних полів з індукцією більше ніж 0,1 Тл може значно впливати на роботу трансмембранних білків внаслідок зміни орієнтації фосфоліпідів. У дослідженні Lin та співавт. [40] було показано значне зниження плинності мембран остеобластів лінії MG63, які культивували протягом 8 год за наявності ПМП.

Дані електронної мікроскопії свідчать про те, що у поліморфноядерних лейкоцитах при впливі ПМП з індукцією 0,1 Тл протягом 30 хв спостерігається дегрануляція лізосом [53]. Крім того, були відмічені такі залежні від часу ефекти, як підвищення секреції лізоциму та лактатдегідрогенази. При цьому антагоністи кальцієвих каналів ніфедипін та верапаміл захищали поліморфноядерні лейкоцити від впливу ПМП. Такі результати все ж таки свідчать про участь кальцієвих каналів у цих процесах. Підтвердженням цього є дані, отримані при аналізі апоптозу і входження  $Ca^{2+}$  у клітини U937 і СЕМ людини [20]. Вплив

ПМП з індукцією 100 мТл протягом 4 год сприяв підвищенню відсотка живих клітин внаслідок інгібування апоптозу, індукованого низкою препаратів. На думку авторів, захисний ефект може бути пов'язаний саме з підвищенням входу  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину.

Цікавими є результати Аокі та співавт. [10] щодо впливу ПМП з індукцією 0,4 Тл протягом 15 хв на включення адриаміцину клітинами гострого лейкозу людини TALL-1. Було показано, що під впливом ПМП препарат швидше проходить у клітину. Автори вважають, що це пов'язано зі змінами властивостей мембрани клітини.

*Зміни структури цитоскелета під впливом ПМП.* Відомо, що зміни у структурно-функціональному стані плазматичної мембрани можуть супроводжуватися певними перетвореннями цитоскелета. Результати електронно-мікроскопічного дослідження впливу ПМП на структуру F-актину клітин ссавців показали, що після дії ПМП з індукцією 10 мТл протягом 12 год розміри та форма клітин практично не змінювалися, тоді як під впливом ПМП з індукцією 120 мТл порушення структури клітин були більш очевидними. При культивуванні клітин за наявності ПМП з індукцією 120 мТл протягом 60 год структуру F-актину було неможливо розрізнити. Зі збільшенням часу експозиції змінювалась і форма клітин (знижувалося співвідношення довжини клітини до її ширини) [68].

У численних дослідженнях на моделі еритроцитів спостерігалися зміни орієнтації клітин крові й активація їх агрегації внаслідок збільшення площі контактів клітинних мембран [29, 34, 50].

При дослідженні особливостей культивування фібробластів і попередників остеобластів з кісткового мозку, які знаходилися під впливом ПМП, було показано, що його дія призводила до порушення взаємодії клітин з субстратом і швидкості росту перитонеальних фібробластів людини. Крім того, спостерігалися зміни морфології клітин, однак вони виявились частково зворотними [16].

Є дані про те, що вплив сильних ПМП,

починаючи з 1 Тл, може спричинити реорієнтації таких макромолекул, як колаген [66], а також клітин тварин *in vitro* [37]. При цьому не до кінця з'ясовані морфологічні ефекти сильних ПМП на культури з адгезивними властивостями порівняно зі впливом ПМП на еритроцити. Вважається, що ПМП впливає на елементи цитоскелета, які динамічно полімеризуються і деполімеризуються в процесі поділу та міграції клітин [43].

Таким чином, у нечисленних дослідженнях на різних біологічних об'єктах показано, що ПМП може взаємодіяти з компонентами цитоскелета, а також викликати зміни морфології клітин.

*Порушення експресії генів, індуковані ПМП.* Особливий інтерес у дослідженні ефекту ПМП лежить у площині пошуку адапторних процесів, задіяних у активації генетичного апарату клітини. У доступній нам літературі не вдалося встановити участь жодного гена як безпосередньої мішені ПМП. Є повідомлення про те, що вміст  $\text{Ca}^{2+}$  є регулятором багатьох процесів у клітині, зокрема, експресії деяких генів [14]. Однак внаслідок залучення цілої низки опосередкованих механізмів спостерігаються зміни експресії певних генів і супутніх білків, що в свою чергу призводить до змін швидкості проходження клітинного циклу та проліферативних процесів загалом.

Зокрема, під впливом ПМП спостерігалась експресія мРНК гена *c-fos*, яка до цього не виявлялася у клітинах HeLaS3. Рівень експресії мРНК змінювався залежно від тривалості впливу ПМП з піком через 6 год. Вважають, що вплив ПМП на клітини призводить до експресії *c-fos* через активацію низки сигнальних каскадів [31]. Ще в одному дослідженні було показано, що короткотривала експозиція з ПМП 100 мТл суттєво, але зворотно посилює експресію білків Fra-2, *c-Jun* та Jun-D в нейронах гіпокампа в культурі клітин [30, 43]. Натомість у деяких дослідженнях було показано, що ПМП не змінювало вміст в астроцитах білків стресу *hsp25*, *hsp27*, *hsp60*, *hsp70*, актину та кислого гліального

білка, а також відповідних мРНК [23, 27].

Іншими дослідниками на клітинах ліній MCF-7, NC-B4 і FNC-B4 було показано зниження вбудовування  $^3\text{H}$  тимідину в клітини MCF-7 раку молочної залози людини і нейрони лінії NC-B4 на відміну від клітин лейкемії морських свинок лінії WENI-3 [51, 52].

Таким чином, підвищення концентрації вільних радикалів, зміна концентрації іонів кальцію в цитоплазмі, рівня експресії низки генів і їх білків під впливом ПМП може активувати програми апоптичної загибелі клітини. Це підтверджується результатами досліджень Tofani та співавт. [65] щодо впливу ПМП на клітини аденокарциноми шийки матки (WiDr), молочної залози (MCF-7) та ембріональні фібробласти. Цікавим є той факт, що апоптоз спостерігався лише у злоякісних клітинах.

Наведені результати вказують на те, що ефекти ПМП по-різному проявляються у різних типах клітин, і самі по собі не призводять до летальних змін в процесах росту за нормальних умов культивування незалежно від його індукції [43]. Водночас не викликає сумнівів те, що середні ПМП (зі значеннями індукції 0,1...1,0 Тл) достовірно впливають на процеси, які відбуваються в клітинах, що,

безумовно, є важливим як з точки зору оцінки безпеки впливу на організм людини, так і терапевтичних перспектив його застосування для підвищення вибірковості дії нових лікарських форм протипухлинних препаратів.

Отже, усе викладене свідчить про те, що наведені у огляді аспекти впливу ПМП на життєво важливі процеси в клітинах в системі *in vitro* та *in vivo* недостатньо вивчені і не надають вичерпних відповідей на поставлені питання. Але, незважаючи на це, на підставі наявних у літературі даних ми вважаємо за доцільне навести можливий алгоритм змін, які відбуваються у клітинах під впливом ПМП (рисунок).

Першопричиною таких змін є збільшення концентрації вільних радикалів, що призводить до розвитку окисного стресу, а також (гіпотетично) до змін конформації фосфоліпідів цитоплазматичної мембрани, наслідком чого є розлад функціонування іонних каналів. В результаті цього може змінюватися морфологія клітин, експресія деяких генів і білків, а також проходження клітинного циклу, процесів апоптозу та проліферації.

Однак виявлення особливостей біологічних ефектів і механізмів дії ПМП повинно



Схема можливих механізмів впливу постійного магнітного поля (ПМП) на внутрішньоклітинні процеси



знайти подальший розвиток, оскільки, з одного боку, активно напрацьовуються наукові розробки щодо керованої зовнішнім магнітним полем доставки у пухлинне вогнище протипухлинних препаратів на основі нанорозмірних феромагнетиків, з іншого, – вимальовується новий перспективний напрям досліджень в онкології, пов'язаний з процесами обміну ендogenous заліза в організмі та впливом на ці процеси ПМП.

**В.Ф. Чехун, Д.В. Демаш, Л.А. Налескина**

### **ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ И ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ**

Рассмотрены существующие представления о механизмах взаимодействия постоянного магнитного поля (ПМП) с клетками и клеточными структурами, а также проанализированы данные о возможных биотропных эффектах этого фактора. Сделан акцент на анализе результатов исследований, в которых использовались средние (0,1–1 Тл) ПМП, поскольку поля с такими характеристиками применяются для таргетной доставки магнитоуправляемых наноконструкций во время таргетной терапии злокачественных новообразований. Сделан вывод о том, что первопричиной индуцированных внешним ПМП изменений в клетках является нарушение обмена свободных радикалов и увеличение их количества, что приводит к развитию оксидативного стресса, нарушению функционирования ионных каналов, изменению морфологии клеток, экспрессии некоторых генов и белков, а также изменениям в процессах апоптоза и пролиферации.

Ключевые слова: постоянное магнитное поле, свободно-радикальные процессы, кальций, ионные каналы.

**V.F. Chekhun, D.V. Demash, L.A. Naleskina**

### **EVALUATION OF BIOLOGICAL EFFECTS AND POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION OF STATIC MAGNETIC FIELD**

Modern views on mechanisms of interaction between static magnetic field and cells or cellular structures are reviewed. An analysis of the data about possible biotropic effects of this factor was performed. The emphasis was put on the analysis of the studies in which moderate (0.1–1 T) static magnetic fields were used, because such fields are used for targeted delivery of magnetosensitive nanocomposites in development of new strategies in target therapy of patients with malignant neoplasms. Based on available data it was concluded that the primary cause of changes in cells after incubation in external static magnetic field is disruption of free radical metabolism and elevation of their concentration. Such disruption causes

oxidative stress, and, as a result, damages ion channels, leading to changes in cell morphology and expression of different genes and proteins, and also changes in apoptosis and proliferation.

Key words: static magnetic field, free radical processes, calcium, ion channels.

*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Березов Т.Т., Яглова Н.В., Дмитриева Т.Б., Чехонин В.П., Жирков Ю.А. Направленный транспорт лекарственных средств с помощью липосом // Вестн. Рос. акад. мед. наук. – 2004. – 3. – С. 42–46.
2. Бинги В.Н., Савин А.В. Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы // Успехи. физ. наук. – 2003. – 173. – С. 265–300.
3. Вайнер Л.М., Подоплелов А.В., Лешина Т.В. Влияние магнитного поля на скорость разложения  $H_2O_2$  катализом и комплексом ЭДТА с  $Fe^{3+}$  // Биофизика. – 1978. – 23, №2. – С. 234–241.
4. Гуляр С.А., Лиманский Ю.П. Постоянные магнитные поля и их применение в медицине. – К.: Ин-т физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, 2005. – 320 с.
5. Хёрд К.М. Многообразие видов магнитного упорядочивания в твердых телах // УФН. – 1984. – 142, №2. – С. 331–357.
6. Чехун В.Ф., Горобець С.В., Горобець О.Ю. Магніто-впорядковані сполуки ендogenous заліза і проблема впливу постійних магнітних полів на біосистеми // Біофізич. вісн. – 2010. – 29, №2. – С. 123–130.
7. Чехун В.Ф., Шишова Ю.В. Современные взгляды на механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолей // Онкология. – 2000. – 2, №1–2. – С. 11–15.
8. Шпак А.П., Горбик П.П., Чехун В.Ф. Наноконструкты медико-биологического назначения на основе ультрадисперсного магнетита. – В кн.: Физико-химия наноконструктов и супрамолекулярных структур: Сб. тр. / Под ред. А.П. Шпака, П.П. Горбика. – К.: Наук. думка, 2007. – С. 45–87.
9. Andresen T. L., Jensen S. S., Jørgensen K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release // Prog. Lipid Res. – 2005. – 44. – P. 68–97.
10. Aoki H., Yamazaki H., Yohino T., Akagi T. Effects of static magnetic fields on membrane permeability of a cultured cell line // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. – 1990. – 69, №1. – P. 103–106.
11. Arosio P., Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – 33. – P. 457–463.
12. Ayrapetyan S.N., Grigirian K.V., Avanesian A.S., Stambolstian K.V. Magnetic fields alter electrical properties of solutions and their physiological effects // Bioelectromagnetics. – 1994. – 15, № 2. – P. 133–142.

13. Azanza M.J., Del Moral A. Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism // *Prog. Neurobiol.* – 1994. – 44, №6. – P. 517–601.
14. Berridge M.J. Unlocking the secrets of cell signaling // *Annu. Rev. Physiol.* – 2005. – 67. – P. 1–21.
15. Beu T.A. Simulations of Biological Ion Channels in Intense Magnetic Fields // *Physica.* – 2004. – 49. – P. 91–97.
16. Blumenthal N.C., Ricci J., Breger L., Zychlinsky A., Solomon H., Chen G.G., Kuznetsov D., Dorfman R. Effects of low-intensity AC and/or DC electromagnetic fields on cell attachment and induction of apoptosis // *Bioelectromagnetics.* – 1997. – 18, №3. – P. 264–272.
17. Carson J.J., Prato F.S., Drost D.J., Diesbourg L.D., Dixon S.J. Time-varying magnetic fields increase cytosolic free  $Ca^{2+}$  in HL-60 cells // *Amer. J. Physiol.* – 1990. – 259. – P. 687–692.
18. Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery // *Drug Develop. Res.* – 2006. – 67, № 1. – P. 55–60.
19. Eveson R.W., Timmel C.R., Brocklehurst B. Hore P.J., McLauchlan K.A. The effects of weak magnetic fields on radical recombination reactions in micelles // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2000. – 76, №11. – P.1509–1522.
20. Fanelli C., Coppola S., Barone R. Colussi C., Gualandi G., Volpe P., Ghibelli L. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of  $Ca^{2+}$  influx // *FASEB J.* – 1999. – 13, №1. – P. 95–102.
21. Fenske D.B. Cullis P.R. Liposomal nanomedicinas // *Exp. Opin Drug Deliv.* – 2008. – 5, №5. – P. 25–44.
22. Feynman R.P., Leighton R., Sands M. The Feynman lectures on physics, USA: Addison-Wesley. – Vol. 2. – 1963. – Ch. 37.
23. Forcada A., Suárez I., Fernández B. Acute and chronic effects of exposure to a 1-mT magnetic field on the cytoskeleton, stress proteins, and proliferation of astroglial cells in culture // *Environmental. Res.* – 2005. – 98, №3. – P. 355–362.
24. Fortin-Ripoche J.-P., Martina M.S., Gazeau F., Menager C., Wilhelm C., Bacri J.C., Lesieur S., Clement O. Magnetic Targeting of Magnetoliposomes to Solid Tumors with MR Imaging Monitoring in Mice: Feasibility // *Radiology.* – 2006. – 239, №2. – P. 415–424.
25. Funk R.H., Monsees T., Ozkucur N. Electromagnetic effects – From cell biology to medicine // *Prog. Histochem. and Cytochem.* – 2009. – 43, №4. – P. 177–264.
26. Grundler W., Kaiser F., Keilmann F., Walleczek J. Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems // *Naturwissenschaften* - 1992. – 79. – P. 5551–5597.
27. Guiasola C., Desco M., Millan O., Villanueva F.J., Garcia-Barreno P. Biological dosimetry of magnetic resonance imaging // *J. Magn. Reson. Imaging.* – 2002. – 15, №5. – P. 584–590.
28. Hafeli U. Magnetically modulated therapeutic systems // *Int. J. Pharmacol.* – 2004. – 277, №1-2. – P. 19–24.
29. Higashi T., Yamagishi A., Takeuchi A., Kawaguchi N., Sagawa S., Onishi S., Date M. Orientation of erythrocytes in a strong static magnetic field // *Blood.* – 1993. – 82. – P.1328–1333.
30. Hirai T., Nakamichi N., Yoneda Y. Activator protein-1 complex expressed by magnetism in cultured rat hippocampal neurons // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2002. – 292, №1. – P. 200–207.
31. Hiraoka M., Miyakoshi J., Li Y.P., Shung B. Takebe H., Abe M. Induction of c-fos gene expression by exposure to a static magnetic field in HeLaS3 cells // *Cancer Res.* – 1992. – 52, № 23. – P. 6522–6524.
32. Hirose H., Nakahara T., Zhang Q.M., Yonei S., Miyakoshi J. Static magnetic field with a strong magnetic field gradient (41.7T/m) induces c-Jun expression in HL-60 cells // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 2003. – 39, № 8–9. – P. 348–352.
33. ICNIRP. Exposure to static and low frequency electromagnetic fields. – In: *Biological effects and health consequences (0–100 kHz)* // Matthes R., McKinlay A.F., Bernhardt J.H., Vecchia P., Veyret B. (Eds.). – München, Märkl-Druck, 2003.
34. Iino M., Okuda Y. Osmolality dependence of erythrocyte sedimentation and aggregation in a strong magnetic field // *Bioelectromagnetics.* – 2001. – 22, №1. – P. 46–52.
35. Ikehata M., Koana T., Suzuki Y., Shimizu H., Nakagawa M. Mutagenicity and co-mutagenicity of static magnetic fields detected by bacterial mutation assay // *Mutat. Res.* – 1999. – 427. – P. 147–150.
36. Kittel C. Introduction to solid state physics. – New York: Wiley, 1996. – 689 p.
37. Kotani H., Kawaguchi H., Shimoaka T. Iwasaka M., Ueno S., Ozawa H., Nakamura K., Hoshi K. Strong static magnetic field stimulates bone formation to a definite orientation in vitro and in vivo // *J. Bone. Miner. Res.* – 2002. – 17, №10. – P. 1814–1821
38. Kovács-Bálint Z., Csathó A., László J.F., Juhasz P., Hernadi I. Exposure to an inhomogeneous static magnetic field increases thermal pain threshold in healthy human volunteers // *Bioelectromagnetics.* – 2011. – 32, №2. – P. 131–139.
39. Le Chapellier P., Matta B. Cellular perception and static magnetic fields active penetration depth for pain magnetotherapy // *PIERS Online.* – 2010. – 6, №3. – P. 287-292.
40. Lin S.L., Chang W.J., Chiu K.H., Hsieh S.C., Lee S.Y., Lin C.T., Chen C.C., Huang H.M. Mechanobiology of MG63 osteoblast-like cells adaptation to static magnetic forces // *Electromagn. Biol. Med.* – 2008. – 27, №1. – P. 55–64.
41. McCann J., Dietrich F., Rafferty C., Martin A. A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields // *Mutat. Res.* – 1993. – 297. – P. 61–95.
42. Minelli C., Lowe S. B., Stevens M.M. Engineering nanocomposite materials for cancer therapy // *Small.* – 2010. – 6. – P. 2336–2357.
43. Miyakoshi J. The review of cellular effects of a static magnetic field // *Sci. and Technol. Advan. Mat.* – 2006. – 7, № 4. – P. 305–307.
44. Miyamoto H., Yaaguchi H., Ikehara T. Kinouchi Y. Effects of electromagnetic fields on  $K^+$  ( $Rb^+$ ) uptake by HeLa cells. – In: *Biological effects of magnetic and electromagnetic fields* (ed. Ueno S.). New York: Plenum press, 1996. – P. 101–119.
45. Mohtat N., Cozens F.L., Hancock-Chen T., Scaiano J.C., McLean J., Kim J. Magnetic field effects on the

- behavior of radicals in protein and DNA environments // Photochem. Photobiol. – 1998. – **67**, №1. – P. 111–118.
46. Morris C.E., Skalak T.C. Chronic static magnetic field exposure alters microvessel enlargement resulting from surgical intervention // J. Appl. Physiol. – 2007. – 103. – P. 629–636.
  47. Nossol B., Buse G., Silny J. Influence of weak static and 50 Hz magnetic fields on the redox activity of cytochrome-C oxidase // Bioelectromagnetics. – 1993 – **14**, № 4. – P. 361–372.
  48. Nygren P., Larsson R. Overview of the clinical efficacy of investigational anticancer drugs // J. Int. Med. – 2003. – 53, №2. – P. 46–75.
  49. Okano H. Effects of static magnetic fields in biology: role of free radicals // Front Biosci. – 2008. – **13**. – P. 6106–6125.
  50. Okazaki M., Seiyama A., Kon K., Maeda N., Shiga T. Boycott effect with vertical cylinder for paramagnetic red blood cells under the inhomogenous magnetic field // J. Coll. Interface Sci. – 1991. – **146**, №2. – P. 590–593.
  51. Pacini S., Aterini S., Pacini P., Ruggerio C., Gulisano M., Ruggerio M. Influence of static magnetic field on the antiproliferative effects of vitamin D on human breast cancer cells // Oncol. Res. – 1999. – **11**, №6. – P.265–271.
  52. Pacini S., Vannelli G.B., Barni T., Ruggerio M., Sardi I., Pacini P., Gulisano M. Effect of 0.2 T static magnetic field on human neurons: remodeling and inhibition of signal transduction without genome instability // Neurosci. Lett. – 1999. – **267**, №3. – P.185–188.
  53. Papatheofanis F.J. Papatheofanis B.J. Short-term effect of exposure to intense magnetic fields on hematologic indices of bone metabolism // Invest. Radiol. – 1989. – **24**, №3. – P. 221–223.
  54. Park J.W. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment // Breast Cancer Res. – 2002. – 4. – P. 95–99.
  55. Polyak B., Friedman G. Magnetic targeting for site-specific drug delivery: applications and clinical potential // Exp. Opinion on Drug Delivery. – 2009. – **6**, №1. – P. 53–70.
  56. Raguz S, Yagüe E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem // Br. J. Cancer – 2008. - **99**. – P. 387–391.
  57. Ritz T., Thalau P., Phillips J.B., Wiltshcko R., Wiltshcko W. Resonance effects indicate a radical-pair mechanism for avian magnetic compass // Nature. – 2004. – **429**. – P. 177–180.
  58. Rosen A.D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems // Cell Biochem. Biophys. – 2003. – **39**, №2. – P. 163–173.
  59. Rosen A.D. Studies on the Effect of Static Magnetic Fields on Biological Systems // PIERS Online. – 2010. – **6**, №2. – P. 133–136.
  60. Ruggiero M. Static magnetic fields, blood and genes. An intriguing relationship // Cancer Biol. & Therapy. – 2008. – 7, №4. – P. 1–2.
  61. Saunders R. Effects of static magnetic fields relevant to human health // Progr. in Biophys. and Molec. Biol. – 2005. – **87**, №2–3. – P. 225–239.
  62. Sonnier H. Kolomytkin O., Marino A. Action potentials from human neuroblastoma cells in magnetic fields // Neurosci. Lett. – 2003. – **337**, №3. – P. 163–166.
  63. Suzuki Y., Ikehata M., Nakamura K., Nishioka M., Asanuma K., Koana T., Shimizu H. Induction of micronuclei in mice exposed to static magnetic fields // Mutagenesis. – 2001. – **16**, №6. – P. 499–501.
  64. Teodori L., Grabarek J., Smolewski P. Ghibelli L., Bergamaschi A., de Nicola M., Darzynkewicz Z. Exposure of cells to static magnetic field accelerates loss of integrity of plasma membrane during apoptosis // Cytometry. 2002. – **49**, № 3. – P. 113–118.
  65. Tofani S., Barone D., Cintorino M., de Santi M.M., Ferrara A., Orlassino R., Ossola P., Peroglio F., Rolfo K., Ronchetto F. Static and ELF magnetic fields induce tumor growth inhibition and apoptosis. – Bioelectromagnetics. – 2001. – **22**, №6. – P. 419–428.
  66. Torbet J., Ronziere M.-C. Magnetic alignment of collagen during self-assembly // Biochem. J. – 1984. – **219**. – P. 1057–1060.
  67. WHO, Environmental Health Criteria 232. Static Fields. – WHO, 2006. – 369 p.
  68. Xu C., Fan Z., Chao Y.-L., Du L., Zhang F.Q. Magnetic fields of 10mT and 120mT change cell shape and structure of F-actins of periodontal ligament cells // Bioelectrochemistry. – 2008. – **72**, №1. – P. 41–46.
  69. Yang J., Lee J., Kang J, Oh S.J., Ko H.-J., Son J.-H., Lee K., Suh J.S., Huh J.M. Smart Drug-Loaded Polymer Gold Nanoshells for Systemic and Localized Therapy of Human Epithelial Cancer // Advanc. Mater. – 2009. – **21**, № 43. – P. 4339–4342.
  70. Zhang Q.M., Tokiwa M., Doi T., Nakahara T., Chang P.W., Nakamura N., Hori M., Miyakoshi J., Yonei S. Strong static magnetic field and the induction of mutations through elevated production of reactive oxygen species in Escherichia coli soxR // Int. J. Radiat. Biol. – 2003. – **79**. – P.281–286.
  71. Zmyslony M., Palus J., Jajte J., Dziubaltowska E. Rajkowska E. DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7 mT magnetic fields (static or 50 Hz) // Mutat. Res. – 2000. – **453**. – P. 89–96.

Н.В. Макогон, **І.М. Алексєєва**

## Полі(АДФ-рибозо) полімераза-1: фізіологічна та патофізіологічна роль

*Полі(АДФ-рибозо) полімераза (ПАРП) – родина із 18 ферментів, знайдених практично у всіх еукаріотів. ПАРП-1, найбільш розповсюджена ізоформа, активується при розривах ДНК і здійснює посттрансляційну модифікацію білків. Фермент синтезує ланцюги полімеру АДФ-рибози та приєднує їх до гістонів, білків репарації ДНК, транскрипційних факторів тощо. Встановлена важлива роль ПАРП-1 у підтримці стабільності геному. За надмірної активації ферменту проявляється його патологічна роль. ПАРП-1 задіяна в ушкодження тканин і є ключовим медіатором клітинної загибелі за умов окислативного стресу, ішемії й ушкодження ДНК. Участь ПАРП-1 у запаленні пов'язана як з посиленням некрозу, так і з активацією експресії прозапальних генів. Інгібування ПАРП виявляло значний протективний ефект при моделюванні патології серцево-судинної системи, запальних і аутоімунних захворювань. Інгібітори ПАРП також мають протипухлинну дію, вони підвищують чутливість ракових клітин до ДНК-ушкоджувальних агентів. ПАРП-1 видається перспективною терапевтичною мішенню.*

*Ключові слова: ПАРП, стабільність геному, загибель клітин, запалення, інгібітори ПАРП.*

В останні роки зросла увага до полі(АДФ-рибозо) полімерази (ПАРП) – ферменту, який каталізує утворення ланцюгів полі(АДФ-рибози) на білках. Це зумовлено як важливим фізіологічним значенням ПАРП, так і встановленням ролі її гіперактивації в розвитку патологічних процесів, що дало змогу розглядати цей фермент як мішень для терапевтичних заходів.

### ФІЗІОЛОГІЧНА РОЛЬ ПАРП

АДФ-рибозилування є оборотною посттрансляційною модифікацією, яка регулює активність білків-мішеней. При полі-АДФ-рибозилуванні негативно заряджені лінійні або розгалужені молекули полімеру АДФ-рибози (ПАР) приєднуються до акцепторних білків. Така модифікація білків залучена в широкий спектр фізіологічних процесів у клітині, включаючи репарацію ДНК, транскрипцію генів, регулювання клітинного циклу, проліферацію, диференціацію та загибель клітин

[1, 4, 7, 23, 38]. Ферменти родини ПАРП (КФ 2.4.2.30), яка складається з 18 білків з гомологічним каталітичним доменом, здійснюють синтез ПАР із нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАД<sup>+</sup>). Значна кількість ПАРП наявна в ядрах, їх активність виявлена в клітинах всіх вищих і більшості нижчих еукаріотів. Крім каталітичного, представники родини ПАРП мають широкий спектр структурних і функціональних доменів, внаслідок чого ензими виконують різні фізіологічні функції [7, 48, 61]. Найкраще досліджений фермент ПАРП-1 є найбільш поширеною ізоформою цієї родини ферментів. Він утворює більше ніж 90 % від усіх ПАР [23]. Встановлено два різні шляхи активації ПАРП-1: 1) залежний від ушкодження ДНК і 2) опосередкований посттрансляційною модифікацією ферменту [6, 68]. Інший представник родини, ПАРП-2, також активується при ушкодженні ДНК і має функціональну та структурну подібність до ПАРП-1 [7, 56, 65].

За катаболізм полімерів АДФ-рибози

© Н.В. Макогон, **І.М. Алексєєва**



відповідають ПАР-глікогідролаза і АДФ-рибозил-ліаза. Швидкий синтез і розщеплення ПАР зумовлюють короткий період напіврозпаду полімеру. Інтенсивний обмін ПАР свідчить про активне регулювання його вмісту в клітині за фізіологічних умов та при клітинному стресі. Деградація починається відразу після ініціації синтезу полімеру [6, 86]. Існує два механізми полі-АДФ-рибозилування білків: 1) ковалентне зв'язування ПАР, що здійснюється ферментом ПАРП і 2) нековалентне приєднання полімерів АДФ-рибози, які утворюються у полі(АДФ-рибозо)-глікогідролазній реакції. ПАРП-1 проявляє 3 види ферментативної активності: ініціація АДФ-рибозилування субстрату, елонгація полімеру та розгалуження полімеру. Молекула ПАРП-1 (113 кДа) включає такі основні функціональні домени: 1) N-кінцевий домен, що зв'язує ДНК, який містить два структурних „цинкових пальці” і розпізнає одно- та двониткові розриви ДНК; 2) центральний домен, що відповідає за білок-білкові взаємодії та за транспорт ферменту через ядерну пору, він здатний до аутомодифікації; 3) C-кінцевий каталітичний НАД<sup>+</sup>-зв'язувальний домен [7, 23]. Більшість фізіологічних субстратів полі-АДФ-рибозилування – ядерні білки, які задіяні в підтриманні архітектури хроматину та метаболізмі нуклеїнових кислот: гістони, негістонові структурні компоненти хроматину, транскрипційні фактори, ядерні ферменти тощо. Вони мають специфічний ПАР-зв'язувальний структурний мотив з 20–26 амінокислот [54]. Полі-АДФ-рибозилування збільшує негативний заряд і розміри акцепторних білків, внаслідок чого змінюються їх функціональні властивості. Одним з основних акцепторів ПАР є сама ПАРП. Приєднання полімерів АДФ-рибози призводить до аутомодифікації ферменту та зниження його активності [7, 23]. Важливим механізмом здійснення функцій ПАРП-1 є рибозилування гістонів, що спричиняє збільшення їх негативного заряду і відштовхування від ДНК. Це призводить до деконденсації полінуклеосом, внаслідок чого ДНК

стає доступною для протеїнів „риштування” та ензимів, задіяних у репарації і метаболізмі ДНК: XRCC1 (від англ. X-ray repair cross-complementing group-1), ДНК-лігази III, ДНК-полімерази- $\beta$ , нуклеаз тощо. Полі-АДФ-рибозильований деконденсований хроматин може знову конденсуватися ферментом, який розщеплює ПАР. Така модуляція структури хроматину (оборотна релаксація) дуже важлива, оскільки від архітектури хроматину залежать процеси транскрипції, реплікації та репарації ДНК [1, 38, 48, 86].

Наявність систем, що сигналізують про ушкодження ДНК, є критичною для підтримання цілісності геному. Фермент ПАРП-1 називають молекулярним сенсором генотоксичного стресу [54]. Його активація та синтез ПАР із НАД<sup>+</sup> – одна з перших реакцій клітини на ушкодження ДНК, викликане оксидативним або нітрозативним стресом, іонізуючою радіацією, ДНК-алкілюючими агентами тощо. ПАРП-1 є інтегральним компонентом мультибілкового комплексу, який здійснює ексцизійну репарацію азотистих основ ДНК; інгібування ПАРП-1 призводить до пригнічення активності цього комплексу [14, 54]. За допомогою „цинкових пальців” фермент розпізнає ділянки розривів ДНК. Дві молекули ПАРП-1 утворюють гомодимери в місцях ушкодження ДНК, що індукує активацію ферментативної активності, синтез і приєднання ланцюгів ПАР до білків [6, 23]. За моделлю Lindahl та співавт. [51], довгі ланцюги ПАР маркують місця розривів ДНК та направляють до цих діянок ферменти репарації. Сама ПАРП-1 підлягає аутомодифікації в результаті приєднання полімерів АДФ-рибози. За певного критичного рівня аутомодифікації комплекс ПАРП-1 з ДНК розпадається й ензим стає неактивним. Репарація ДНК відбувається після дисоціації комплексу модифікованої ПАРП-1 – ДНК [51]. Крім того, ПАРП-1 деконденсує хроматин внаслідок рибозилування гістонів H1 і корових гістонів [7, 48]. Це призводить до відкривання фрагмента ДНК у безпосередній близькості до місця ушкодження. Вста-



новлено також, що крім участі у репарації, ПАРП-1 передає сигнал низці білків, які здійснюють координовану відповідь клітини на ушкодження ДНК, зокрема призводить до швидкої акумуляції білка р53, активації його зв'язування з ДНК і транскрипційної активності. Затримка клітинного циклу, індукована активацією р53, забезпечує необхідний для репарації ДНК час [54, 88]. Таким чином, однією з найважливіших фізіологічних функцій ПАРП-1 є участь у підтриманні стабільності і цілісності геному (рисунок). За умов дії факторів, що ушкоджують ДНК, інгібування ПАРП спричинює дефекти репарації ДНК, частіше утворення мікроядерць, анеуплоїдію, генну ампліфікацію та делецію, збільшення плідності клітин і кількості центросом, посилення обміну між ділянками сестринських хроматид [3, 22, 25, 56, 77].

Хоча історично дослідження функцій ПАРП-1 були сфокусовані на репарації ДНК, нині встановлено ключову роль ферменту в транскрипції генів, реплікації ДНК, рекомбінації хромосом, мітозі, проліферації та загибелі клітин. Зазначені функції можуть реалізуватися як у результаті полі-АДФ-рибозилування, так і завдяки прямим протеїн-протеїновим взаємодіям або через активацію клітинних сигнальних систем, що реалізуються за участю ПАРП-1 в ядрі. ПАРП-1 бере участь у транскрипції ДНК і може регулювати її як позитивно, так і негативно в залежності від гена. Методом ДНК-мікрочіп-технології встановлено, що 91 ген (з 11 тисяч) по-різному експресований у фібробластах дикого типу та в ПАРП<sup>-/-</sup> фібробластах; зменшувалася експресія генів, які беруть участь у репарації та реплікації ДНК, регуляції клітинного циклу та мітозі [77]. Одним з механізмів залучення ферменту в процеси транскрипції є зміни архітектури хроматину, його деконденсація за умов рибозилування гістонових білків, що призводить до змін у доступності ДНК [38, 54]. Дослідження локалізації ПАРП-1 показали, що фермент зв'язаний з промоторами більшості генів, які активно транскрибуються. Також виявлено, що ПАРП-1

рибозилує низку транскрипційних факторів або вступає у білок-білкові взаємодії з ними [1, 39, 48]. Встановлена кофакторна активність ПАРП-1 при утворенні преініціювального комплексу, яка стимулює транскрипцію, здійснювану РНК-полімеразою II. У цьому ефекті був задіяний не каталітичний, а ДНК-зв'язувальний домен ферменту [55]. Численними експериментами показано, що ПАРП-1 *in vivo* та *in vitro* посилює транскрипцію, опосередковану факторами сімейства AP-1 (від англ. activator protein 1) і NF-κB (від англ. nuclear factor kappa-B), які є ключовими для імунної та запальної реакцій [8, 17, 34, 37, 64, 94]. Однак є дані, що ПАРП-1 може як активувати, так і пригнічувати транскрипцію деяких NF-κB-залежних генів [15, 34, 94]. Отримані докази, що ПАРП-1 активується не тільки розривами ДНК. Фермент задіяний в опосередкованих полі-АДФ-рибозилуванням сигнальних шляхах, незалежних від ушкодження ДНК [6, 38]. Він бере участь у сигналзалежній регуляції генів як кінцевий пункт стероїдних, ретиноїдних, нейрогенних та інших гормональних сигнальних шляхів [48], наприклад, він є інгібітором транскрипції, залежної від ядерного ретиноїдного X-рецептора та рецептора тиреоїдного гормону [57]. Таким чином, механізми, за якими ПАРП-1 змінює транскрипцію генів за відсутності ушкодження ДНК, різноманітні та залежать від конкретних генів. Однак при наявності розривів ДНК працює універсальний механізм полі-АДФ-рибозилування базальних транскрипційних факторів, яке призводить до загального пригнічення транскрипції, що важливо для запобігання експресії ушкоджених генів [23]. Згідно з іншою моделлю, в умовах генотоксичного стресу ПАРП-1 релокалізується з промоторів генів у місце розривів ДНК, що могло б пояснити значне зменшення транскрипції, яке спостерігається у відповідь на ушкодження ДНК [48]. Можливо також, що деякі клітинні сигнальні шляхи можуть використовувати регульоване видалення ПАРП-1 від промоторів для інгібування експресії генів [48].

Встановлена пряма активна роль ПАРП-1 у процесі реплікації ДНК. Цей фермент задіяний в мультипротейному комплексі – ДНК-синтесомі. ПАРП-1 модулює активність синтесоми, здійснюючи полі-АДФ-рибозилування її білків, що показано для такого важливого білка синтесоми, як PCNA (від англ. proliferating cell nuclear antigen) [23, 86]. Було виявлено, що полі-АДФ-рибозилування впливає на старіння клітин *in vitro* через регуляцію теломеразної активності та довжини теломер. Охарактеризовано окремий тип ферментів з родини ПАРП – танкираз, які локалізуються в теломерах і рибозилують фактори, що регулюють довжину теломер. Найбільш досліджені танкирази 1 і 2 є позитивними регуляторами довжини теломер у клітинах людини. Надекспресія танкирази-1 сприяє елонгації теломер; вважають, що фермент входить в теломеразний комплекс і регулює доступність теломерази для цього комплексу [19, 40, 78]. У клітинах ПАРП<sup>-/-</sup> мишей посилювалася нестабільність хромосом і значно зменшувалася довжина теломер порівняно з контролем [22]. Враховуючи роль ПАРП у стабілізації геному та регуляції довжини теломер, виникає питання, чи впливає цей фермент на тривалість життя. Був виявлений сильний позитивний кореляційний зв'язок між активністю ПАРП у мононуклеарах крові та тривалістю життя у 13 видів ссавців, які живуть від 4 до 120 років [32]. У нокаутних за геном ПАРП-1 мишей зменшується тривалість життя, пришвидшується старіння з більш інтенсивним підвищенням маси тіла, особливо після 20 міс життя, прискорюється статеве дозрівання та більш виражені вікові порушення естральної функції [3]. Зниження експресії ПАРП може бути раннім фактором, який бере участь у патогенезі раку та пов'язаних із віком захворювань [3, 6, 77]. Наведені дані свідчать про досягнутий значний прогрес у встановленні фізіологічної ролі полі-АДФ-рибозилування, однак для отримання цілісної картини участі ПАРП в життєдіяльності клітини потрібні подальші

глибокі дослідження. Це особливо стосується питання, як інтегруються та контролюються в клітинах численні різноманітні функції цього ферменту.

Конститутивний рівень активності ПАРП-1 низький. При розривах ниток ДНК (за умов дії мітогенних стимулів або генотоксичного стресу) активність може збільшуватися у 10–500 разів залежно від інтенсивності ушкодження [23, 38]. При незначному ушкодженні ПАРП-1 призводить до репарації ДНК та виживання клітин. При значній кількості розривів ДНК спостерігається надмірна активація ПАРП-1 і починає проявлятися патологічна роль ферменту (див. рисунок).

## РОЛЬ ПАРП У ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН

Численні дані свідчать, що ПАРП-1 відіграє критичну роль у загибелі клітин в умовах ушкодження ДНК при оксидативному та нітрозативному стресі, ексайтотоксичності, ішемії тощо. Це показано як для некрозу, так і для умов запрограмованої загибелі – апоптотичної (залежної від каспаз), незалежної від каспаз та аутофагічної [12, 24, 33, 42, 89]. Суїцидальний шлях, викликаний надмірною активацією ПАРП-1, був закріплений еволюцією багатоклітинних організмів, оскільки дає змогу видаляти клітини, що зазнали значного генотоксичного стресу і внаслідок цього мають ризик неопластичної трансформації [30].

Дослідженнями з використанням інгібіторів ПАРП-1 і нокаутних за геном ПАРП-1 мишей встановлено участь цього ферменту в некротичній загибелі клітин [5, 33, 58, 66, 82]. Було запропоновано так звану „суїцидальну” модель, згідно з якою при впливі на клітину значної кількості чинників, що ушкоджують ДНК, відбувається гіперактивнація ПАРП, підвищення синтезу ПАР і, відповідно, зменшення НАД<sup>+</sup> [10]. Для ресинтезу НАД<sup>+</sup> використовується АТФ, пул якого в клітинах, таким чином, виснажується. Це може викликати енергетичну катастрофу,

порушення функцій клітин та їх некротичну загибель. На багатьох типах клітин показано, що при оксидативному стресі, викликаному перекисом водню ( $H_2O_2$ ) та іншими чинниками, підвищувалася активність ПАРП і значно знижувався вміст внутрішньоклітинних  $НАД^+$  і АТФ. При цьому клітини гинули за некротичним шляхом, а інгібування ферменту зменшувало загибель (некроз або некроз і апоптоз залежно від експериментальних умов) [13, 18, 33, 66, 84]. Було доведено, що виснаження цитозольного  $НАД^+$  є і необхідним і достатнім для ПАРП-1-опосередкованої загибелі деяких типів клітин [5, 18]. Однак нині існують дані, які суперечать вищевикладеній „суїцидальній” гіпотезі. Виснаження  $НАД^+$  не обов'язково є головним фактором у ПАРП-1-індукованій загибелі. Активація ПАРП-1 і утворення полімерів АДФ-рибози можуть здійснювати пряму дію на мітохондрії, призводячи до їх дисфункції, зменшення синтезу АТФ і до некрозу клітин [30, 61, 89]. Один із встановлених механізмів впливу на мітохондрії включає катаболізм синтезованих ПАРП-1 полімерів АДФ-рибози з утворенням АМФ, що зменшує синтез АТФ (через конкуренцію АМФ з АДФ за зв'язування з АТФ/АДФ транслоказаю) [30]. Питання про те, чи є виснаження клітинного  $НАД^+$  необхідною і достатньою подією для здійснення ПАРП-1-опосередкованої загибелі, лишається дискусійним [5, 24, 30]. Nagaz та співавт. [36] зауважують, що вміст  $НАД^+$  в мітохондріях не знижується за умов дії деяких генотоксичних стресорів, тож потрібно визначати субклітинний, а не тотальний його вміст. Внесок реакцій полі-АДФ-рибозилування і, відповідно, ПАРП-1 у некротичну загибель залежить від ушкоджувального чинника, типу клітин та їх метаболічного статусу. Ці реакції важливі для опосередкованої оксидативним і нітрозативним стресом загибелі епітеліальних, ендотеліальних і деяких видів нейрональних клітин [5, 13, 33, 44, 58]. Водночас некроз гепатоцитів при їх оксидативному ацетамінофеніндукованому ураженні не за-

лежить від ПАРП [20]. Донедавна вважалося, що некроз є пасивним і неконтрольованим процесом, який, на відміну від апоптозу, не може бути модульованим фармакологічними засобами. Однак дослідження останніх років доводять, що інгібування або відсутність ПАРП-1 забезпечують значну протекцію при моделюванні таких захворювань, як інсульт, інфаркт міокарда, аутоімунний гломерулонефрит тощо, пов'язаних з переважно некротичним шляхом клітинної загибелі [44, 68, 69, 82, 86].

Нині активно вивчається участь ПАРП-1 в апоптотичній загибелі. В культурах багатьох видів клітин на ранніх стадіях апоптозу спостерігалася тимчасова сильна активація ПАРП-1 з накопиченням ПАР [86, 87]. Рання активація ПАРП-1 може брати участь у апоптотичному каскаді, наприклад, внаслідок регуляції p53 або сприяння виходу АІФ (від англ. apoptosis inducing factor) з мітохондрій [87, 88, 89]. Вважають, що полі-АДФ-рибозилування протеїнів хроматину на ранніх стадіях апоптозу сприяє міжнуклеосомній фрагментації ДНК за рахунок збільшення доступу ДНК для ендонуклеаз. Однак надалі апоптотичні ферменти каспази здійснюють протеолітичне розщеплення ПАРП-1 у N-термінальній частині молекули. Внаслідок цього фермент інактивується, що запобігає репарації ДНК при розвитку апоптозу [86]. Апоптоз і некроз, які вважалися раніше альтернативними шляхами, нині розглядаються як крайні прояви клітинної загибелі, між якими існує багато проміжних форм і стадій. Шлях апоптозу чи некрозу визначається метаболічним статусом клітин, типом і силою ушкодження. Відомо, що завершення апоптозу цілком залежить від наявності енергетичних ресурсів, а вміст  $НАД^+$  і АТФ розглядається як важлива детермінанта шляху загибелі. АТФ є необхідним для активації каспаз, конденсації хроматину, фрагментації ДНК, гідролізу макромолекул, фрагментації ядра, транслокації фосфатидилсерину та формування апоптотичних тілець. При

недостатності енергетичних ресурсів тип клітинної загибелі перемикається з апоптозу на некроз. Тому ПАРП-1, який використовує НАД<sup>+</sup> як субстрат, може бути молекулярним „перемикачем” між апоптозом і некрозом [66, 86, 87]. Показано, що вилучення гена ПАРП-1 або підтримка клітинного енергетичного рівня інгібуванням цього ферменту переводить клітинну загибель з некротичного на апоптотичний шлях [33, 66, 82, 84]. Оскільки протеоліз ПАРП-1 запобігає виснаженню АТФ, розщеплення ПАРП-1 каспазами – це механізм захисту від опосередкованого активацією цього ферменту виснаження НАД<sup>+</sup> і АТФ, який виник і еволюційно закріпився у еукаріотів [23].

Низкою досліджень доведено наявність окремої ПАРП-1-залежної загибелі клітин, яка має деякі морфологічні риси, подібні до апоптозу, однак не залежить від активації апоптотичних ферментів – каспаз [5, 24, 36, 89]. Хоча такий тип загибелі більшою мірою досліджений на клітинах центральної нервової системи, є дані, що він існує і в інших органах. Встановлено посилення «незалежного від каспаз апоптозу» при гіперактивації ПАРП-1 і пригнічення такої загибелі в клітинах нокаутних за ПАРП-1 мишей або при інгібуванні ферменту [61, 92]. Синтезований ПАРП полімер АДФ-рибози є потужним сигналом смерті, його дія опосередковується АІФ. АІФ – еволюційно консервативний флавопротеїн, локалізований у міжмембранному просторі мітохондрій; він може як спричиняти клітинну загибель, так і проявляти протективні функції. В експериментах з виключенням гена АІФ методом РНК-інтерференції, а також із застосуванням анти-АІФ-антитіл доведено, що цей фактор є ключовим для ПАРП-1-залежної загибелі [61, 89, 92]. На культурах астроцитів було встановлено, що виснаження НАД<sup>+</sup> є ключовою подією для інгібування гліколізу, вивільнення АІФ і ПАРП-1-опосередкованої загибелі нейронів, а відновлення пулу НАД<sup>+</sup> у клітинах має нейропротективну дію [5]. ПАРП-1 призводить, за думкою Alano та співавт. [5], як

до виснаження НАД<sup>+</sup>, так і до вивільнення АІФ, але причинно-наслідкові відношення цих двох подій потребують детальних досліджень. Припускається, що утворені при надмірній активації ПАРП-1 вільні полімери ПАР або полі-АДФ-рибозильовані акцепторні білки транспортуються з ядер у цитозоль і далі в мітохондрії, де вони взаємодіють з АІФ, викликаючи його вихід з мітохондрій [61, 92]. Механізми ПАРП-1-індукованого вивільнення АІФ та його транслокації в ядро досліджені недостатньо. В ці процеси можуть бути залучені продукція активних форм кисню (АФК), відкриття мітохондріальних пор, проапоптотичний білок сімейства Bcl-2-Вах, кальційзалежні цистеїнові протеази кальпаїни [12, 36, 61]. Транслокація АІФ в ядра призводить до конденсації хроматину та фрагментації ДНК. Механізм цього процесу не встановлено, однак припускають залучення активації ендонуклеаз [12, 89]. Клітинну загибель, опосередковану ПАРП-1 і вивільненням АІФ з мітохондрій, запропоновано називати „партанатоз” (parthanatos, par – від poly-ADP-ribose і thanatos – уособлення смерті у грецькій міфології) [36]. При партанатозі фосфатидилсерин транслокується на зовнішній бік плазматичної мембрани, знижується мембранний потенціал мітохондрій, спостерігається конденсація хроматину та фрагментація ДНК на великі частини – близько 50 тисяч пар нуклеотидів. На відміну від апоптозу, при цьому не утворюються малі фрагменти ДНК і не формуються апоптотичні тільця. Інгібітори каспаз не запобігають партанатозу [89, 92]. Хоча при цій ПАРП-1-опосередкованій загибелі може порушуватися мембранна цілісність, але набряку клітин, подібного до некротичного, не спостерігається [92]. Інша група дослідників класифікує клітинну загибель, яка спричиняється ушкодженням ДНК з наступною активацією ПАРП-1, кальпаїнів і АІФ і супроводжується втратою цілісності плазматичної мембрани, як АІФ-опосередкований програмований некроз [12]. Викликана активацією ПАРП-1 АІФ-залежна клітинна загибель відрізняється також і від аутофагіч-



ної, за якої формуються аутофагічні вакуолі і відбувається лізосомальна деградація [89].

Нині активно досліджується залучення ПАРП-1 у процеси аутофагії, яка відіграє важливу роль у фізіологічних і патологічних процесах, у тому числі при оксидативному стресі, сприяючи або виживанню, або загибелі клітин. Встановлено, що аутофагія бере участь у незалежній від каспаз загибелі деяких типів клітин, індукованій АФК. На інших експериментальних моделях, навпаки, виявлено її цитопротективну роль при АФК-індукованій загибелі [36, 41, 42, 91]. Було показано, що активація ПАРП-1 передує утворенню аутофагічних тілець у макрофагах [91]. Пригнічення аутофагії інгібувало ПАРП-опосередковану загибель цих клітин. З іншого боку, блокування активації ПАРП-1 (хімічними інгібіторами або за допомогою РНК-інтерференції) послаблювало  $H_2O_2$ -індуковану аутофагію в культивованих клітинах. Сигнальний шлях, який пов'язує активацію ПАРП-1 і посилення аутофагії за даних умов, включає в себе АМФ-активовану протеїнкіназу [42]. Запропоновано гіпотезу щодо подвійної ролі ПАРП-1 у модуляції аутофагії та некрозу при оксидативному стресі та ушкодженні ДНК: з одного боку, гіперактивація ПАРП-1 спричиняє виснаження АТФ і некротичну загибель, а з іншого – посилює аутофагію, що сприяє виживанню клітин. Вирішення питання – життя або смерть клітини – залежить від балансу між аутофагією та некрозом, опосередкованими різними шляхами [41].

Відповідно до концепції Virag і Szabo [86], є три основні шляхи для клітин з ушкодженням ДНК залежно від інтенсивності генотоксичного впливу. Помірні впливи призводять до активації ПАРП-1, що подає сигнал до затримки клітинного циклу і до репарації ДНК. За таких умов клітина виживає без ризику передачі мутантних генів (див. рисунок). Більш інтенсивне ушкодження ДНК запускає апоптоз, при якому каспази розщеплюють ПАРП-1, щоб фермент не активувався у відповідь на фрагментацію ДНК

і не зменшував енергетичні ресурси клітини. Однак за надмірної активації ПАРП-1 виснажуються  $НАД^+$  та АТФ, клітини гинуть за некротичним шляхом. Крім того, активація ПАРП-1 може запускати партанатоз, особливий ПАРП-1-опосередкований, залежний від АІФ шлях клітинної загибелі [36, 89].

## РОЛЬ ПАРП В АКТИВАЦІЇ ЗАПАЛЬНИХ РЕАКЦІЙ

При багатьох захворюваннях за первинним ушкодженням тканин виникають хвилі сигналів, які призводять до запальної відповіді, що може значно обтяжувати ураження. Нині вважають, що ПАРП-1 відіграє суттєву роль у розвитку цієї другої фази [46, 69, 86]. Існує два основні шляхи участі ПАРП-1 у запальних процесах (див. рисунок): 1) через ПАРП-1-опосередковану дисфункцію або загибель клітин; 2) через експресію цитокінів та інших медіаторів запалення [7, 34, 48, 69, 87].

Важливим механізмом впливу ПАРП-1 на розвиток запалення є пронекротична дія ферменту: його гіперактивація викликає перемикання загибелі з апоптозу на некроз. Партанатоз також часто супроводжується втратою цілісності плазматичної мембрани, що характерно для некрозу. Існує припущення, що помірний ПАРП-1-опосередкований некроз може бути протективним для організму. Він викликає обмежене запалення, яке чинить стимулювальний ефект на імунну систему. Це корисно для захисту від деяких вірусних інфекцій або навіть раку. Крім того, активація ПАРП-1 спричиняє загибель клітин із значними ушкодженнями ДНК і сприяє їх видаленню внаслідок рекрутування фагоцитів. Однак посилення некрозу є патогенетичним фактором при багатьох захворюваннях [12, 23, 86]. Некротичний лізис викликає запалення кількома шляхами: 1) фагоцити при поглинанні залишків некротичних клітин проявляють прозапальну та імуностимулювальну дію. При фагоцитозі апоптотичних клітин, як правило, інгібуються прозапальні й утворюються антизапальні цитокіни та



ейкозаноїди [29, 49, 75]; 2) клітини, які гинуть шляхом некрозу, можуть провокувати запалення через активну секрецію власних запальних молекул [49, 75]; 3) при некротичному протеолізі білків можуть утворюватися аутоантигени. Молекули та клітинний дебрис поглинаються антиген-представляючими клітинами, які здатні провокувати імунне запалення та аутоімунну відповідь [29]; 4) при некрозі вивільняються такі біорегуляторні прозапальні молекули, як еластаза, мієлопероксидаза тощо, в тому числі білок HMGB1 (від англ. high-mobility group box 1). Це негістоновий ядерний протеїн, який діє як потужний запальний цитокін. При надходженні в позаклітинний простір він виступає як сигнал для оточуючих тканин про некротичний статус клітин [29, 38, 75].

Інший механізм участі ПАРП-1 у розвитку запалення пов'язаний з його роллю в реалізації відповідних сигнальних шляхів. ПАРП-1 *in vivo* та *in vitro* посилює транскрипцію генів, опосередковану транскрипційними факторами сімейств NF- $\kappa$ B, AP-1 і NF $\kappa$ B (від англ. Nuclear factor- $\kappa$ B-inducible factor  $\alpha$ ), які відіграють ключову роль у запальній відповіді та розвитку імунних реакцій і є визначальними в патогенезі багатьох захворювань [46, 85, 87, 94]. Знайдено паралелізм активації ПАРП-1 і NF- $\kappa$ B при запальних і імунних процесах. ПАРП-1 є транскрипційним корегулятором NF- $\kappa$ B в сигнальних шляхах від Toll-подібних рецепторів [37, 48]. Фармакологічне інгібування або відсутність гена ПАРП-1 зменшували запалення, експресію NF- $\kappa$ B-залежних генів і синтез відповідних молекул: інтерлейкінів IL-1, IL-6, IL-8, фактора некрозу пухлин альфа (ФНП- $\alpha$ ), інтерферону  $\gamma$  (ІФН- $\gamma$ ); молекул адгезії та хемокінів (ICAM-1 – від англ. Intercellular adhesion molecule-1, P-селектину, E-селектину, MIP-1 – Macrophage inflammatory protein-1, MIP-2, MCP-1-monocyte chemoattractant protein-1); індукцибельних ферментів (iNOS та циклооксигенази), матриксних металопротеїназ. Це було показано на експериментальних

моделях системної ендотоксемії [52, 64, 85], аутоімунного енцефаломієліту [17, 76], аутоімунного нефриту [44], ревматоїдного артрити [31], контактної гіперчутливості [9], хронічного коліту [43], при ішемії–реперфузії печінки [45] та мозку [47], при атеросклерозі у мишей [35, 66], а також на багатьох типах клітин у культурі [13, 15, 34, 62, 90]. Отримані дані дали змогу встановити, що ПАРП-1 є транскрипційним коактиватором NF- $\kappa$ B та зв'язувальною ланкою між енергетичним метаболізмом і запаленням [37, 48, 64]. При ушкодженні ДНК клітин за умов оксидативного та нітрозативного стресу активується як ПАРП-1, так і NF- $\kappa$ B. Це сприяє посиленню синтезу, поряд з іншими прозапальними чинниками, ФНП- $\alpha$ . Цей цитокін у свою чергу активує NF- $\kappa$ B (див. рисунок). Наслідком такого зворотного зв'язку є значне посилення запалення [46, 64]. Ще один, пов'язаний з ПАРП-1, прозапальний позитивний зворотний зв'язок здійснюється в результаті NF- $\kappa$ B-опосередкованої експресії iNOS, що поглиблює оксидативний та нітрозативний стрес клітин та призводить у свою чергу до активації ПАРП-1 і NF- $\kappa$ B [6, 13, 69].

Незважаючи на значні зусилля, не вироблено єдиної концепції, як саме ПАРП-1 здійснює модуляцію NF- $\kappa$ B-опосередкованої транскрипції генів – внаслідок полі-АДФ-рибозилування білків, прямої білок-білкової взаємодії чи за іншим механізмом [1, 6, 34, 37, 51, 62]. Можливо, що в регуляції експресії різних генів задіяні різні механізми. Є дані, що аутомодифікація ПАРП-1 посилює формування комплексу NF- $\kappa$ B з ДНК та підвищує NF- $\kappa$ B-опосередковану транскрипцію [62]. Останнім часом показана участь ПАРП-1 в активації прозапальних сигнальних каскадів, включаючи JNK та p38 MAP-кінази (від англ. c-jun N-terminal kinases, p38-Mitogen-activated protein kinases), а також, крім NF- $\kappa$ B, інших прозапальних транскрипційних факторів: AP-1, Sp-1 (від англ. Specificity Protein 1), Oct-1 (від англ. Octamer transcription factor-1) та STAT-1 (від англ. Signal transducer and

activator of transcription-1) [8, 17, 34, 85, 94]. Таким чином, пригнічення активації ПАРП-1 послаблює патологічний процес значною мірою через зменшення транскрипції прозапальних медіаторів. На сьогодні визначено також, що антизапальна дія інгібіторів ПАРП-1 може бути пов'язана з активацією протективних кіназних каскадів. Дані, отримані на ПАРП-1<sup>-/-</sup>-мишах, свідчать, що цей фермент залучений у патогенез ішемії–реперфузії міокарда не тільки внаслідок посилення активації прозапального AP-1, але й через пригнічення активації транскрипційного фактора HSF-1 (від англ. Heat shock factor-1) і, відповідно, експресії кардіопротективного білка HSP70 (від англ. heat shock protein) [94]. Інгібітори ПАРП-1 за умов септичного шоку зменшують запалення, вірогідно, внаслідок активації фосфатидилінозитол-3-кіназа/Akt шляху, який послаблює активацію прозапальних транскрипційних факторів [85]. За ішемії мозку у щурів інгібітор ПАРП 3-амінобензамід (3-ABA) зменшував експресію прозапальних цитокінів і водночас посилював сигнали, направлені на виживання клітин (фосфорилування протеїнкінази Akt і GSK-3 – Glycogen synthase kinase 3), що сприяло зменшенню зони інфаркту та клітинної загибелі [47].

Встановлено ключову роль ПАРП-1 в активації клітин-ефекторів запалення та їх міграції в ушкоджені тканини, зокрема, завдяки посиленню експресії генів молекул міжклітинної адгезії та хемокінів [35, 68, 86]. Показано зменшення лейкоцитарної інфільтрації уражених тканин у нокаутних за геном ПАРП-1 мишей та при дії інгібіторів ферменту за умов ішемії–реперфузії міокарда [68], печінки [45, 82], при ушкодженні легенів [13, 21], за умов зимозан- та карагенаніндукованого запалення та множинного ушкодження органів [80], при ревматоїдному артриті [31], гострому панкреатиті [60], на моделі контактної гіперчутливості [9]. Слід зауважити, що пригнічення інфільтрації лейкоцитів розглядається як один із важливих механізмів

протективної дії інгібіторів ПАРП. Оскільки АФК, що виділяються рекрутованими у вогнище запалення лейкоцитами, є активаторами ПАРП-1 і спричиняють посилення експресії молекул адгезії та iNOS, інгібітори ПАРП-1 переривають це порочне коло, зменшують вміст клітин-ефекторів запалення, утворення ними АФК і похідних оксиду азоту та послаблюють запальний процес [6, 52, 60, 80]. Інгібітори ПАРП-1 за деяких експериментальних умов зменшують міграцію нейтрофілів у вогнище запалення внаслідок змін метаболічного/функціонального статусу васкулярного ендотелію [80]. На моделі атеросклерозу було встановлено, що потужний інгібітор ПАРП-1 TIQ-A мав антиатеросклеротичну дію, значно знижував міграцію CD68<sup>+</sup>-макрофагів у бляшки і, відповідно, кількість пінистих клітин [35]. Такий ефект був пов'язаний із суттєвим зменшенням MCP-1 і молекул адгезії ICAM-1, що може бути зумовлене різким зниженням експресії ФНП-α.

ПАРП-1 задіяна в патогенезі аутоімунних захворювань і розвитку імунного запалення, що було встановлено на моделях різних патологічних процесів (експериментальний аутоімунний енцефаломієліт, запальна хвороба кишечника, експериментальний ревматоїдний артрит, діабет 1-го типу, імунне ушкодження яєчників, контактна гіперчутливість уповільненого типу); була показана участь ПАРП-1 в T-helper-1 (Th1)-опосередкованій аутореактивній відповіді [9, 17, 31, 43, 53]. ПАРП-1 підтримує транскрипційну активацію лімфоцитів [17]. На моделі астми у мишей показано, що ПАРП-1 активується у відповідь на введення антигена, а інгібування ферменту попереджує інфільтрацію клітин запалення в легені при дії алергену, що пов'язано із модуляцією активності NF-κB [13]. За умов колагеніндукованого артрити у мишей інгібування ПАРП регулювало експансію аутореактивних Th1-клітин і зменшувало кількість аутоантитіл проти колагену. При цьому посилювався вміст антизапального IL-10 [31]. При експериментальному аутоімунному

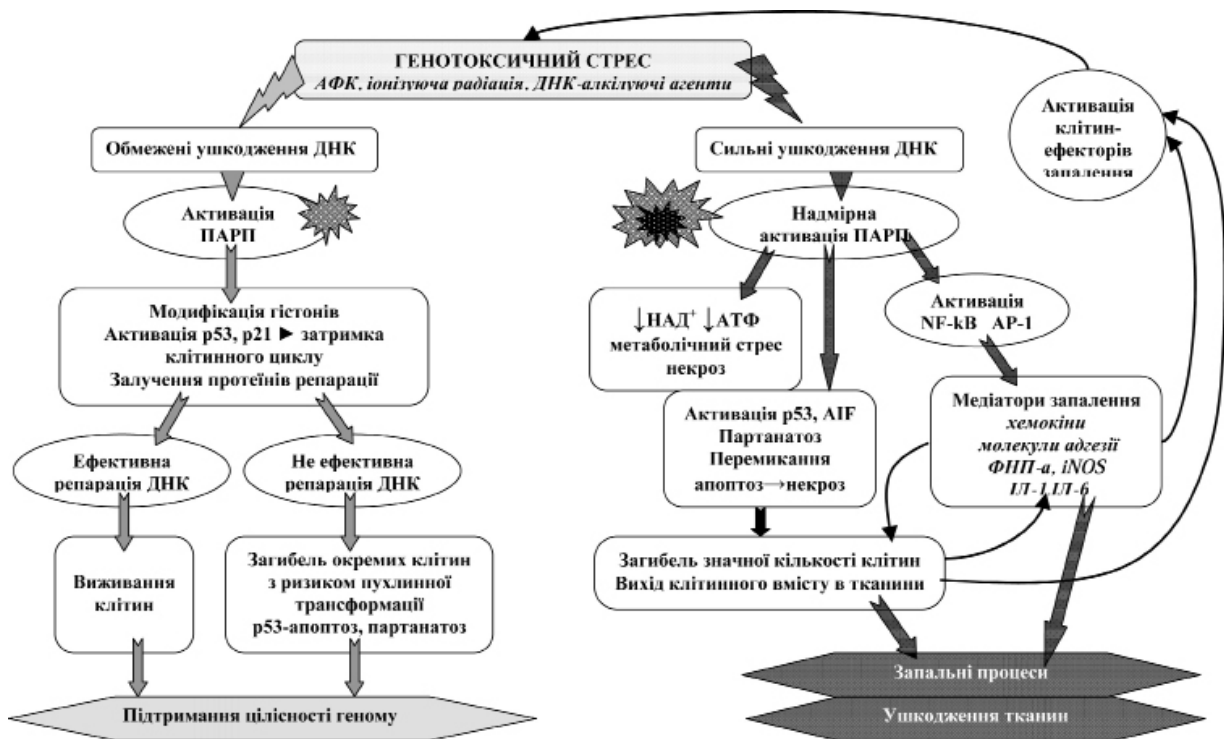
енцефаломієліті у мишей і шурів показано посилення полі-АДФ-рибозилування як у тканині центральної нервової системи, так і в Т- та В-зонах лімфовузлів імунізованих тварин, що свідчить про залучення ПАРП-1 в цей патологічний процес [17, 76]. Різні інгібітори ПАРП-1 покращували прояви цієї хвороби, зменшували нейроімунну інфільтрацію, пригнічували в культивованих лімфоцитах ДНК-зв'язувальну активність NF- $\kappa$ B та AP-1 і транскрипцію прозапальних цитокінів Th1-типу. Спостерігався зсув імунної відповіді від фенотипу прозапальних Th1-клітин до антизапальних Th2-клітин [17, 28, 76]. За таких умов спостерігалася активація мікроглії, макрофагів і астроцитів через шлях, пов'язаний з Toll-подібним рецептором-2 і ПАРП-1. Інгібування ферменту запобігало демієлінізації та втраті аксонів [28].

На підставі аналізу власних і літературних даних Virág і Szabó [86] запропонували мо-

дель, згідно з якою ПАРП-1 займає критичну позицію у позитивному зворотному зв'язку, що посилює запалення. Оксидативний, нітрозативний стрес клітин призводить до ушкодження ДНК. У результаті активується ПАРП-1, що може спричинити некротичну загибель і потенціює експресію NF- $\kappa$ B та AP-1-залежних прозапальних чинників. Це викликає міграцію активованих клітин-ефекторів запалення в ушкоджену тканину, що призводить до подальшого посилення оксидативного та нітрозативного стресу та замикає позитивний зворотний зв'язок (див. рисунок).

### ІНГІБІТОРИ ПАРП-1 У ЛІКУВАННІ ЗАХВОРЮВАНЬ

ПАРП-1 може як попереджувати, так і посилювати патологічний процес. Функція ферменту є критичною для підтримання



Фізіологічна (за умов помірного генотоксичного стресу) та патогенетична (за умов сильного ушкодження ДНК) роль ПАРП-1. Весь спектр функцій ПАРП-1 див. у тексті статті

стабільності геному. Однак надмірна активація PARP-1 викликає некроз або парганатоз, активує запальні сигнальні шляхи, що посилює вторинне ушкодження тканин. Підвищення активності PARP-1 було виявлено при різних захворюваннях у людини: в лейкоцитах при інфаркті та ішемії–реперфузії міокарда, в мононуклеарах крові пацієнтів з множинним склерозом, у тканині серця при септичному шоці, в тубулярних клітинах при ішемії–реперфузії нирок, в атеросклеротичних бляшках, у тканині мозку при нейродегенеративних захворюваннях та травмі мозку, причому рівень активації ферменту корелював із ступенем ураження [28, 67, 69, 79, 83]. У сироватці крові пацієнтів з аутоімунними захворюваннями (ревматоїдним артритом, системним червоним вовчаком, виразковим колітом, хворобою Крона, хворобою Альцгеймера) виявлено антитіла проти PARP-1, роль яких лишається нез'ясованою [69].

*Перспективи застосування інгібіторів PARP при запальних, дегенеративних та аутоімунних хворобах.* З огляду на необхідність пошуку ефективних шляхів лікування захворювань важливо встановити, які патобіохімічні процеси в клітинах є ключовими і можуть бути мішенями для терапевтичних впливів. Таким визначальним первинним процесом при розвитку багатьох захворювань мозку Nagraz та співавт. [36] вважають PAR-опосередкований клітинний сигналінг. Згідно з чисельними даними PARP-1 визнано ключовим медіатором клітинної загибелі за умов дії цитотоксичних факторів, ішемії та оксидативного стресу [11, 26, 81, 86, 87]. Оскільки цей фермент є також регулятором залежної від NF- $\kappa$ B запальної відповіді, його вважають центральним інтегратором метаболічних і запальних сигналів, який бере участь у багатьох патологічних процесах та старінні [6, 48]. На модельних дослідженнях встановлено визначальну патогенетичну роль PARP-1 при деяких захворюваннях нервової та серцево-судинної систем, кишечника та нирок, при діабеті та його ускладненнях,

аутоімунних хворобах, системному запаленні [6, 11, 24, 26, 46, 68, 81, 86, 87]. Видалення гена або інгібування PARP-1 переривало деструктивні прозапальні зворотні зв'язки та призводило до запобігання і послаблення патологічного процесу. Такі результати були отримані на моделях ішемічного та травматичного ураження мозку [11, 47], хвороби Паркінсона [24], при стрептозотоциновому діабеті [50, 52, 81], аутоімунному нефриті [44] та ішемічному ушкодженні нирок [26, 67], при хронічному запаленні кишечника [43], колагеніндукованому артриті [31], при експериментальному алергічному енцефаломієліті – моделі розсіяного склерозу [17, 28, 76], за умов контактної гіперчутливості [9], на моделях септичного та геморагічного шоку [64, 68, 85], при експериментальному ураженні легенів [13] та гострому панкреатиті [60]. Встановлено протективну дію інгібіторів PARP на моделях таких серцево-судинних захворювань, як ішемія–реперфузія та інфаркт міокарда, різні форми серцевої недостатності, кардіоміопатія, циркуляторний шок, гіпертрофія міокарда, гіпертонія, атеросклероз [35, 63, 66, 68, 81]. За умов експериментального атеросклерозу було показано, що в бляшках активність PARP-1 збільшена [35]. Інгібування ферменту затримувало розвиток бляшок і підвищувало їх стабільність через перемикання загибелі пінистих клітин з некрозу на апоптоз. Більше того, потужний інгібітор PARP-1 TIQ-A не тільки попереджував атерогенез, але й сприяв регресії вже існуючих бляшок [35, 66]. Крім зазначених ефектів інгібіторів PARP, існують також поодинокі дані про відсутність протективної дії інгібіторів PARP, зокрема при ушкодженні легенів, індукованому гіпероксією [70].

Значна кількість захворювань пов'язана з дією на клітину активних форм кисню й азоту. Вільні радикали, особливо пероксинітрил, викликають ушкодження ДНК і, відповідно, активацію PARP-1 з усіма вищезначеними наслідками метаболічного та запального



характеру. Зокрема, посилюється NF- $\kappa$ B-залежна експресія iNOS, що призводить до подальшої продукції NO, пероксинітриту і, таким чином, до поглиблення патологічного процесу [11, 64, 69]. Низка цитотоксичних ефектів пероксинітриту (пригнічення клітинного метаболізму, ендотеліальна дисфункція, підвищена епітеліальна проникність) принаймні частково опосередковуються активацією ПАРП-1 [69]. Як утворення активних форм кисню й азоту, так і активація ПАРП-1 спостерігались на експериментальних моделях захворювань та у людей з патологією центральної і периферичної нервової системи [11, 28, 79], судин і серця [66, 68, 83], при діабеті та його ускладненнях [2, 69, 81], при гострих захворюваннях легень, астмі, плевриті [13, 21]. Фармакологічна нейтралізація пероксинітриту при різних патологічних станах супроводжується зменшенням ступеня активації ПАРП-1; з іншого боку, пероксинітриту індукуюча загибель клітин зменшується при генетичній або фармакологічній інактивації ПАРП-1 [69, 72]. За умов оксидативного та нітрозативного стресу спостерігається дисфункція васкулярного ендотелію, зниження продукції цитопротективних медіаторів. Інгібування ПАРП-1 сприяє відновленню функцій ендотелію, при цьому покращується ендотелій-залежна релаксація [68, 80, 81]. Більшість із вищезгаданого є відносно гострими захворюваннями, ініційованими оксидативним стресом, однак інгібітори ПАРП-1 були ефективними і при моделюванні хронічних захворювань з менш вираженим оксидативним ураженням, включаючи кардіоваскулярний атеросклероз та кардіоваскулярні ускладнення діабету [35, 66, 68, 81]. Також було показано, що пригнічення активності ПАРП-1 було протективним при моделюванні аутоімунних захворювань, включаючи гломерулонефрит та ревматоїдний артрит, і послаблювало як аутоімунний, так і запальний процеси [31, 44]. За нашими даними, інгібітор ПАРП 3-амінобензамід (3-АБА), застосований за умов експерименталь-

ної імунної патології яєчників, мав виражену протективну дію на оогенез. При цьому спостерігалось послаблення запалення, а також значне зменшення загибелі фолікулярних та імунотоксичних клітин, переважно за некротичним шляхом [53]. Хоча більшість експериментальних досліджень інгібіторів ПАРП-1 проводилося із їх профілактичним застосуванням, було доведено значний позитивний ефект при терапевтичному введенні інгібіторів після того, як клінічні, біохімічні та патологічні ознаки захворювань повністю розвинулись [11, 31, 35, 52, 60].

Всі ці обнадійливі результати, отримані в експериментах, дали змогу рекомендувати інгібітори ПАРП як терапевтичні засоби для клінічних випробувань при різних серцево-судинних захворюваннях, атеросклерозі, ускладненнях діабету [48, 68, 81, 86]. Нині вже отримані перші результати. При введенні інгібітора ПАРП-1 INO-1001 40 пацієнтам з інфарктом міокарду виявлено тенденцію до зменшення у плазмі крові С-реактивного білка і прозапального цитокіну ІЛ-6; окрім того, не спостерігалось ускладнень, пов'язаних з введенням інгібітора [59]. Проводяться дослідження, скеровані на попередження ускладнень при операціях на серці [71]. За даними О'Valle та співавт. [67], вміст ПАРП-1 у біоптатах донорської нирки суттєво впливає на успішність трансплантації. Ступінь активації ПАРП-1 співвідноситься зі ступенем ушкодження каналців і функції нирок, що засвідчує роль ферменту в патогенезі гострого тубулярного некрозу. Запропоновано використовувати тест на вміст ПАРП-1 при прогнозуванні успіху трансплантації, а інгібітори ферменту – для попередження гострого некрозу каналців.

*Інгібітори ПАРП в лікуванні онкологічних захворювань.* Особливий інтерес становить використання інгібіторів ПАРП-1 при лікуванні онкологічних захворювань. Нестача ПАРП може призводити до дефектів репарації, нестабільності геному, порушення індукції загибелі клітин, що збільшує ризик



їх трансформації [3, 25, 77]. З іншого боку, за умов канцерогенезу активація ПАРП-1 може підтримувати ріст пухлин. На різних лініях ракових клітин встановлено посилення експресії або активності ПАРП-1. Це дає змогу клітинам протистояти генотоксичному стресу та збільшує їх резистентність до дії ДНК-ушкоджувальних агентів за умов протипухлинної терапії. [46, 71, 86]. Інгибування ПАРП-1 збільшує чутливість пухлин до таких цитотоксичних агентів, як темозоломід, цисплатин, інгібітори топоізомерази-1 та радіація. Нині проводяться клінічні дослідження (на стадії I, II та III) безпечності та ефективності комбінації інгібіторів ПАРП з хіміо- та радіо-терапією [16, 46, 71, 74]. Хоча були отримані позитивні результати, необхідні додаткові дослідження довготривалих ефектів інгібіторів ПАРП, з огляду на можливість вторинної малінгізації [74]. Слід зауважити, що механізм дії інгібіторів ПАРП при деяких злоякісних новоутвореннях фундаментально відрізняється від такого при лікуванні інших хвороб. Його визначають як синтетичну летальність, коли мутація або видалення одночасно двох генів є цитотоксичними, тоді як видалення кожного з генів окремо не має ефекту. [16, 46, 74]. Інгібітори ПАРП (монотерапія) виявилися найбільш ефективними проти ракових клітин з дефіцитом білків – продуктів генів BRCA1 (від англ. breast cancer1) і BRCA2. Пригнічення ПАРП-1 блокує відновлення спонтанних одностранных розривів ДНК, які переходять у двостранные. Указані ушкодження ДНК стають летальними для ракових клітин через дефіцит у них BRCA-білків, що беруть участь у репарації двостранных розривів ДНК. Отримані позитивні результати клінічних випробувань інгібіторів ПАРП при таких ракових захворюваннях [71, 74]. Донедавна вважалося, що основним механізмом протипухлинної дії інгібіторів ПАРП є їх здатність посилювати загибель трансформованих клітин. Дослідження останніх років показали, що інгібітори цього ферменту можуть бути корисними при лікуванні раку завдяки їх

здатності пригнічувати ангиогенез [73].

*Створення нових інгібіторів та природні модулятори активності ПАРП-1.* Інгібітори ПАРП назвали „золотою кулею”. У 2005 р. уже було відомо близько 50 інгібіторів ферменту і щороку синтезуються нові [27, 65]. Структурний аналіз каталітичних доменів ПАРП-1 і ПАРП-2 показав, що більшість інгібіторів відтворює нікотинамідну частину НАД<sup>+</sup> і зв’язується з локусом всередині каталітичного домену. Таким чином, інгібітори конкурують з субстратом за НАД-зв’язувальний домен, який є висококонсервативним серед 18 ізоформ ферменту [27, 65, 86]. Це викликає труднощі у синтезі інгібіторів, направлених на окремі ПАРП і зумовлює одне з головних завдань – створення інгібіторів, специфічних для ПАРП-1. Зважаючи на подібність функцій ПАРП-1 і ПАРП-2 в підтриманні стабільності геному, специфічне пригнічення лише ПАРП-1 може бути протективним, без суттєвого впливу на стан ДНК клітин. Нині досягнутий значний прогрес у створенні потужних інгібіторів ПАРП [16, 74]. Синтезовано інгібітор, специфічність якого в 100 разів вища відносно ПАРП-1, ніж ПАРП-2 [27]. Проблема полягає також у тому, що наявні інгібітори погано розчинні, важко проникають через мембрани, зокрема через гематоенцефалічний бар’єр [24, 27], тобто необхідне створення специфічних та ефективних при введенні per os інгібіторів. Синтезований нещодавно інгібітор такого типу KR 33889 проявляє значний протективний ефект при ішемії–реперфузії міокарда у щурів [63]. Деякі тетрациклінові антибіотики виявилися потужними інгібіторами ПАРП-1 [68]. Як модулятори активності цього ферменту виступають численні ендогенні та екзогенні фактори, включаючи різні кінази, тиреоїдні гормони, поліаміни, пурини, флавоноїди, активні форми вітаміну Д, похідні кофеїну [46, 86, 90], в тому числі статеві гормони, з чим може бути пов’язана статева диференціація відповіді на активацію ПАРП-1 за умов ішемії мозку [93]. Цікаві дані про те, що поліфеноли червоного

вина виявляють антидіабетичну дію, зокрема, через зменшення вмісту нітротирозину та полі-АДФ-рибозильованих білків у гломерулі нирки, тобто знижують активність ПАРП-1 і нітрозативний стрес клітин [2]. Встановлено, що ПАРП-1-інгібувальні флавоноїди зменшують індуковану ліпополісахаридом продукцію прозапальних цитокінів ФНП- $\alpha$  та ІЛ-6 у лейкоцитах хворих на хронічну обструктивну хворобу легенів і діабет 2-го типу [90]. Оскільки активація ПАРП-1 виснажує клітинний пул НАД<sup>+</sup>, важливо також врахувати роль ніацину (вітамін РР, В<sub>3</sub>), який надходить в організм ззовні та є необхідним для утворення НАД<sup>+</sup> [4]. Існує думка, що дієтотерапія з використанням флавоноїдів, вітамінів РР і D є безпечним і ефективним шляхом модуляції функції ПАРП-1 за умов хронічних захворювань, зокрема аутоімунних [46, 90].

Беручи до уваги фізіологічну роль ПАРП-1, Kirkland [46] вважає, що інгібування ферменту може зумовити тенденцію до геномної нестабільності та канцерогенезу в хронічних моделях ушкодження ДНК; поряд з тим те саме інгібування може послаблювати такі гострі захворювання, як інфаркт міокарда, інсульт і септичний шок. Однак повне пригнічення експресії ПАРП-1 не спричиняє геномної нестабільності через подібність функцій ПАРП-1 і ПАРП-2, лише подвійний нокаут є летальним [56]. Водночас як зазначено вище, нокаутні за геном ПАРП-1 миші були захищені від багатьох видів ушкодження тканин. Mota та співавт. [60], які на моделі гострого панкреатиту встановили значну протективну дію інгібіторів ферменту без жодних побічних ефектів, прогнозують, що вже незабаром інгібітори ПАРП-1 знайдуть широке застосування при гострих захворюваннях, що несуть загрозу життю. Підтримуючи цю думку, Besson [11] вважає, що, з огляду на фізіологічну роль ПАРП-1, досягнення часткового інгібування ферменту буде більш безпечним лікувальним підходом. Kirkland [46] пише: „Потужні нові інгібітори ПАРП-1 повинні відіграти значну роль у

лікуванні або попередженні різних хвороб у недалекому майбутньому. Стиль життя та дієтотерапія також можуть збільшувати ефективність модуляції функцій ПАРП-1 і покращувати здоров'я”.

І хоча функції ПАРП-1 і реакцій полі-АДФ-рибозильовання все ще дискутуються в широких наукових колах, численні експериментальні дані, починаючи від отриманих на клітинних культурах і закінчуючи передклінічними випробуваннями на тваринах, чітко свідчать про позитивний ефект інгібіторів ферменту при запальних і дегенеративних процесах та при онкологічних захворюваннях. Станом на 2011 р. у світі проводиться клінічне тестування (на фазі 1, 2 або 3) восьми інгібіторів ПАРП-1 третього покоління як засобів монотерапії, так і для посилення хіміотерапії у онкологічних хворих [16]. Сайт, який містить базу даних клінічних випробувань (<http://www.clinicaltrials.gov>), дає (на кінець 2011 р.) 74 посилання на тестування інгібіторів ПАРП, переважна більшість яких направлена на лікування ракових захворювань. Три дослідження тестують протективні протизапальні ефекти інгібіторів ПАРП на міокард та при хронічних обструктивних захворюваннях легень. Вирішення проблеми створення ефективних, специфічних, потужних і безпечних інгібіторів ПАРП-1 продовжується.

**Н.В. Макогон, І.Н. Алексеєва**

### **ПОЛИ(АДФ-РИБОЗО) ПОЛИМЕРАЗА-1: ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ**

Поли(АДФ-рибозо) полімераза (ПАРП) – семейство из 18 ферментов, найденных практически у всех эукариот. ПАРП-1, самая распространенная изоформа, активируется при разрывах ДНК и осуществляет посттрансляционную модификацию белков, синтезируя цепочки полимера АДФ-рибозы и прикрепляя их к гистонам, белкам репарации ДНК, транскрипционным факторам и др. Доказана важная роль ПАРП-1 в поддержании стабильности генома. При чрезмерной активации фермента проявляется его патологическая роль. ПАРП-1 вовлечена в повреждение тканей и является ключевым медиатором клеточной гибели при оксидативном стрессе, ишемии

и повреждении ДНК. Участие ПАРП-1 в воспалении связано как с усилением некроза, так и с активацией экспрессии провоспалительных генов. Ингибирование ПАРП оказывает существенный протективный эффект при моделировании патологии сердечно-сосудистой системы, воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Ингибиторы ПАРП также проявляют противоопухолевую активность, повышая чувствительность ряда раковых клеток к ДНК-повреждающим агентам. ПАРП-1 представляется перспективной терапевтической мишенью. Ключевые слова: ПАРП, стабильность генома, гибель клеток, воспаление, ингибиторы ПАРП.

**N.V. Makogon, L.M. Alexeyeva**

### **POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE (PARP): PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL ROLES**

PARPs are a large family of 18 enzymes found in most eukaryotes. PARP-1, the most abundant isoform, is activated by DNA breaks and catalyzes the post-translational modification of proteins. It forms polymers of ADP-ribose and attaches them to acceptor proteins, including histones, DNA repair proteins, transcription factors. PARP-1 is a key enzyme involved in a maintenance of genomic stability. Excessive activation of the enzyme has been shown to contribute to tissue injury and inflammatory disorders. PARP is a key mediator of cell death in oxidative stress, ischemia and DNA damage. It also promotes the activation of proinflammatory gene expression. Inhibition of PARP-1 provides significant protection in animal models of cardiovascular, autoimmune and inflammatory diseases. PARP inhibitors have shown antitumor activity because they compromise ability of cancer cells to repair DNA. PARP-1 is a promising therapeutic target.

Key words: PARP, genomic stability, cell death, inflammation, PARP inhibitors.

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

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Дрель В.Р., Шиманський І.О., Сибірна Н.О., Великий М.М. Роль PARP та процесу полі-ADP-рибозилування протеїнів у регулюванні клітинних функцій // Укр. біохім. журн. – 2011. – 83. – С.5–34.
2. Дрель В.Р., Сибірна Н.О. Нефропротекторна дія виноградних вин у тварин із експериментальним цукровим діабетом // Біол. студії. – 2009. – 3. – С.59–68.
3. Пискунова Т.С., Юрова М.Н., Забежинский М.А., Анисимов В.Н. Поли(АДФ-рибоза)-полимераза – связь с продолжительностью жизни и канцерогенезом // Успехи геронтологии. – 2007. – 20. – С.82–90.
4. Шиманський І.О., Кучмеровська Т.М. Некоферментна функція вітаміну РР та його біологічно активних похідних: сучасний стан проблеми // Укр. біохім. журн. –

2007. – 79. – С.59–68.
5. Alano C.C., Garnier P., Ying W., Higashi Y., Kauppinen T.M., Swanson R.A. NAD<sup>+</sup> depletion is necessary and sufficient for poly (ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death // J. Neurosci. – 2010. – 30. – P.2967–2978.
6. Altmeyer V., Hottiger MO. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 at the crossroad of metabolic stress and inflammation in aging // Aging. – 2009. – 1. – P.458–469.
7. Amé J., Spenlehauer C., de Murcia G. The PARP superfamily // Bioassays. – 2004. – 26. – P.882–893.
8. Andreone T.L., O'Connor M., Denenberg A., Hake P.W., Zingarelli B. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of AP-1 in murine fibroblasts // J. Immunol. – 2003. – 170. – P.2113–2120.
9. Bai P., Csaba H., Szabo E., Gyure L., Bakondi E., Brunyanski A., Gergely S., Szabo C., Virag L. Poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity // J. Investig. Dermatol. – 2009. – 129. – P.234–238.
10. Berger N.A. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage // Radiat. Res. – 1985. – 101. – P.4–15.
11. Besson V.C. Drug targets for traumatic brain injury from poly(ADP-ribose) polymerase pathway modulation // Brit. J. Pharmacol. – 2009. – 157. – P.696–704.
12. Boujrad H., Gubkina O., Robert N., Krantic., Susin S.A. AIF-mediated programmed necrosis // Cell Cycle. – 2007. – 6. – P.2612–2619.
13. Boulares A.H., Zoltoski A.J., Sherif Z.A., Jolly P., Massaro D., Smulson M.E. Gene knockout or pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 prevents lung inflammation in a murine model of asthma // Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2003. – 28. – P.322–329.
14. Caldecott K.W., Aoufouchi S., Johnson P., Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro // Nucleic Acids Res. – 1996. – 24. – P.4387–4394.
15. Carillo A., Monreal Y., Ramirez P., Marin L., Parrilla P., Oliver F.J., Yelamos J. Transcription regulation of TNF-alpha-early response genes by poly(ADP-ribose) polymerase-1 in murine heart endothelial cells // Ibid. – 2004. – 32. – P.757–766.
16. Chen A. PARP inhibitors in cancer treatment // Chin. J. Cancer. – 2011. – 30. – P.463–471.
17. Chiarugi A. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 suppress transcriptional activation and ameliorate autoimmune encephalomyelitis in rats // Brit. J. Pharmacol. – 2002. – 137. – P.761–770.
18. Cole K., Perez-Polo J. Poly (ADP – ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury // J. Neurochemistry. – 2002. – 82. – P. 19–29.
19. Cook B.D., Dynek J.N., Chang W., Shostak G., Smith S. Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres // Mol. Cell. Biol. – 2002. – 22. – P.332–342.
20. Cover C., Fickert P., Knight T., Fuchsichler., Farhood

- A., Trauner M., Jaeschke H. Pathophysiological role of poly (ADP – ribose) polymerase (PARP) activation during acetaminophen-induced liver cell necrosis in mice // *Toxicol. Sci.* – 2005. – 84. – P.201–208.
21. Cuzzocrea S., Zingarelli B., Gilad E., Hake P., Salzman A.L., Szabo C. Protective effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthase in a carrageenan-induced model of local inflammation // *Eur. J. Pharmacol.* – 1998. – 342. – P.67–76.
  22. d'Adda di Fagagna F., Hande M.P., Tong W.M., Lansdorp P.M., Wang Z.Q., Jackson S.P. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability // *Nat. Genet.* – 1999. – 23. – P.76–80.
  23. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions // *Biochem. J.* – 1999. – 342. – P.249–268.
  24. Dawson V. Inhibition of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase (PARP) in experimental models of neurologic diseases: cell death prevention // *Retina.* – 2005. – 25. – P.S31–S32.
  25. de Murcia J.M., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Walztinger C., Chambon P., de Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – 94, 14. – P.7303–7307.
  26. Devalaraja-Narashimha K., Singaravelu K., Padanilam B.J. Poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell injury in acute renal failure // *Pharmacol. Res.* – 2005. – 52. – P.44–59.
  27. Eltze T., Boer R., Wagner T., Weinbrenner S., McDonald M., Thiernemann C., Burkle A., Klein T. Imidazoquinolinone, imidazopyridine and isoquinolindione derivatives as novel and potent inhibitors of the PARP: a comparison with standard inhibitors // *Mol. Pharmacol.* – 2008. – 74. – P.1587–1598.
  28. Farez M., Quintana F., Gandhi R., Izquierdo G., Lucas M., Weiner H.L. Toll-like receptor 2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1 promote central nervous system neuroinflammation in progressive EAE // *Nat. Immunol.* – 2009. – 10. – P.958–964.
  29. Festjens N., Vanden Berghe T., Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signaling cascades, important mediators and concomitant immune response // *Biochim et Biophys Acta.* – 2006. – 1757. – P.1371–1387.
  30. Formentini L., Macchiarulo A., Cipriani G., Camaioni E., Rapizzi E., Pellicciari R., Moroni F., Chiarugi A. Poly(ADP-ribose) catabolism triggers AMP-dependent mitochondrial energy failure // *J. Biol. Chem.* – 2009. – 284. – P.17668–17676.
  31. Gonzalez-Rey E., Martínez-Romero R., O'Valle F., Aguilar-Quesada R., Conde C., Delgado M., Oliver F.J. Therapeutic effect of a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor on experimental arthritis by downregulating inflammation and Th1 response // *PLoS ONE.* – 2007. – 10. – P.e1071.
  32. Grube K., Bürkle A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – 89. – P.11759–11763.
  33. Ha H.C., Snyder S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion // *PNAS.* – 1999. – 96. – P.13978–13982.
  34. Ha H.C., Hester L.D., Snyder S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – 99. – P.3270–3275.
  35. Hans C.P., Zerfaoui M., Naura A.S., Troxclair D., Strong J.P., Matrougui K., Boulares A.H. Thieno[2,3-c]isoquinolin-5-one, a potent poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, promotes atherosclerotic plaque regression in high-fat diet-fed apolipoprotein E-deficient mice: effects on inflammatory markers and lipid content // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* – 2009. – 329. – P.150–158.
  36. Harraz M., Dawson T., Dawson V. Advances in Neuronal Cell Death 2007 // *Stroke.* – 2008. – 39. – P.286–288.
  37. Hassa P.O., Hottiger M. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders // *Cell. Molec. Life Sci.* – 2002. – 59. – P.1534–1553.
  38. Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O. Nuclear ADP-ribosylation in mammalian cells: where are we today and where are we going? // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2006. – 70. – P.789–829.
  39. Hough C.J., Smulson M.E. Association of poly(adenosine diphosphate ribosylated) nucleosomes with transcriptionally active and inactive regions of chromatin // *Biochemistry.* – 1984. – 23. – P. 5016–5023.
  40. Hsiao S.J., Poitras M.F., Cook B.D., Liu Y., Smith S. Tankyrase 2 poly(ADP-ribose) polymerase domain-deleted mice exhibit growth defects but have normal telomere length and capping // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – 26. – P.2044–2054.
  41. Huang Q., Shen H.-M. The dual role poly(ADP-ribose) polymerase-1 in autophagy and necrosis under oxidative stress and DNA damage // *Autophagy.* – 2009. – 5. – P.273–276.
  42. Huang Q., Wu Y.-T., Tan H.-L., Ong C.-N., Shen H.-M. A novel function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in modulation of autophagy and necrosis under oxidative stress // *Cell Death Differ.* – 2009. – 16. – P.264–277.
  43. Jijon H., Churchill T., Malfair D., Wessler A., Jewell L.D., Parsons H.G., Madsen K.L. Inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis // *AJP-Gastrointest. Liver Physiol.* – 2000. – 279. – P.G641–G651.
  44. Jog N.R., Dinnall J.A., Gallucci S., Madio M.P., Carricchio R. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the progression of autoimmune nephritis in males by inducing necrotic cell death and modulating inflammation // *J. Immunol.* – 2009. – 182. – P. 7297–7306.
  45. Khandoga A., Enders G., Biberthaler P., Krombach F. Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury // *AJP-Gastrointest. Liver Physiol.* – 2002. – 283. – P.G553–G560.
  46. Kirkland J. Poly ADP-ribose polymerase-1 and health // *Exp. Biol. Med.* – 2010. – 235. – P.561–568.
  47. Koh S.H., Park Y., Song C.W., Kim J.G., Kim K., Kim



- J., Kim M-H., Lee S.R., Kim D.W., Yu H-J., Chang D., Hwang S.J., Kim S.H. The effect of PARP inhibitor on ischaemic cell death, its related inflammation and survival signals // *Eur. J. Neurosci.* – 2004. – **20**. – P.1461–1472.
48. Krishnakumar R., Kraus W.L. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets // *Mol. Cell.* – 2010. – **39**. – P.8–24.
  49. Krysko D.V., D’Herde K., Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences // *Apoptosis.* – 2006. – **11**. – P.1709–1726.
  50. Kuchmerovska T., Shymanskyi I., Donchenko G., Kuchmerovskyy M., Pakirbaeva L., Klimentenko A. Poly(ADP-ribosyl)ation enhancement in brain cell nuclei is associated with diabetic neuropathy // *J. Diabet. Comp.* – 2004. – **18**. – P.198–204.
  51. Lindahl T., Satoh M.S., Poirier G.G., Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks // *Trends Biochem. Sci.* – 1995. – **20**. – P.405–411.
  52. Mabley J.G., Jagtap P., Perretti M., Getting S., Salzman A., Virag L., Szabo E., Soriano F., Liaudet L., Abdelkarim G., Hasko G., Marton A., Southan G., Szabo C. Anti-inflammatory effects of a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose)polymerase // *Inflam. Res.* – 2001. – **50**. – P. 561–569.
  53. Makogon N., Voznesenskaya T., Bryzgina T., Sukhina V., Grushka N., Alexeyeva I. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, 3-aminobenzamide, protects against experimental immune ovarian failure in mice // *Reprod. Biol.* – 2010. – **10**. – P. 215–226.
  54. Malanga M., Althaus F.R. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network // *Biochem. Cell Biol.* – 2005. – **83**. – P.354–364.
  55. Meisterernst M., Stelzer G., Roeder R. Poly(ADP-ribose) polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P.2261–2265.
  56. Ménissier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.C., Dierich A., LeMeur M., Sabatier L., Chambon P., de Murcia G. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse // *EMBO J.* – 2003. – **22**. – P.2255–2263.
  57. Miyamoto T., Kakizawa T., Hashizume K. Inhibition of nuclear receptor signaling by poly(ADP-ribose) polymerase // *Mol. Cell Biol.* – 1999. – **19**. – P.2644–2649.
  58. Moroni F., Meli E., Peruginelli F., Chiarugi A., Cozzi A., Picca R., Romagnoli P., Pellicciari R., Pellegrini-Giampietro D. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors attenuate necrotic but not apoptotic neuronal death in experimental models of cerebral ischemia // *Cell Death Differ.* – 2001. – **8**. – P.921–932.
  59. Morrow D.A., Brickman C.M., Murphy S.A., Baran K., Krakover R., Dauerman H., Kumar S., Slomowitz N., Grip L., McCabe C.H., Salzman A.L. A randomized, placebo-controlled trial to evaluate the tolerability, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (INO-1001) in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of the TIMI 37 trial // *J. Thromb. Thrombolysis.* – 2009. – **27**. – P. 359–364.
  60. Mota R., Sanchez-Bueno F., Berenguer-Pina J., Hernandez-Espinosa D., Parilla P., Yelamos J. Therapeutic treatment with poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors attenuates the severity of acute pancreatitis and associated liver and lung injury. // *Brit. J. Pharmacol.* – 2007. – **151**. – P.998–1005.
  61. Moubarak R.S., Yuste V.J., Artus C., Bouharrou A., Greer P.A., Menissier-de Murcia J., Susin S.A. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis // *Mol. Cell Biol.* – 2007. – **27**. – P.4844–4862.
  62. Nakajima H., Nagaso H., Kakui N., Ishikawa M., Hiranuma T., Hoshiko S. Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in nuclear factor-kappa B-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P.42774–42786.
  63. Oh K.S., Lee S., Yi K.Y., Seo H.W., Koo H.N., Lee B.H. A novel and orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, KR-33889 [2[methoxycarbonyl (4-methoxyphenyl) methylsulfanyl]-1H-benzimidazole-4-carboxylic acid amide], attenuates injury in in vitro model of cell death and in vivo model of cardiac ischemia // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* – 2009. – **328**. – P.10–18.
  64. Oliver F., Ménissier-de Murcia J., Nacci C., Decker P., Andriantsitohaina R., Muller S., de la Rubia G., Stoclet J., de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kB activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice//*EMBO J.* – 1999. – **18**. – P.4446–4454.
  65. Oliver A.W., Amé J.C., Roe S. Good V., de Murcia G., Pearl L.H. Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2 // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – **32**. – P.456–464.
  66. Oumouna-Benachour K., Hans C., Suzuki Y., Naura A., Datta R., Belmadani S., Fallon K., Woods C., Boulares A. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition reduces atherosclerotic plaque size and promote factors of plaque stability in ApoE-deficient mice // *Circulation.* – 2007. – **115**. – P.2442–2450.
  67. O’Valle F., Del Moral R., Benitez M., Martin-Oliva D., Gomez-Morales M., Aguilar D., Aneiros-Fernandez J., Hernandez-Cortes P., Osuna A., Moreso F., Seron D., Oliver F.J., Del Moral R.G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 expression is related to cold ischemia, acute tubular necrosis and delayed renal function in kidney transplantation // *PLoS ONE.* – 2009. – **4**. – P.e7138–e7145.
  68. Pacher P., Szabo C. Role poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors // *Cardiovasc. Drug Rev.* – 2007. – **25**. – P. 235–260.
  69. Pacher P., Szabo C. Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease // *Amer. J. Pathol.* – 2008. – **173**. – P.2–13.
  70. Pagano A., Pitteloud C., Reverdin C., Metrailler-Ruchonnet



- I., Donati Y., Barazzone Argiroffo C. Poly(ADP-ribose) polymerase activation mediates lung epithelial cell death in vitro but is not essential in hyperoxia-induced lung injury // *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2005. – **33**. – P.555–564.
71. Peralta-Leal A., Rodriguez-Vargas J.M., Aguilar-Quesada R., Rodriguez M.I., Linares J.L., de Almodovar M.R., Oliver F.J. PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – **47**. – P. 13–26.
72. Radovits T., Seres L., Gero D., Lin L.N., Beller C.J., Chen S.H., Zotkina J., Berger I., Groves J.T., Szabó C., Szabó G. The peroxydinitrite decomposition catalyst FP15 improves ageing-associated cardiac and vascular dysfunction // *Mech. Ageing Dev.* – 2007. – **128**. – P.173–181.
73. Rajesh M., Mukhopadhyay P., Godlewski G., Bátkai S., Haskó G., Liaudet L., Pacher P. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition decreases angiogenesis // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2006. – **350**. – P.1056–1062.
74. Rouleau M., Patel A., Hendzel M.J., Kaufmann S.H., Poirier G.G. PARP inhibition: PARP-1 and beyond // *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – **10**. – P.293–301.
75. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation // *Nature.* – 2002. – **418**. – P. 191–195.
76. Scott G.S., Kean R.B., Mikheeva T., Fabis M.J., Mabley J.G., Szabo C., Hooper D.C. The therapeutic effects of PJ34 [N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide.HCl], a selective inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, in experimental allergic encephalomyelitis are associated with immunomodulation // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* – 2004. – **310**. – P.1053–1061.
77. Simbulan-Rosenthal C.M., Ly D.H., Rosenthal D.S., Konopka G., Luo R., Wang Z.Q., Schultz P.G., Smulson M.E. Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**. – P.11274–11279.
78. Smith S., Giriat I., Schmitt A., de Lange T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres // *Science.* – 1998. – **282**. – P.1484–1487.
79. Soós J., Engelhardt J.I., Siklós L., Havas L., Majtényi K. The expression of PARP, NF-kappa B and parvalbumin is increased in Parkinson disease // *Neuroreport.* – 2004. – **15**. – P.1715–1718.
80. Szabó C., Lim L., Cuzzocrea S., Getting S.J., Zingarelli B., Flower R.J., Salzman A.L., Peretti M. Inhibition of poly(ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts anti-inflammatory effects // *J. Exp. Med.* – 1997. – **186**. – P.1041–1049.
81. Szabó C. Roles of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications // *Pharmacol. Res.* – 2005. – **52**. – P. 60–71.
82. Szijarto A., Batmunkh E., Hahn O., Mihaly Z., Kreiss A., Kiss A., Lotz G., Schaff Z., Vali L., Blazovics A., Gero D., Szabo C., Kupcsulik P. Effect of PJ-34 PARP-inhibitor on rat liver microcirculation and antioxidant status // *J. Surg. Res.* – 2007. – **142**. – P.72–80.
83. Tóth-Zsámboki E., Horváth E., Vargova K., Pankotai E., Murthy K., Zsengellér Z., Bárányi T., Pék T., Fekete K., Kiss R., Préda I., Lacza Z., Gerő D., Szabó C. Activation of PARP by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes // *Mol. Med.* – 2006. – **12**. – P.221–228.
84. Troyano A., Sancho P., Fernandez C., de Blas E., Bernardi P., Aller P. The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells // *Cell. Death Differ.* – 2003. – **10**. – P.889–898.
85. Veres B., Radnai B., Gallyas F., Varbiro G., Berente Z., Osz E., Sumegi B. Regulation of kinase cascades and transcription factors by a PARP inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* – 2004. – **310**. – P. 247–255.
86. Virag L., Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors // *Pharmacol. Rev.* – 2002. – **54**. – P.375–429.
87. Virag L. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies // *Current Vascular Pharmacol.* – 2005. – **3**. – P. 209–214.
88. Wang X., Ohnishi K., Takahashi A., Ohnishi T. Poly(ADP-ribosylation) is required for p53-dependent signal transduction induced by radiation // *Oncogene.* – 1998. – **17**. – P.2819–2825.
89. Wang Y., Dawson V.L., Dawson T.H. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in Parthanatos // *Exp. Neurol.* – 2009. – **218**. – P.193–202.
90. Weseler A.R., Geraets L., Moonen H.J., Manders R.J., van Loon L.J., Pennings H.J., Wouters E.F., Bast A., Hageman G.J. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-inhibiting flavonoids attenuate cytokine release in blood from male patients with chronic obstructive pulmonary disease or type 2 diabetes // *J. Nutr.* – 2009. – **139**. – P.952–957.
91. Xu Y., Kim S.O., Li Y., Han J. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**. – P. 19179–19187.
92. Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor // *Science.* – 2002. – **297**. – P.259–263.
93. Yuan M., Siegel C., Zeng Z., Li J., Liu F., McCullough L. Sex differences in the response to activation of poly(ADP-ribose) polymerase after experimental stroke // *Exp. Neurol.* – 2009. – **217**. – P.210–218.
94. Zingarelli B., Hake P.W., O'Connor M., Denenberg A., Wong H.R., Kong S., Aronow B.J. Differential regulation of AP-1 and heat shock factor-1 in myocardial ischemia and reperfusion injury: role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – **286**. – P.H1408–1415.

# РЕЦЕНЗІЇ

## ОТЗЫВ

о книге И.И. Коренюк, Т.В. Гамма, Д.Р. Хусаинов, М.Ю. Раваева, А.Е. Кизилов, О.В. Костюченко, О.И. Колотилова «**Нейротропные эффекты химических соединений различных классов и возможные механизмы их действия**». Симферополь. «ДИАЙПИ». 2012. 182 с. илл.

В большинстве развитых стран на медицину и фармакологию выделяются огромные средства, составляющие до одной трети их ВВП. Такое положение, отвечающее интересам населения, в определенной мере стало возможным в результате последовательной реализации стратегий разработки новых высокоэффективных лекарственных препаратов. Приведение в действие этих стратегий проходит на фоне интенсивного развития медицинской химии и оценки функциональной эффективности конечного продукта. К последнему положению рассматриваемая монография имеет самое непосредственное отношение.

Всемирно признанная и авторитетная нейрофизиологическая школа академика П.Г. Костюка с её достижениями в разработке механизмов нейрональных взаимодействий и клеточных ионно-мембранных процессов в своем развитии достигла весьма ощутимых результатов.

Благодаря глубокопрофессиональным поискам и экспериментальным разработкам одного из продолжателей киевской костюковской школы – профессора И.И. Коренюка с энтузиастами-нейрофизиологами Таврического национального университета им. В.И. Вернадского удалось установить многие доселе мало или совсем неизвестные механизмы отчётливо проявляющихся неврологических эффектов нескольких классов химических соединений, на основе которых разработаны и активно используются многочисленные медикаментозные препараты широкого спектра действия.

Несомненно, это большое достижение и

успех, которые в равной мере можно отнести к фундаментальным аспектам нейрофизиологической науки, а также прикладным фармакологическим направлениям.

В этом небольшом издании авторами наряду с конкретными результатами экспериментального поиска удалось рассмотреть и может быть дополнить или поправить уже существующие теории, представления и взгляды на анализируемые механизмы отдельных фармпрепаратов, а то и целых групп фармсоединений. Всё это является хорошим примером, заслуживающим одобрения и похвалы. Разумеется, к подобной оценке следует непременно добавить и перспективу, которая столь же однозначно открывается при знакомстве с материалами. Перспективу дальнейшего развития исследований особенно практического плана. На этом я как раз и хочу сделать акцент в своих впечатлениях от знакомства с книгой.

Например, хорошо известные работы, связанные с изучением биологического действия налоксона были в определенной мере направлены на исследование механизмов его взаимодействия с опиатными рецепторами и системой эндогенных морфинов. В результате были открыты особенности влияния этого соединения на ноцицепцию. Последнее оказалось знаковым достижением нейрофизиологии, особенностью механизма сенсорных восприятий и последующих реакций. Дальше больше, появились данные, прямо указывающие на существование налоксонзависимого действия морфинов на структуру функционального поведения нервно-клеточных ассоциаций и особенно

медиаторную чувствительность межнейронного синаптического аппарата. В результате взаимодействия медиатора с рецепторами постсинаптической мембраны, как известно, меняется характер передачи и, соответственно, конечный эффект. Однако каких-либо экспериментальных наблюдений о таких важных показателях состояния синаптического аппарата, как лабильность, функциональная устойчивость, функциональная подвижность и многие другие показатели, характеризующие его состояние и работу в условиях действия налоксона, практически не имеется. А знать об этом надо. И не просто думать, а не откладывая, браться за дело. Ведь ни одно сколько-нибудь значимое явление в организме – будь-то память, забывание, эмоции, мотивации, утомление и прочее не обходится без участия синаптического процесса. Стало быть, изучение названных тонких механизмов взаимодействия налоксона и близких ему соединений со структурами синаптических мембран вероятней всего может стать задачей первостепенной важности.

И ещё. Хорошо известно, что аминокислотные медиаторы с большим трудом проходят через щелевые контакты гистогематического и гематоэнцефалического барьеров, что особенно сказывается при системном введении этих веществ в клинических случаях. В этом отношении определенных успехов достигла казанская физиологическая школа. Правда, у них иной подход, иная научная идеология. А вот симферопольская команда И.И. Коренюка с их опытом могла бы свободно, детально, до тонких механизмов рассмотреть нейротропные эффекты и механизмы многих производных медиаторных аминокислот. Основанием к тому является хорошее впечатление от знакомства с «аминокислотным» разделом книги.

Нельзя пройти мимо и такого класса соединений, как хромоны. Соединений, характеризующихся высокой биологической активностью, низкой токсичностью, противовоспалительными, гепатопротекторными, антиоксидантными, противовирусными и

другими характерными свойствами. Многочисленные производные хромона, объединенные в группу флавоноидов в большом количестве поступают в организм человека, достигая высоких концентраций. Некоторые из них могут заменять эндогенные антиоксиданты. Свое действие производные хромона, как и большинство рассмотренных в издании препаратов, реализуют свое действие на клеточном уровне. Вместе с тем нейрофизиологические аспекты то ли выпали из поля зрения исследователей, то ли до них ещё не добрались. Так или иначе, но то, что авторы книги заполнили этот пробел результатами своих экспериментальных поисков (электрические показатели, динамика трансмембранных токов и др.), достойно особого отношения. Что же касается заключения, что производные хромона помимо перечисленных выше, обладают ещё анестетическими и противосудорожными свойствами, представляется достаточно аргументированным, весомым и заслуживает исключительно высокой оценки.

Монография содержит большое число авторских и взятых из других изданий качественных иллюстраций. Список литературы включает большое число источников. Особо импонирует то, что авторы не опускают спорные вопросы, приводят альтернативные точки зрения и обсуждают многие проблемы, которые в настоящее время ещё не решены.

При описании фармакологических свойств лекарственных препаратов авторы чаще всего ограничивались их краткой характеристикой, не прибегая к сложной медицинской терминологии. Обсуждая эффекты и функциональные показатели нервных структур организма при действии изучавшихся лекарств опустили также и рассмотрение схем химического превращения последних. С этим нельзя не согласиться – избыток химических формул действительно может оттолкнуть читателей нехимических специальностей.

К сожалению, книга не завершается абсолютно необходимым в любом издании подобного типа «Предметным указателем»,

что существенно затрудняет поиск порой столь необходимых терминов и понятий.

Заключая в целом, можно с уверенностью констатировать, что книга получилась. Она бесспорно займет достойное место в системе подготовки специалистов и окажется весьма

полезной для начинающих исследователей и практиков. Книга будет полезна студентам и преподавателям вузов, медикам, физиологам, токсикологам, аллергологам и иммунологам, а также всем, кто интересуется современной наукой.

академик РАН А.Д. Ноздрачёв  
Санкт-Петербургский государственный  
университет

# ПАМ'ЯТНІ ДАТИ

## Неруш Петро Опанасович



16 лютого 2012 р. на 72-му році пішов із життя професор кафедри фізіології Дніпропетровської державної медичної академії, доктор медичних наук Петро Опанасович Неруш.

Незважаючи на тяжкі повоєнні роки (сім'я залишилася без батька, який загинув на фронті) юнаком володіла жага до знань і мрія займатися лікарською справою. Після закінчення з відзнакою Київського медичного училища №2 ім. П.І. Гаврося продовжив здобувати вищу освіту у Дніпропетровському медичному інституті. Ще зі студентської лави він зацікавився науковою роботою та став активним членом студентського наукового гуртка кафедри фармакології. По закінченні з відзнакою інституту на цій самій кафедрі в

1966 р. розпочалася трудова діяльність Петра Опанасовича, де він пройшов свій шлях від старшого лаборанта до професора, доктора медичних наук. На формування Петра Опанасовича як викладача та науковця великий вплив мали філософські погляди, світогляд, педагогічна майстерність, життєвий досвід, наукові ідеї таких надзвичайних особистостей, як завідувач кафедри фармакології, професори Г.О. Батрак, С.І. Хрустальов, О.Т. Зленко, яких він завжди згадував з глибокою пошаною та любов'ю.

Під керівництвом професора Г.О.Батрака Петро Опанасович виконав кандидатську дисертаційну роботу (1972), присвячену вивченню порівняльної характеристики і співвідношення біоелектричної активності і енергетичного обміну різних відділів кори головного мозку і таламуса в умовах наркозу. Ним було встановлено, що ступінь порушення реактивності окремих структур ЦНС залежить від рівня їх еволюційного розвитку.

Досягненням П.О. Неруша було заснування та відкриття нової кафедри фармакології Камагуейського університету Республіки Куба, створення її навчальної і методичної бази, підготовка науково-педагогічних працівників, організація науково-експериментальної лабораторії.

Ідеї П.О. Неруша про роль нейромедіаторних амінокислот у механізмах неврологічних станів та їх корекції були підтримані чл.-кор. АМН СРСР Раєвським К.С. і д.м.н., професором В.О. Краузом, який на той час очолював кафедру фармакології. Надалі вони знайшли свій розвиток та втілилися в докторській дисертації Петра Опанасовича, яка була блискуче захищена в 1991 р. у спеціалізованій раді Інституту фармакології і токсикології АМН СРСР.



В роботі була показана роль системи медіаторних амінокислот (аспарагінової, глютамінової, гліцину, ГАМК, тауринової) в інтегративній діяльності ЦНС (пам'ять, умовно-рефлекторні реакції, вроджена спонтанна поведінкова активність) за умов експериментального неврозу. Встановлено, що стан психічної дезадаптації супроводжувався порушенням фосфоліпідних фракцій і, в першу чергу, арахідонової та лінолевої кислот. Висунута гіпотеза про стратегію фармакорегуляції неврологічних порушень психотропними засобами, анксиогенної дезінгібувальної дії, що активують мнестичні функції мозку через нормалізацію балансу нейромедіаторних амінокислот, а також жирнокислотного складу ліпідів.

Висока ерудиція та професіоналізм, організаторський і педагогічний талант, широкий світогляд та творча натхненність, наукові ідеї та методичні нароби дали можливість Петру Опанасовичу очолити кафедру нормальної фізіології (1993–2008 рр.) і заснувати гідну школу фізіологів. Наукові ідеї П.О. Неруша, що представляють один з актуальних напрямків фізіології – розкриття компенсаторних можливостей ЦНС за умов екстремальних станів – були відображені у 5 кандидатських і 2 докторських дисертаціях його учнів. Разом зі своїм учителем дисертанти змогли розкрити особливості нейрохімічних і нейрофізіологічних механізмів інтегративної діяльності ЦНС за умов дії низькодозованого іонізуючого випромінювання, порушеного тиреоїдного статусу, діабетичного стану, впливу екогенних факторів.

П.О. Неруш – автор понад 250 наукових праць, у тому числі одного відкриття: «Закономірність змін функціональної активності тканинної структури організму при дії на неї зовнішнього низького магнітного поля», 4 винаходів, 2

монографій, 31 праці міжнародного рівня.

П.О. Неруша відрізняв талант педагога і організатора. Він володів високою ерудицією і лекторською майстерністю, плідно працював над розробкою і впровадженням новітніх навчальних технологій вищої медичної освіти. Петро Опанасович зробив значний особистий внесок у вирішенні проблем інтеграції навчального процесу, оптимізації самостійної, аудиторної та поза аудиторної роботи студентів, індивідуалізації навчання, підготовки та впровадження ліцензійного контролю знань «Крок-1». Під час роботи в академії П.О. Неруш приділяв значну увагу удосконаленню навчально-методичної, навчально-наукової та гуманітарно-виховної роботи. Це знайшло свій розвиток і підтримку в 15 опублікованих науково-методичних роботах і доповідях, на спільних міжнародних конференціях ДДМА і медичної школи Рочестерського університету США (1996) на міжнародних наукових конференціях з сучасних проблем реформування вищої школи України і підготовки фахівців у вищих медичних і фармацевтичних навчальних закладах України. Автор 5 навчальних посібників для студентів і лікарів-інтернів.

П.О.Неруш постійно займався громадською діяльністю: член правління Українського фізіологічного товариства та українського товариства нейронаук, член комісії з медицини науково-методичної ради МОН України. Був нагороджений знаками «Відмінник охорони здоров'я», «За відмінні успіхи у роботі», численними дипломами, міжнародними сертифікатами. Російською академією природничих наук нагороджений пам'ятною медаллю академіка П. Капіци і срібною – академіка І. Павлова за розвиток медицини і охорони здоров'я.

Світлу пам'ять про Петра Опанасовича назавжди збережемо в наших серцях.



### **Пам'яті Олени Платонівни Костюк**

7 лютого 2012 р. після тяжкої хвороби пішла з життя відомий учений-патофізіолог, ендокринолог, професор, доктор медичних наук, лауреат премії ім. О.О. Богомольця, член професійної секції Американської діабетичної асоціації, провідний науковий співробітник Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України Олена Платонівна Костюк.

Олена Платонівна народилася 29 січня 1957 р. у Києві в родині науковців – відомого вченого-нейрофізіолога, академіка Платона Григоровича Костюка та вченого-патофізіолога Людмили Василівни Костюк. Її бабуся, Олена Миколаївна Хохол, була відомим лікарем-педіатром, членом-кореспондентом АМН СРСР, завідувачем кафедри госпітальної педіатрії Київського медичного інституту. Дідусь Олени Платонівни, Костюк Григорій Силевич, був відомим ученим, академіком, директором науково-дослідного Інституту психології УРСР (нині Інститут психології ім. Г.С. Костюка АПН України). Після закінчення у 1980 р. Київського державного медичного інституту з відзнакою за спеціальністю «лікувальна справа» Олена Платонівна працювала в Київському НДІ ендокринології та обміну

речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України на посадах від клінічного ординатора до провідного наукового співробітника. Вона займалася проблемами цукрового діабету та в 1986 р. захистила кандидатську дисертацію «Роль декотрих контрінсулінових гормонів (глюкагону, соматостатину та соматотропіну) у патогенезі цукрового діабету та діабетичних ангіопатій» за спеціальністю «ендокринологія». Згодом Олена Платонівна розпочала тісне наукове співробітництво з Інститутом фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де намагалася поєднати клінічні та експериментальні дослідження для більш глибокого розуміння перебігу захворювань на клітинному та молекулярному рівні. У результаті такої співпраці вона захищає докторську дисертацію «Зміни кальцієвого гомеостазу в нервових клітинах при розвитку діабетичних нейропатій» (1999 р.). З 2004 р. до останніх своїх днів Олена Платонівна працювала в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України на посаді провідного наукового співробітника відділу загальної фізіології нервової системи та була керівником наукової групи, що займалася проблемами, пов'язаними з вивченням низки патологій нервової системи. З появою О.П. Костюк в інституті започаткувалися дослідження змін кальцієвого гомеостазу при нейроендокринних захворюваннях і фармакологічних впливів на них. Особлива увага була спрямована на вивчення порушень внутрішньоклітинної регуляції кальцію в нервових клітинах при таких патологіях, як діабетична нейропатія та ацидоз, що виникають при цукровому діабеті. Нею були започатковані дослідження особливостей внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу нервових клітин при хворобі Альцгеймера. Під керівництвом Олени Платонівни в Міжнародному центрі молекулярної фізіології АН України проводилися дослідження ролі TRP-каналів у кальцієвій сигналізації сенсорних нейронів у нормі та патології. Олена Платонівна була керівником або відповідальним виконавцем

низки вітчизняних і міжнародних наукових проектів, пов'язаних з дослідженнями в галузі ендокринології та нейрофізіології, була членом українських і міжнародних наукових товариств, серед яких Українське фізіологічне товариство, Українське товариство з нейронаук, Українське товариство патофізіологів, а також була членом редакційної ради «Фізіологічного журналу».

О.П. Костюк – автор понад 140 наукових публікацій і співавтор монографій «Клиническая диабетология», «Артериальная гипертензия при сахарном диабете», «Ионы кальция у функции мозга – від фізіології до патології», «Внутриклеточная кальциевая сигнализация: структура і функції». Вона була науковим керівником трьох кандидатських дисертацій, нею підготовлений курс лекцій «Молекулярна фізіологія», який вона викладала студентам кафедри прикладної фізики факультету ФТІ Національного технічного університету «КПІ». У 2010 р. Олені Платонівні присуджено вчене звання професор. Зараз її учні працюють у відомих лабораторіях США та Швеції. За

вагомий особистий внесок у розвиток вітчизняної фізіологічної науки, підготовку висококваліфікованих кадрів, багаторічну плідну наукову діяльність Олена Платонівна Костюк нагороджена медаллю «За працю і звитягу».

Леся, як її називали рідні та друзі, до останнього свого подиху цікавилася науковими новинами. Вона була скута хворобою і не могла писати, тому диктувала, а мати записувала текст статті. Один із її учнів, Сергій Романенко, написав із США, де він зараз працює: «Олена Платонівна була непересічною особистістю та чуттєвою людиною, віддано присвячувала своє життя науці та роботі, незважаючи на всі складнощі, що спіткали її у житті, вона невпинно рухалася вперед, не жаліючи сил задля роботи та колег. Вона залишила нас у молодому віці, коли ще могла чудово та плідно працювати, це безсумнівно значна втрата для української науки...».

Світла пам'ять про Олену Платонівну назавжди залишиться в серцях її колег, учнів, співробітників, її ім'я вписано в історію української науки.

## АВТОРАМ ПРО ЖУРНАЛ

Для публікації в «Фізіологічному журналі» приймаються оригінальні статті з основних розділів фізіології, а також огляди (на замовлення редакції), які відображають найбільш актуальні її проблеми, статті з історії вітчизняної та світової фізіологічної науки, котрі висвітлюють генезис і еволюцію ідей, виникнення та розвиток наукових шкіл, творчі портрети вчених, забуті імена науки, дискусійні статті, рецензії на статті та нові видання, наукову хроніку, оформлені відповідно до наступних вимог.

Рукописи статті висуваються українською, російською чи англійською мовами в двох екземплярах. Обсяг статті не повинен перевищувати 14 сторінок машинописного тексту через два інтервали (огляд – 25 сторінок), включаючи список літератури, таблиці, рисунки, короткий зміст статті російською, українською (реферат) та англійською (резюме) мовами обсягом 0,5 сторінки з наведеними ключовими словами. Текст статті потрібно надати в електронному варіанті на диску чи надіслати електронною поштою на адресу редакції (в форматі doc, docx чи rtf), наявність роздрукованого матеріалу при цьому обов'язкова.

Експериментальні статті повинні супроводжуватися рекомендаціями для друку від керівництва установи, де проводили дослідження. Рукопис має бути підписаний кожним з авторів. Наявність номера телефону та адреси (E-mail в т.ч..) для переписки обов'язкова.

На першій сторінці в лівому верхньому кутку приводиться шифр УДК, під ним – ініціали і прізвище автора, нижче – назва статті.

Вступ статті коротко висвітлює історію питання з посилками на опубліковані праці. Тут же слід обґрунтувати мету роботи. Розділ «Методика» викладається так, щоб використовуючи описану методику, можна було відтворити дослідження.

У розділі «Результати та їх обговорення» не слід повторювати дані таблиці. Обговорення результатів потрібно обмежити розглядом лише найбільш важливих установлених фактів, враховуючи попередні відомості з цих питань.

Список літератури упорядковується за алфавітом авторів, в тексті джерело відмічається порядковим номером у квадратних дужках. Список іноземних авторів наводиться мовою оригіналу, після списку вітчизняних,

продовжуючи нумерацію. На неопубліковані праці посилатися не можна. Після порядкового номера потрібно вказати прізвище та ініціали авторів, назву статті, назву видання, потім – для періодичних видань – 1) рік, 2) том (виділити жирним текстом), 3) номер (при його відсутності – місяць видання), 4) сторінки (від і до), а для неперіодичних – місце видання статті, назва видавництва, рік видання та сторінки.

Таблиці варто подавати тільки в тому разі, коли отримані результати не можна представити у вигляді діаграм і графіків. Їх потрібно друкувати на окремих сторінках. Скорочування слів у таблицях не допускається. Цифрові результати слід округляти, згідно з прийнятими правилами, враховуючи середню похибку методу. Вірогідність різниці потрібно підтверджувати статистичним аналізом. Таблиця не повинна дублювати ілюстрації. Кількість колонок і обсяг таблиці повинні давати можливість для її розміщення на одній сторінці журналу.

Графічні рисунки слід подавати в електронному варіанті у файлах форматів редакторів Excel, Microsoft Craft, CorelDRAW, Origin тощо. Штрихові та півтонові рисунки, фотографії подаються у будь-якому графічному форматі з роздільною здатністю не менше ніж 300 dpi. Графіки повинні мати чіткі калібровки по осям, мікрофотографії – лінійний масштаб.

Якщо наводяться декілька кривих, безпосередньо на рисунку потрібно вказати їх порядкові номери. Надписи на рисунках повинні бути лаконічними, всі умовні позначення розшифровуються в підтекстовці. На зворотному боці ілюстрацій слід зробити легкий надпис, указавши їх номери, прізвища, авторів і скорочену назву статті; на мікрофото – його верх і низ. Підписи до рисунків варто друкувати окремо від основної частини тексту. Вони мають складатися з загальної назви рисунка та пояснення його окремих елементів, у тому числі й умовних позначень (а, б, 1,2, I, II тощо). На полях рукопису потрібно відмітити місце рисунків.

Математичні та хімічні формули слід вміщувати в текст статті, використовуючи для їх створення засоби Microsoft Office.

Редакція залишає за собою право редагувати матеріали статей, погоджуючи правки з авторами.

## CONTENTS

N.D. Nosenko, L.V. Tarasenko, P.V. Sinitsyn, O.V. Sachinskaya, I.Yu. Ganzhiy, A.G. Reznikov. The dynamics of hormonal changes in female rats exposed to chronic stress and androgen excess during pubescence	3
T.V. Serebrovskaya, I.S. Nikolsky, L.I. Taranukha, V.V. Nikolska, S.M. Galytska, V.A. Ishchuk. Hematopoietic stem cells and immune status of subjects with different hypoxic tolerance	9
L.E. Vesnina, T.V. Mamontova, M.V. Mikityuk, L.A. Kutsenko, N.A. Bobrova, N.L. Kutsenko, I.P. Kaidashev. The condition of lipid peroxidation in balb/c mice and the effect of fullerene C <sub>60</sub> during immune response	19
M.I. Lisyany, A.I. Kluchnikova. Immune answer of mice's in case of intrabrain injection of the alohenic spleen cells or brain	27
V.I. Khorevin, A.V. Gorkovenko, I.V. Vereschaka. Relation between changes in displacement of center of pressure on the support and the angles of joints of the lower extremities at squatting	32
V.A. Berezovskiy, R.V. Yanko, I.G. Litovka, O.G. Chaka, T.M. Zamorska. Dosed normobaric hypoxia as non-medicamental approach of stimulation of physiological regeneration of liver parenchima	43
S.M. Korogod, I.B. Kulagina. Dynamical electrical states of heterogeneous populations of ion channels in the membranes of excitable cells	50
O.P. Yeliseyeva, D.V. Kaminskyy, K.O. Semen, O.H. Mysakovets, I.V.Chelpanova, A.K. Kurkevych. To the question of the heart rate fluctuations during submaximal workload by bicycle ergometry test	60
A.I. Gozhenko, A.M.Moskalenko, V.M. Sirman, A.A. Zhizhnevskaya, S.A. Storozhenko. Kidney function in oncologic patients after cisplastin chemotherapy	72
K. V. Yatsenko, V. A. Berezovskii, J.V. Deyeva. Effects of intermittent normobaric hypoxia on the state of the cns and cerebral circulation in children with cerebral palsy	77

## REVIEWS

V.F. Chekhun, D.V. Demash, L.A. Naleskina. Evaluation of biological effects and possible mechanisms of action of static magnetic field	85
N.V. Makogon, I.M. Alexeyeva. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP): physiological and pathological roles	95
A.D. Nozdrachev. Comment on the book of I.I. Korenyuk, T. Gamma, D.R.Husainov, M. Ravaeva, A.E. Dogwood, O. Kostyuchenko, O.T. Kolotilova "Nephrotropic effects various classes of chemical compounds and possible mechanisms of action"	113

## MEMORY DATES

Nerush Petro Opanasovych	116
Kostyuk Olena Platonivna	118

До відома авторів

У №1, том 58, 2012 назву статті Fartushok N.V. та співавт. слід читати:

**CHANGES IN ANTIOXIDANT SYSTEM AND THE LEVEL OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES (IL-1B) IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS PATIENTS**