

# Фізіологічний журнал

ТОМ 59 № 1 2013

---

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

---

Виходить 1 раз на 2 місяці

---

## Зміст

<i>Струтинська Н.А., Дорофєєва Н.О., Вавілова Г.Л., Сагач В.Ф.</i> Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкриття мітохондріальної пори у серці щурів зі спонтанною гіпертензією . . . . .	3
<i>Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Струтинська Н.А., Нецерет О.П., Мойбенко О.О.</i> Вплив активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліном на функцію серцево-судинної системи . . . . .	11
<i>Опанасенко Г.В., Братусь Л.В., Гавенаускас Б.Л., Гончар О.О., Маньковська І.М., Носар В.І., Французова С.Б.</i> Стан і способи фармакологічної корекції киснезалежних процесів у тканинах пародонта при тривалому іммобілізаційному стресі . . . . .	17
<i>Токарчук К.О., Капустяненко Л.Г., Шандренко С.Г.</i> Роль альдегідів у розвитку оксидативного стресу при рабдоміолізі у щурів . . . . .	25
<i>Данилович Ю.В., Чуніхін О.Ю., Данилович Г.В.</i> Тестування змін розмірів міоцитів матки за дії модуляторів її скоротливої активності методом фотонної кореляційної спектроскопії . . . . .	32
<i>Вовкун Т.В., Янчук П.І., Штанова Л.Я., Весельський С.П., Барановський В.А.</i> Вплив корвітину на секреторні процеси та кровотік у слизовій оболонці шлунка щура . . . . .	40
<i>Труш В.В., Соколов В.І.</i> Модуляція тестостероном ефектів дексаметазону у скелетному м'язі щурів . . . . .	47
<i>Хоревін В.І., Горковенко А.В., Верещака І.В.</i> Зв'язок між м'язовою активністю та кінематикою нижньої кінцівки в повільних руках присідання людини . . . . .	56
<i>Гуніна Л.М., Чекман І.С., Небесна Т.Ю., Горчакова Н.О.</i> Ефективність застосування $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот за фізичних навантажень . . . . .	68
<i>Михейцева І.М.</i> Протекторна дія мелатоніну за експериментальної глаукоми у щурів . . . . .	78

<i>Компанець І.В., Короткий О.Г., Нікольська В.В., Остапченко Л.І., Пилипенко С.В.</i> Продукція інтерферону лімфоцитами селезінки й тимуса щурів за умов тривалої гіпоацидності . . . . .	84
<i>Тищенко Ю.О., Кірошка В.В.</i> Динаміка морфогенезу і функціонального розвитку алотрансплантата оваріальної тканини щурів . . . . .	89
<i>Верещак В.В.</i> Зовнішні ознаки вікових змін лица як маркер дегенеративних змін колагену . . . . .	97
<i>Бесчасний С.П.</i> Стресорний вплив вродженої сенсоневральної туговухості на імунну систему дітей 7–11 років . . . . .	110
<i>Шпишина М.С., Веселовський М.С.</i> Пре- та постсинаптичні механізми довготривалої депресії глутаматергічної нейропередачі в синапсах нейронів спінальних гангліїв на нейронах дорсальних рогів спинного мозку щурів у кокультурі . . . . .	117
<i>Радченко В.Г.</i> Нові підходи до корекції гіперактивності сечового міхура . . . . .	124
<b>ХРОНІКА</b>	
VI Конгрес Наукового товариства патофізіологів України з міжнародною участю «Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології» (Крим, Сімферополь – Місхор, 3–5 жовтня 2012 року) . . . . .	129
VII Міжнародний симпозіум “Актуальні проблеми біофізичної медицини” . . . . .	132
<b>ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ</b>	
В.Я. Березовський (до 80-річчя з дня народження) . . . . .	135

Н.А. Струтинська, Н.О. Дорофєєва, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

## Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці щурів зі спонтанною гіпертензією

*У досліджах in vivo та in vitro на мітохондріях, ізольованих із тканини серця щурів з нормальним тиском і щурів зі спонтанною гіпертензією, досліджували вплив донора сірководню NaHS, а також субстрату його біосинтезу L-цистеїну, на чутливість мітохондріальної пори (МП) до дії її природного індуктора  $Ca^{2+}$ . Виявлено концентраційну залежність впливу NaHS ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  моль/л) на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця у обох групах тварин. Донор сірководню у концентраціях  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  і  $10^{-4}$  моль/л пригнічував кальційіндуковане відкривання МП (на 31, 76 і 100 % відповідно), що свідчить про його протекторний вплив на пороутворення, у серці щурів з нормальним тиском. Інгібування МП у серці щурів зі спонтанною гіпертензією потребувало на порядок вищої концентрації NaHS ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  моль/л) на тлі підвищеної здатності органел до пороутворення. В експериментах in vivo при одноразовому внутрішньоочеревинному введенні L-цистеїну ( $10^{-3}$  моль/кг) показано зменшення чутливості МП до індуктора  $Ca^{2+}$  в обох групах. Пригнічення in vivo біосинтезу сірководню за допомогою специфічного блокатора цистатіонін-γ-ліази пропарглілгіцину ( $10^{-4}$  моль/кг) запобігало дії L-цистеїну у серці щурів з нормальним тиском на відміну від щурів зі спонтанною гіпертензією, де спостерігали зменшення підвищеної чутливості МП до  $Ca^{2+}$ . Таким чином, за фізіологічних умов і при гіпертензії як екзогенній, так і ендогенній сірководень чинить стабілізуючу дію на мембрани мітохондрій, підвищуючи резистентність органел до природного індуктора МП  $Ca^{2+}$ .*

*Ключові слова: сірководень, L-цистеїн, мітохондріальна пора, серце, гіпертензія, щури.*

### ВСТУП

Артеріальна гіпертензія визначається як один із провідних чинників зростання серцево-судинних ускладнень, інвалідизації та зменшення тривалості життя [2, 7]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, кожна третя доросла людина на планеті має підвищений артеріальний тиск. Проте механізм розвитку цього захворювання остаточно не з'ясований. Багато авторів пов'язують причину виникнення артеріальної гіпертензії з особливостями функціонування мембран мітохондрій і клітинним дефіцитом енергії, який зумовлений порушенням процесу утворення енергії в мітохондріях клітин і зменшенням продукції АТФ [2, 6, 8, 9].

Згідно з даними попередніх досліджень, гіпертензивні стани організму пов'язані з мітохондріальною дисфункцією. Остання характеризується зниженням мембранного потенціалу мітохондрій і ступеня спряження процесів окиснення і фосфорилування, зниженням порога відкривання мітохондріальної пори (МП) та збільшенням її чутливості до індуктора  $Ca^{2+}$ . Це може спричинити втрату енергії та тканинні ушкодження, якими супроводжується гіпертензія [3, 13]. Крім того, нами було показано, що газовий трансмітер сірководень ( $H_2S$ ) бере участь у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран за фізіологічних умов і за старіння. А саме, встановлений факт пригнічення кальційіндукованого відкривання МП у серці дорослих і

© Н.А. Струтинська, Н.О. Дорофєєва, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

старих щурів [12]. Тому ми припустили дію сірководню в регуляції мітохондріальної дисфункції при гіпертензії.

Відомо, що  $H_2S$  відіграє роль у таких фізіологічних і патофізіологічних процесах, як кардіопротекція, регуляція тону судин, ангиогенез і проліферація гладеньком'язових клітин, довготривала синаптична потенціалізація тощо [11, 20, 21, 23]. В організмі синтез  $H_2S$  відбувається в результаті діяльності ферментів, що беруть участь у метаболізмі амінокислоти цистеїну: цистатіонін- $\gamma$ -ліази, цистатіонін- $\beta$ -синтази та 3-меркаптопіруват-сульфуртрансферази [20]. Дослідження, проведені з використанням специфічного інгібітора цистатіонін- $\gamma$ -ліази DL-пропаргілгліцину та субстрату L-цистеїну, показали, що саме цей фермент відіграє ключову роль в утворенні  $H_2S$  у серцево-судинній системі [22]. Дані літератури свідчать про можливу участь ендogenous сірководню щодо розвитку артеріальної гіпертензії [17]. Наші попередні дослідження показали, що донор сірководню знижував кінцево-діастолічну жорсткість міокарда й артеріальну жорсткість у щурів зі спонтанною гіпертензією [5]. Інтенсифікація процесів окиснення і фосфорилування під дією сірководню (*in vivo*) не супроводжувалася зниженням мембранного потенціалу мітохондрій та ступеня спряження процесів дихання і фосфорилування [4]. Тому актуальним є дослідження ролі сірководню у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран при гіпертензії.

Метою нашої роботи було вивчити вплив донора сірководню  $NaHS$ , а також субстрату його біосинтезу L-цистеїну у дослідах *in vitro* та *in vivo* на чутливість МП до дії  $Ca^{2+}$  у серці щурів зі спонтанною гіпертензією.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих щурах (6 міс, маса 220–250 г) лінії Вістар з нормальним тиском (I група) і щурах зі спонтанною гіпертензією (II група). Всі експериментальні

процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986р. (86/609/ЕЕС). Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10 тварин.

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

Відкривання МП досліджували спектрофотометричною реєстрацією набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л):  $KCl$  – 120,  $трис-HCl$  – 25,  $KH_2PO_4$  – 3; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при  $\lambda=520$  нм за 3 хв до і впродовж 15 хв їх набухання за наявності індуктора  $Ca^{2+}$ . Зміну рівня набухання органел визначали як різницю у відсотках між показником набухання мітохондрій на 15-й хвилині відносно вихідного значення. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з подальшою реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв. Одноразове введення щурам амінокислоти L-цистеїну здійснювали внутрішньоочеревинно за 30 хв до декапітації тварин. В іншому випадку, введення L-цистеїну ( $10^{-3}$  моль/кг) здійснювали через 30 хв після дії інгібітора ендogenous синтезу сірководню пропаргілгліцину.

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

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні дії  $NaHS$  у концентрації  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  моль/л на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця щурів з нормальним

тиском і зі спонтанною гіпертензією виявлено деякі відмінності (рис. 1). Показано, що в умовах преінкубації мітохондрій з донором сірководню у фізіологічних концентраціях  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  моль/л спостерігали дозозалежне зменшення рівня набухання органел серця у щурів з нормальним тиском на 31 і 76 % відповідно, що свідчить про його захисний ефект щодо відкриття МП (див. рис. 1,а). На рис. 1,б представлено результати досліджень дії NaHS щодо кальційіндукованого набухання мітохондрій у серці щурів зі спонтанною гіпертензією. Слід відмітити, що при концентрації  $10^{-6}$  моль/л ефекту не спостерігалося, а у концентрації  $10^{-5}$  моль/л NaHS зменшував рівень набухання органел серця на 21 %. Можливо, для відновлення та стабілізації мітохондріальних мембран у серці тварин з гіпертензією потрібна більша концентрація сірководню ( $10^{-4}$  моль/л; див. рис. 1,б), оскільки дані літератури вказують на зменшення його біосинтезу при різних патологічних станах, зокрема, при артеріальній і легеневої гіпертензії, хворобі Альцгеймера, пошкодженні слизової оболонки шлунка, цирозі печінки тощо [19]. Ми встановили, що ефективність донора сірководню у межах концентрацій  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  моль/л була вища у щурів з нормальним тиском порівняно зі зна-

ченнями щурів зі спонтанною гіпертензією; можливо, через дефіцит вмісту ендogenous сірководню при гіпертензії (рис. 2). У концентрації, вищій за фізіологічну, NaHS ( $10^{-4}$  моль/л) попереджав кальційіндуковане відкриття МП: рівень набухання мітохондрій у серці щурів з нормальним тиском був навіть нижчим за контрольне значення, а у щурів зі спонтанною гіпертензією – практично збігався з ним. Зниження рівня набухання мітохондрій, оптична густина яких була більшою у порівнянні з нативними органелами серця щурів I групи при дії NaHS у концентрації  $10^{-4}$  моль/л, можна пояснити особливостями конформаційних змін мембран органел, а також уповільненням їх метаболічної активності, що зумовлюють підвищену проникність мембран і пов'язане з цим відкриття МП.

Серце є важливим джерелом утворення ендogenous  $H_2S$  [16]. За даними літератури, його концентрація у серцево-судинній системі щурів становить  $(45,6 \pm 14,2)$  мкмоль/л, а утворення його у тканинах міокарда щурів прирівнюється до  $(18,64 \pm 4,49)$  нмоль  $\cdot$  хв $^{-1}$   $\cdot$  г $^{-1}$  білка [22]. Отримані нами результати вказують на те, що інгібування МП сірководнем відбувалося за фізіологічних його концентрацій, тобто при 1–50 мкмоль/л у тварин з нормальним тиском і потребувало на порядок

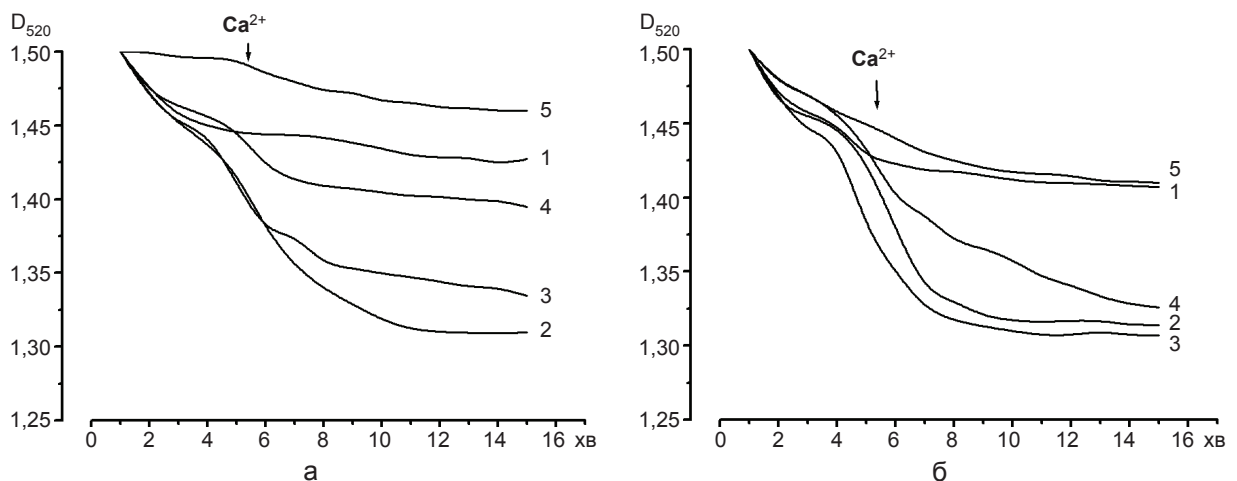


Рис. 1. Дія донора сірководню на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця щурів з нормальним тиском (а) і зі спонтанною гіпертензією (б): 1 – контроль; 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); 3, 4, 5 – преінкубація з NaHS ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  моль/л відповідно), дія  $Ca^{2+}$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

вищої концентрації 10-100 мкмоль/л у щурів зі спонтанною гіпертензією.

Для з'ясування ролі ендogenous сірководню щодо регуляції відкриття МП у серці щурів обох груп була проведена серія експериментів з використанням специфічного блокатора  $H_2S$ -синтезуючого ферменту цистатіонін- $\gamma$ -ліази пропаргілгліцину для моделювання тим самим умов недостатності ендogenous синтезу сірководню ( $H_2S$ -дефіциту). В експериментах *in vivo* досліджували одноразове введення щурам обох груп амінокислоти L-цистеїну ( $10^{-3}$  моль/кг) як субстрату для синтезу сірководню та за умов попереднього введення пропаргілгліцину ( $10^{-4}$  моль/кг).

Так, після ін'єкції L-цистеїну було встановлено зменшення чутливості МП до індуктора  $Ca^{2+}$  у серці щурів обох груп (рис. 3,а,б). У разі концентрації  $Ca^{2+}$   $10^{-4}$  моль/л рівень набухання мітохондрій серця щурів обох груп був таким як при концентрації індуктора  $10^{-7}$  моль/л. Це свідчить про збільшення на три порядки порогової концентрації іона, яка спричиняє набухання органел як у серці щурів з нормальним тиском, так і зі спон-

танною гіпертензією. Цей факт пояснюється залученням L-цистеїну до ендogenous шляхів синтезу сірководню з наступною регуляцією пороутворення як за фізіологічних умов, так і при гіпертензії.

Натомість, після введення L-цистеїну щурам з нормальним тиском за умов попереднього інгібування пропаргілгліцином, не спостерігали ефекту щодо зміни чутливості МП до  $Ca^{2+}$ : концентраційна крива не відрізнялася від контрольної (див. рис. 3,а). Таким чином, введення пропаргілгліцину запобігало дії L-цистеїну щодо зменшення чутливості МП до  $Ca^{2+}$ . Очевидно, в цьому разі спрацьовує один із механізмів інгібування утворення ендogenous  $H_2S$  за допомогою пропаргілгліцину, введення якого перешкоджає дії субстрату для ферменту цистатіонін- $\gamma$ -ліази L-цистеїну. Інший ефект спостерігали у щурів зі спонтанною гіпертензією (див. рис. 3,б). Так, у разі введення L-цистеїну, за умов попереднього інгібування цистатіонін- $\gamma$ -ліази, зменшувалася чутливість МП до дії  $Ca^{2+}$  за рахунок збільшення на два порядки концентрації індуктора, подібно до дії самого L-цистеїну. Отриманий ефект

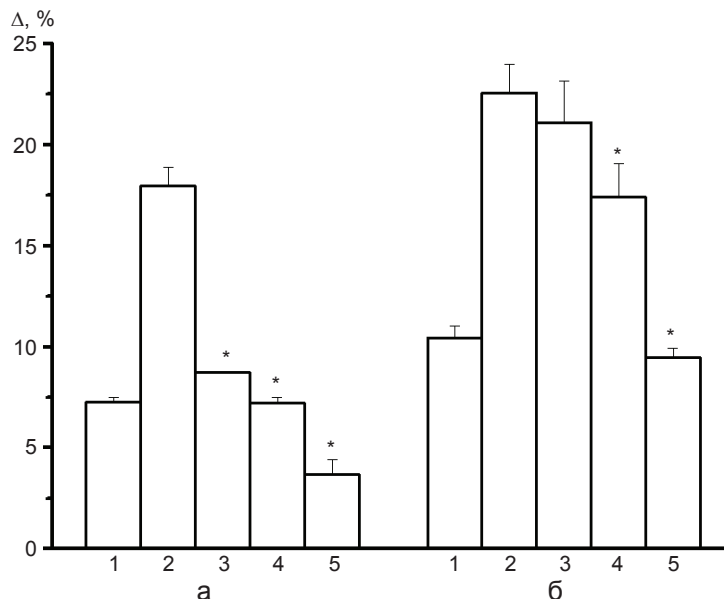


Рис. 2. Порівняння дії *in vitro* донора сірководню на набухання мітохондрій серця щурів з нормальним тиском (а) і зі спонтанною гіпертензією (б): 1 – контроль; 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); 3,4,5 – преінкубація з NaHS ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  моль/л відповідно), дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л). \* $P < 0,05$ , відносно набухання мітохондрій в умовах дії  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л)



можна пояснити можливим зниженням експресії  $H_2S$ -синтезуючого ферменту цистатіонін- $\gamma$ -ліази (відсутність мішені дії пропаргілгліцину), розвитком недостатності ендогенного синтезу сірководню у тканинах серця та залученням амінокислоти L-цистеїну з її антиоксидантними властивостями до інших ендогенних шляхів метаболізму за участю амінокислотних функціональних SH-груп при гіпертензії.

Відомо, що концентрація  $H_2S$  у плазмі крові, експресія та активність ферменту цистатіонін- $\gamma$ -ліази в аорті є зменшеною у щурів зі спонтанною гіпертензією. Застосування NaHS знижувало кров'яний тиск у таких тварин, але не у щурів з нормальним тиском. Інгібітор цистатіонін- $\gamma$ -ліази пропаргілгліцин зменшував вміст  $H_2S$  у плазмі крові, в аорті і підвищував кров'яний тиск у останніх, але не у щурів зі спонтанною гіпертензією [19]. Таким чином, ми припускаємо, що зниження вмісту ендогенного сірководню спричиняє підвищення чутливості МП до  $Ca^{2+}$ , що свідчить про його участь у регуляції пороутворення у серці. Подібний ефект спостерігали у разі підвищення чутливості МП до дії індуктора  $Ca^{2+}$  за умов впливу інгібітора конститутивної NO-синтази L-NAME

[14]. Дані літератури вказують на можливу взаємодію обох газових трансмітерів –  $H_2S$  та оксиду азоту (NO), що може мати важливе фізіологічне значення. Крім того,  $H_2S$  здатний як посилювати, так і послаблювати дилататорну дію NO в аорті щурів, тоді як саме NO індукує вивільнення  $H_2S$  у судинах щурів, а також підвищує експресію цистатіонін- $\gamma$ -ліази у культурі гладеньком'язових клітин судин [18].

На рис.4 представлено порівняння дії інгібітора МП циклоспорину А (ЦсА) на кальційіндуковане набухання мітохондрій у серці щурів з нормальним тиском і зі спонтанною гіпертензією за умов введення їм L-цистеїну та інгібування пропаргілгліцином  $H_2S$ -синтезуючого ферменту. Так, у щурів з нормальним тиском інгібітор МП як при введенні L-цистеїну, так і цієї амінокислоти на тлі дії пропаргілгліцину, повністю запобігав кальційіндукованому набухання мітохондрій у серці (див. рис. 4,а), а у щурів зі спонтанною гіпертензією – лише частково (на 54 %). Подібний ефект спостерігали як при введенні L-цистеїну (інгібування ЦсА становило 52 %), так і при дії цієї амінокислоти за умов попереднього введення пропаргілгліцину (інгібування ЦсА становило 53 %) у порівнянні

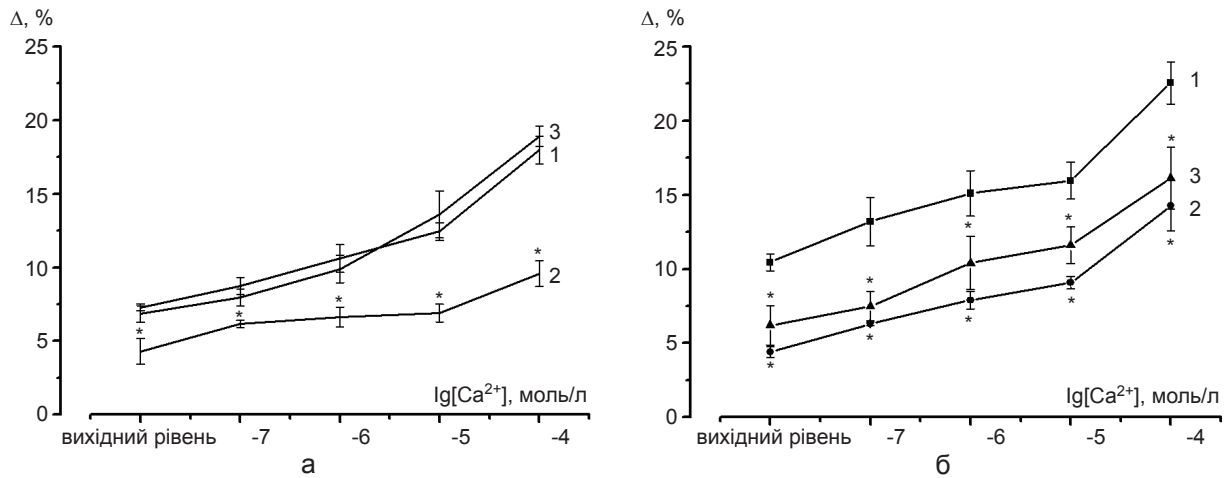


Рис. 3. Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора її відкриття –  $Ca^{2+}$  у серці щурів з нормальним тиском (а) і зі спонтанною гіпертензією (б) за умов впливу *in vivo* L-цистеїну та пропаргілгліцину: 1 – контроль; 2 – дія L-цистеїну ( $10^{-3}$  моль/кг), 3 – попереднє введення пропаргілгліцину ( $10^{-4}$  моль/кг), дія L-цистеїну ( $10^{-3}$  моль/кг). \* $P < 0,05$  відносно контролю

з вихідним рівнем, що свідчить про наявність ЦсА-нечутливої компоненти МП. Отже, ефективність дії ЦсА як інгібітора МП була вища у щурів з нормальним тиском.

Дані літератури свідчать про те, що за умов спонтанної гіпертензії вміст  $H_2S$ , як і  $NO$  був зниженим [15]. Відомо, що  $NO$  є одним із найсильніших вазодилататорів, що продукується ендотелієм і залучений до судинної патології. Він відіграє важливу роль у регуляції функціонування мітохондрій у разі гіпертензії. Якщо молекула  $H_2S$  має сильні відновні властивості, ми робимо припущення, що протекторні її ефекти у фізіологічних концентраціях можуть бути пов'язані із захистом тіолових груп білків, зокрема одного з компонентів МП аденіннуклеотид-трансферази, від окиснення. Окрім того, до захисних ефектів, які спостерігаються при дії сірководню на мітохондрії, можуть бути також частково залучені мітохондріальні АТФ-залежні калієві канали, як нами було показано раніше [11].

Таким чином, результати наших досліджень дають підставу припустити, що гіпертензивні стани організму супроводжуються мітохондріальною дисфункцією, яка прояв-

ляється у збільшенні чутливості МП до дії  $Ca^{2+}$ , на тлі зниження ендогенного синтезу  $H_2S$ , що може спричинити поширені тканинні ушкодження, пов'язані з хворобами серцево-судинної системи. Отримані нами результати свідчать про участь як екзогенного, так і ендогенного  $H_2S$  у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, зокрема, через інгібування кальційіндукованого відкриття МП у серці щурів зі спонтанною гіпертензією. Отже, за фізіологічних умов та при гіпертензії ендогенний  $H_2S$  імовірно чинить стабілізуючу дію на мембрани мітохондрій, підвищуючи резистентність органел до природного індуктора МП  $Ca^{2+}$ . Ми припустили, що за умов інгібування пропаргілгліцином цистатіонін- $\gamma$ -ліази ендогенний вміст газового трансмітера може суттєво зменшуватися, що призводить до підвищення чутливості МП до кальцію. У зв'язку з цим знижений вміст  $H_2S$  при гіпертензії може бути наслідком або зменшення експресії  $H_2S$ -синтезуючого фермента цистатіонін- $\gamma$ -ліази, або його каталітичної активності, тому сірководень може бути важливим регуляторним фактором у серцево-судинній системі за фізіологічних і патологічних умов, зокрема при гіпертензії.

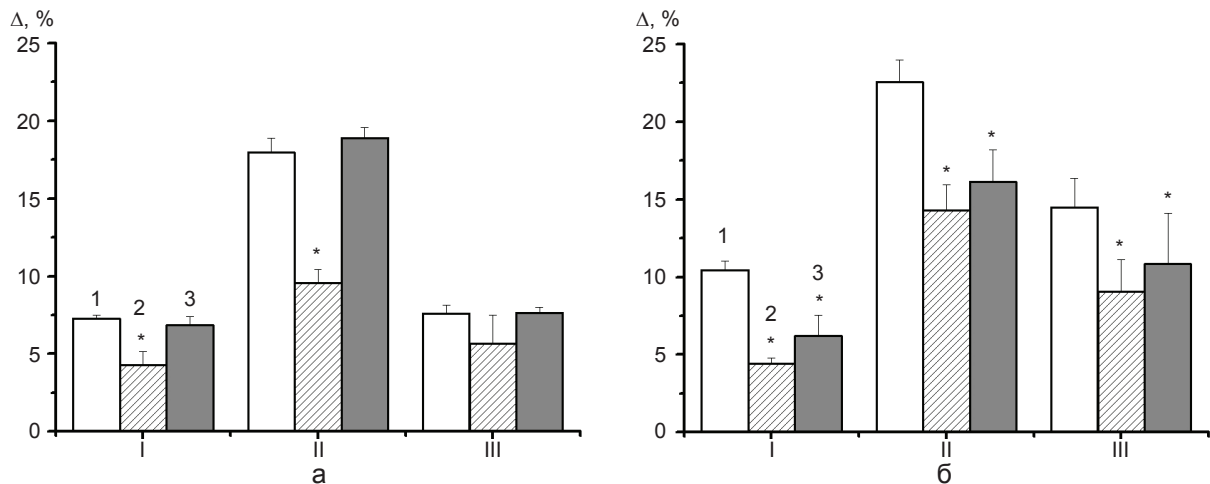


Рис. 4. Порівняння дії *in vivo* L-цистеїну та пропаргілгліцину на набухання мітохондрій серця щурів з нормальним тиском (а) і зі спонтанною гіпертензією (б): I – контроль; II – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); III – преінкубація з циклоспорином А ( $10^{-5}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); 1 – вихідний рівень, 2 – L-цистеїн, 3 – пропаргілгліцин і L-цистеїн. \* $P < 0,05$  відносно вихідного рівня



## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що донор сірководню NaHS ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  моль/л) дозозалежно пригнічував кальційіндуковане відкриття МП у серці щурів зі спонтанною гіпертензією. Інгибування МП у серці цих тварин потребувало на порядок вищої концентрації донора у порівнянні зі щурами з нормальним тиском.

2. В експериментах *in vivo* при введенні щурам субстрату для синтезу сірководню L-цистеїну ( $10^{-3}$  моль/кг) показано зменшення чутливості МП до індуктора її відкриття  $Ca^{2+}$  у серці як у щурів з нормальним тиском, так і зі спонтанною гіпертензією.

3. За умов інгибування *in vivo* біосинтезу сірководню за допомогою пропаргілгліцину ( $10^{-4}$  моль/кг) введення щурам L-цистеїну ( $10^{-3}$  моль/кг) призводило до зменшення чутливості МП до  $Ca^{2+}$  у серці тварин зі спонтанною гіпертензією, тоді як у серці щурів з нормальним тиском пропаргілгліцин запобігав дії L-цистеїну як інгібітора МП.

Н. А. Струтинская, Н.А. Дорофеева,  
Г. Л. Вавилова, В. Ф. Сагач

### СЕРОВОДОРОД ИНГИБИРУЕТ КАЛЬЦИЙИНДУЦИРОВАННОЕ ОТКРЫТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ В СЕРДЦЕ КРЫС СО СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

В опытах *in vivo* и *in vitro* на митохондриях, изолированных из ткани сердца крыс со спонтанной гипертонией и крыс с нормальным давлением, исследовали влияние донора сероводорода NaHS, а также субстрата его биосинтеза L-цистеина, на чувствительность митохондриальной поры (МП) к действию природного индуктора  $Ca^{2+}$ . Установлена концентрационная зависимость между влиянием NaHS ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  моль/л) и кальцийиндуцированным набуханием митохондрий сердца в обеих группах животных. Донор сероводорода в концентрациях  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  моль/л угнетал (на 31, 76 и 100 % соответственно) кальцийиндуцированное открытие МП, что свидетельствовало о его протекторном действии на порообразование в сердце крыс с нормальным давлением. Ингибирование МП в сердце крыс со спонтанной гипертонией требовало на порядок более высокой концентрации NaHS ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  моль/л) на фоне повышенной способности органелл к порообразованию. В экспериментах *in vivo* при однократном внутривенном введении L-цистеина ( $10^{-3}$  моль/кг)

показано уменьшение чувствительности МП к индуктору  $Ca^{2+}$  в сердце обеих групп животных. Ингибирование *in vivo* биосинтеза сероводорода с помощью специфического блокатора цистатионин- $\gamma$ -лиазы пропаргилглицина ( $10^{-4}$  моль/кг) предотвращало действие L-цистеина в сердце крыс с нормальным давлением в отличие от крыс со спонтанной гипертонией, где наблюдалось уменьшение повышенной чувствительности МП к  $Ca^{2+}$ . Таким образом, при физиологических условиях и при гипертонии как экзогенный, так и эндогенный сероводород оказывает стабилизирующее действие на мембраны митохондрий, повышая резистентность органелл к природному индуктору МП  $Ca^{2+}$ .

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

N.A. Strutynska, N.Dorofeyeva, G.L.Vavilova,  
V.F. Sagach

### HYDROGEN SULFIDE INHIBITS $Ca^{2+}$ - INDUCED MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

In experiments *in vivo* and *in vitro* on the mitochondria isolated from the control and spontaneously hypertensive rats (SHR) hearts, we studied the effects of a donor of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ), NaHS, and  $H_2S$  biosynthesis substrate, L-cysteine, on the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening to its natural inductor,  $Ca^{2+}$ . We found that NaHS ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  and  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) influenced the mitochondrial swelling in a concentration-dependent manner in control and spontaneously hypertensive rats. The  $H_2S$  donor NaHS used in physiological concentrations ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  and  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) exerted the inhibiting effect on the  $Ca^{2+}$ -induced mPTP opening in control hearts (corresponding values of such effect were 31, 76, and 100%, respectively), while in spontaneously hypertensive rats hearts the protector effect of NaHS was observed only at its concentration of  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  mol/l. In experiments *in vivo*, single intraperitoneal injections of L-cysteine ( $10^{-3}$  mol/kg) resulted in a decrease in the sensitivity of mPTP to its inductor  $Ca^{2+}$  in control rats and SHR. In experiments *in vivo* in which we used a specific blocker of cystathionine- $\gamma$ -lyase, propargylglycine ( $10^{-4}$  mol/kg), with the further injections of L-cysteine we observed a decrease in the threshold  $Ca^{2+}$  concentration (that induce the mitochondrial swelling) by three orders of magnitude in SHR, but in control rats did not effect of L-cysteine. Thus, both endogenous and exogenous hydrogen sulfide inhibits  $Ca^{2+}$ -induced mitochondrial permeability transition pore opening, indicating its protective effect on pore formation in spontaneously hypertensive rats hearts. Therefore, our studies are indicative of the involvement of  $H_2S$  in modulation of changes in the permeability of mitochondrial membranes, which can be an important regulatory factor in the development of cardiovascular diseases. Key words: hydrogen sulfide, L-cysteine, mitochondrial permeability transition pore, heart, hypertension, rats.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Будников Е.Ю., Постнов А.Ю., Дорошук А.Д., Афанасьева Г.В., Постнов Ю.В. Сниженная АТФ-синтезирующая способность митохондрий печени спонтанно гипертензивных крыс (SHR): роль кальциевой перегрузки митохондрий // Кардиология. – 2002. – № 12. – С. 47–50.
2. Горбась І.М. Епідеміологічні та медико-соціальні аспекти артеріальної гіпертензії // Укр. кардіол. журн. – 2010. – № 1. – С.13–18.
3. Дорофеева Н.О., Гошовська Ю.В., Сагач В.Ф. Мембранный потенциал митохондрий сердца і швидкість споживання кисню у щурів із генетично детермінованою артеріальною гіпертензією // Фізіол. журн. – 2011. – 57, №3 – С.3–9.
4. Дорофеева Н.А., Сагач В.Ф. Влияние сероводорода на функционирование митохондрий сердца спонтанно гипертензивных крыс // Актуальні проблеми транспортної медицини. – 2012. – №2(28). – С.116–119.
5. Дорофеева Н.О., Кузьменко М.О., Сагач В.Ф. Вплив донору сірководню на функцію сердца спонтанно гіпертензивних щурів // Таврич. мед.-биол. вестн. – 2012. – №3, ч.1(59). – С.92–94.
6. Дорошук А.Д. Структурно-функциональные особенности митохондрий при экспериментальной гипертонии различного генеза: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: – М., 2007. – 17 с.
7. Коваленко В.М. Талаева Т.В., Братусь В.В. Значимость артериальной гипертензии как фактора сердечно-сосудистой патологии, механизмы ее проатерогенного действия // Укр. кардіол. журн. – 2010. – № 3.
8. Постнов А.Ю. Некоторые молекулярные и клеточно-тканевые характеристики патогенеза артериальной гипертензии: особенности наследования и клеточной энергетики (экспериментальное исследование): Автореф. дис... д-ра мед. наук. – М., 2005. – 18 с.
9. Постнов Ю.В., Орлов С.Н., Будников Е.Ю., Дорошук А.Д., Постнов А.Ю. Нарушение преобразования энергии в митохондриях клеток с уменьшением синтеза АТФ как причина стационарного повышения уровня системного артериального давления // Кардиология. – 2008. – № 8. – С. 49–59.
10. Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів // Фізіол. журн. – 2004. – 50, №2. – С.49–63.
11. Семенихіна О.М., Базилюк О.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Роль та механізми впливу сірководню на скоротливу активність гладеньких м'язів різних судин щурів // Там само. – 2011. – 57, № 4 – С.3–11.
12. Струтинська Н.А., Семенихіна О.М., Чорна С.В., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкриття мітохондріальної пори у серці дорослих і старих щурів // Там само. – 2011. – 57, № 6. – С.3–14.
13. Струтинська Н.А., Дорофеева Н.О., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф. Підвищена чутливість мітохондріальної пори до індуктора  $Ca^{2+}$  у серці щурів зі спонтанною гіпертензією // Там само. – 2012. – №6. – С.
14. Шиманская Т.В., Добровольский Ф.В., Вавилова Г.Л., Струтинская Н.А., Рудык Е.В., Сагач В.Ф. NO-зависимая модуляция чувствительности открытия митохондриальной поры при ишемии–реперфузии изолированного сердца // Рос. физиол. журн. – 2009. – 95, №1 – С.28–37.
15. Aguilera-Aguirre L., Gonzalez-Hernandez J.C., Perez-Vazquez V., Ramirez J., Clemente-Guerrero M., Villalobos-Molina R., Saavedra-Molina A. Role of intramitochondrial nitric oxide in rat heart and kidney during hypertension // Mitochondrion. – 2002. – P. 413–423.
16. Chang L., Geng B., Yu F., Zhao J., Jiang H., Du J, Tang C. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats // Amino Acids. – 2008. – 34. – P. 573 – 585.
17. Junbao D., Hui Y., Chaoshu T. Endogenous H<sub>2</sub>S in involved in the development of spontaneous hypertension // J. Peking. Univ.[Health Sci.]. – 2003. – № 35. – P.102.
18. Li L., Hsu A., Moore P.K. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation – a tale of three gases// Pharmacol. Ther. – 2009. – 123. – P. 386–400.
19. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) – the third gas of interested for pharmacologists // Pharmacol. Rep. – 2007. – 59. – P. 4–24.
20. Mancardi D., Penna C., Merlino A., Del Soldato P, Wink D.A., Pagliaro P. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter : hydrogen sulphide // Biochem. Biohys. Acta. – 2009. – 1787. – P. 864–872.
21. Skovgaard N, Gouliaev A, Aalling M, Simonsen U. The role of endogenous H<sub>2</sub>S in cardiovascular physiology // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2011. – 12, № 9. – P. 1385–1393.
22. Whiteman M., Moore P.K. Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability // J. Cell. Mol. Med. – 2009. – 13. – P. 488–507.
23. Yang G., Wu L., Jiang B., Yang W., Qi J. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine  $\gamma$ -lyase // Science. – 2008. – 322. – P. 587–590.

Р.Б. Струтинський, Р.А. Ровенець, Н.А. Струтинська, О.П. Нещерет, О.О. Мойбенко

## Вплив активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліном на функцію серцево-судинної системи

*В досліджах in vivo на анестезованих собаках вивчено вплив фторвмісного активатора АТФ-чутливих калієвих ( $K_{ATP}$ ) каналів флокаліну, введеного внутрішньовенно в дозах від 0,01 до 1,5 мг/кг на кардіогемодинаміку. Показано, що він дозозалежно знижує системний артеріальний тиск, перфузійний тиск у коронарних судинах і загально-периферичний опір судин з максимальними ефектами  $56,8 \pm 2,7$ ,  $22,4 \pm 4,7$  та  $47,2\% \pm 6,5\%$  відповідно, викликає розвиток кардіодепресорних реакцій у роботі серця, що проявляються в зменшенні тиску у лівому шлуночку, швидкості наростання ( $dP/dt_{max}$ ) і зменшення ( $dP/dt_{min}$ ) тиску в ньому з найбільшими ефектами  $37,1 \pm 5,1$ ,  $51,2 \pm 9,4$  та  $55,6\% \pm 6,9\%$  відповідно при дозі флокаліну 1,5 мг/кг. Зменшує хвилинний об'єм крові та частоту серцевих скорочень з максимальним ефектом  $23,1 \pm 12,7$  та  $19,2\% \pm 1,7\%$  відповідно при дозі 1,0 мг/кг. Слід зауважити, що частота серцевих скорочень та загально-периферичний опір значно знижуються лише при великих дозах флокаліну – 1 та 1,5 мг/кг. Таким чином, показано, що активація  $K_{ATP}$ -каналів флокаліном призводить до дозозалежного зниження судинного тонуусу та скоротливої активності міокарда. Ключові слова: аденозинтрифосфатчутливі калієві канали, флокалін, кардіогемодинаміка, судинний тиск, кардіодепресорні реакції.*

### ВСТУП

Флокалін відноситься до фторвмісних активаторів АТФ-чутливих калієвих ( $K_{ATP}$ ) каналів сарколемальної та мітохондріальної клітинних мембран підродини ціаногуанідинів [3,17]. Основним принципом його дії, як і всіх сполук такого типу, є гіперполяризація сарколемальної та деполяризація внутрішньої мітохондріальної мембран клітин. Суть його дії полягає в тому, що відкривання каналів у сарколемальній мембрані судинних, гладеньком'язових клітин призводить до їх розслаблення, розширення судин та збільшення кровотоку. Гіперполяризація мембран у кардіоміоцитах зменшує тривалість рефрактерного періоду потенціалу дії, під час якого кальцій надходить в клітину, зокрема через кальцієві канали L-типу, та відповідно, його внутрішньоклітинну концентрацію, внаслідок чого зменшується скоротлива активність міокарда. На показ-

ники кардіогемодинаміки може впливати також пригнічення активності  $Ca^{2+}$ -залежних ферментів і, відповідно, зміна метаболічних процесів. У попередніх дослідженнях in vitro показано дозозалежну вазодилататорну дію флокаліну на препарати ізольованих смужок аорти та коронарні судини ізольованого та перфузованого за Лангендорфом серця шурів і морських свинок [8, 10]. Вивчено також вплив флокаліну на системний артеріальний тиск (САТ) в експериментах in vivo [15]. Крім того, на ізольованих за Лангендорфом серцях показано, що в дозах 1–10 мкмоль/л він практично не змінює скоротливу активність серця [10]. Водночас широкого дослідження ефектів флокаліну в експериментах in vivo не проводилося.

Метою нашої роботи було дослідження впливу флокаліну на показники кардіогемодинаміки в експериментах in vivo на великих тваринах.

© Р.Б. Струтинський, Р.А. Ровенець, Н.А. Струтинська, О.П. Нещерет, О.О. Мойбенко

## МЕТОДИКА

Експерименти проводили на безпородних собаках ( $n=7$ ) різної статі масою від 17 до 23 кг під хлоразо-уретановим наркозом (хлоралоза – 0,07 та уретан – 0,35 г/кг, внутрішньовенно) при закритій грудній клітці та збереженні природного дихання (детально метод описаний [11]). Перфузія коронарних судин з постійним об'ємом крові давала можливість слідкувати за змінами судинного тону. САТ і тиск у лівому шлуночку (ТЛШ) реєстрували електроманометром через катетер у аорті та порожнині шлуночка. Хвилинний об'єм крові (ХОК) визначали методом термодилуції [2]. Зміни скоротливості міокарда лівого шлуночка оцінювали за допомогою першої похідної тиску у шлуночку ( $dP/dt$ ). Реєстрацію гемодинамічних параметрів проводили протягом всього дослідження за допомогою полікардіографа "Mingograph-82" ("Siemens-Elema", Швеція).

Флокалін розчиняли в диметилацетаміді (на 5 мг флокаліну – 0,1 мл диметилацетаміду) та вводили в дозах від 0,01 до 1,5 мг/кг внутрішньовенно. В окремі серії експериментів в аналогічних дозах вводили сам розчинник, для виявлення можливих впливів на показники гемодинаміки.

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

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що внутрішньовенне введення флокаліну в експериментах *in vivo* дозозалежно знижує САТ і розширює коронарні судини (рис. 1). Виявлено, що його порогова доза становить 0,05 мг/кг і відповідає незначній дилататорній реакції амплітудою у середньому  $9,5\% \pm 2,0\%$  (для САТ,  $n=7$ ,  $P < 0,05$ ) та  $6,71\% \pm 0,64\%$  ( $n=7$ ,  $P < 0,05$ ) для перфузійного тиску в коронарних судинах (ПКТ). Збільшення дози призводило до послі-

довного дозозалежного зменшення значення цих показників. Вплив флокаліну на САТ нами був детально описаний раніше [15]. Слід зауважити, що лімітом для збільшення його дози в експериментах *in vivo* (понад 1,5 мг/кг) було критичне зниження саме цього показника (див. рис. 1). Проте застосування такої дози флокаліну в терапевтичних цілях не є доречним, адже його оптимальними кардіопротекторними дозами в експериментах з гострою ішемією та реперфузією міокарда доцільно вважати 0,1–0,2 мг/кг (що менше у 15 та 7,5 раза) [3, 7].

Максимальне зниження ПКТ – на  $22,44\% \pm 4,67\%$  або на  $28,92$  мм рт.ст.  $\pm 5,46$  мм рт.ст. ( $n=5$ ,  $P < 0,05$ ) при вихідному рівні тиску  $130,29$  мм рт.ст.  $\pm 5,82$  мм рт.ст. також реєстрували при введенні максимальної дози флокаліну – 1,5 мг/кг (див. рис. 1). Ці результати добре корелюють з отриманими раніше в експериментах *in vitro* на ізольованих, перфузованих за Лангендорфом серцях самців морської свинки, де максимальне зменшення ПКТ становило  $22,1\% \pm 4,7\%$  від вихідного рівня та відбувалося при концентрації 10 мкмоль/л [10]. Вазодилататорні ефекти флокаліну є швидкими і сягають свого максимуму протягом 2–4 хв після вну-

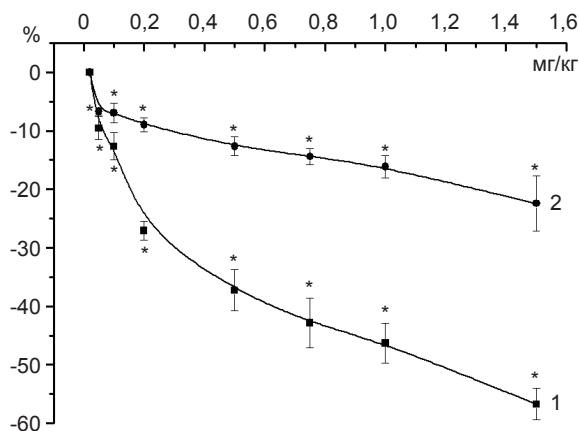


Рис. 1. Залежність (крива доза-ефект) системного артеріального тиску (1) та перфузійного тиску в коронарних судинах (2) від введеної дози флокаліну (в відсотках від вихідного рівня) в експериментах на анестезованих собаках. \* $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем



трішньовенного введення в експериментах *in vivo*, що може бути досить перспективним у разі термінового зняття коронарспазмів у клініці. Слід зауважити, що вазодилаторні ефекти в відповідь на введення флокаліну були отримані за умов, близьких до фізіологічних, де вихідний рівень САТ і ПКТ становив у середньому 121,5 та 130,3 мм рт.ст. відповідно. Цілком можливо, що зменшення судинного тиску при дії флокаліну в умовах гіпертензії повинно бути значно сильнішим. Щодо використання активаторів  $K_{AT\Phi}$ -каналів у терапевтичних цілях (Hyperstat<sup>®</sup>, Loniten<sup>®</sup>, Rogaine<sup>®</sup>, Adancor<sup>®</sup>, Pindac<sup>®</sup> тощо) при артеріальній та легеневій гіпертензії, гіпертензивних кризах і стенокардії, то саме вони використовуються при особливо важких формах цих захворювань, резистивних до комбінованої терапії іншими гіпотензивними засобами [1]. Отже, зважаючи на значно меншу токсичність флокаліну порівняно з закордонними аналогами (у 3–4 рази), він є досить перспективним лікарським засобом [3, 4, 9].

Відповідно до зниження артеріального тиску при збільшенні активації  $K_{AT\Phi}$ -каналів, дозозалежним чином зменшувався загальнопериферичний опір (ЗПО) судин (рис. 2). Водночас зниження ХОК дещо запобігало цьому – зокрема, при дозах флокаліну – 0,1 та 0,5 мг/кг – ЗПО майже не відрізнявся від вихідного рівня. При збільшенні дози до 1 та 1,5 мг/кг він значно зменшувався, а саме на  $20,14 \pm 7,09$  та  $47,17\% \pm 6,45\%$  (для обох  $n=5$ ,  $P<0,05$ ) відповідно.

У разі введення флокаліну дещо знижувався ХОК, з максимальним ефектом при введенні дози 1,0 мг/кг – на  $23,13\% \pm 12,66\%$  ( $n=5$ ,  $P<0,05$ ; див. рис. 2).

При дослідженні скоротливої функції серця було показано, що флокалін викликає кардіодепресорні реакції в його роботі, які полягають в дозозалежному зменшенні ТЛШ, швидкості наростання ( $dP/dt_{max}$ ) та зменшення ( $dP/dt_{min}$ ) тиску в ньому (рис. 3). З їх максимальним зниженням на  $37,07 \pm 5,06$ ,  $51,24 \pm 9,39$  та  $55,62\% \pm 6,92\%$  (для всіх  $n=5$ ,

$P<0,05$ ) від вихідного рівня відповідно. І це не дивно, а навпаки, є одним із захисних, пристосувальних механізмів при гіпоксії міокарда, направлених на зменшення його скоротливої активності та метаболічних процесів в ньому, забезпечує зменшення витрат енергоресурсів (АТФ) і кисню в кардіоміоцитах, що є особливо важливим пристосувальним механізмом в відповідь на гіпоксію перед можливою ішемією. Суть цього захисту полягає в тому, що відкривання  $K_{AT\Phi}$ -каналів зміщує мембранний потенціал у бік гіперполяризації, зменшує тривалість потенціалу дії кардіоміоцитів, під час якого кальцій надходить в клітину, та відповідно, його внутрішньоклітинну концентрацію, який є одним із головних вторинних посередників чисельних метаболічних реакцій і активатором багатьох ферментів [13, 18]. Цілком можливо, що гіперполяризація плазматичної мембрани та зниження скоротливої активності міокарда може відбуватись не лише при активації цих каналів, але і, як було недавно показано в експериментах на ізольованих неонатальних кардіоміоцитах з використанням методу patch-clamp, внаслідок прямого інгібування флокаліном активності високопорогових кальцієвих і потенціалзалежних натрієвих каналів [16]. Компенсаторним механізмом у

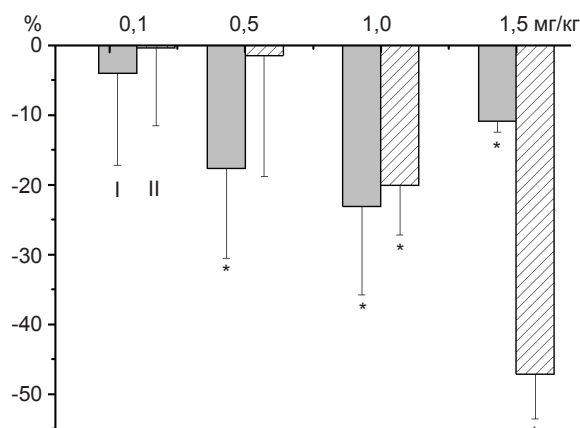


Рис. 2. Залежність хвилинного об'єму крові (I) та загального периферичного опору (II) від введеної дози флокаліну (в відсотках від вихідного рівня) в експериментах на анестезованих собаках. \* $P<0,05$  порівняно з вихідним рівнем

відповідь на гіпоксію може виступати також розширення вільцевих судин і збільшення коронарного кровотоку.

Відомо, що в невеликих дозах (до 1 мкмоль/л включно) активатори  $K_{ATP}$ -каналів (бімакалім, кромакалім, діазоксид) практично не впливають на функцію непошкодженого міокарда, тоді як при ішемії-реперфузії викликають кардіопротекторні ефекти, подібні до захистного феномена ішемічного преко-ндиціювання [5, 12, 14]. Оптимальна кардіопротекторна при гострій ішемії-реперфузії міокарда доза флокаліну (0,1 мг/кг) [3, 7] має незначний вплив на кардіогемодинаміку, проте, практично всі показники мають тенденцію до зниження. Достовірного значення зазнає зниження таких показників, як САТ (на  $12,66 \pm 2,31$ ,  $n=8$ ) та ПКТ (на  $6,94 \pm 1,63$ ,  $n=8$ ), швидкість наростання (на  $6,99 \pm 4,21$ ,  $n=8$ ) та зменшення (на  $13,76\% \pm 2,48\%$ ,  $n=8$ ) ТЛШ (див. рис. 1, 3). Причому, для всіх показників, крім  $dP/dt_{max}$  достовірність цих змін триває не більше ніж 5 хв (рис. 4). При збільшенні активації  $K_{ATP}$ -каналів флокаліном кардіодепресорні реакції міокарда стають більш сильними та тривалішими (див. рис. 3, 4). Водночас, незважаючи на значне пригнічення функції скоротливої активності серця та

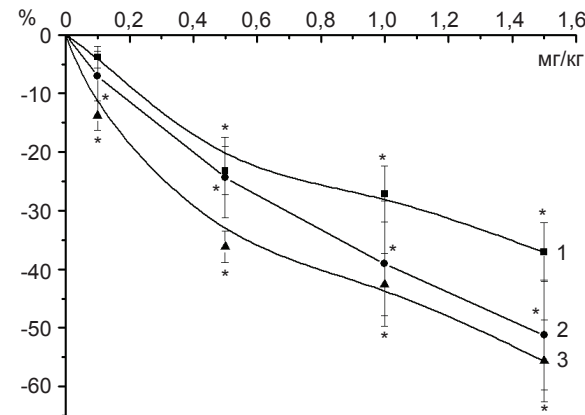
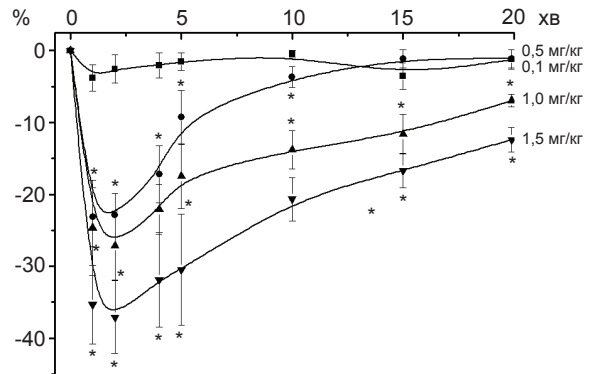
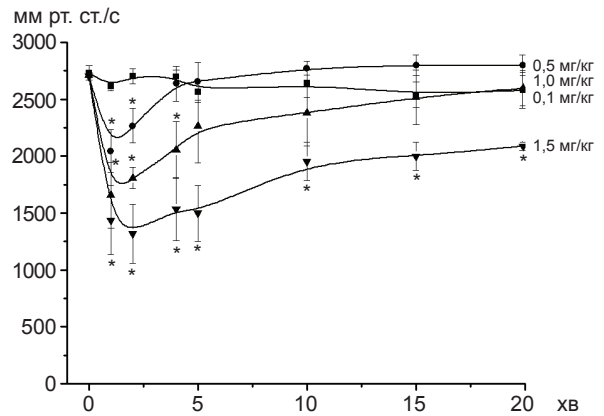


Рис. 3. Залежність (крива доза-ефект) тиску у лівому шлуночку (1), швидкості скорочення ( $dP/dt_{max}$ ), (2) та розслаблення ( $dP/dt_{min}$ ) (3) міокарда від введеної дози флокаліну (в відсотках від вихідного рівня) в експериментах на анестезованих собаках. \* $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем

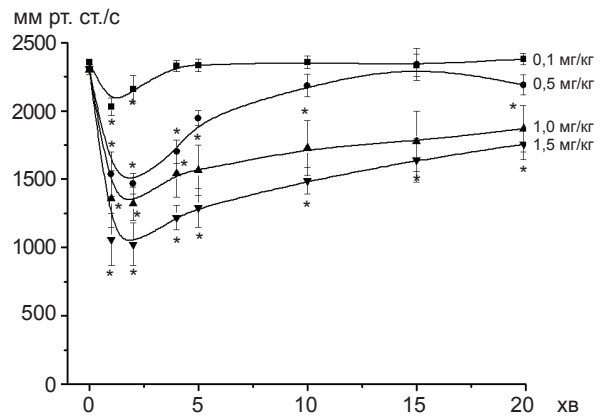
суттєвого зниження судинного тиску, потужні кардіопротекторні ефекти флокаліну спричиняє і при великих дозах, що може свідчити про важливу роль у його кардіопротекторній дії й інших механізмів. Зокрема, інгібування



а



б



в

Рис. 4. Залежність тиску у лівому шлуночку (в відсотках від вихідного рівня) (а), швидкості скорочення ( $dP/dt_{max}$ ), (б) та розслаблення ( $dP/dt_{min}$ ) (в) міокарда від введеної дози флокаліну у часі в експериментах на анестезованих собаках. \* $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем



окисного метаболізму внаслідок обмеження генерації вільних радикалів кисню та азоту, та попередження зниження активності ферментів антиоксидантної системи: каталази та супероксиддисмутази; інгібування надлишкового індукційного і реутилізаційного та, навпаки, в підвищенні конститутивного синтезу оксиду азоту, пригнічення деградації L-аргініну аргіназою, інгібуванні гідролізу фосфоліпідів і, тим самим, утворення вільної арахідонової кислоти та патогенних в умовах ішемії міокарда ейкозаноїдів – лейкотриєну  $C_4$  та тромбоксану  $B_2$  (LTC<sub>4</sub> та TxV<sub>2</sub>); інгібування відкривання мітохондріальної пори, та зменшення апоптотичних і некротичних процесів [6].

Виявлено, що при використанні флокаліну в дозах нижчих від 1 мг/кг, він практично не впливає на частоту серцевих скорочень (ЧСС). Спостерігається незначна тенденція до зниження – на  $2,16 \pm 0,93$  (n=8) та  $4,23\% \pm 2,37\%$  (n=6) для дози 0,1 та 0,5 мг/кг відповідно. Водночас введення 1 та 1,5 мг/кг у перші 10 хв реакції значно зменшує ЧСС, з максимумом на 2-й хвилині –  $19,15\% \pm 1,69\%$  (n=5, P<0,05) для першої та на 5-й хвилині –  $13,12\% \pm 3,18\%$  (n=5, P<0,05) для другої дози. Надалі вона відновлюється та на 25-й хвилині після введення флокаліну вже практично не відрізняється від вихідного рівня.

Показано, що розчинник флокаліну – диметилацетамід, у використаних у експериментах дозах не впливав на показники кардіогемодинаміки.

Таким чином, у наших експериментах на анестезованих собаках *in vivo* за умов, близьких до фізіологічних, з закритою грудною кліткою та зі збереженням природного дихання, показано, що внутрішньовенне введення флокаліну в дозах 0,05–1,5 мг/кг призводить до дозозалежного зниження САТ, ПКТ, ЗПО та розвитку кардіодепресорних реакцій в роботі серця, що проявляються в зменшенні ТЛШ,  $dP/dt_{max}$  та  $dP/dt_{min}$ , зниженні ХОК. Водночас значне зменшення ЧСС та ЗПО відбувається лише при великих дозах флокаліну – 1 та 1,5 мг/кг.

**Р.Б. Струтинский, Р.А. Ровенец,  
Н.А. Струтинская, А.П. Нещерет, А.А. Мойбенко**

### **ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ФЛОКАЛИНОМ НА ФУНКЦИЮ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ**

В экспериментах на анестезированных собаках изучено влияние фторсодержащего активатора АТФ-чувствительных калиевых ( $K_{ATP}$ ) каналов флокалина на кардиогемодинамику больших животных *in vivo*. Флокалин вводили внутривенно в дозах 0,01–1,5 мг/кг. Показано, что он дозозависимым образом снижает системное артериальное давление, перфузионное давление в коронарных сосудах и общее периферическое сопротивление сосудов с максимальными эффектами на  $56,8 \pm 2,7$ ,  $22,4 \pm 4,7$  и  $47,2\% \pm 6,5\%$  соответственно. Он вызывает развитие кардиодепрессорных реакций в работе сердца, что проявляется в снижении давления в левом желудочке, скорости увеличения и уменьшения в нем давления с наибольшими эффектами на  $37,1 \pm 5,1$ ,  $51,2 \pm 9,4$  и  $55,6\% \pm 6,9\%$  соответственно при его дозе 1,5 мг/кг. Уменьшает минутный объем крови и частоту сердечных сокращений с максимальным эффектом на  $23,1 \pm 12,7$  та  $19,2\% \pm 1,7\%$  соответственно при введении 1,0 мг/кг. Следует отметить, что значительное уменьшение частоты сердечных сокращений и общего периферического сопротивления происходит только при большой дозировке флокалина – 1 и 1,5 мг/кг. Таким образом, показано, что активация  $K_{ATP}$ -каналов флокалином вызывает дозозависимое снижение давления в системе кровообращения и сократительной активности миокарда.

Ключевые слова: аденозинтрифосфатчувствительные калиевые каналы, флокалин, кардиогемодинамика, артериальное давление, кардиодепрессорные реакции.

**R.B. Strutynskiy, R.A. Rovenets, N.A. Strutynska,  
A.P. Neshcheret, A.A. Moibenko.**

### **THE INFLUENCE OF ACTIVATION OF THE ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS BY FLOCALIN ON THE FUNCTION OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM**

In experiments on the anaesthetized dogs the influence of a new fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium ( $K_{ATP}$ ) channels flocalin on the cardiohemodynamic of great animals *in vivo* was studied. Flocalin introduced intravenously in doses 0,01 - 1,5 mgs/kg. It is shown that it reduces in dose-dependent manner a system arterial pressure, perfusion pressure in coronary artery and general peripheral resistance of vessels with maximal effects on  $56,8 \pm 2,7$ ,  $22,4 \pm 4,7$  and  $47,2\% \pm 6,5\%$  accordingly at most dose 1,5 mgs/kg. Flocalin causes development of cardiodepressive reactions in heart, that is exhibited in dose-dependent decrease of pressure in the left ventricle, speed of growth ( $dP/dt_{max}$ ) and reduction

( $dp/dt_{min}$ ) in it's of pressure with maximal effects on  $37,1 \pm 5,1$ ,  $51,2 \pm 9,4$  and  $55,6\% \pm 6,9\%$  accordingly at introduction of most dose of flocalin. Diminish of the cardiac out put and heart rate with a maximal effects on  $23,1\% \pm 12,7\%$  and  $19,2\% \pm 1,7\%$  accordingly at a dose 1,0 mgs/kg was shown. It should be noted that considerable reduction of heart rate and general peripheral resistance of vessels takes place only at the large doses of flocalin - 1 and 1,5 mgs/kg. Thus, it is shown that activation of  $K_{ATP}$  channels by flocalin causes the dose-dependent decrease of pressure in the system of circulation of blood and contraction activity of myocardium.

Key words:  $K_{ATP}$  channels, flocalin, cardiohemodynamic, diminishing of vascular pressure, cardiodepressive reactions.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурбелло А.Т., Шабров А.В., Денисенко П.П. Современные лекарственные средства. Клинико-фармакологический справочник практического врача // Нева, Санкт-Петербург, М.; 2006. – 896 с.
2. Гуревич М.И., Повжитков М.М. Методы исследования сердечного выброса и некоторые аспекты его регуляции. – В кн.: Гемодинамика и периферическое кровообращение. – К., 1968. – С.3–26.
3. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А. Розробка та підготовка до впровадження нового вітчизняного кардіопротекторного препарату – фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів флокалін // Наука та інновації. – 2006. – 2, №4. – С.77–82.
4. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А., Шаламай А.С. Організація промислового виготовлення препарату Флокалін – нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора // Там само. – 2009. – 5, №1. – С.80–84.
5. Пивовар С.М. Ендогенні механізми кардіопротекції: Роль активації мітохондріальних АТФ-чутливих калієвих каналів. – Автореф. ... канд. дис. – 2006. – 20 с.
6. Струтинський Р.Б., Коцюруба А.В., Нещерет О.П., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Зміни метаболізму в міокарді при ішемії-реперфузії та активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів // Фізіол. журн. – 2012. – 58, №1 – С.13–26.
7. Струтинський Р.Б., Коцюруба А.В., Нещерет О.П., Шиш А.М., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти активації аденозинтрифосфатзалежних калієвих каналів в експериментах *in vivo*: вплив на біохімічні параметри крові за умов ішемії-реперфузії міокарда // Там само. – 2009. – 55, №6. – С.12–19.
8. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. Дослідження вазомоторних ефектів нових фторвмісних синтетичних активаторів АТФ-залежних калієвих каналів. // Там само. – 2000. – 46, №4. – С.17–23.
9. Струтинський Р., Мохорт М., Ягупольський Л., Мойбенко О. Флокалін - новий вітчизняний кардіопротектор // Вісник фармакології та фармацевції. – 2010. – №3. – С.44–56.
10. Струтинський Р.Б., Пивовар С.Н., Ровенець Р.А., Піскун О.В., Ягупольський Л.М., Мойбенко О.О. Вплив активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну на функціонування ізолюваного серця // Фізіол. журн. – 2005. – 51, № 6, С.18–24.
11. Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Нещерет О.П., Тумановська Л.В., Бойчук Т.М., Джуран Б.В., Мойбенко О.О. Вплив лікарської форми флокаліну на перебіг ішемії-реперфузії міокарда // Там само. – 2011. – 57, №1. – С. 55–65.
12. Eells J.T., Henry M.M., Gross G.J., Baker J.E. Increased mitochondrial  $K_{ATP}$  channel activity during chronic myocardial hypoxia. Is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? // Circ Res. – 2000. – 87, №10. – P.915–921.
13. Gross G.J., Fryer R.M. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channels and myocardial preconditioning // Ibid. – 1999. – 84, №9. – P.973–979.
14. Grover G.J., Baird A.J., Slep P.G. Lack of pharmacologic interaction between ATP-sensitive potassium channels and adenosine  $A_1$  receptors in ischemic rat hearts // Cardiovasc Res. – 1996. – 31, №4. – P.511–517.
15. Strutyński R.B. Vasodilatation Effects of Fluorine-Containing  $K_{ATP}$  Channels Opener of Flocalin // Int. J. Phys. Pathophys. – 2011. – 2, №1. – P. 69–77.
16. Voitychuk O.I., Strutyński R.B., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Effects of fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels, pinacidil-derivative flocalin, on cardiac voltage-gated sodium and calcium channels // NSAP. – 2012. – 385, №11. – P. 1095–1102.
17. Voitychuk O.I., Strutyński R.B., Yagupolskii L.M., Tinker A., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Sarcolemmal cardiac  $K_{ATP}$  channels as a target for the cardioprotective effects of the fluorine-containing pinacidil analogue flocalin // Brit. J. Pharmacol. – 2011. – 162, №3. – P. 701–711.
18. Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T., Sperelakis N. ATP-sensitive  $K^+$  channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells // Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. – 1998. – 274. – P. 25–37.

Г.В. Опанасенко, Л.В. Братусь, Б.Л. Гавенаускас, О.О. Гончар, І.М. Маньковська, В.І. Носар, С.Б. Французова

## Стан і способи фармакологічної корекції киснезалежних процесів у тканинах пародонта при тривалому іммобілізаційному стресі

*Досліджували вплив тривалої іммобілізації (суворе горизонтальне розміщення щурів у тисних пена-лах по 6 год щоденно протягом 14 діб) на напруження кисню в яснах, споживання кисню кістковою тканиною альвеолярного відростка нижньої щелепи, енергетичний обмін та про- – антиоксидантний баланс у тканинах ясен. Показано, що тривалий іммобілізаційний стрес призводить до зниження напруження кисню в тканинах ясен (на 36%), швидкості споживання кисню кістковою тканиною (на 46%), та зниження швидкості дихання мітохондрій, яке більш істотно проявляється за умов окиснення НАД-залежного субстрату дихального ланцюга –  $\alpha$ -кетоглутарату, ніж при використанні сукцинату, порівняно з контролем. Тривалий стрес викликає також посилення перекисних процесів і зниження антиоксидантного захисту в тканинах ясен. При застосуванні фармакологічних препаратів – тіотріазоліну та актовегіну показано їх модифікуючий протекторний ефект на механізми стресіндукованих порушень кисневого гомеостазису в м'яких та твердих тканинах пародонта. Ключові слова: іммобілізаційний стрес, тканини пародонта, споживання кисню, напруження кисню, мітохондрії, про- – антиоксидантний баланс, тіотріазолін, актовегін.*

### ВСТУП

Відомо, що стрес-реакція є необхідною ланкою адаптації організму до різних факторів навколишнього середовища. Проте при збільшенні тривалості та інтенсивності стресорних впливів адаптивний ефект перетворюється у пошкоджувальний і є одним із провідних факторів патогенезу більшості „хвороб цивілізації”, зокрема такого розповсюдженого захворювання, як пародонтит [5, 12].

Показано, що тривалий вплив на людину і тварин іммобілізаційного стресу супроводжується перерозподілом циркулюючої крові, змінами мікроциркуляції та деструктивними пошкодженнями мікросудин [19], посиленням вільнорадикальних процесів [12], зменшенням споживання кисню [26], порушенням енергетичного обміну [27] та розвитком дистрофії кісткової тканини [8, 28, 29]. Водночас питання про стресіндуковані

порушення транспорту та утилізацію кисню у м'яких і твердих тканинах пародонта залишається майже нез'ясованим.

Виходячи з цього наші дослідження були спрямовані на вивчення саме цих питань з акцентом на розробку раціональних патогенетично зумовлених заходів щодо фармакологічної корекції можливих метаболічних зсувів.

В останній час значний інтерес дослідників різного профілю привертають лікарські засоби метаболічного типу дії, які мають широкий спектр фармакологічної активності, політропністю дії і, що є найбільш важливим, захисним ефектом відносно життєво важливих органів і систем. Саме до таких засобів відносяться сучасні лікарські препарати – тіотріазолін та актовегін. Тіотріазолін – оригінальний вітчизняний препарат синтетичного походження. Серед його фармакологічних

© Г.В. Опанасенко, Л.В. Братусь, Б.Л. Гавенаускас, О.О. Гончар, І.М. Маньковська, В.І. Носар, С.Б. Французова

ефектів особливу увагу привертає мембрано-стабілізувальна, антиоксидантна та протиішемічна дія. Препарат посилює компенсаторну активацію анаеробного гліколізу, активує процеси окиснення в циклі Кребса зі збереженням внутрішньоклітинного фонду АТФ [11].

Деякі автори [11,15] звертають увагу на перспективність застосування тіотріазоліну в терапії травматичних порушень остеопоезу та при ренальних остеодистрофіях у стабілізації кісткового метаболізму. Використання препарату у вигляді мазі для лікування пацієнтів з катаральним гінгівітом сприяло покращенню мікроциркуляції в тканинах пародонта та істотно прискорювало ремісію [3]. Другий препарат – актовегін є депротеїнізованим стандартизованим гемодіалізатом з крові молодих телят, тобто має тваринне походження. Основою його фармакологічної дії є вплив на процеси внутрішньоклітинного метаболізму. Актовегін широко впроваджується в практику для інтенсифікації енергетичного метаболізму, збільшення стійкості до гіпоксії, стимуляції процесів регенерації за умов недостатнього кровозабезпечення тканин [23].

Метою нашої роботи було з'ясування киснезалежних механізмів пошкоджень тканин пародонта при тривалому стресі й шляхів профілактики та корекції таких порушень, насамперед за допомогою тіотріазоліну та актовегіну.

## МЕТОДИКА

Робота проведена на 28 щурах–самцях лінії Вістар масою 180–210 г, які методом випадкового вибору були поділені на 4 групи: I – контрольна; II – іммобілізаційний стрес; III – іммобілізаційний стрес і введення тіотріазоліну; IV – іммобілізаційний стрес і введення актовегіну. Контрольні та дослідні тварини знаходились на стандартній дієті в одному і тому самому приміщенні при 20–22°C. Під час іммобілізаційного стресу тварини мали вільний доступ до їжі і води. Досліди проводили згідно з положенням Міжнародної конвенції з захисту тварин, які

використовуються в експериментальних та інших наукових цілях [Страсбург, 1989].

Іммобілізаційний стрес моделювали розміщенням тварин в індивідуальні тісні пенали, які забезпечували суворе горизонтальне положення щурів по 6 год щоденно протягом 14 діб. Контролем були інтактні тварини. Експериментальне моделювання стресу контролювали за зміною маси надниркових залоз і тимуса, а також за наявністю виразок на слизовій оболонці шлунка [17]. Всі досліджувані показники реєстрували у тварин через добу після останнього сеансу іммобілізації. Напруження кисню в яснах *in vivo* визначали полярографічним методом з використанням відкритого платинового електроду [2]. Швидкість споживання кисню кістковою тканиною альвеолярного відростку нижньої щелепи, яку виділяли з декапітованих під ефірним наркозом тварин, визначали полярографічним методом за допомогою платинового електроду [30]. Кісткову тканину відмивали в 0,1 М КСl, маса фрагментів кістки становила 15–65 мг. Фрагменти кісткової тканини розміщували в термостатованій комірці, заповненій фізіологічним розчином при 26°C, рН 7,4. Хроноамперограму реєстрували протягом 30 хв. Споживання кисню за хвилину розраховували за кривою зниження напруження кисню ( $P_{O_2}$ ) в часі на 100 г тканини. Коефіцієнт розчинності кисню приймали рівним  $0,028 \text{ мл} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{атм}^{-1}$ .

Процеси АДФ-стимульованого дихання мітохондрій м'яких тканин пародонта реєстрували полярографічним методом [24]. Виділяли їх методом диференційного центрифугування, який дозволяє зберегти нативність ізольованих органел [4]. Середовище гомогенізації містило (ммоль/л): КСl – 120, НЕРЕС – 10, EGTA – 10, 0,2%-й бичачий сироватковий альбумін; рН 7,2. Середовище інкубації складалося з (ммоль/л): КСl – 120, NaCl – 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 5, EGTA – 3, тріс-НСl – 30,  $\text{MgCl}_2$  – 1,5; рН 7,2. Субстратами окиснення були: 1 ммоль/л сукцинату натрію; 1 ммоль/л  $\alpha$ -кетоглутарату. У середовище додавали АДФ



200 мкмоль/л. За отриманими полярограмами розраховували такі показники: швидкість фосфорилуючого (в метаболічному стані 3 за Чансом,  $V_3$ ) та контрольованого (в метаболічному стані 4 за Чансом,  $V_4$ ) дихання мітохондрій, дихальний контроль за Чансом ( $V_3/V_4$ ) [24], коефіцієнт ефективності фосфорилування АДФ/О [25] Концентрацію білка вимірювали за методом Лоурі.

Третій групі тварин перед щоденною іммобілізацією вводили внутрішньоочеревинно розчин тіотриазоліну (50 мг/кг), четвертій – розчин актовегіну (20 мг/кг). В роботі використовували Thiotriazolin 2,5%-й розчин по 2 мл в ампулах (ВАТ „Київмедпрепарат, корпорація „Артеріум”) та Actovegin в ампулах (80 мг в 2 мл розчину для ін’єкцій, ТОВ „Нікомед Україна”). З тканин ясен виготовляли гомогенати на 0,025 М тріс-буфері (рН 7,4; 1:9). Процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за вмістом активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [20], антиоксидантний захист – за активністю ферментів супероксиддисмутази та каталази [7].

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи критерій Вілкоксона–Манна–Уїтні. Відмінності між групами вважали статистично вірогідними при  $P<0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень показали, що іммобілізація впродовж 6 год щоденно протягом

14 діб викликала у тварин стрес-реакцію, яка супроводжувалась інволюцією тимуса, збільшенням маси надниркових залоз та появою виразок на слизовій оболонці шлунка у порівнянні з контролем (табл.1).

Хронічний іммобілізаційний стрес супроводжувався підвищенням вмісту вторинних продуктів ПОЛ у тканинах пародонта на 21% у порівнянні з контролем ( $P<0,05$ ; рис.1).

Аналогічна реакція відмічалася при гострому іммобілізаційному та емоційно-больовому стресі у людей та тварин [1, 13]. Відомо, що активні форми кисню здатні запускати цілий каскад реакцій вільнорадикального окиснення, продукти якого мають токсичну дію на клітини та можуть бути одним з патогенетичних факторів, що викликає деструкцію тканин ясен [12]. Поряд з посиленням перекисних процесів у тканинах пародонта, деякі автори спостерігали руйнування клітинних мембран, гальмування синтезу колагену, посилення резорбції кісткової тканини, розлади гемоциркуляції [8, 21]. Нами було показано також, що за умов тривалої іммобілізації у щурів знижувалась активність таких важливих ферментів, що складають першу лінію антиоксидантного захисту, як супероксиддисмутаза та каталаза (рис. 2).

Кисневе забезпечення м’яких тканин пародонта за цих умов характеризувалося зменшенням  $P_{O_2}$  в яснах порівняно з контролем (рис. 3). Зазначені зміни відбуваються насамперед внаслідок порушення системного

Таблиця 1. Показники маси тимуса, надниркових залоз, стану слизової оболонки шлунка при моделюванні іммобілізаційного стресу ( $M\pm m$ ,  $n=7$ )

Групи тварин	Тимус, мг	Надниркові залози, мг	Кількість виразок слизової оболонки шлунка
Контроль	188,2 $\pm$ 13,0	42,8 $\pm$ 1,7	0
Іммобілізаційний стрес	112,6 $\pm$ 11,7*	62,5 $\pm$ 3,4*	10,3 $\pm$ 1,3
Іммобілізаційний стрес і тіотриазолін	149,3 $\pm$ 11,5*	49,6 $\pm$ 1,5*	4,5 $\pm$ 1,1**
Іммобілізаційний стрес і актовегін	158,8 $\pm$ 8,3*	51,4 $\pm$ 2,7*	3,1 $\pm$ 1,2**

Примітка. Тут і в табл. 2 \* $P<0,05$  у порівнянні з контролем; \*\* $P<0,05$  у порівнянні з іммобілізаційним стресом.

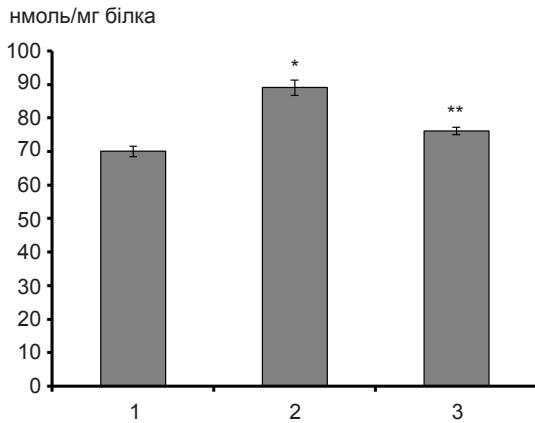


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів у тканинах ясен за умов тривалого стресу та застосування тіотриазоліну: 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – стрес і тіотриазолін. \*P<0,05 у порівнянні з контролем; \*\*P<0,05 у порівнянні з групою тварин зі стресом

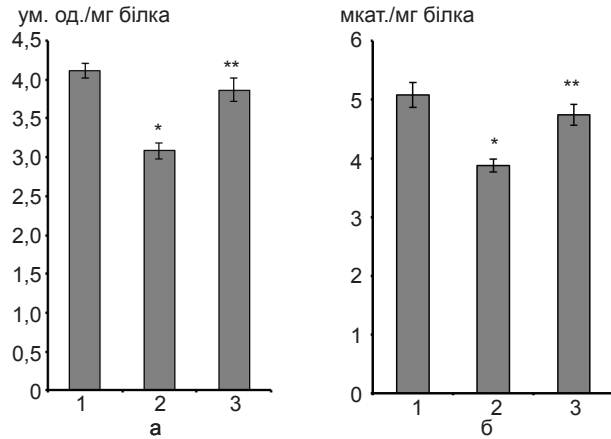


Рис. 2. Активність антиоксидантних ферментів Cu, Zn-супероксиддисмутази (а) і каталази (б) у тканинах ясен за умов тривалого стресу та застосування тіотриазоліну: 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – стрес і тіотриазолін. P<0,05 у порівнянні з контролем; \*\*P<0,05 у порівнянні з групою тварин зі стресом

та місцевого кровообігу на тлі зменшення споживання кисню цілісним організмом [16]. Швидкість споживання кисню кістковою тканиною пародонта у стресованих тварин також знижувалася порівняно з контролем (рис.4).

Доцільно було дослідити і процеси енергозабезпечення в тканинах ясен за умов іммобілізаційного стресу. Результати досліджень показали, що стимуляція процесів дихання мітохондрій за допомогою екзогенної АДФ була неоднозначною і залежала від субстрату окиснення (табл.2).

Зокрема, при окисненні сукцинатом вірогідно зростало значення фосфорилуючого

дихання на тлі вірогідного зниження ефективності окисного фосфорилування. Так, за цих умов показник АДФ/О порівняно з контролем зменшився на 17 %. Спостерігалася тенденція до зниження спряження процесів дихання і фосфорилування ( $V_3/V_4$ ). За умов окиснення НАД-залежного субстрату дихального ланцюга –  $\alpha$ -кетоглутарату зниження фосфорилуючого дихання в стані  $V_3$  супроводжувалося зменшенням дихального контролю та ефективності процесу окисного фосфорилування (АДФ/О). Таким чином, спостерігалася тенденція до обмеження ролі НАД-залежних субстратів у загальному

Таблиця 2. Показники мітохондріального дихання в тканині ясен щурів при моделюванні іммобілізаційного стресу ( $M \pm m$ ,  $n=7$ )

Групи тварин	$V_3$ , нг атом $O \cdot xv^{-1} \cdot мг^{-1}$ білка	$V_4$ , нг атом $O \cdot xv^{-1} \cdot мг^{-1}$ білка	$V_3/V_4$	АДФ/О
<b>Сукцинат натрію</b>				
Контроль	49,61±2,73	19,68±1,38	2,52±0,24	1,64±0,07
Іммобілізаційний стрес	56,51±3,84*	25,91±2,05*	2,18±0,31	1,36±0,09*
Іммобілізаційний стрес і актовегін	50,07±2,69	20,19±1,74	2,48±0,19	1,57±0,08
<b><math>\alpha</math>-Кетоглутарат</b>				
Контроль	45,86±2,18	16,08±1,85	2,87±0,22	2,68±0,05
Іммобілізаційний стрес	39,47±1,83*	19,16±1,79	2,06±0,19*	2,32±0,07*
Іммобілізаційний стрес і актовегін	42,73±2,77	15,60±1,36	2,74±0,27	2,80±0,08



окисненні, за умов дії стресових чинників. Це ще раз підкреслює положення Лук'янової [9] про те, що саме зі зниженням функціонування мітохондрій на субстратній, а не на термінальній ділянці дихального ланцюга, починається порушення утилізації кисню в останньому у відповідь на дію несприятливих умов (стрес різного генезу, гіпоксія, гіпокінезія тощо). Проте нез'ясованим залишається питання – чому ФАД-залежний субстрат має переваги в окисненні при гальмуванні окиснення НАД-залежних субстратів?

Раніше вважали, що у разі переходу клітини від спокою до активації фізіологічних функцій зберігається однакова послідовність реакцій циклу Кребса. Оскільки найбільш „повільними” ферментами циклу є початкові – цитратсинтаза і ізоцитратдегідрогеназа, то рівень їх активності повинен був би визначати загальну швидкість проходження цього циклу. Однак було встановлено [10], що підвищення функціональної активності клітин печінки та мозку супроводжується переважно окисненням лише одного з інтермедіатів циклу трикарбонових кислот – сукцинату. На думку Кондрашової [6], активація окиснення сукцинату за цих умов визначається можливістю швидкого поновлення його пулу за рахунок переамінування глутамінової і щавлевоцтової кислот з наступним окисним декарбоксилюванням КГЛ до СК. З цією гіпоте-

зою добре узгоджуються дані про структурну організацію ферментів циклу трикарбонових кислот. Встановлено, що ферменти останніх, які розташовані у матриксі мітохондрій, організовані у мультиферментний комплекс, метаболон. При цьому ферменти окиснення дикарбонових кислот і аспаратамінотрансфераза складають тісний асоційований агрегат у центрі комплексу, що створює умови для прискорення їх взаємодії. Специфічна активація  $\alpha$ -кетоглутарату у мітохондріях здійснюється за рахунок активації амінотрансферазних реакцій при інгібуванні активності сукцинатдегідрогенази (СДГ) і пов'язана з функціонуванням „швидкого” циклу у циклі Кребса при функціональних навантаженнях різного характеру (стрес, гіпоксія тощо) [6].

Нещодавно Кондрашовою із співавторами [22] була показана участь переамінування в регуляції відкриття мітохондріальної пори іонами кальцію та зростання його ролі при наявності тенденції до інгібування СДГ щавлевоцтовою кислотою, яке посилюється за умов стресу. Адже відомо, що накопичення та утримання кальцію в мітохондріях – кальцієва ємність мітохондрій – підтримується окисненням бурштинової кислоти. Так, стабільна активність СДГ забезпечує утримання мембранного потенціалу на одному рівні, тим самим попереджуючи відкриття неспецифічної пори.

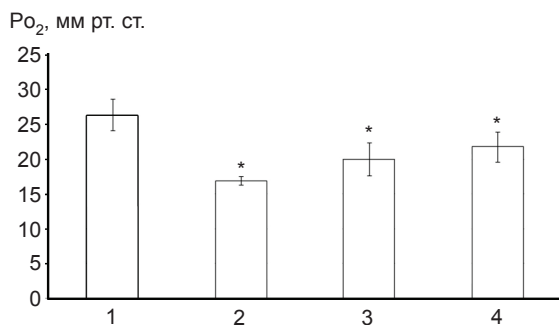


Рис.3. Напруження кисню в яснах за умов тривалого іммобілізаційного стресу та застосування тіотріазоліну та актовегіну: 1 – контроль, 2 – іммобілізаційний стресс, 3 – іммобілізаційний стресс і тіотріазолін, 4 – іммобілізаційний стресс і актовегін. \*P<0,05 у порівнянні з контролем

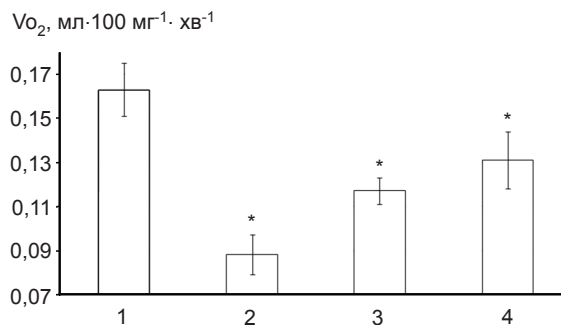


Рис.4. Швидкість споживання кисню кістковою тканиною пародонта за умов тривалого іммобілізаційного стресу та застосування тіотріазоліну та актовегіну: 1 – контроль, 2 – іммобілізаційний стресс, 3 – іммобілізаційний стресс і тіотріазолін, 4 – іммобілізаційний стресс і актовегін. \*P<0,05 у порівнянні з контролем

У групі тварин, яким перед щоденною іммобілізацією вводився препарат метаболічного типу дії – тіотріазолін, спостерігалися менш виражені зміни маси тимуса, надниркових залоз і зменшення кількості виразок слизової оболонки шлунка (див. табл.1). Застосування тіотріазоліну продовж дії тривалого стресу призводило до зниження інтенсивності вільнорадикальних процесів. Так, вміст ТБК-АП у пародонті був значно нижчий (на 15 %;  $P < 0,05$ ) на відміну від іммобілізованих тварин, що не мали медикаментозної підтримки (див. рис.1). У цих тварин відмічалось зростання активності супероксиддисмутази на 25 % ( $P < 0,05$ ), каталази на 22 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з щурами 2-ї групи. Було також виявлено покращення умов транспорту і утилізації кисню як у твердих, так і в м'яких тканинах пародонта (див. рис.3, 4). Так,  $P_{O_2}$  в яснах при іммобілізаційному стресу на тлі вживання тіотріазоліну знижувалося на 24 % порівняно з контролем, в той час як за умов іммобілізаційного стресу без застосування препарату це зниження становило 36 %. Швидкість споживання кисню кістковою тканиною пародонта також змінювалася менше на тлі сумісної дії іммобілізації та тіотріазоліну (на 28 % відносно контролю) щодо значень при іммобілізації без вживання препарату (на 46 %). Зазначений позитивний вплив тіотріазоліну може бути результатом різнобічної дії препарату на місцевий кровообіг та енергетичний обмін тканин. Так, встановлено, що тіотріазолін нормалізує кровообіг у шийно-хребетному венозному сплетінні та синусах мозку у дітей [18].

Застосування актовегіну зменшувало ступінь стресіндукованих порушень у тканинах пародонта щурів (див. табл.1). При цьому  $P_{O_2}$  в яснах зменшувалося всього на 17% порівняно з контролем, а швидкість споживання кисню кістковою тканиною пародонта – на 20 % (див. рис. 3, 4).

Вплив іммобілізаційного стресу на тлі щоденного введення актовегіну на енергетичний обмін в тканинах ясен щурів засвідчив існування модифікуючого протекторного

ефекту цього препарату. При окисненні сукцинату зареєстровано нормалізацію показників функціонування мітохондрій. Окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату за цих умов супроводжувалося тенденцією збільшення АДФ/О на тлі нормалізації інших показників енергозабезпечення. Отримані результати свідчать про те, що актовегін виявляє стимулювальні ефекти на процеси окисного фосфорилування, які зумовлені економізацією роботи дихального ланцюга мітохондрій через переважну активацію НАД-залежних субстратів і може використовуватися для спрямованої метаболічної корекції негативних порушень кисневого забезпечення ясен, викликаних тривалим іммобілізаційним стресом. Зазначені результати збігаються з даними інших авторів [23], якими показано, що актовегін підвищує поглинання кисню в тканинах, поліпшує оксигенацію мікросудин, збільшує енергетичний потенціал клітин, покращує роботу внутрішньоклітинних ферментних систем і посилює синтетичні процеси [14]. Крім того, для актовегіну характерна висока СОД активність, що зумовлює його антиоксидантну дію [23]. Отже, застосування цього препарату при іммобілізаційному стресі особливо важливо, враховуючи активацію перекисних процесів – ріст вторинних продуктів ПОЛ і зниження активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази та каталази у тканинах пародонта за умов хронічного стресу.

Таким чином, на підставі проведених досліджень можна стверджувати, що дія таких фармакологічних препаратів метаболічного типу, як тіотріазолін та актовегін при довготривалому іммобілізаційному стресі сприяє зменшенню стресіндукованих порушень киснезалежних процесів, а також про- та антиоксидантного балансу у м'яких і твердих тканинах пародонта. Отримані результати можуть стати експериментальним обґрунтуванням доцільності використання тіотріазоліну і актовегіну в стоматологічній практиці для корекції метаболічних порушень у твердих та м'яких тканинах пародонта.

**А.В. Опанасенко, Л.В. Братусь,  
Б.Л. Гавенаускас, О.А. Гончар, І.Н. Маньковская,  
В.І. Носарь, С.Б. Французова**

### **СОСТОЯНИЕ И СПОСОБЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ КИСЛОРОД-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ**

Исследовали влияние длительной иммобилизации (строгое горизонтальное положение крыс в тесных пеналах в течение 6 ч ежедневно на протяжении 14 суток) на напряжение кислорода в деснах, потребление кислорода костной тканью альвеолярного отростка нижней челюсти, энергетический обмен и про- – антиоксидантный баланс в мягких тканях пародонта. Показано, что длительный иммобилизационный стресс вызывает резкое снижение напряжения кислорода в тканях десен (на 36 %), скорости потребления кислорода костной тканью (на 46 %) и снижение скорости дыхания митохондрий десен, которое существенно проявляется в условиях окисления НАД-зависимого субстрата дыхательной цепи –  $\alpha$ -кетоглутарата, чем при использовании сукцината натрия, по сравнению с контролем. Хронический стресс приводит также к усилению перекисных процессов и снижению антиоксидантной защиты в мягких тканях пародонта. При применении фармакологических препаратов тиотриазолина и актовегина отмечено наличие их модифицирующего протекторного эффекта на механизмы стрессиндуцируемых нарушений кислородного гомеостаза мягких и твердых тканей пародонта.

Ключевые слова: иммобилизационный стресс, ткани пародонта, потребление кислорода, напряжение кислорода, митохондрии, про-/антиоксидантный баланс, тиотриазолин, актовегин.

**H.V. Opanasenko, L.V. Bratus, B.L. Gavenauskas,  
O.O. Gonchar, I.M. Mankovska, V.I. Nosar,  
S.B. Frantsuzova**

### **DISTURBANCES PERIODONTAL TISSUES OXYGEN DEPENDENT PROCESSES UNDER PROLONGED IMMOBILIZATION STRESS AND WAYS OF THEIR PHARMACOLOGICAL CORRECTION**

Influence of prolonged immobilization (6 h strict horizontal position of rats in the tight containers daily for 2 weeks) on oxygen tension, oxygen consumption, pro-/antioxidant balance, and energetic metabolism of soft and hard periodontal tissues has been investigated. It was established that prolonged immobilization stress resulted in marked decrease in the gum tissue  $P_{O_2}$  (36%) and in the bone tissue oxygen consumption rate (46%) compared to control. It was also determined that prolonged stress led to a reduction in the gum mitochondrial respiration rate. The latter was more expressed in case of the

NAD-dependent substrate oxidation than of the FAD-dependent one. It was determined that the prolonged stress results in intensification of peroxide processes and depletion of antioxidant protection of soft tissues of periodontum. It was found that Thiotriazolin and Actovegin have modified and diminished stress-induced disorders in the soft and hard periodontal tissues oxygen homeostasis under prolonged immobilization stress. Key words: immobilization stress, periodontal tissues, oxygen tension, oxygen consumption, mitochondria, pro-/antioxidant balance, Thiotriazolin, Actovegin

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

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Акопов С.Э., Троманян Э.Н., Канкарян А.П., Ван Дорн, Саркисян М.А. Клинико-биохимическая характеристика заболеваний пародонта у лиц, находящихся в условиях перманентного стресса // *Стоматология*. – 1996. – 75 №1. – С.30–32.
2. Березовский В.А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. – К.: *Наук. думка*, 1975. – 280 с.
3. Бурковська А.Ю., Голейко М.В., Голейко Д.М. Эффективность застосування 2% мазі тиотриазоліну в комплексному лікуванні катарального гінгівіту // *Актуальні питання фармацевт. та мед. науки та практики*: Зб.наук. ст. – Запоріжжя, 2002. – Вип. VIII. – С.138–142.
4. Захарченко М.В., Хундерякова Н.В., Кондрашова М.Н. Важность сохранения биофизической организации выделенных митохондрий для выявления физиологической регуляции их функций // *Биофизика*. – 2011. – 56, вып.5. – С.840–847.
5. Казарина Л.Н., Егупова А.В. Влияние «боевого» стресса на состояние тканей пародонта участников локальных вооруженных конфликтов. – В кн.: *Актуальные проблемы управления здоровьем населения*. – Запорожье, 2010. – С.149–153.
6. Кондрашова М.Н. Трансаминазный цикл окисления субстратов в клетке как механизм адаптации к гипоксии. – В кн.: *Фармакологическая коррекция гипоксических состояний*. – М., 1989. – С.51–70.
7. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Определение активности каталазы // *Лаб.дело*. – 1988. – 1. – С. 16–19.
8. Левашов О.М., Березовский В.А., Левашов М.И., Сафонов С.Л. Влияние прерывистой нормобарической гипоксии на кислородный метаболизм и биофизические свойства кости при гипоккинезии // *Укр. мед. альманах*. – 2007. – 10, №5. – С.105–109.
9. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы гипоксии // *Вестн. РАМН*. – 2000. – №9. – С.3–12.
10. Маевский Е.И., Розенфельд А.С., Гришина Е.В., Кондрашова М.Н. Экспериментальное доказательство преимущественного образования и окисления сукцината при гипоксии. – В кн.: *Митохондрии, клетки и активные формы кислорода*. – Пушкино, 2000. – С.102–104.

11. Мазур И.А., Чекман И.С., Беленичев И.Ф. Метаболитотропные препараты. – Запорожье, 2007. – 309 с.
12. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. – М.: Медицина, 1998. – 254 с.
13. Непорада К.С., Скрипник І.М., Тарасенко Л.М., Клуша В.Є. Залежність активації ПОЛ і ефективності його корекції глутатіоном при емоційному стресі від типологічних особливостей реагування організму // Мед. хімія. – 2002. – 4 (2). – С.23–26.
14. Нордвик Б. Механизм действия и клиническое применение препарата актовегина. – В кн.: Актовегин. Новые аспекты клинического применения. – М., 2002. – С.10–14.
15. Носаченко Р.В. Значение некоторых биохимических показателей в диагностике и эффективности лечения травматического повреждения остеопоза препаратом «Тиотриазолин» // Актуальні питання фармацевт. та мед. науки та практики. – Запоріжжя, 2002. – Вип. VIII. – С.181–184.
16. Подгасцька О.Є, Портніченко В.І., Носар В.І., Маньковська І.М. Загальні та місцеві особливості кисневого метаболізму при тяжкому іммобілізаційному стресі та їх роль в патогенезі пародонтиту // Мед. реабілітація, курортологія, фізіотерапія. – 2008. – 1 (53). – С.31–34.
17. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. – М: Медгиз, 1960. – 255 с.
18. Славкин Ю.Л., Котова Т.П., Половинец В.П. Ультразвуковая доплерография в диагностике сосудистой головной боли у детей на фоне лечения тиотриазолином // Лік. справа. – 1999. – №7–8. – С.62–64.
19. Соловьева А.В., Галанж а Е.И., Степанова Т.В., Бриль Г.Е. Изменение лимфомикроциркуляции при патологическом стрессе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2002. – 134, №9. – С.280–282.
20. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. – В кн.: Современные методы в биохимии/ Под ред. В.Н.Ореховича. – М: Медицина, 1977. – С.66–68.
21. Тарасенко Л.М., Скрипник І.М., Петрушанко Т.О., Непорада К.С. Патогенетичні механізми корекції стрессорного пошкодження пародонта та шлунка // Фізіол. журн. – 2000. – 46, №4. – С.76–79.
22. Федотчева Н.И., Захарченко А.В., Захарченко М.В., Литвинова Е.Г., Кондрашова М.Н. Роль переаминирования в регуляции митохондриальной поры ионами кальция в норме и при стрессе // Материалы VII Международ. симпози. «Актуальные проблемы биофизической медицины». – К., 2012. – С.144–145.
23. Шилов А.М. Антигипоксантаы и антиоксиданты в кардиологической практике // Рос. мед. журн. – 2004. – 12, №2. – С.77–80.
24. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. Kinetics of oxygen utilization // J. Biol. Chem. – 1995. – 217. – P.383–393.
25. Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and polarographic measurement of ADP: O ratio // Methods Enzymol. – 1967. – 10. – P.41–47.
26. Kojic Z., Scepanovic L.J., Kostic T. Immobilization stress reduced oxygen consumption of the isolated interstitial rats' testes cells // Acta Physiol. Hung. – 2011. – 98 (1). – P.45–50.
27. Novoselova A.M., Custaud M.A., Tsvirkun D.V., Larina I.M., Kulchitsky V.A. Metabolism in rats during antiorthostatic hypokinesia // Bull. Exp. Biol. Med. – 2008. – 46, №7. – P.42–45.
28. Peruzzo D.C., Benatti B.B., Antunes I.B., Andersen M.L. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats // J. Periodontol. – 2008. – 79, №4. – P.697–704.
29. Rosania A.E., Low K.G., McCormick C.M., Rosania D.A. Stress, depression, cortisol, and periodontal disease // Ibid. – 2009. – 80, №2. – P.260–266.
30. Schirmmacher K., Lauterbach S., Bingmann D. Oxygen Consumption of Calvatial Bone Cells In Vitro // J. Orthopaedic. Res. – 1997. – 15. – P.558–562.

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

*Матеріал надійшов до редакції 20.06.2012*

К.О. Токарчук, Л.Г. Капустяненко, С.Г.Шандренко

## Роль альдегідів у розвитку оксидативного стресу при рабдоміолізі у щурів

*На моделі гліцеринстимульованого рабдоміолізу у щурів досліджено зміни у формах заліза плазми крові та участь альдегідів у розвитку оксидативного стресу. Розчин гліцерину (50 %) ввели разово внутрішньом'язово у обидва стегнові м'язи у дозі 10 мл/кг. Показано накопичення в плазмі крові неекранованого редокс-активного заліза у концентраціях до 2,6 мг/л, що майже втричі більше за вміст заліза у трансферині, це і є одним із пускових механізмів розвитку оксидативного стресу. Спостерігалось підвищення показників оксидативного стресу. Так, на 4-ту добу вміст альдегідів у печінці підвищився в 2,8 раза, на фоні чого збільшились інші показники: вміст ТБК-реагуючих продуктів у печінці – на 38 %, СО-груп протеїнів сироватки крові в 3,5 раза і печінки в 2,9 раза. Для виокремлення участі ендогенних альдегідів у розвитку оксидативного стресу на цій моделі додаткової групі тварин крім гліцерину вводили щодобово підшкірно 1%-й розчин акцептора альдегідів – димедону (10 мл/кг). На 4-ту добу у них реєстрували зменшення вмісту альдегідів у печінці на 79 %, котре супроводжувалося нормалізацією показників оксидативного стресу: зменшився вміст ТБК-реагуючих продуктів у печінці на 62 %, вміст СО-груп протеїнів сироватки крові на 38 % і печінки на 46 %. Отримані результати доводять, що підвищений вміст альдегідів не тільки є «продуктом» оксидативного стресу, але вони також можуть потенціювати розвиток цього процесу.*

*Ключові слова:* оксидативний стрес, рабдоміоліз, альдегіди, димедон.

### ВСТУП

Відомо, що в організмі в результаті глікозилювання протеїнів і перекисного окиснення ліпідів утворюються різні активні карбонільні сполуки, до яких належать альдегіди [1, 18]. Вони можуть відігравати деяку регуляторну роль в організмі або проявляти токсичні властивості. Токсична дія альдегідів зумовлена їх здатністю алкілувати аміногрупи амінокислот та основ нуклеїнових кислот, реагувати з протеїнами та пептидами з подальшим утворенням стійких інтермедіатів у вигляді шиффових основ або N-гідроксиметильних адуктів, утворювати поперечні метиленові містки між зближеними ділянками в протеїнах [13, 16]. Ці реакції спричиняють порушення функцій ензимів та інших клітинних структур [4, 6, 7, 9, 25] і, таким чином альдегіди беруть участь у патогенезі таких захворювань, як діабет, хвороби

Паркінсона, Альцгеймера тощо. В процесі перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) утворюється широкий спектр альдегідів: насичені (етаналь, пропаналь), ненасичені (акролеїн [23], 4-гідроксिनоненаль [15], а також дикарбоніли (гліоксаль [19], метилгліоксаль [8]).

Рабдоміоліз (РМ) – руйнування поперечно-смугастої мускулатури, що призводить до вивільнення продуктів розпаду міоцитів у позаклітинну рідину і кров'яне русло [22]. Основною токсичною сполукою, що вивільняється при РМ є міоглобін. У нормі він вільно зв'язується з глобуліном плазми і лише невелика його кількість потрапляє в сечу. Але при активному вивільненні глобулін плазми не здатен зв'язати весь міоглобін, що надходить у кров'яне русло. В результаті він проходить через гломерулярний фільтр і потрапляє в каналці нирок, де здатний викликати їх обструкцію і порушення ниркових

© К.О. Токарчук, Л.Г. Капустяненко, С.Г.Шандренко



функцій. Ступінь РМ може бути різною: від субклінічної форми з підвищенням вмісту креатинкінази до критичного клінічного стану з набряком інтерстицію і м'язових клітин, скороченням об'єму внутрішньосудинної рідини і пігментною нефропатією з розвитком гострої ниркової недостатності [11]. Накопичення вільних гемопротеїнів є одним із основних факторів ініціалізації ПОЛ і пошкодження нирок [10]. Відомо, що індукція гемоксидази (ГО) є одним із основних механізмів деградації гемопротеїнів і перешкоджає розвитку тканинних ушкоджень у нирках при РМ у щурів [17]. Під час інтенсивного вивільнення гемму з цих протеїнів можливе утворення вільного заліза.

Існує гіпотеза, що вільне залізо, яке утворюється в процесі деградації міоглобіну у нирках, через участь у реакції Фентона є одним із чинників генерації активних окисних радикалів. Вагомим доказом цієї гіпотези є експериментальні дані про те, що дефероксамін – хелатор вільного заліза, зменшує ушкодження нирок при РМ у щурів і запобігає цитотоксичній дії міоглобіну [20].

Мета нашої роботи – дослідження змін різних форм заліза у плазмі крові та з'ясування участі ендогенних альдегідів у процесі розвитку оксидативного стресу на експериментальній моделі гліцеринстимульованого РМ у щурів.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах самцях лінії Вістар масою 180–220 г, раціон харчування яких складався із концентрованого гранульованого комбікорму. Тварин поділили на 7 груп по 6 в кожній: група I – контроль (інтактні тварини); щурам з інших груп (II-VII) вводили в обидва стегнових м'язи 50 %-й водний розчин гліцерину у дозі 10 мл/кг. Через 1 добу після ін'єкції гліцерину тваринам VII групи додатково підшкірно вводили 0,5 %-й розчин димедону у дозі 10 мл/кг раз на добу протягом 3 діб. Тварин виводили з експерименту декапітацією під ефірним на-

ркозом через 1 добу (група II), 3 доби (група III), 4 доби (групи VI, VII), 6 діб (група IV), 10 діб (група V) після введення гліцерину. В тканині печінки визначали гемоксигеназну активність за вмістом утвореного білірубіну [21]. У зразках плазми крові вимірювали наступні показники: вміст гемму – піридингемохромним методом, активність креатинкінази – набором «Audit Diagnostics» (Ірландія), а також білірубін, креатинін, сечову кислоту, залізо та залізов'язувальну здатність – наборами реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна). Вміст вільного заліза – за допомогою вищевказаного набору із заміною у буферному розчині гліцин/HCl (0,2 М) на фосфатний буфер, рН 7,4 (0,1М). У зразках печінки визначали інтенсивність процесів ПОЛ за накопиченням тіобарбітуратактивних продуктів (ТБК-реагуючих продуктів) [12].

Визначення вмісту карбонільних груп (СО-груп) у протеїнах сироватки крові та печінки, що базується на якісній реакції перетворення 2,4-динітрофенілгідразину в 2,4-динітрофенілгідразон (2,4-ДНФГ) із карбонільними групами протеїнів, здійснювали з використанням специфічних антитіл Rabbit Anti-DNP Antibody («Sigma», США) та твердофазного імуноферментного аналізу (т-ІФА) за стандартною методикою [24]. Вміст білка оцінювали методом Bradford [5].

Концентрацію альдегідів міряли пурпалдним методом [14]: до 1 мл зразка додавали 0,5 мл 0,1%-го розчину пурпалду в 2 N NaOH. Через 15 хв додавали 0,5 мл 0,07 % перйодату натрію та визначали оптичну густину при довжині хвиль 550 нм. Для калібрування використовували стандартний розчин формальдегіду.

Спектр електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) реєстрували на радіоспектрометрі «Varian E-109» (США) при температурі рідкого азоту. Оптичні вимірювання проводили на спектрофотометрі «μQuant» (США).

Статистичну обробку результатів проводили в програмі Excel, для оцінки достовірності змін застосували критерій t Стьюдента.



## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спостерігали динаміку розвитку РМ у щурів після введення розчину гліцерину: починаючи з 1-ї доби підвищується загальний вміст вільного гемму в 10 разів, що є результатом вивільнення гемопротейнів, а саме міоглобіну, з ушкоджених м'язових клітин. З 3-ї по 10-ту добу цей показник поступово зменшився, але залишався на підвищеному рівні порівняно з контролем. Так, на 10-ту добу вміст вільного гемму був у 3 рази вищим, ніж у контролі. Характерним для РМ є різке зростання креатинкіназної активності. На 1-шу добу цей показник був у 10 разів вищим за контроль, та надалі поступово зменшувався так само, як і вміст вільного гемму ( $r = 0,99$ ). Ці показники характеризують процес руйнування міоцитів та вивільнення внутрішньоклітинних компонентів у кров'яне русло.

Одним із механізмів захисту організму від токсичної дії вільного гемму є його утилізація в гемоксигеназній реакції. На 1–3-тню добу після введення гліцерину рівень ГО-активності у печінці був у 5–6 разів вищим за контроль, що вказує на індукцію цього ферменту. В результаті функціонування ГО гемова група трансформується у білірубін, спричиняючи стрімке зростання вмісту останнього в крові. На 1–3-тню добу експерименту вміст білірубіну дослідних тварин був у 7 разів вищим за контроль. Хоча цей показник поступово зменшувався, на 10-ту добу він залишався у 4 рази вищим щодо контрольних значень. Динаміка вмісту у плазмі крові таких метаболітів, як креатинін, сечовина та сечова кислота характеризують розвиток патологічного стану, який пов'язаний з погіршенням екскреторної функції нирок. Зміна цих показників доводить факт розвитку РМ на моделі гліцериніндукованого оксидативного стресу.

У разі гемолізу та РМ при дії різних окиснювачів у плазмі крові з'являється лабільне тривалентне залізо, котре не включене до трансферину (Тр)– протеїну, який його зв'язує та екранує від хімічної взаємодії.

Таке залізо здатне накопичуватись в плазмі і посилювати окисні процеси. Підтвердження накопичення лабільного тривалентного заліза у плазмі крові є результати дослідження з використанням ЕПР. Окиснене залізо ( $Fe^{+3}$ ) на відміну від відновленого ( $Fe^{+2}$ ) має парамагнітні властивості, тому його сигнал реєструється в спектрі ЕПР. Положення лінії в спектрі ЕПР характеризується величиною  $g$ -фактора. Так, залізо у складі метгемоглобіну дає сигнал з  $g = 6,0$ ; нітрозильного комплексу гемоглобіну –  $g = 2,3$ ; гемму цитохрому Р-450 –  $g = 2,52$  та  $2,24$ ; мітохондріальних залізо-сірчаних комплексів –  $g = 1,94$ . Хоча залізо буває в різних протеїнових формах, їх сигнали розділяються в спектрі ЕПР за  $g$ -фактором і можуть бути окремо визначені. Тривалентне залізо, що включене до Тр має характерний анізотропічний синглетний сигнал  $g = 4,3$  з триплетною тонкою структурою (рис. 2,а, «класичний» сигнал). На моделі РМ, як і у разі гемолітичних процесів, наприклад при інтоксикації щурів гідроксиламіном [2] або при гіперпродукції оксиду азоту [3] у зразках плазми крові реєструється сигнал з  $g = 4,3$ , форма якого відмінна від такої відповідного сигналу в контрольній групі (див. рис. 2,в, «рабдоміолізний» сигнал). Такі зміни, можливо, пов'язані з формуванням нового пулу  $Fe^{+3}$ , яке не включене до Тр. Щоб підтвердити це припущення було отримано спектр ЕПР модельного розчину  $Fe^{+3}$  (20 мкмоль/л  $FeCl_3$ ) на 4%-му бичачому сироватковому альбуміні (БСА; рН 7,4, 0,2 М фосфатний буфер), сигнал з  $g = 4,3$  представлено на рис. 1, б. Він не має вираженого триплетного розщеплення. При суперпозиції останнього з «класичним» сигналом отримаємо зміну форми, що є аналогічною в дослідній групі. Для остаточної перевірки був використаний хелатор заліза – диетилдитіокарбамат (ДТК). Попередні досліди показали, що він є відновником лабільного  $Fe^{+3}$  з утворенням залізо-сірчаного комплексу, в якому  $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ . Тому при додаванні ДТК до модельного розчину заліза на альбуміні сигнал  $g = 4,3$

зникає. ДТК не вступає в реакції із  $\text{Fe}^{+3}$ , що зв'язане з Тр. Залізотранспортний протеїн екранує включене залізо від хімічної взаємодії. При додаванні розчину ДТК до плазми крові інтактних тварин сигнал з  $g = 4,3$  не змінюється. У зразках дослідної групи із застосуванням розчину ДТК нормалізується форма сигналу, і він стає аналогічним «класичному» сигналу.

На моделі РМ у тканинах різних органів вивільнене при утилізації вільного гему ензимами з ГО-активністю залізо передається на залізозв'язувальні протеїни. Однак при значній інтенсивності цього процесу можливий «витік» лабільного заліза та формування його пулу в крові. У зразках плазми крові контрольних тварин така форма заліза не визначається, у дослідних тварин вже на 1-шу добу після введення щурам гліцерину кількість лабільного заліза майже вдвічі перевищує вміст заліза у Тр контрольних тварин (табл. 1). Цей показник зберігається на такому високому рівні до 6 діб, поповнюючись продуктами ГО-активності та каталізуючи окисні процеси в організмі. Максимальні зміни в параметрах обміну заліза спостерігаються на 3-тю добу. В порівнянні з контролем загальний вміст заліза, за виключенням гемового заліза, що не визначається за допомогою ферозину, на цей період зростає майже втричі. Але це спричинено формуванням пулу саме лабільного заліза, вміст якого також майже втричі перевищує вміст заліза у Тр. Останній зменшується на 25 %, хоча вміст апотрансферину (зв'язуюча здатність Тр) залишається незмінним, що призводить до зменшення відсотка заповнення Тр залізом у 1,3 раза. Коефіцієнт кореляції між вмістом лабільного заліза у плазмі крові та ГО-активністю в печінці становить 0,98

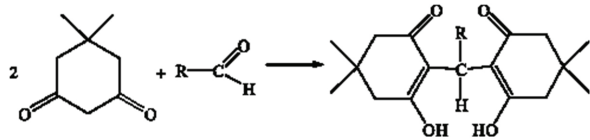


Рис. 1. Схема комплексоутворення димедону з альдегідами

(при  $P < 0,05$ ). Такий сильний зв'язок між двома показниками свідчить, що саме процес катаболізму вільного гему ГО-оксидазою є джерелом утворення пулу лабільного заліза у крові. Накопичення не екранованого редокс-активного заліза є одним із чинників розвитку оксидативного стресу при РМ.

Для з'ясування участі альдегідів у розвитку оксидативного стресу на моделі РМ використали акцептор альдегідів – димедон (5,5-диметил-1,3-циклогександіон,  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_2$ ). Він є циклічним дикетоном, який використовується для ідентифікації альдегідів, оскільки взаємодіє з ними і не взаємодіє з кетонами. Дві молекули димедону конденсуються з молекулою альдегіду, а утворений аль-димедон може втрачати воду з утворенням циклічного ангідриду (див. рис. 1).

Показано значне підвищення показників, які характеризують розвиток оксидативного стресу. Так, на 4-ту добу після введення гліцерину вміст ТБК-реагуючих продуктів у

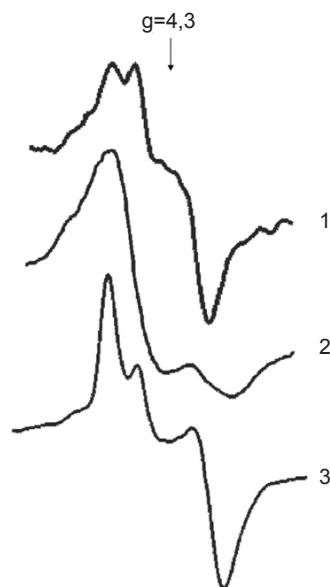


Рис. 2. Сигнали електронного парамагнітного резонансу тривалентного заліза з  $g=4,3$  у плазмі крові: 1 – інтактних щурів, класичний сигнал заліза у трансферині; 2 – модельного розчину  $\text{Fe}^{+3}$  (20 мкмоль/л  $\text{FeCl}_3$ ) на 4%-му бичачому сироватковому альбуміні (рН 7,4, 0,2 М фосфатний буфер); 3 – щурів з гліцериніндукованим рабдоміолізом, «рабдоміолізнний» сигнал зі зміненою формою

печінці підвищився на 38 % в порівнянні з контролем, що свідчить про посилення процесів ПОЛ (табл. 2). Вміст СО-груп протеїнів одного із основних показників, що характеризують наслідки оксидативного стресу на 4-ту добу підвищився у сироватці крові в 3,5 раза та в тканині печінки в 2,8 раза порівняно з контролем.

Загальний вміст альдегідів у печінці підвищився на в 2,9 раза відносно контролю, що можна вважати наслідком оксидативного стресу, оскільки саме посилення процесів ПОЛ є джерелом утворення альдегідів. Однак, ми припустили, що підвищений вміст ендogenous альдегідів є не тільки результатом оксидативного стресу, але і наслідком того, що вони можуть потенціювати згадані окисні процеси.

Для дослідження цієї гіпотези тваринам вводили акцептор альдегідів – димедон. Це додаткове введення призвело до зниження загального вмісту альдегідів у печінці на 79 %. Слід відмітити відсутність впливу димедону на вміст неекранованого заліза

в крові. Усунення участі альдегідів у патологічному процесі призвело до зменшення показників оксидативного стресу. Так, на 4-ту добу вміст ТБК-реагуючих продуктів в тканині печінки знизився на 62 %, СО-груп протеїнів сироватки крові на 38 % та печінки на 46 % ( $P < 0,05$  порівняно з групою щурів з РМ, але без введення димедону, див. табл. 2).

Таким чином, експериментально доведено, що у щурів на моделі РМ підвищений вміст ендogenous альдегідів є не тільки наслідком посилення процесів ПОЛ, але і самі ці альдегіди потенціюють окисні процеси. На користь цього свідчить суттєве зменшення значень показників оксидативного стресу, а саме вмісту ТБК-реагуючих продуктів і СО-груп протеїнів при зниженні вмісту ендogenous альдегідів за допомогою введення димедону. Також показані зміни у формах заліза плазми крові при розвитку РМ. Накопичення неекранованого редокс-активного заліза, що є каталізатором вільно радикальних процесів, є особливістю розвитку оксидативного стресу на цій моделі.

**Таблиця 1. Біохімічні показники плазми крові та печінки щурів на моделі рабдоміолізу ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

Показники	Контроль (I група)	1-ша доба (II група)	3-тя доба (III група)	6-та доба (IV група)	10-та доба (V група)
<b>Плазма крові</b>					
Загальний гем, мкмоль/л	11±5	120±26*	45±9*	41±10*	34±9*
Креатинкіназна активність, мкмоль · л · хв <sup>-1</sup>	32±10	350±95*	184±77*	68±19*	53±18*
Креатинін, мкмоль/ л	62±9	95±9*	79±10	130±18*	243±27*
Сечова кислота, ммоль/ л	0,11±0,04	0,19±0,05	0,22±0,05*	0,28±0,07*	0,39±0,11*
Сечовина, ммоль/л	2,4±0,3	4,0±0,5*	6,5±1,0*	8,7±1,6*	8,5±1,7*
Білірубін, мкмоль/л	4,6±0,6	31±4*	34±6*	20±4*	18±4*
Загальне залізо, мг/л	1,2±0,2	3,1±0,7*	3,5±0,7*	3,3±0,7*	2,4±0,5*
Зв'язане залізо, мг/л	1,2±0,2	1,0±0,2	0,9±0,2*	1,2±0,3	1,5±0,4
Лабільне залізо, мг/л	н.в.	2,1±0,6	2,6±0,6	2,1±0,6	0,9±0,4
Зв'язувальна здатність, мг/л	4,4±0,9	4,8±0,9	5,0±0,9	4,8±1,0	5,8±0,9*
Зв'язування заліза, %	27±3	21±4	18±3*	25±4	26±5
<b>Печінка</b>					
Гемоксигеназна активність, нмоль білірубину · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка	8,1±2,0	47±7*	51±8*	38±5*	22±7*

\*  $P < 0,05$  відносно контролю.

**Таблиця 2. Показники оксидативного стресу, вмісту альдегідів та лабільного заліза на 4-ту добу після введення шурам гліцерину (M±m, n = 6)**

Схема досліджу	Протеїнові карбонільні групи, нмоль/мг білка		ТБК-реагуючі продукти, нмоль/мг білка	Альдегіди (загальний вміст) мкмоль/г тканини	Лабільне залізо, мг/л
	сироватка	печінка	печінка	печінка	сироватка
Контроль (I група)	0,98±0,12	1,3±0,2	2,5±0,3	0,13±0,02	н.в.
Рабдоміоліз (VI група)	3,4±0,8*	3,7±0,9*	4±0,4*	0,38±0,09*	2,4±0,6*
Рабдоміоліз і введення димедону (VII група)	2,1±0,4**	2,0±0,5**	1,5±0,4**	0,08±0,01**	2,2±0,4**

\* P<0,05 відносно контролю; \*\* P<0,05 відносно рабдоміолізу.

**К.О. Токарчук, Л.Г. Капустяненко, С.Г Шандренко**

### **РОЛЬ АЛЬДЕГИДОВ В РАЗВИТИИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ РАБДОМИОЛИЗЕ У КРЫС**

Исследованы изменения в формах железа плазмы крови и участие альдегидов в развитии оксидативного стресса на модели глицеринстимулированного рабдомиолиза у крыс. Раствор глицерина (50 %) ввели внутримышечно в обе бедренные мышцы в дозе 10 мк/кг. Показано накопление в плазме крови неэкранированного редокс-активного железа в концентрациях до 2,6 мг/л, что почти в три раза превышает содержание железа в трансферине. Образование этой формы железа – один из пусковых механизмов развития оксидативного стресса. Зарегистрировано повышение показателей оксидативного стресса. На 4-е сутки содержание ТБК-реагирующих продуктов в печени увеличилось на 38 %, СО-групп протеинов в сыворотке крови в 3,5 раза и в печени в 2,8 раза. Содержание альдегидов в печени увеличилось в 2,9 раза. Для выделения участия эндогенных альдегидов в развитии оксидативного стресса на данной модели дополнительной группе животных кроме глицерина вводили ежедневно подкожно 1%-й раствор акцептора альдегидов – димедона в дозе 10 мл/кг. На 4-е сутки в этой группе крыс регистрировали уменьшение содержания альдегидов в печени на 79 %. Нормализация содержания альдегидов сопровождалась некоторой нормализацией показателей оксидативного стресса: уменьшением содержания ТБК-реагирующих продуктов в печени на 62 %, СО-групп протеинов в сыворотке крови на 38 % и в печени на 46 %. Полученные результаты доказывают тот факт, что повышенное содержание альдегидов есть не только «продуктом» оксидативного стресса, но и сами активно участвуют в развитии этого процесса.

Ключевые слова: оксидативный стресс, рабдомиолиз, альдегиды, димедон.

**K.O.Tokarchuk, L.G. Kapustyanenko, S.G. Shandrenko**

### **THE ROLE OF ALDEHYDES IN DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS UNDER RHABDOMYOLYSIS IN RATS**

We investigated the changes in the forms of plasma iron and participation of aldehydes in the development of oxidative stress under glycerol-induced rhabdomyolysis in rats. Rhabdomyolysis was caused by intramuscular injection of 50 % glycerol in the dose 10 ml/kg. We detected an increase in indexes of oxidative stress. On the day 4, the content of TBA-reactive products in the liver increased by 38 %, CO-group proteins in serum in 3,5 times and in the liver in 2,8 times. The content of aldehydes in the liver was increased in 2,9 times. Accumulation of not shielded redox-active iron in the blood plasma in concentrations up to 2,6 mg/l, which is almost three times of iron content of transferrin was showed. The formation of this form of iron is one of the triggers of oxidative stress. To explore the participation of endogenous aldehydes in the development of oxidative stress in this model, in additional group of animals glycerol was injected simultaneously with a daily 1 % solution of dimedone, aldehydes acceptor at a dose of 10 ml/kg. In this group, at 4th day a decrease in the content of aldehydes in the liver by 79 % was recorded. Normalization of aldehydes followed by normalization of the indicators of oxidative stress: decrease the content of TBA-reactive products in the liver by 62 %, CO-group proteins in serum by 38 % in the liver by 46 %. These results demonstrate that elevated level of aldehydes is not only a “product” of oxidative stress, but the aldehydes themselves are actively involved in the development of this process.

Key words: oxidative stress, rhabdomyolysis, aldehydes, dimedone.

*Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Kyiv*



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дмитренко Н.П., Холиан А. Роль взаємодії метаболізму формальдегіду та оксиду азоту в механізмі їх токсичного дії. II. Токсичне дієння оксиду азоту // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 5. – С. 5–26.
2. Проданчук Г.Н., Шандренко С.Г., Кишко Т.О., Дмитренко Н.П. Нові аспекти механізму токсичного дієння гідроксиламіну // Совр. Пробл. токсикол. – 2006. – №1. – С. 37–46.
3. Шандренко С.Г., Кишко Т.О., Чумаченко І.М., Дмитренко М.П. Зміни в обміні оксиду азоту та заліза у щурів, спричинені азбестом // Укр. біохім. журн. – 2011. – 83, №2. – С. 93–100.
4. Andersen M.E., Clewell H.J., Bermudez E., Dodd D.E., Willson G.A., Campbell J.L., Thomas R.S. Formaldehyde: integrating dosimetry, cytotoxicity, and genomics to understand dose-dependent transitions for an endogenous compound // Toxicol. Sci. – 2010. – 118, №2. – P. 716–731.
5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–254.
6. Conaway C.C., Whysner J., Verna L.K., Williams G.M. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation // Pharmacol. Ther. – 1996. – 71, № 1–2. – P. 29–55.
7. Deng Y., Yu P.H. Simultaneous determination of formaldehyde and methylglyoxal in urine: involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in diabetic complications // J. Chromatogr. Sci. – 1999. – 37, № 9. – P. 317–322.
8. Desai K.M., Chang T., Wang H., Banigesh A., Dhar A., Liu J., Untereiner A., Wu L. Oxidative stress and aging: Is methylglyoxal the hidden enemy? // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2010. – 88. – P. 273–284.
9. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes // Free Rad. Biol. Med. – 1991. – 11. – P. 81–128.
10. Holt S., Moore K. Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: The role of myoglobin // Exp. Nephrol. – 2000. – 8. – P. 72–76.
11. Huerta-Alardin A.L., Varon J., Marik P.E. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis – an overview for clinicians // Crit. Care. – 2005. – 9. – P. 158–169.
12. Janero D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury // Free Rad. Biol. Med. – 1990. – 9, № 6. – P. 515–540.
13. Kitamoto Y., Maeda H. Reevaluation of the reaction of formaldehyde at low concentration with amino acids // J. Biochem. – 1980. – 87, № 5. – P. 1519–1530.
14. Lee C.H., Tsai C.M. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: Measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation // Anal. Biochemistry. – 1999. – 267. – P. 161–168.
15. Lui W., Kato M., Akhand A., Hayakawa A., Suzuki H., Miyata T., Kurokawa K., Hotta Y., Ishikawa N., Nakashima I. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the cascade for apoptotic cell death // J. Cell Sci. – 2000. – 11, №3. – P. 635–641.
16. Metz B., Kersten G.F., Hoogerhout P., Brugghe H.F., Timmermans H.A., de Jong A., Meiring H., ten Hove J., Hennink W.E., Crommelin D.J., Jiskoot W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides // J. Biol. Chem. – 2004. – 279, № 8. – P. 6235–6243.
17. Nath K.A., Haggard J.J., Croatt A.J. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo // Amer. J. Pathol. – 2000. – 156, №5. – P. 1527–1535.
18. Negre-Salvayre A., Coatrieux C., Ingueneau C., Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors // Br. J. Pharmacol. – 2008. – 153, № 1. – P. 6–20.
19. Paul J. Thornalley. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems – role in ageing and disease // Drug Metab. Drug Interact. – 2008. – 23, № 1–2. – P. 125–150.
20. Plotnikov E.Y., Chupyrkina A.A., Pevzner I.B., Isaev N.K., Zorov D.B. Myoglobin causes oxidative stress, increase of NO production and dysfunction of kidney's mitochondria // Biochim Biophys. Acta. – 2009. – 1792, № 8. – P. 796–803.
21. Sardana M.K., Sassa S., Kappas A. Hormonal regulation of heme oxygenase induction in avian hepatocyte culture // Biochem. Pharmacol. – 1985. – 34, № 16. – P. 2937–2944.
22. Sauret J.M., Marinides G., Wang G.K. Rhabdomyolysis // Amer. Fam. Physician. – 2002. – 65, № 5. – P. 907–912.
23. Uchida K., Kanematsu M., Morimitsu Y., Osawa T., Noguchi N., Niki E. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins // J. Biol. Chem. – 1998. – 273. – P. 16058–16066.
24. Winterbourn C.C., Buss I.H. Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay // Methods Enzymol. – 1999. – 300. – P. 106–111.
25. Zhu Q., Sun Z., Jiang Y., Chen F., Wang M. Acrolein scavengers: reactivity, mechanism and impact on health // Mol. Nutr. Food Res. – 2011. – 55, № 9. – P. 1375–1390.

Ю.В. Данилович, О.Ю. Чуніхін, Г.В.Данилович

## Тестування змін розмірів міоцитів матки за дії модуляторів її скоротливої активності методом фотонної кореляційної спектроскопії

*Із використанням фотонної кореляційної спектроскопії вивчено вплив речовин-модуляторів контрактильної активності гладеньких м'язів на розміри (діаметр) міоцитів матки щурів. Клітини візуалізувалися за допомогою лазерної конфокальної мікроскопії як об'єкти переважно овальної або близької до овальної форми. Діаметр міоцитів, оцінений за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії, становив 7–10 мкм, що узгоджується із результатами, одержаними нами з використанням лазерної конфокальної мікроскопії. Показано, що такі міоконстрикторні агенти, як кальцієвий іонофор А-23187 (10 мкмоль/л) та інгібітори калієвих каналів (тетраетиламоній та 4-амінопіридин у концентрації 1 ммоль/л), призводять до зменшення діаметра клітин у середньому на 22, 12 і 24 % відповідно. За наявності оубабіну, який знижує скоротливу активність гладенького м'яза, спостерігається збільшення досліджуваного показника в середньому на 23 %. Отже, зменшення/збільшення діаметра міоцитів матки за дії вказаних речовин корелює із добре відомим в науковій літературі їх впливом на скорочення/розслаблення міометрії.*

*Ключові слова:* фотонна кореляційна спектроскопія, міоцити, міометрія, міоконстриктори, оубабін.

### ВСТУП

Скоротлива активність м'язового волокна супроводжується суттєвими змінами низки його фізико-хімічних характеристик, передусім електропровідності, осмомолярності міоплазми, її іонної сили та рН, температури, локального тиску, а також лінійних розмірів самого волокна [1, 5, 7]. Водночас інформація щодо змін об'єму міоцитів під час контрактильної активності доволі обмежена. З огляду на те, що скорочення м'яза багато в чому визначається структурно-функціональними особливостями окремих його волокон, дослідження волюметричних характеристик міоцитів здатне розширити наші уявлення стосовно клітинних механізмів узгодженої роботи м'язів.

Зміни об'єму клітин спостерігаються як за умови дії на них речовин-регуляторів, так і у разі впливу чинників патогенезу. Клітинний об'єм чутливий до широкого спектра

зовнішніх (внутрішніх) факторів, до яких відносяться створення анізоосмотичних умов, оксидативний/нітрозативний стрес, вплив концентрованих амінокислот, аміаку, гормонів тощо [14–16, 25, 26]. З огляду на це коло проблем стосовно осморегуляції клітинних функцій та її порушення, яке супроводжує виникнення патологічного стану, а також осмосигналінгу, як передумови осморегуляції, знайшли нині відображення в деяких роботах. Як приклад дослідницької активності в цій царині можна навести встановлення зв'язку між дією інсуліну і глютаміну на гепатоцити та збільшенням об'єму клітин, що супроводжується змінами у їхньому метаболізмі і генній експресії, причому роль осмосенсорів відіграють білки-інтегрини [14, 23]. У цьому разі в сигналізацію залучені MAP-кіназний месенджерний каскад (можливо, його Erk-підкаскад), а також G-протеїнзалежні та тирозинкіназні шляхи.

© Ю.В. Данилович, О.Ю. Чуніхін, Г.В.Данилович



Спричинену печінковою недостатністю енцефалопатію, яка супроводжується набряком мозку та підвищеним внутрішньочерепним тиском, багато авторів пов'язують із дією амонію на астроцити, що також супроводжується збільшенням їх об'єму [16, 26]. Наводяться докази того, що амоній посилює експресію та підвищує активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  – котранспортера, чому передують оксидативна/нітрозативна модифікація останнього [16]. З іншого боку, продемонстровано, що астроцити у гіпоосмотичному середовищі мають підвищену активність  $\text{Ras/Raf/Erk}_{1/2}$  – сигнального шляху та характеризуються підвищенням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі [23, 25]. Можна припустити, що зазначені біохімічні механізми лежать в основі осмосигналіngu гліальних клітин.

Загальноприйнятою є точка зору, що зміни клітинного об'єму визначаються процесами транспорту води крізь плазматичну мембрану. Відповідно до цього, порушення іонного гомеостазу клітини, як наслідок дисфункції іонотранспортувальних систем, може призвести до руйнації осмобалансу між цитозолем та позаклітинним середовищем, що супроводжується акумуляцією міжклітинної води та зростанням клітинного об'єму [15]. Зокрема, в хондроцитах стабільність цього показника може підтримуватися за рахунок транспорту калію з клітини в умовах існування фізіологічнозначущих значень потенціалу спокою на мембрані [18]. В осморегуляції клітини особливе значення мають іонні транспортери і обмінники на кшталт  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспортера,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмінників, а також неселективні катіонні канали та чутливі до об'єму осмолітичні аніонні канали [15, 16]. Функціональна активність електрозбудливих клітин, зокрема м'язових, супроводжується суттєвими змінами інтенсивності трансмембранних іонних струмів, які достатні для зміщення осмотичної рівноваги між цитозолем і позаклітинним середовищем, а, отже, впливають на клітинний об'єм. Наводяться окремі докази кореляції

між скоротливою активністю гладенького м'яза та змінами об'єму міоцитів [12]. Можлива наявність функціонального зв'язку між змінами об'єму міоцитів і структурою сарколеми, цитоскелетними білками, а також протеїнами контрактильного апарату [13, 19, 21] дає змогу припустити значення осмосигналіngu в регуляції скоротливої активності м'язів. Проте інформація стосовно впливу речовин, які здатні змінювати контрактильну активність міоцитів на їх об'єм майже відсутня у доступній нам науковій літературі.

Для вивчення скоротливої функції міоцитів ефективними виявилися різноманітні оптичні методи дослідження [9, 11, 21]. Подальша розробка таких підходів дасть можливість розширити уявлення про механізми функціонування м'яза на клітинному рівні. Контрактильна активність м'язової клітини супроводжується змінами її геометрії [12, 19], що буде впливати на оптичні характеристики клітин у суспензії, зокрема, показники світлорозсіювання [4, 6]. Зручним, швидким і відносно простим методом аналізу змін розмірів об'єктів, які знаходяться у броунівському русі, є фотонна кореляційна (лазерна кореляційна) спектроскопія. За допомогою цього методу аналізується інтенсивність розсіювання монохроматичного світла поверхнею об'єктів, які вивчаються, наслідком чого є одержання інформації щодо змін їх гідродинамічного діаметра (фактично розміру). Метод з високою ефективністю використовується в біології та медицині для вивчення формених елементів крові в нормі та при патології, оцінки ступеня набухання мітохондрій, яке спричинене відкриванням пори перехідної провідності, при дослідженні взаємодії антиген–антитіло, руху мікроорганізмів тощо [3, 4, 6]. Водночас у науковій літературі майже відсутня інформація стосовно застосування фотонної кореляційної спектроскопії для оцінки функціонального стану міоцитів.

Метою нашої роботи було: вивчити зміни розмірів свіжовиділених гладеньком'язових клітин матки (міометрія), які знаходяться у

суспензії, при дії на них речовин, що впливають на контрактильну активність.

## МЕТОДИКА

Виділення суспензії інтактних міоцитів з міометрія щурів. Суспензію гладеньком'язових клітин матки невагітних щурів, естрогенізованих за 16 год до забору тканини, одержували з використанням колагенази і соєвого інгібітора трипсину за допомогою методу Молларда та співавт. [20]. Загальну кількість клітин і кількість життєздатних клітин підраховували з використанням гемоцитометра (камери Горяєва).

Фотонна кореляційна спектроскопія. Контрольні виміри проводили в модифікованому фізіологічному середовищі Хенкса (розрахована концентрація кальцію становить 0,03 ммоль/л). Розміри міоцитів оцінювали за допомогою приладу ZetaSizer-3 ("Malvern Instruments", Великобританія) з корелятором Multi8 computing correlator type 7032 ce. Прилад облаштований гелій-неоновим лазером ЛГ-111 з довжиною хвилі 633 нм і потужністю 25 мВт. Розсіюване від суспензії міоцитів лазерне опромінення реєстрували протягом 1 хв п'ятиразово під кутом розсіювання 90°. Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v 1.61.

Розмір міоцитів досліджували методом фотонної кореляційної спектроскопії на лазерному кореляційному спектрометрі "ZetaSizer-3" ("Malvern Instrument", Великобританія), обладнаного He-Ne лазером ЛГН-111 (P = 25 мВт,  $\lambda = 633$  нм). Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 20 мкм. Робота цього спектрометра основана на аналізі кореляційних характеристик флуктуації інтенсивності динамічно розсіяного світла при проходженні лазерного променя через середовище. Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла і інтегральної інтенсивності розсіювання дає змогу визначити коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних часток у

рідинах і за рівнянням Стокса-Ейнштейна визначити розподілення частинок у рідинах за розміром. Коефіцієнт трансляційної дифузії D частинок пов'язаний з тривалістю кореляції  $\tau_c$  співвідношенням:

$$Dq^2 = 1/\tau_c,$$

Хвильової вектор флуктуацій концентрації q описується виразом:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right),$$

де n – показник заломлення середовища (рідина),  $\lambda_0$  – довжина хвилі випромінювання,  $\theta$  – кут розсіювання.

Використовуючи формулу Стокса-Ейнштейна, яка пов'язує розмір частинок з їх коефіцієнтом трансляційної дифузії і в'язкістю рідини, можна розрахувати розмір сферичних частинок:

$$d(H) = \frac{k_B \cdot T}{3\pi\eta D},$$

де  $k_B$  – стала Больцмана, T – абсолютна температура,  $\eta$  – зсувна в'язкість середовища, в якому суспендовані частинки, D – коефіцієнт трансляційної дифузії.

Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від водної (n = 1,33) суспензії міоцитів, проводили 5-разово протягом 60 с при +22°C під кутом розсіювання 90°.

Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

Зйомки неприкріплених до субстрату клітин з використанням лазерної конфокальної мікроскопії. Візуалізували міоцити в фізіологічному середовищі Хенкса із використанням потенціалчутливого зонда DiOC<sub>6</sub>(3) у концентрації 0,5 мкмоль/л. Забарвлені енергетизовані клітини досліджували на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META ("Carl Zeiss", Німеччина) [2] у режимі Multi Track. Збудження флуоресценції DiOC<sub>6</sub>(3) здійснювали на довжині хвилі 488 нм, а її реєстрацію – в діапазоні 505-530 нм (світлофільтр BP 505-530).

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили із використанням пакета стандартних програм IBM PC, застосовуючи загальновідомі методи і критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В 1 мл отриманої клітинної суспензії містилося в середньому  $6,6 \cdot 10^6$  міоцитів; кількість життєздатних клітин, яку визначали при фарбуванні клітинного препарату вітальним барвником трипановим синім, становила 90–95 % від їх загального вмісту. Розміри міоцитів у суспензії становили 7–10 мкм, що узгоджується із результатами, одержаними нами з використанням лазерної конфокальної мікроскопії, хоча у суспензії наявні також більші за розмірами утворення та об'єкти нетривіальної геометрії (рис. 1). Більшість неприкріплених до субстрату клітин мають округлу та близьку до овальної форму, що відповідає термодинамічному принципу мінімуму енергії. In vitro лише міоцити, які прикріплюються до субстрату та розпlastуються, набувають веретеноподібної морфології, характерної для гладеньком'язових клітин. Близька до сферичної форма міоцитів

у суспензії дає змогу використовувати метод фотонної кореляційної спектроскопії для оцінювання зміни їх розмірів. Переважання об'єктів видовженої форми або складної геометрії унеможливило б коректну рестрацію автокореляційної функції. Необхідно зазначити, що у складі міометріальної тканини міоцити об'єднані в пучки, формують щільні контакти і через рецептори інтегринів взаємодіють із білками позаклітинного матриксу [21, 24]. Це не дає змоги проаналізувати функціональну відповідь окремих клітин і вимагає проведення досліджень на міоцитах, одержаних за допомогою протеолітичних ферментів [21].

Аналіз змін мод діаметра міоцитів протягом 10 хв (розміри, які найбільш часто зустрічаються в досліджуваному зразку) дає змогу припустити, що процеси осадження клітин чи їх злипання не відіграють суттєвої ролі для інтерпретації подальших дослідів, оскільки спостерігаються флуктуації навколо середнього значення досліджуваного показника (рис. 2).

Надалі вивчали вплив окремих модулаторів скоротливої активності міометрія, дія яких надійно тестована в тензометричних

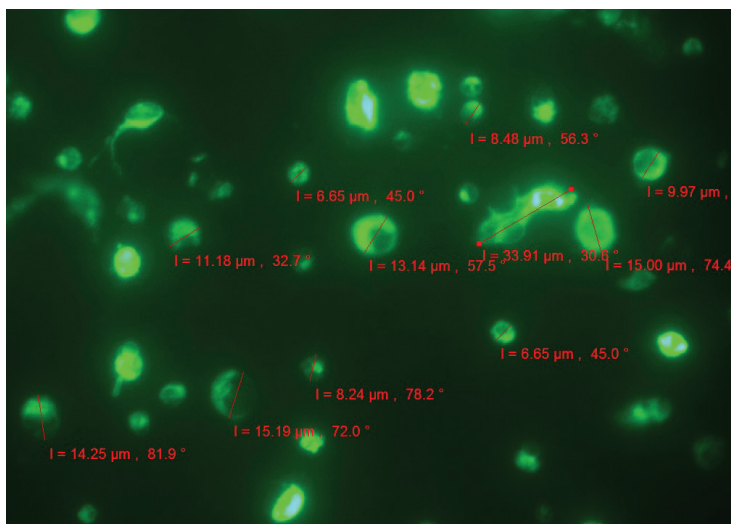


Рис. 1. Суспензія міоцитів, візуалізована із використанням лазерної конфокальної мікроскопії. Для візуалізації клітин використовували флуоресцентний барвник DiOC<sub>6</sub> (3). Зазначено розміри окремих об'єктів з відповідними кутами виміру

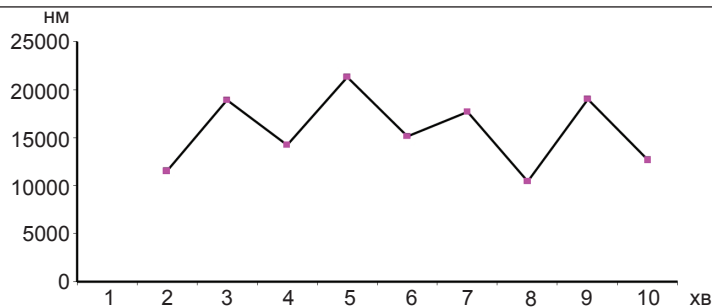


Рис. 2. Зміни мод діаметра міоцитів протягом 10 хв у середовищі із низькою концентрацією кальцію

дослідженнях, на розміри міоцитів. Встановили, що додавання  $\text{Ca}^{2+}$  (близько 3 ммоль/л) до суспензії міоцитів, які були преінкубовані в гіпокальцієвому фізіологічному розчині, зменшувало розміри клітин (рис. 3,а), що відповідає уявленням про „базальний” вхід катіона з позаклітинного середовища [17] і підвищення контрактильної активності матки у разі заміни гіпокальцієвого на нормальне середовище. Подальші дослідження проводилися при фізіологічних концентраціях  $\text{Ca}^{2+}$ . Обробка суспензії кальцієвих іонофором А-23187 [17] викликала суттєве зменшення їхнього діаметра (див. рис. 3,б), причиною якого може бути зміна геометрії міоцитів, індукована масованим входом  $\text{Ca}^{2+}$  з позаклітинного середовища й активацією скоротливого апарату. Широковживані інгібітори кальцієвих каналів, зокрема в міометрії, тетраетиламоній та 4-амінопіридин [10], очікувано знижували розміри міоцитів (див. рис. 3,в). Це знаходиться у відповідності із

стимуляцією цими речовинами транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в клітини внаслідок їх деполяризувальної дії на сарколему з подальшою активацією актоміозинового комплексу. Додавання до міоцитів специфічного інгібітора  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази оуабаїну спричинило збільшення розмірів міоцитів (див. рис. 3,в), що корелює з даними тензометричних досліджень, де оуабаїн знижував скоротливу активність смужок гладенького м'яза [8].

Аналіз конкретного випадку розподілу діаметра клітин (рис. 4) свідчить, що підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі до 3 ммоль/л призводить як до зниження кількості крупних об'єктів у суспензії, так і до появи більш дрібних, що може бути наслідком зменшення розмірів міоцитів.

Слід також зазначити, що односпрямовані зміни розмірів міоцитів, наприклад у середовищі з  $\text{Ca}^{2+}$  та 4-амінопіридином, звужують діапазон розподілу їхнього діаметра.

Згідно з результатами конфокальної зйомки, вплив досліджуваних речовин на розміри

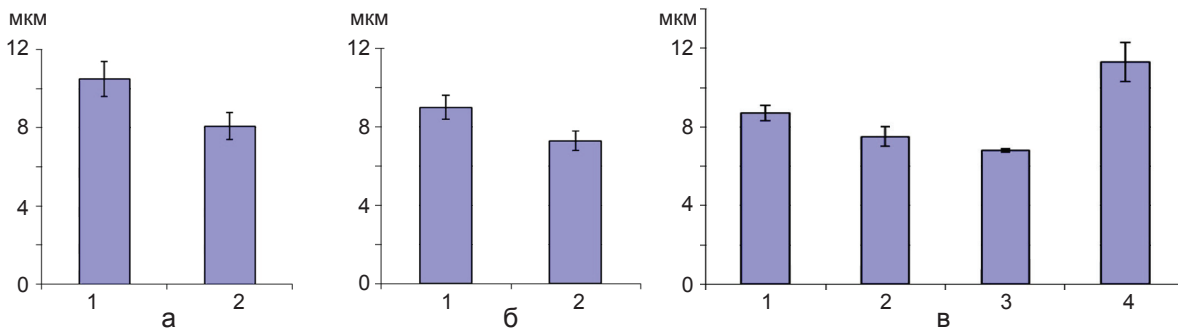


Рис. 3. Зміни діаметра міоцитів за дії речовин-модуляторів контрактильної активності: а – до гіпокальцієвого середовища (1 – контроль, 0,03 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ ), 2 – внесення 3 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , б – 1 – контроль, 3 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , 2 – внесення 10 мкмоль/л А-23187, в – 1 – контроль, 3 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , 2 – внесення 1 ммоль/л 4-амінопіридину, тетраетиламонію (3), 4 – 50 мкмоль/л оуабаїну.  $P \leq 0,05$  – відносно контролю

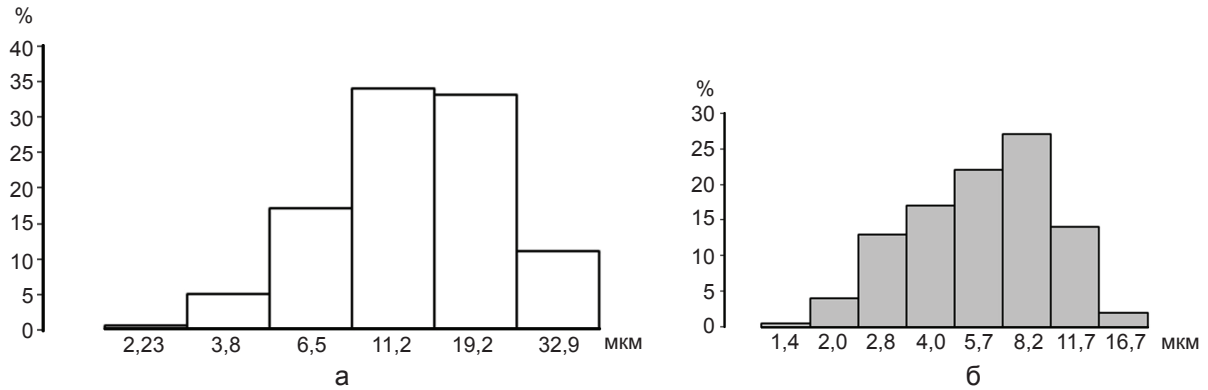


Рис. 4. Розподіл діаметра клітин в гіпокальцієвому середовищі (а) та за наявності 3 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  (б). За віссю абсцис – діаметр, за віссю ординат – розподіл клітин у зразку за розмірами (у відсотках). Представлений результат обробки результатів комп’ютерною програмою

міоцитів важко інтерпретувати як процеси вкорочення–подовження клітин. Зміни їхнього діаметра можуть бути пояснені з огляду на можливі перебудови цитоскелета, які спостерігаються за дії речовин-модуляторів скоротливої активності. Зокрема, показано, що їхній вплив супроводжується виникненням як евагінацій, так і інвагінацій поверхні міоцитів [19, 21]. При інтерпретації одержаних нами результатів слід також враховувати взаємодію актинових філаментів із плазматичною мембраною в гладеньком’язових клітинах [13]. Отже, не викликає сумніву, що впливи, які змінюють активність контрактильного апарату клітин міометрія, можуть призвести до відповідних змін в їх морфології. Так, показано, що скорочення клітин міометрія вагітних жінок супроводжується зменшенням об’єму міоцитів [12]. Широковідомим є зв’язок між  $\text{Cl}^-$ -каналами сарколеми, які регулюють динаміку клітинного об’єму, та скоротливу активністю [22].

Вірогідним поясненням зареєстрованих нами змін діаметра клітин може бути також суттєве порушення осмотичної рівноваги між міоплазмою та позаклітинним середовищем як наслідок змін у транспорті іонів на рівні сарколеми під дією речовин, що модулюють скоротливу активність.

Таким чином, в деяких випадках, зміни розмірів міоцитів, оцінені із використанням

фотонної кореляційної спектроскопії, корелюють із даними досліджень скоротливої активності, які одержані іншими методами. Проте при математичному їх аналізі та інтерпретації корелограм виникає низка питань, пов’язаних із високою гетерогенністю клітинної популяції за розмірами та нетривіальною геометрією міоцитів (еліпс, подвійний конус або більш складна форма).

Автори висловлюють подяку члену-кореспонденту НАН України, професору С.О. Костеріну за цінні рекомендації під час обговорення експериментальних результатів.

Робота виконана за підтримки програми наукових досліджень НАН України “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій” № держреєстрації 0110U005971.

**Ю.В. Данилович, А.Ю. Чуніхін,  
Г.В. Данилович**

#### **ТЕСТИРОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ РАЗМЕРОВ МИОЦИТОВ МАТКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ МОДУЛЯТОРОВ ЕЕ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТОДОМ ФОТОННОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

С использованием фотонной корреляционной спектроскопии изучено влияние веществ-модуляторов контрактильной активности гладких мышц на размеры (диаметр) миоцитов матки крыс. Клетки визуализировались с использованием лазерной конфокальной микроскопии как объекты преимущественно овальной или близкой к



овальной формы. Диаметр миоцитов, оцененный с помощью фотонной корреляционной спектроскопии, составлял 7–10 мкм, что соответствует результатам, полученным нами с использованием лазерной конфокальной микроскопии. Показано, что такие миоконстрикторные агенты, как кальциевый ионофор А-23187 (10 мкмоль/л) и ингибиторы калиевых каналов (тетраэтиламмоний и 4-аминопиридин в концентрации 1 ммоль/л), приводят к уменьшению диаметра клеток в среднем на 22, 12 и 24 % соответственно. В присутствии оубаина, который снижает сократительную активность гладкой мышцы, наблюдается увеличение исследуемого показателя в среднем на 23 %. Таким образом, уменьшение/увеличение диаметра миоцитов матки в присутствии указанных веществ коррелирует с хорошо известным в научной литературе их действием на сокращение/расслабление миометрия.

Ключевые слова: фотонная корреляционная спектроскопия, размер миоцитов, миометрий, миоконстрикторы, оубаин.

**Yu.V. Danylovych, A. Ju.Chunikhin,  
G.V. Danylovych**

#### **INVESTIGATION OF THE CHANGES IN UTERINE MYOCYTES SIZE DEPENDING ON CONTRACTILE ACTIVITY MODULATORS BY PHOTON CORRELATION SPECTROSCOPY**

By using photon correlation spectroscopy the effect of contractile activity modulators of smooth muscle to the size (diameter) of rats uterine muscle cells was investigated. Cells were studied by using laser confocal microscopy as objects mostly oval or nearly oval form. The diameter of myocytes, assessed by photon correlation spectroscopy, was amounted 7-10  $\mu\text{m}$  which is consistent with the results obtained by using laser confocal microscopy. It is shown that the myoconstricted agents as  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore A-23187 (10  $\mu\text{M}$ ) and  $\text{K}^{+}$ -channels inhibitors (tetraethylammonium and 4-aminopyridine in a concentration of 1 mM) leading to decrease the diameter of the cells by 22%, 12% and 24% in average respectively. The ouabain, that reduces contractile activity of smooth muscle, leads to increase this parameter up 23% from control. Thus, decreasing/increasing the diameter of uterine myocytes correlates with their well known influence on myometrium constriction/relaxation.

Key words: photon correlation spectroscopy, hydrodynamic diameter, myocytes, myometrium, myoconstrictors, ouabain.

*Palladine Institute of Biochemistry, National Academy of  
Science of Ukraine, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Березовский В.А., Колотилов Н.Н. Биофизические характеристики тканей человека. Справочник. – К.: Наук. думка, 1990. – 224 с.

2. Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Горчев В.Ф. Порівняльне дослідження методами спектрофлуориметрії та протокової цитометрії поляризації плазматичної і внутрішньої мітохондріальної мембран гладеньком'язових клітин із використанням потенціалчутливого зонда  $\text{DiOC}_6(3)$  // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 3. – С. 99–105.
3. Кандаурова Н.В., Чуніхін О.Ю., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Костерін С.О. Модулятори трансмембранного кальцієвого обміну в мітохондріях змінюють їхній гідродинамічний діаметр // Там само. – 2010. – **82**, № 6. – С. 52–57.
4. Ключева А.В., Левчук Ю.Н., Набока Ю.Н. Фотон-корреляційна спектроскопія білків // Там само. – 2002. – **74**, № 5. – С. 12–26.
5. Костюк П.Г., Зима В.Л., Мірошніченко М.С., Шуба М.Ф. Біофізика. – К.: Обереги, 2001. – 544 с.
6. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. – К.: Наук. думка, 1987. – 256 с.
7. Тугай В.А. Регуляторная роль протона в мембранных процессах мышечной клетки. – Там само, 1993. – 183 с.
8. Цимбалюк О.В., Онуфрийчук О.В., Веклич Т.О., Черенок С.О., Кальченко В.І., Мірошніченко М.С., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу оубаїну і каліксарен біс-гідроксиметилфосфонові кислоти на активність  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ -АТФази та механокінетику процесу «скорочення-розслаблення» гладенького м'язу // Фізика живого. – 2006. – **14**, № 1. – С. 53–72.
9. Bazan C., Torres Borda D., Blomgren P., Paolini P. Image processing techniques for assessing contractility in isolated neonatal cardiac myocytes // Int. J. Biomed. Imaging. – 2011. – **2011**, Article ID 729732. – 9 p.
10. Brainard A.M., Korovkina V.P., England S.K. Potassium channels and uterine function // Semin. Cell Dev. Biol. – 2007. – **18**, № 3. – P. 332–339.
11. Delbridge L.M., Roos K.P. Optical methods to evaluate the contractile function of unloaded isolated cardiac myocytes // J. Moll. Cell Cardiol. – 1997. – **29**, № 1. – P. 11–25.
12. Dessouky D.A. Ultrastructural observations of the human uterine smooth muscle cells during gestation // Amer. J. Obstet. Gynecol. – 1976. – **125**, № 8. – P. 1099–1107.
13. Gunst S.J., Tang D.D. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle // Eur. Respir. J. – 2000. – **15**, № 3. – P. 600–616.
14. Haussinger D., Reinehr R., Schliess F. The hepatocyte integrin system and cell volume sensing // Acta Physiol. – 2006. – **187**, Is. 1-2. – P. 249–255.
15. Hoffman E.K., Dunham P.B. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation // Int. Rev. Cytol. – 1995. – **161**. – P. 162–173.
16. Jayakumar A.R., Lin M., Moriyama M. Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling // J. Biol. Chem. – 2008. – **283**, № 49. – P. 33874–33882.
17. Kosterin S.A., Burdyga Th.V., Fomin V.P., Grover A.K. Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -transport in myometrium. – In: Control of Uterine Contractility / Eds. R.E. Garfield, T.N.

- Tabb // London, Tokyo: CRC Press, 1994. – P. 129–153.
18. Lewis R., Asplin K.E., Bruce G. The role of the membrane potential in chondrocyte volume regulation // J. Cell Physiol. – 2011. – **226**, № 11. – P. 2979–2986.
  19. Maruyama I., Kobayashi M., Yoshida C., Momose K. Ultrastructure of single smooth muscle cells contracted by carbachol and calcium ion // J. Pharmacobiodyn. – 1987. – **10**, № 8. – P. 396–403.
  20. Mollard P., Mironneau J., Amedee T. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture // Amer. J. Physiol. – 1986. – **19**, № 1. – P. 47–54.
  21. Momose K. Isolation, configuration and contractile responses of single smooth muscle // Nihon Yakurigaku Zasshi. – 1993. – **101**, № 3. – P. 101–110.
  22. Remillard C.V., Yuan J.X. CLC-3: more than just a volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel // Br. J. Pharmacol. – 2005. – **145**, № 1. – P. 1–2.
  23. Schliess F., Sinning R., Fisher R. Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling // Biochem. J. – 1996. – **320**, Pt. 1. – P. 167–171.
  24. Shynlova O., Tsui P., Jaffer S., Lye S.J. Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2009. – **144**, № 1. – P. 2–10.
  25. Sinning R., Schliess F., Kubitz R., Haussinger D. Osmosignalling in C6 glioma cells // FEBS Lett. – 1997. – **400**, № 2. – P. 163–167.
  26. Stephan vom Dahl, Kircheis G., Haussinger D. Hepatic encephalopathy as a complication of liver disease // World J. Gastroenterol. – 2001. – **7**, № 2. – P. 152–156.

*Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*  
*E-mail: danylovysh@biochem.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 17.04.2012*

Т.В. Вовкун, П.І. Янчук, Л.Я. Штанова, С.П. Весельський, В.А. Барановський

## Вплив корвітину на секреторні процеси та кровотік у слизовій оболонці шлунка щура

*Вивчали об'єми секретії, біохімічні компоненти соку в шлунку щура з перев'язаним пілорусом, а також швидкість кровотоку у слизовій оболонці шлунка (СОШ) при навантаженні препаратом корвітин у дозах 2,5 і 5 мг/кг. Біохімічний аналіз шлункового соку базувався на визначенні дебіту хлористоводневої кислоти (ХК), концентрації білка, гексозамінів (у розрахунку на глюкозамін) і цистеїну. У контрольних щурів виявлено індикатори шлункового слизу гексозаміни та вільна амінокислота цистеїн, яка є сильним антиоксидантом. Внаслідок застосування корвітину концентрація цих сполук у шлунковому соку збільшувалася. Корвітин не впливав на такі показники шлункової секретії, як рН, об'єм шлункового соку, дебіт ХК, концентрація білка. Показано також, що цей препарат дозозалежно збільшує швидкість кровотоку в СОШ. Отримані результати дають підставу вважати, що корвітин можна розглядати як засіб, що забезпечує посилення роботи захисних механізмів СОШ, не впливаючи на секрецію ХК та білка.*

*Ключові слова:* шлунок, корвітин, кровотік, шлункова секреція, хлористоводнева кислота, білок, гексозамін, цистеїн.

### ВСТУП

Засоби рослинного походження, що належать до групи біофлавоноїдів – сполук, відомих своїми потужними антиоксидантними властивостями, здавна використовуються медициною багатьох країн для профілактики та лікування шлункових хвороб. Наприклад, у Китаї та Японії дуже популярними є поліфенольні екстракти з високим вмістом флавоноїдів, зокрема препарати софарадин і солон [32]. Використання сучасних синтетичних фармакологічних засобів для усунення певних захворювань шлунка має деякі обмеження, особливо при його виразці зі складною патологією, що вказує на необхідність заміни таких ліків на альтернативні сполуки природного походження. Тому багато сучасних досліджень направлені на їх пошуки не лише для лікування, а й попередження згаданих хвороб. Нині багато захворювань шлунка розглядаються з позиції вільнорадикальної патології, тому застосування флавоноїдів для профілактики і боротьби з ними обгрунтовані [31].

Аналізи шлункового соку можуть свідчити про патофізіологічні зміни діяльності органа. Розвиток хвороб шлунка, включаючи ерозивні гастрити і ульцерогенез, часто викликає надмірна продукція хлористоводневої кислоти (ХК). Проте ульцерогенні процеси в шлунку відбуваються і на тлі нормальної або зниженої кислотності шлункового вмісту. У таких випадках причиною захворювання є не гіперсекреція ХК, а порушення функціонування механізмів захисту слизової оболонки шлунка (СОШ). Основним захистом шлунка від уражень різними патогенними чинниками вважають шлунковий слиз, бікарбонати, простагландини, нормальний кровотік.

Типовим представником біофлавоноїдів є кверцетин – сильний вазодилататор і антиоксидант [15, 21]. Це сполука нетоксична, без шкідливих побічних ефектів, тому його використання безпечно для людини. Проте недоліком при його застосуванні є низька розчинність у воді [10]. Вітчизняні вчені створили розчинну форму кверцетину –

© Т.В. Вовкун, П.І. Янчук, Л.Я. Штанова, С.П. Весельський, В.А. Барановський

корвітин, який добре себе зарекомендував у клініці при лікуванні хворих з інфарктом міокарда: в ураженому атеросклерозом серці він справляв виражену антиоксидантну дію [6]. З патофізіологічної точки зору його протекторні властивості визначає здатність підвищувати вміст оксиду азоту (NO) в тканинах [3] та блокувати 5-ліпоксигеназу [4]. Раніше ми показали [7], що кверцетин, одержаний співробітниками нашого інституту з надземної частини *Fagopyrum esculentum*, запобігає гострим ураженням СОШ 80%-м етанолом чи індометацином, посилюючи в ній продукцію простагландинів, зменшуючи перекисне окиснення ліпідів і секрецію ХК. Ефекти корвітину на функціонування шлунка наразі не вивчені, тому метою нашої роботи було дослідження впливу цього препарату на об'єми шлункової секреції, біохімічний склад шлункового соку та швидкість кровотоку у СОШ щурів.

## МЕТОДИКА

Гострі досліди проводили на голодних самицях білих щурів масою 200–250 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. В кожній з 5 експериментальних груп перебувало 6–8 щурів. У тварин 1, 2 та 3-ї груп досліджували секреторну функцію шлунка, у щурів 4-ї та 5-ї – кровотік. Шлункову секрецію стимулювали за Шеєм, перев'язавши на 4 год пілорус [29]. Цей метод широко використовується для дослідження шлункової секреції у дрібних лабораторних тварин, переважно щурів і мишей [14, 18, 24]. Щурів 1, 2 і 3-ї груп після 24-годинного голодування наркотизували тіопенталом натрію (35 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Пілоричну частину шлунка перев'язували лігатурою, після чого негайно, через металеву орогастральну трубку, в нього вводили: тваринам 1-ї (контрольної) групи – фізіологічний розчин (5 мл/кг), тваринам 2-ї та 3-ї груп – розчин корвітину в дозах 2,5 і 5 мг/кг (внутрішньошлунково) відповідно. В єдиній знайденій нами роботі

з вивчення впливу корвітину на шлунковий кровотік кота Чорноіван та співавт. вводили препарат внутрішньовенно в дозі 0,25; 0,5 та 1 мг/кг [5], а в шлунок зазвичай вводять дозу на порядок вищу, ніж у вену. Тому вибір нами доз препарату ґрунтувався на цих даних. Згідно з обраною нами методикою, через 4 год після перев'язки пілоруса тварин забивали, шлунки видаляли, а їх вміст збирали в градуйовані конічні пробірки. У зібраних пробах шлункового соку визначали: загальний об'єм секрету (мілілітр), рН, концентрацію білка (міліграм на мілілітр), гексозамінів (у розрахунку на глюкозамін, мілімоль на літр) та вільного цистеїну (мікромоль на літр). Для розрахунку концентрації білка, гексозамінів і цистеїну від кожної проби відбирали по 0,2 мл соку. Решту – центрифугували протягом 10 хв при  $3500 \text{ хв}^{-1}$ , супернатант обережно переносили в хімічні стакани, після чого до нього додавали 5 мл дистильованої води, визначали рН (іономір “рН-150”) і титрували 0,01 N розчином NaOH до рН 7,0, щоб розрахувати загальну продукцію ХК (мікромоль за годину). Вміст білка вимірювали спектрофотометрично за біуретовою реакцією [2], концентрацію гексозамінів і цистеїну – за допомогою хроматографії на папері FN1. Для цього ХК нейтралізували 23%-м розчином аміаку в дистильованій воді у співвідношенні 0,2 : 0,1. Вільні амінокислоти екстрагували сумішню ацетон–етанолу (3 : 1), екстракт концентрували в конусовидній пробірці досуха. Сухий залишок розчиняли в суміші етанол–вода (1 : 1). Невеликі порції (5 мкл) наносили на хроматограму. Вільні амінокислоти розділяли в системі розчинника, до складу якого входить: ізоаміловий спирт, бутанол, оцтова кислота, мурашина кислота і вода (9 : 5 : 5 : 1 : 5). Хроматограми фарбували 0,2%-м розчином нінгідрину в ацетоні. Кількісну оцінку показників проводили на приладі «Денситометр ДО-1М» з попередньою побудовою калібрувальної кривої [1].

Швидкість кровотоку в СОШ досліджували методом кліренсу водню з електро-

хімічною його генерацією за допомогою модифікованих нами платинових електродів [8]. Після 24 год голодування щурів 4-ї та 5-ї груп наркотизували уретаном (1,0 г/кг). На череві робили надріз, шлунок промивали фізіологічним розчином при  $37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , після чого занурювали в СОШ модифікований електрод. Корвітин вводили внутрішньошлунково в дозі 2,5 мг/кг щурам 4-ї групи і 5 мг/кг тваринам 5-ї групи. Швидкість кровотоку в СОШ розраховували за кривою зменшення напруження водню в ній після припинення генерації останнього до та після дії корвітину. Вихідну швидкість кровотоку в СОШ кожної тварини визначали до моменту введення корвітину.

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили за стандартними методами варіаційної статистики з використанням W-тесту Шапіро–Вілка та критерію t Стьюдента. Відмінності між окремими групами вважали статистично значущими при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після перев'язування пілоруса шлункова секреція збільшується внаслідок активації локальних ваго-вагальних рефлексів стимуляцією пресорних рецепторів антральної зони шлункової слизової [13]. У тварин контрольної групи об'єм шлункового соку становив  $3,7\text{ мл} \pm 0,2\text{ мл}$ , а після введення корвітину в дозах 2,5 мг/кг і 5 мг/кг –  $3,8 \pm 0,1$  та  $3,6\text{ мл} \pm 0,25\text{ мл}$  відповідно. рН шлункового соку інтактних щурів відповідав значенню  $2,78 \pm 0,03$ , а в групах тварин, яким вводили корвітин у вищезазначених дозах –  $2,74 \pm 0,02$  і  $2,83 \pm 0,14$  відповідно. Дебіт ХК у контрольних щурів сягав  $47,7\text{ мкмоль/год} \pm 3,0\text{ мкмоль/год}$ , а в щурів, яким негайно після перев'язування пілоруса в шлунок вводили 2,5 і 5 мг/кг корвітину цей показник був на рівні  $50,8 \pm 2,5$  і  $48,7\text{ мкмоль/год} \pm 2,9\text{ мкмоль/год}$  відповідно. Концентрація білка в шлунковому соку до введення корвітину в середньому дорівнювала  $2,41\text{ мг/мл} \pm 0,18$

мг/мл, а після застосування 2,5 і 5 мг/кг препарату –  $2,42\text{ мг/мл} \pm 0,16\text{ мг/мл}$  і  $2,82\text{ мг/мл} \pm 0,17\text{ мг/мл}$  відповідно. Слід зазначити, що у щурів 3-ї групи порівняно з тваринами 1-ї групи цей показник зріс на 17 % що дає змогу говорити про тенденцію до підвищення концентрації білка в шлунковому соку зі збільшенням дози корвітину.

На відміну від вищезгаданих біохімічних компонентів шлункового секрету, дія корвітину збільшувала концентрацію гексозамінів і цистеїну відносно контролю (рис. 1). Концентрація гексозамінів після введення в шлунок 2,5 і 5 мг/кг корвітину дозозалежно зростала відносно контрольних значень на 19,5 % ( $P < 0,01$ ) і 33,5 % ( $P < 0,001$ ) відповідно (рис. 2). Гексозаміни – основні індикатори синтезу шлункового слизу. Пристінковий його шар підтримує певний градієнт рН між просвітом шлунка та СОШ і затримує  $\text{H}^+$ , що надходять з порожнини шлунка [9]. Слиз зменшує ураження СОШ при дії на неї агресивних чинників через посилення синтезу глікопротеїнів, інактивацію вільних радикалів, нейтралізацію ХК, нормалізацію синтезу білка і активності пепсину [12, 26, 31]. Синтез і секреція гексозамінів тісно корелюють з продукцією простагландинів та NO [25,

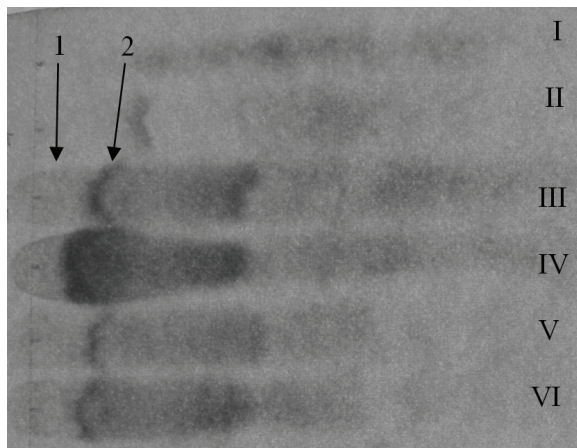


Рис. 1. Хроматограма шлункового соку щурів з перев'язаним пілорусом до і після застосування корвітину. Смуги I–II – контрольні щури; смуги III–IV – корвітин, 2,5 мг/кг; смуги V–VI – корвітин, 5 мг/кг; 1 – гексозаміни; 2 – цистеїн



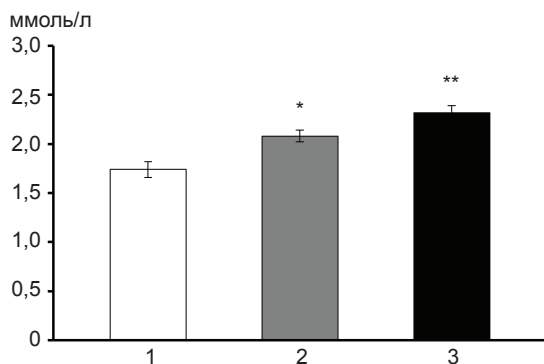


Рис. 2. Вплив внутрішньошлункового введення корвітину на вміст гексозамінів (у розрахунку на глюкозамін) у шлунковому соку щура з перев'язаним пілорусом: 1 – контроль, 2, 3 – корвітин, 2,5 і 5 мг/кг відповідно. \* $P < 0,01$ ; \*\* $P < 0,001$  – порівняно з контролем; \*\*\* $P < 0,05$  – порівняно зі значеннями при введенні корвітину в дозі 2,5 мг/кг

27], тому на підставі одержаних результатів можна припустити, що корвітин посилює в шлунку синтез як простагландинів, так і NO.

Корвітин у дозах 2,5 і 5 мг/кг збільшував в шлунковому соку концентрацію цистеїну порівняно з контролем на 101 і 50 % відповідно (рис. 3). У шлунковому соку наявна певна кількість вільних амінокислот, які відіграють роль не лише структурних елементів для локального синтезу білків, але мають і інші важливі функції, наприклад, модулюють кислоту шлункову секрецію чи діють як цитопротектори [16, 30]. Часто зміни амінокислот-

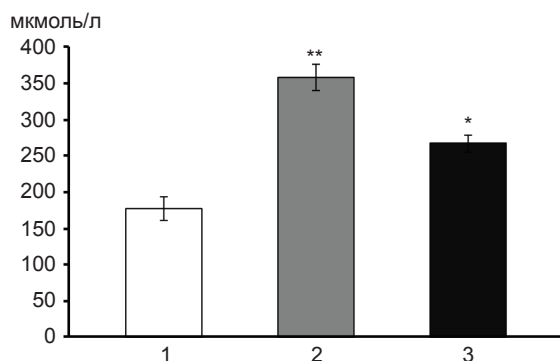


Рис. 3. Ефект внутрішньошлункового застосування корвітину на концентрацію цистеїну в шлунковому соку щура з перев'язаним пілорусом: 1 – контроль, 2, 3 – корвітин в дозі 2,5 і 5 мг/кг відповідно. \* $P < 0,01$ ; \*\* $P < 0,001$  – порівняно з контролем

ного складу шлункового соку корелюють із втратою білка шлунковою стінкою. Зокрема, відомо, що у людей з виразками шлунка концентрація вільних амінокислот у шлунковому соку збільшується як при базальній, так і при стимульованій шлунковій секреції, і серед інших переважають ароматичні амінокислоти. У людей, хворих на дуоденальну виразку, концентрація амінокислот у шлунку, навпаки, зменшується [20]. З 19 вільних амінокислот, які були виявлені нами в шлунковому соку контрольних щурів, ми вибрали як індикатор ефектів корвітину лише одну – цистеїн. Це – важлива сірковмісна амінокислота, яка входить до складу деяких травних ферментів. Крім того, цистеїн сприяє формуванню колагену, що має значення для прискорення заживлення виразок, а також, що було для нас особливо важливим у цій роботі, має потужні антиоксидантні і дезінтоксикаційні властивості, завдяки чому захищає шлунок від ушкоджувальної дії різних агресивних чинників, у тому числі й від ураження етанолом [23]. Ще одна важлива його роль полягає в тому, що він є попередником глутатіону – речовини, яка захищає клітини від ушкодження деякими лікарськими препаратами і токсинами, що містяться в тютюновому димі [11]. Як зазначалося вище, дія корвітину збільшувала концентрацію цистеїну на тлі стабільного білкового синтезу, що можна розглядати не як результат розпаду білка, а як можливий ефект досліджуваного нами препарату на синтетичні процеси в шлунку. Менш істотне зростання концентрації цистеїну при застосуванні корвітину у дозі 5 мг/кг, порівняно з дозою 2,5 мг/кг, може бути пов'язане з початком активації білкового синтезу, оскільки, як зазначено вище, ця амінокислота входить до складу травних ферментів, а при введенні корвітину саме в цій дозі спостерігалася тенденція до збільшення концентрації білка в шлунковому соку.

Вихідна швидкість кровотоку в СОШ у дослідних щурів становила  $(61,8 \pm 9,0)$  мл/хв на 100 г тканини. Введення корвітину в

дозах 2,5 і 5 мг/кг викликало дозозалежне збільшення швидкості на 58,6 і 89,3 % відповідно (рис.4).

Кровотік відіграє важливу роль у підтриманні нормального функціонування СОШ, а саме у збереженні її цілісності та резистентності до дії шкідливих чинників, а також у забезпеченні нормальної роботи травних залоз [19]. Зареєстроване нами збільшення значень цього показника під впливом корвітину було очікуваним. З літературних джерел відомо, що рослинні екстракти з високим вмістом флавоноїдів зазвичай викликають збільшення кровотоку в СОШ, посилюючи в ній продукцію факторів розширення судин – NO і простагліцину та водночас гальмуючи синтез вазоконстриктора ендотеліну-1 в клітинах судинного ендотелію [21, 32]. Гіперемія СОШ, яка спостерігалася в наших дослідах після введення корвітину, певною мірою пояснює результати щодо збільшення продукції гексозамінів у шлунку, оскільки кровотік у СОШ, як правило, корелює з утворенням шлункового слизу [17].

Отже, корвітин активує в шлунку щурів низку таких захисних механізмів, як продукція слизу, синтез цистеїну, зростання швидкості кровотоку в слизовій оболонці, не впливаючи на секрецію ХК, і тому його можна розглядати як засіб, який підвищує резистентність слизової оболонки шлунка та покращує його загальний функціональний стан.

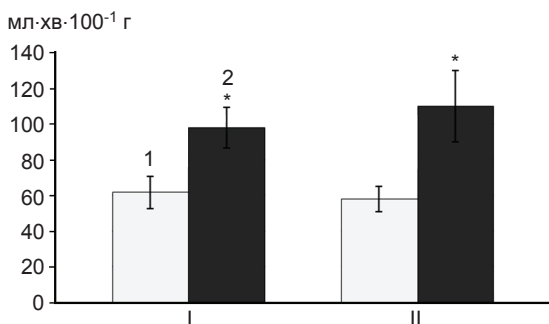


Рис. 4. Зміни швидкості кровотоку в слизовій оболонці шлунка щурів при внутрішньошлунковому введенні корвітину в дозі 2,5 (I) і 5 мг/кг (II): 1 – вихідна швидкість кровотоку, 2 – швидкість кровотоку при введенні корвітину. \*P<0,05 порівняно з вихідним рівнем

**Т.В. Вовкун, П.И. Янчук, Л.Я. Штанова, С.П. Весельский, В.А. Барановский**

### **ВЛИЯНИЕ КОРВИТИНА НА СЕКРЕТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ И КРОВОТОК В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫСЫ**

Изучали показатели желудочной секреции у крыс с перевязанным пилорусом, а также кровоток в слизистой оболочке желудка при нагрузке препаратом корвитин в дозах 2,5 и 5 мг/кг. Биохимический анализ желудочного сока базировался на определении дебита хлористоводородной кислоты (ХК), концентрации белка, гексозаминов и цистеина. Анализ желудочного сока контрольных животных показал наличие в нем гексозаминов – индикаторов желудочной слизи и цистеина – свободной аминокислоты, которая является сильным антиоксидантом. Вследствие применения корвитина концентрация данных соединений в желудочном соке возросла. Корвитин не влиял на такие показатели желудочной секреции, как объем желудочного сока, его рН, дебит ХК, концентрация белка. Показано также, что исследуемый препарат дозозависимо увеличивал скорость кровотока в слизистой оболочке желудка. Полученные результаты дают основание считать, что корвитин можно рассматривать как средство, обеспечивающее усиление защитных механизмов слизистой оболочки желудка без влияния на секрецию ХК и белка.

Ключевые слова: желудок, корвитин, кровоток, желудочная секреция, хлористоводная кислота, белок, гексозамин, цистеин.

**T.V. Vovkun, P.I. Yanchuk, L.Y. Shtanova, S.P. Veselsky, V.A. Baranovsky**

### **THE INFLUENCE OF CORVITIN ON SECRETORY PROCESSES AND BLOOD FLOW IN THE RAT GASTRIC MUCOSA**

We studied parameters of gastric secretion in pylorus-ligated rat and blood flow in the rat gastric mucosa under the influence of drug corvitin used intragastrically in doses of 2,5 and 5 mg/kg. Biochemical analysis of gastric juice was based on the determination of pH, total hydrochloric acid production and total protein, hexosamine and cysteine concentration. Gastric juice analysis in control rats found the presence of hexosamines – a gastric mucus indicators and cysteine – free amino acid which properties of a strong antioxidant. Concentration of these compounds in the gastric juice increased as a consequence of corvitin action. However, corvitin did not affect at these parameters of gastric secretion as the volume of gastric juice, pH, hydrochloric acid output rate, protein concentration. Additionally it was shown that corvitin in dose-dependent manner increased blood flow in the gastric mucosa. This results give reason to believe that corvitin can be considered as a tool that amplifies gastric mucosal defense mechanisms without affecting the secretion of gastric hydrochloric acid and total protein.

Key words: stomach, corvitin, blood flow, gastric secretion, hydrochloric acid, protein, hexosamine, cysteine.

*Kyiv Taras Shevchenko National University*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Коробейникова Э.М., Мещеринова Т.В. Определение содержания свободных аминокислот в сыворотке крови и моче здоровых детей // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 221–224.
- Кочетков Г.А. Практическое руководство по энзимологии – М.: Высш. школа, 1980. – 272 с.
- Мойбенко А.А. Патогенетическое обоснование эффективности нового отечественного кардиопротектора корвитина (водорастворимого кверцетина) при остром инфаркте миокарда // Вісн. фармакології та фармації. – 2007. – № 5. – С. 38–47.
- Пархоменко А.Н., Кожухов С.Н., Мойбенко А.А., Гавриленко Т.И. Блокатор 5-липоксигеназы корвитин: влияние на маркеры воспаления и эндотелиальной дисфункции у больных с острым инфарктом миокарда // Здоровье Украины. – 2008. – №2/1.
- Чорноіван Н.Г., Бухтіарова Т.А., Шаламай А.С. Вплив корвітину на шлунковий кровотік та утилізацію кисню шлунком // Фармакологія та лікар. токсикологія. – 2011. – №3. – С. 64–66.
- Шиш А.М., Пашевін Д.О., Досенко В.С., Мойбенко О.О. Корекція порушень перекисного окиснення ліпідів і системи антиоксидантного захисту за допомогою біофлавоноїдів при моделюванні холестеринного атеросклерозу у кролів // Фізіол. журн. – 2011. – № 2. – С. 19–26.
- Штанова Л.Я., Говоруха Т.М., Косян А.М., Бабан В.М., Вовкун Т.В., Таран Н.Ю., Весельський С.П., Макачук М.Ю. Порівняльна характеристика гастропротекторної, антисекреторної і антиоксидантної дії кверцетину, омепразолу та ранітидину // Фітотерапія. – 2010. – № 4. – С. 47–52.
- Янчук П.И., Палатный Т.П., Русинчук Я.И. Модифицированный электрод для регистрации локального кровотока в слизистой оболочке желудка методом водородного клиренса // Рос. Физиол. журн. – 2005. – 91, №9. – С. 1108–1110.
- Allen A., Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. – 2005. – 288, № 1. – P. C1–19.
- Barnes S., Prasain J., Alessandro T., Arabshahi A., Botting N., Lila M.A., Jackson G., Janleb E.M., Weaver C.N. The metabolism and analysis of isoflavones and other dietary polyphenols in foods and biological systems // Food Funct. – 2011. – № 2. – P. 235–244.
- Chávez-Piña A.E., Tapia-Alvarez G.R., Navarrete A. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide synthesis by PAG protects against ethanol-induced gastric damage in the rat // Eur. J. Pharmacol. – 2010. – 630, № 1-3. – P. 131–136.
- Gindzienski A., Zwierz K., Sarosiek J. The role of mucus and its components in protection and repair within the alimentary tract mucosa: Polish experience // J. Physiol. Pharmacol. – 2003. – 54. – P. 127–144.
- Hakanson R., Hedenbro J., Liedberg G., Sundler F., Vallgren S. Mechanisms of gastric acid secretion after pylorus and oesophagus ligation in the rat // J. Physiol. – 1980. – 305. – P. 139–149.
- Hariprasath L., Raman J., Najian R. Gastroprotective effect of Senecio candicans DC on experimental ulcer models // J. Ethnopharmacol. – 2012. – 140, №1. – P. 145–150.
- Khoo N.K., White C.R., Pozzo-Miller L. Zhou F., Constance C., Inoue T., Patel R.P., Parks D.A. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels // Free Radic. Biol. Med. – 2010. – 49, № 3. – P. 339–347.
- Komorowska M., Szafran H., Szafran Z., Popiela T. Free amino acids in basal and vagally stimulated gastric secretion // Acta Physiol. Pol. – 1989. – 40, № 5-6. – P. 496–503.
- Kwiecien S., Brzozowski T., Konturek P.C. Effect of central and peripheral actions of histamine and its metabolite N-alpha methyl histamine on gastric secretion and acute gastric lesions // J. Physiol. Pharmacol. – 2001. – 52, №4. – P. 625–638.
- Kurasawa T., Chikaraishi Y., Naito A., Toyoda Y., Notsu Y. Effect of humulus lupulus on gastric secretion in a rat pylorus-ligated model // Biol. Pharm. Bull. – 2005. – 28, №2. – P. 353–357.
- Kwiecien S., Konturek P.C., Sliwowski Z., Mitis-Musiol M., Pawlik M.W., Brzozowski B., Jasnos K., Magierowski M., Konturek S.J., Brzozowski T. Interaction between selective cyclooxygenase inhibitors and capsaicin-sensitive afferent sensory nerves in pathogenesis of stress-induced gastric lesions. Role of oxidative stress // J. Physiol. Pharmacol. – 2012. – 63, № 2. – P. 143–151.
- Liang C.R., Tan S., Tan H.T., Lin Q., Lim T.K., Liu Y., Yeoh K.G., So J., Chung M.C. Proteomic analysis of human gastric juice: a shotgun approach // Proteomics. – 2010 – 21. – P. 3928–3931.
- Loke W.M., Hodgson J.M., Proudfoot J.M., Mc Kinley A.J., Puddey I.B., Croft K.D. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men // Amer. J. Clin. Nutr. – 2008 – 88, № 4. – P. 1018–1025.
- Margina D., Ilie M., Manda G., Neagoe I., Mocanu M., Ijnescu D., Gradinaru D., Ganea C. Quercetin and epigallocatechin gallate effects on the cell membranes biophysical properties correlate with their antioxidant potential // Gen. Physiol. Biophys. – 2012. – 31, №1. – P. 47–55.
- Moutaery M., Raves H., Swailam R., Elfaki I., Khan H.A., Arshaduddin M., Tariq M. Protective effect of a cysteine prodrug and antioxidant, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, against ethanol-induced gastric lesions in rats // Exp. Toxicol. Pathol. – 2012. – 64, № 3. – P. 233–237.
- Niero R., Molin M.M., Silva S., Damian N.S., Maia L.O., Monache F.D., Filho V.C., de Andrade S.F. Gastroprotective effects of extracts and guttiferone A isolated from Garcinia achachairu Rusby (Clusiaceae) against experimentally induced gastric lesions in mice // Naunym Schmiedebergs Arch. Pharmacol. – 2012. – 385, №11. – P. 1103–1109.
- Nishida K., Ohta Y., Ishiguro I. Relationship between constitutive nitric oxide synthase activity and mucus level

- in the gastric mucosa of rats with stress // Pharmacol. Res. – 1998. – **38**, № 5. – P. 393–400.
26. Qader S.W., Ameen M.A., Lee S.C., Mohd H.S. Pharmacological mechanisms underlying gastroprotective activities of the fractions obtained from Polygonum minus in Sprague Dawley rats // Intern. J. Molec. Sci. – 2012. – **13**. – P. 1481–1496.
27. Sánchez-Mendoza M.E., Reyes-Trejo B., Sánchez-Gómez P., Rodríguez-Silverio J., Castillo-Henkel C., Cervantes-Cuevas H., Arrieta J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from Eupatorium aschenbornianum: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls // Fitoterapia. – 2010. – **81**. – P.66–71.
28. Santhosh S., Anandan R., Sini T.K., Mathew P.T. Protective effect of glucosamine against ibuprofen-induced peptic ulcer in rats // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2007. – **22**, № 6. – P. 949–953.
29. Shay H., Komarov S., Fels S.S., Meranze D., Gruenshtein M., Siplet H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat // Gastroenterology. – 1945. – **5**. – P. 43–61.
30. Subudhi B.B., Sahoo S.P. Synthesis and antiulcer activity evaluation of conjugates of amino acids with N-aryol- N, N'-dicyclohexyl urea // Chem. Central J. – 2011. – **5**. – 86 p.
31. Sumbul S., Ahmad M.A., Mohd A. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview // J. Pharm. Bioallied Sci. – 2011. – **3**, № 3. – P. 361–367.
32. Zayachkivska O.S., Konturek S.J., Drozdowicz D., Konturek P.S., Brzozowski T., Ghegotsky M.R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts // J. Physiol. and Pharmacol. – 2002. – **56**. – P. 219–231.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка*  
*E-mail: shtanova@ukr.net*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 20.08.2012*

В.В. Труш, В.І. Соболев

## Модуляція тестостероном ефектів дексаметазону у скелетному м'язі щурів

*В експериментах на молодих білих щурах-самицях за допомогою методів електроміографії та ергографії досліджували ефективність пропіонату тестостерону для згладжування негативних ефектів дексаметазону на скелетний м'яз. Установлено що хронічне введення дексаметазону викликало зниження амплітуди скорочення переднього великогомілкового м'яза на 29,7–59,3 % (після 5–25 ін'єкцій) та подовження латентного періоду збудження м'яза на 18,5–16,5 % (після 15–25 ін'єкцій), тоді як комплексне застосування тестостерону і дексаметазону запобігло зміні цих показників. Разом з тим тестостерон не забезпечував згладжування негативного впливу дексаметазону на стійкість м'яза до розвитку стомлення.*

*Ключові слова: дексаметазон, тестостерон, скелетний м'яз, одиночне скорочення м'яза.*

### ВСТУП

Відомо, що першопричиною багатьох функціональних і метаболічних розладів у скелетній мускулатурі, викликаних надлишком глюкокортикоїдів в організмі, є їх катаболічний ефект на міогенні білки, який зумовлює розвиток локальних деструктивних змін м'язових волокон, особливо гліколітичного типу [4, 8, 9, 12]. Деякі автори [9, 10] висловлюють припущення, згідно з яким засоби й фактори, що стимулюють анаболізм або гальмують катаболізм білків у м'язовій тканині, можливо, виявляться здатними дещо згладжувати негативні ефекти глюкокортикоїдів на м'язи. Такими засобами можуть бути анаболічні гормони, у тому числі андрогенного типу [5]. Проте літературні дані щодо ефективності андрогенів у динаміці розвитку стероїдної міопатії дуже суперечливі. Зокрема, потребує подальшого вивчення характер впливу андрогенів на прояв ефектів глюкокортикоїдів на скелетні м'язи у зв'язку зі специфічним впливом андрогенних анаболіків і глюкокортикоїдів на м'язи різного типу й функціональної спеціалізації [2].

Мета нашої роботи – дослідження функціональних змін у скелетному м'язі білих щурів

© В.В. Труш, В.І. Соболев

при тривалому введенні терапевтичних доз дексаметазону, застосовуваного ізольовано та у комбінації із введенням терапевтичних доз пропіонату тестостерону.

### МЕТОДИКА

Експерименти проводили на 130 статевозрілих (4–5-місячних) білих щурах, спочатку поділених на 3 групи. Тварини першої групи (n=10) були контролем. У тварин другої групи (n=60) відтворювали гіперкортицизм різної тривалості за допомогою тривалого введення дексаметазону в терапевтичній дозі (0,25 мг/кг, внутрішньоочеревинно, через добу від 10 до 60 діб). Тварин третьої групи (n=60) піддавали комбінованій дії терапевтичних доз дексаметазону (0,25 мг/кг, внутрішньоочеревинно, через добу) і пропіонату тестостерону (0,6 мг/кг, у вигляді масляної емульсії, підшкірно, через добу) від 10 до 60 діб. У тварин другої і третьої груп надалі було виділено по 6 підгруп (по 10 щурів у кожній підгрупі), кожна з яких отримала різну кількість ін'єкцій дексаметазону (5, 10 і т.д. аж до 30 ін'єкцій), застосовуваних ізольовано (друга група) або в комплексі з уведенням тестостерону (від 5 до 30 ін'єкцій, третя група).



Експериментальними тваринами були обрані особини жіночої статі у зв'язку з більшою чутливістю їх скелетних м'язів до катаболічної дії глюкокортикоїдів у порівнянні з особинами чоловічої статі [4], як об'єкт дослідження – передній великогомілковий м'яз, котрий належить, як і більшість м'язів ссавців, до змішаного типу, але з перевагою кількості швидких м'язових волокон [6], які характеризуються більш високою, у порівнянні з повільними, чутливістю до глюкокортикоїдів [8, 12].

Хід досліду був таким. Спочатку у наркотизованих тварин (тіопентал натрію в дозі 100 мг/кг) проводили реєстрацію М-відповіді м'яза, на підставі якої визначали латентний період його збудження. Електричну відповідь м'яза викликали подразненням малогомілкового нерва надпороговими імпульсами тривалістю в 0,15 мс із частотою 4 імпульс/с. Для посилення біопотенціалів м'яза застосовували диференціальний електрометричний підсилювач із режекторним гіраторним фільтром (50 Гц), з'єднаний із цифровим дивайсом (аналогово-цифровий перетворювач на базі IBEAA76545 або цифровий осцилограф TDS2004C Tektronix з пам'яттю) і комп'ютером.

Після реєстрації М-відповіді переднього великогомілкового м'яза проводили графічний запис його скорочень протягом 7 с із зовнішнім навантаженням 20 г. Скорочення м'яза індукували подразненням надпороговим електричним струмом (напруга 200 мВ) малогомілкового нерва. Частота електричної стимуляції нерва становила 8 імпульс/с, що зумовлювало скорочення м'яза в ритмі 8 одиночних скорочень за секунду. На підставі ергограми надалі визначали такі показники: латентний період і тривалість фаз вкорочення та розслаблення першого одиночного скорочення м'яза, максимальну амплітуду скорочення м'яза при його ритмічній роботі протягом 7 с і тривалість її утримання на максимальному рівні (максимальну стійку працездатність м'яза).

Ступінь скорочення м'яза виміряли за допомогою потенціометричного датчика ПТП-1, включеного в міст постійного струму МОД-61. Напругу розбалансу моста через аналогово-цифровий перетворювач подавали на вхід комп'ютера й реєстрували за допомогою спеціально розробленої програми.

Для оцінки вірогідності різниці між центральними тенденціями порівнюваних груп (контрольної, тих, що отримали певну кількість ін'єкцій дексаметазону, та тих, що отримали певну кількість ін'єкцій дексаметазону в комплексі з тестостероном) використовували критерій *t* Стьюдента для незв'язаних вибірок, попередньо переконавшись у тому, що розподіл значень досліджуваних параметрів близький до нормального (для тестування розподілу на нормальність використовувався критерій Шапіро–Уїлка, Statistica, 7.0). Вірогідність відмінностей між двома вибірками (тією, що отримувала тільки дексаметазон, і тією, що отримувала дексаметазон у комплексі з тестостероном) кожного з досліджуваних показників оцінювали за допомогою двовибіркового *F*-тесту для дисперсій.

На всіх етапах експерименту дотримувалися вимог «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах». Евтаназію тварин по закінченні гострого досліду проводили введенням летальної дози тіопенталу натрію.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив тестостерону на прояв ефектів дексаметазону на латентний період М-відповіді м'яза. Тестостерон, застосований у комплексі з дексаметазоном, згладив негативний ефект синтетичного глюкокортикоїду на швидкість синаптичної передачі, а на початкових етапах уведення зумовив більш тривалий, у порівнянні з ізольованим застосуванням дексаметазону, полегшувальний ефект на нервово-м'язову передачу. Так, у разі ізольованого застосування дексаметазо-

ну після 5 його ін'єкцій спостерігалось скорочення відносно контролю ( $P < 0,05$ ) латентного періоду викликаного збудження м'яза (рис. 1, 2), що побічно відображає збільшення швидкості синаптичної передачі і зумовлено первісним полегшувальним впливом природних і синтетичних глюкокортикоїдів на нервово-м'язові синапси [1]. Разом із тим після 10 ін'єкцій дексаметазону при ізольованому його застосуванні латентний період викликаного збудження м'яза повертався до рівня контролю, а після 15–25 ін'єкцій глюкокортикоїду – подовжувався відносно контролю ( $P < 0,05$ ; див. рис. 1, 2). Спостережуване нами подовження латентного періоду М-відповіді м'яза після 15–25 ін'єкцій дексаметазону при ізольованому його застосуванні свідчить про погіршення стану синаптичної передачі після первинного її полегшення й може бути пов'язане зі здатністю глюкокортикоїдів у разі тривалого їхнього введення в організм викликати порушення синтезу й ресинтезу медіатора в мотонейронах, десенситизацію хо-

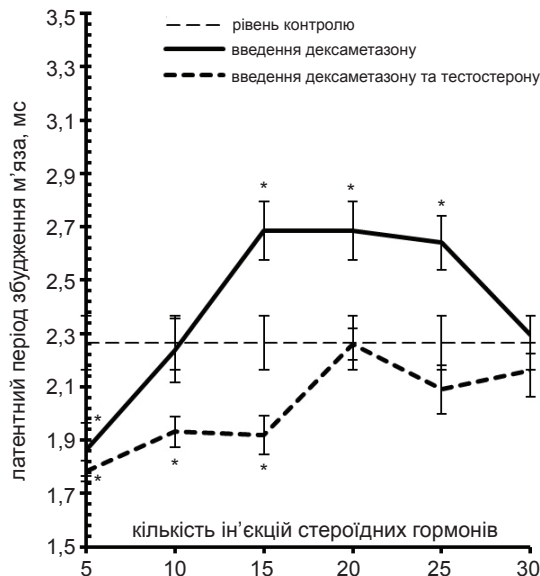


Рис. 1. Залежність латентного періоду М-відповіді переднього великогомілкового м'яза від кількості ін'єкцій дексаметазону, застосованого ізольовано та в комплексі з тестостероном. \* Різниця статистично вірогідна ( $P < 0,05$ ) відносно відповідних значень контрольної групи; кожна точка на кривій відображає середнє значення з 10 окремих варіантів

лінорецепторів або зниження збудливості позасинаптичної мембрани м'язових волокон [4, 7].

Після 30 ін'єкцій дексаметазону латентний період М-відповіді м'яза не відрізнявся від контрольного (див. рис. 1, 2), що говорить про нормалізацію швидкості синаптичної передачі й може бути зумовлене зниженням чутливості м'язових і нервових структур до тривало введеного глюкокортикоїду та посилення процесів його інактивації в організмі.

У разі комплексного застосування дексаметазону з тестостероном після 5–15 ін'єкцій пари стероїдних гормонів латентний період М-відповіді м'яза був коротший за контрольний ( $P < 0,05$ ), а після 20–30 ін'єкцій – статистично вірогідно не відрізнявся від нього (див. рис. 1, 2). На користь коригуючої дії тестостерону на прояв ефектів дексаметазону на латентний період М-відповіді м'яза свідчать і результати двовибіркового F-тесту для дисперсій, що виявив достовірну різницю між групами, які одержали 10–25 ізольованих ін'єкцій дексаметазону і таку саму кількість дексаметазону в комплексі з тестостероном ( $P = 0,006$ ).

Таким чином, тестостерон, що застосовували в комбінації з дексаметазоном, зумовив більш тривале збереження полегшення синаптичної передачі у порівнянні з ізольованим введенням дексаметазону та запобіг зниженню швидкості нервово-м'язової передачі, яке спостерігалось після 15–25 ін'єкцій дексаметазону.

Більш тривала полегшувальна дія пари стероїдних гормонів на синаптичну передачу, у порівнянні з ізольованим застосуванням дексаметазону, пов'язана зі здатністю не тільки глюкокортикоїдів, але й андрогенів, прискорювати нервово-м'язову передачу через підвищення чутливості постсинаптичної мембрани до ацетилхоліну або збудливості позасинаптичної мембрани м'язових волокон. Зокрема, у дослідженнях деяких авторів [5] встановлено, що тестостерон здатний підвищувати натрієву проникність позасинаптичної мембрани м'язового волокна за допомогою впливу на синтез білків натрієвих каналів. Підвищення ж проникності мембран м'язових

волокон для натрію повинне супроводжуватися деякою вихідною їхньою деполаризацією, яка може спричинити тимчасове помірне збільшення збудливості мембран, а, виходить, і полегшення передачі збудливого сигналу від постсинаптичної мембрани на позасинаптичну.

Вплив тестостерону на прояв ефектів дексаметазону на амплітуду скорочення та максимальну стійку працездатність м'яза. При ізольованому застосуванні дексаметазону вже після 5 ін'єкцій максимальна амплітуда скорочення м'яза знижувалася відносно контролю ( $P < 0,05$ ) і залишалася зниженою ( $P < 0,05$ ) з подальшим введенням гормону аж до 25 його ін'єкцій, тоді як після 30 – нормалізувалася (рис. 3). Як причини, що зумовили первинне зниження максимальної амплітуди м'язового скорочення під дією дексаметазону, слід відзначити дві найбільш імовірні: часткова можлива дистрофія м'язових волокон, що призводить до зниження сумарної амплітуди скорочення всього м'яза, і зміна гістохімічного профілю м'яза в бік збільшення питомої частки повільних м'язових волокон через часткову атрофію швидких волокон, більш чутливих до глюкокортикоїдів [8, 12]. Враховуючи здатність дексаметазону підсилювати катаболізм білків у скелетних м'язових волокнах, особливо гліколітичного типу, і тим самим викликати дистрофічні зміни в м'язах [8, 11, 12], обидві зазначені причини можуть

спричинити погіршення силових характеристик м'яза у разі тривалого ізольованого застосування дексаметазону.

Час утримання амплітуди м'язового скорочення на максимальному рівні після 10–30 ін'єкцій дексаметазону коротшав відносно контрольованого рівня ( $P < 0,05$ ; див. рис. 3), що свідчить про підвищення стомлюваності м'язових волокон, викликаного погіршенням енер-

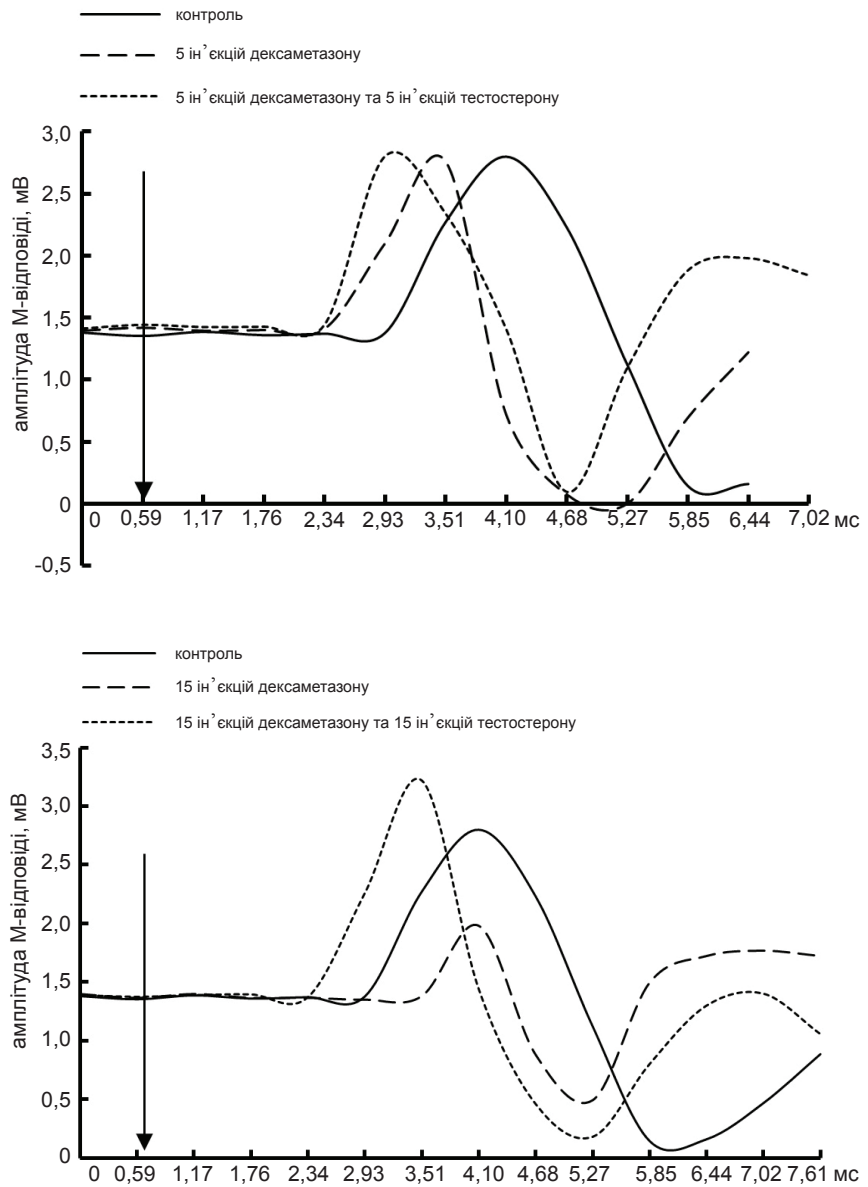


Рис. 2. Зразки записів вихідної М-відповіді переднього великогомілкового м'яза тварин різних груп. Стрілкою відображено початок подразнення

гетичного забезпечення скорочувального акту.

При комплексному застосуванні дексаметазону з тестостероном максимальна амплітуда скорочення м'яза не знижувалися відносно

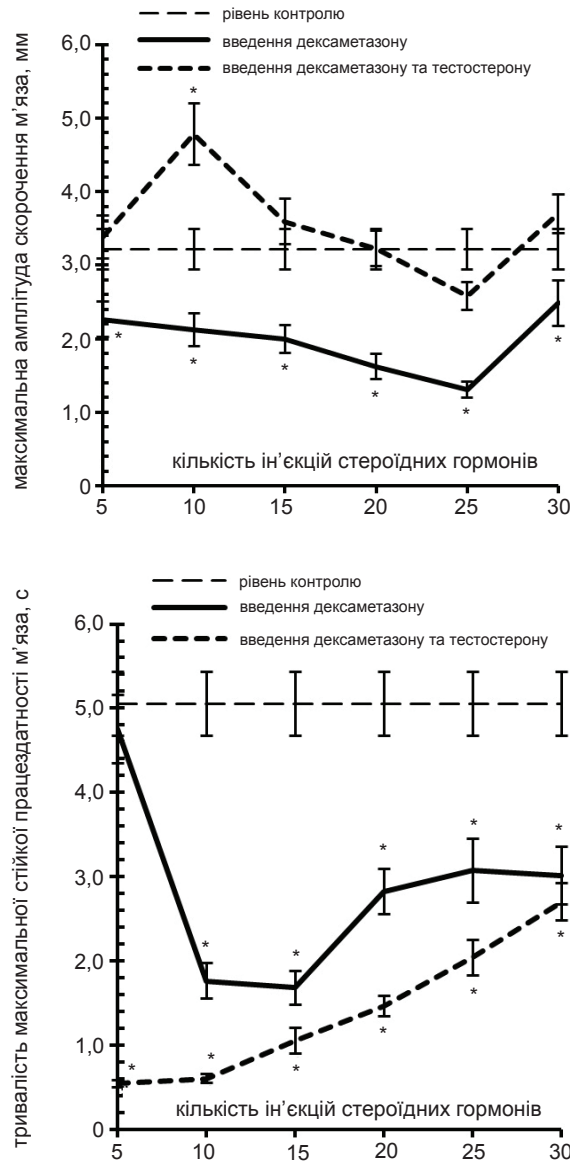


Рис. 3. Характер зміни максимальної амплітуди скорочення та тривалості максимальної стійкої працездатності переднього великогомілкового м'яза при збільшенні кількості ін'єкцій дексаметазону, застосованого ізольовано та в комплексі з тестостероном. \* Різниця статистично вірогідна ( $P < 0,05$ ) відносно відповідних значень контрольної групи; кожна точка на кривій відображає середнє значення з 10 окремих варіантів

контролю протягом усього періоду введення гормональної пари в організм і, відповідно, після 5–30 ін'єкцій пари стероїдних гормонів перевищувала значення у тварин, що одержали відповідну кількість ін'єкцій дексаметазону при ізольованому його введенні ( $P < 0,05$ , див. рис. 3). На користь корегуючої дії тестостерону на прояв негативного ефекту дексаметазону на амплітуду скорочення м'яза свідчать і результати двовибіркового F-тесту для дисперсій, який виявив наявність статистично вірогідної різниці між групами, що одержали 5–25 ін'єкцій дексаметазону і 5–25 ін'єкцій дексаметазону в комплексі з тестостероном ( $P = 0,00005$ ). Більше того, після 10 ін'єкцій дексаметазону в комплексі з тестостероном спостерігалось навіть збільшення максимальної амплітуди скорочення м'яза ( $P < 0,05$  відносно контролю, див. рис. 3), що може бути пов'язане зі збільшенням питомої частки гліколітичних волокон у ньому у зв'язку із трансформацією під дією тестостерону повільних або проміжного типу волокон у гліколітичні. І, дійсно, в літературі є відомості, згідно з якими тестостерон при тривалому введенні в організм здатний не тільки спричинити гіпертрофію скелетних м'язів [13], але й часткову трансформацію оксидативних волокон у гліколітичні [2]. Проте такий ефект тестостерону залежить від вихідного гістохімічного профілю м'яза, його функціональної спрямованості, нейротрофічного контролю й низки інших обставин [2].

Разом з тим після 15–30 ін'єкцій дексаметазону в комплексі з тестостероном відбувалося повернення максимальної амплітуди скорочення м'яза до рівня контролю (див. рис. 3), що побічно свідчить про деяке зниження силових характеристик м'яза після первинного їх збільшення і може бути зумовлене виключенням зі скорочувального акту частини дистрофічно змінених під дією дексаметазону швидких м'язових волокон.

Тривалість максимальної стійкої працездатності переднього великогомілкового м'яза, котра, з одного боку, залежить від енергетичного забезпечення м'язових волокон, а, з іншого, – частково

від гістохімічного профілю м'яза, уже після 5–10 ін'єкцій дексаметазону в комплексі з тестостероном зменшується ( $P < 0,05$  відносно контролю; див. рис. 3). Це може бути спричинено не тільки порушенням енергетичного забезпечення скорочувального акту, але й можливим збільшенням частки швидких м'язових волокон під впливом тестостерону. З подальшим введенням дексаметазону з тестостероном в організм (після 15–30 ін'єкцій стероїдних препаратів) максимальна стійка працездатність переднього великогомілкового м'яза залишалася зниженою відносно контролю ( $P < 0,05$ ) і після 30 ін'єкцій стероїдної гормональної пари не відрізнялася від такої при ізольованому застосуванні дексаметазону (див. рис. 3). Таким чином, тестостерон, який вводився в комбінації з дексаметазоном, не забезпечив згладжування негативного впливу дексаметазону на енергетичне забезпечення скорочувального акту, а, отже, на стійкість м'яза до розвитку стомлення.

Для перевірки висловленого нами припущення щодо можливості зсувів питомої частки швидких і повільних м'язових волокон переднього великогомілкового м'яза під впливом дексаметазону, застосовуваного ізольовано та у комплексі з тестостероном, надалі був проведений аналіз зміни тривалості фаз одиночного скорочення м'яза у дослідних тварин, що побічно відображає його швидкісні характеристики, а, отже, і можливі зсуви гістохімічного профілю.

Вплив тестостерону на прояв ефектів дексаметазону на швидкісні характеристики м'яза. Аналіз швидкісних характеристик м'яза дослідних тварин показав, що їх зміна з збільшенням кількості введених ін'єкцій дексаметазону, застосовуваного ізольовано або в комплексі з тестостероном, носила фазний характер, але при цьому тестостерон модулював ефекти дексаметазону на швидкісні параметри досліджуваного м'яза. Так, у разі ізольованого застосування дексаметазону вже після 10 його ін'єкцій спостерігалася подовження фаз одиночного скорочення м'яза: латентного періоду скорочення, фази вкорочення та розслаблення ( $P < 0,05$  відносно контролю; рис. 4), яке зберігалася і у тварин, що одержали від 15 до 25 ін'єкцій гормону.

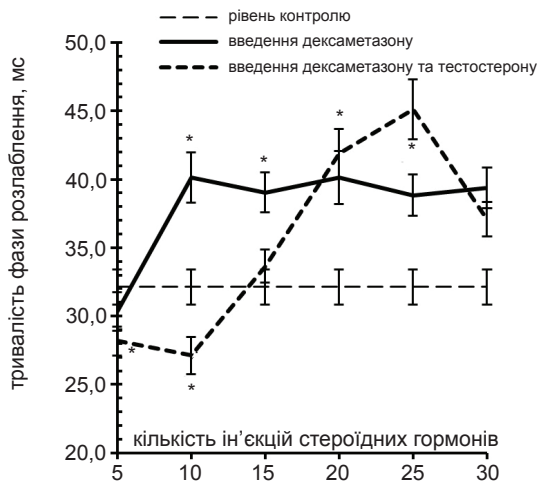
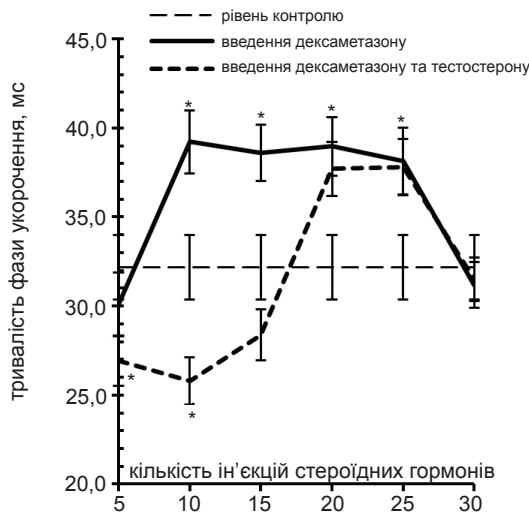
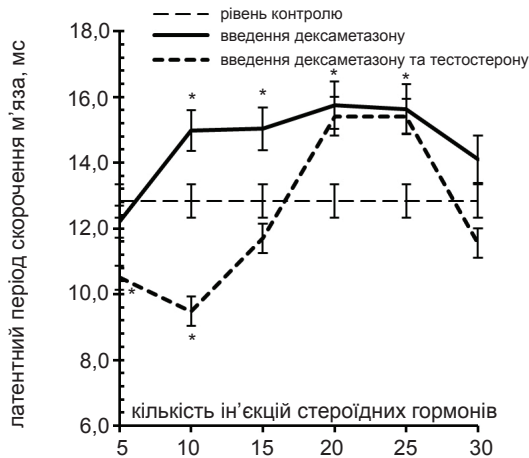
Після 30 ін'єкцій дексаметазону латентний період одиночного скорочення м'яза і тривалість фази скорочення поверталися до рівня контролю, тоді як фаза розслаблення залишалася подовженою відносно контролю ( $P < 0,05$ ; див. рис. 4).

Відзначене подовження фаз одиночного скорочення м'яза після 10–25 ін'єкцій дексаметазону при ізольованому його застосуванні може бути наслідком збільшення питомої частки повільних волокон у ньому у зв'язку із частковою дистрофією й виключенням зі скорочувального акту частини швидких волокон в результаті їх більш високої чутливості до глюкокортикоїдів у порівнянні з повільними [8, 11, 12]. На користь можливого зменшення частки швидких м'язових волокон, які беруть участь у скорочувальному акті, після 10–25 ін'єкцій дексаметазону, застосовуваного ізольовано, свідчить і зменшення амплітуди скорочення, про що обговорювалося вище (див. рис. 3).

Після 30 ін'єкцій дексаметазону у разі ізольованого його застосування відбувалася нормалізація тривалості латентного періоду скорочення та фази вкорочення м'яза (див. рис. 4), а також амплітуди скорочення (див. рис. 3). Це говорить про прагнення до нормалізації гістохімічного профілю м'яза, зумовленого, мабуть, ослабленням протеолізу міофібрилярних і інших м'язових білків у швидких м'язових волокнах і можливою поступовою активацією протеосинтезу в них. Разом з тим фаза розслаблення у тварин, які одержали 30 ін'єкцій дексаметазону, залишається подовженою відносно контролю ( $P < 0,05$ , рис. 4), а тривалість максимальної стійкої працездатності, як уже відзначалося раніше, скороченою (див. рис. 3). І це є важливим свідченням збереження порушень енергетичного забезпечення скорочувального акту, викликаних тривалим введенням дексаметазону в організм.

Таким чином, при ізольованому застосуванні дексаметазону динаміка швидкісних характеристик м'яза, подібно зміні амплітуди його скорочень, мала фазний характер: на початкових етапах спостерігалася їхне погіршення, тоді як після 30 ін'єкцій глюкокортикоїду – нормалізація. Отриманий





факт є ще одним підтвердженням на користь адаптації нервово-м'язових структур до тривалого введення постійної дози синтетичного глюкокортикоїду, що може бути пов'язане як зі зниженням їх чутливості до дексаметазону, так і з прискоренням його інактивації в організмі.

Застосування тестостерону в комплексі з дексаметазоном супроводжувалося певними змінами швидкісних характеристик переднього великогомілкового м'яза, які виявилися відмінними від таких при ізольованому застосуванні дексаметазону. Так, на початкових етапах введення гормональної пари (після 5–10 ін'єкцій дексаметазону в комплексі з тестостероном) анаболічний стероїд зумовлював прискорення одиночного скорочення. Про що свідчить зменшення тривалості латентного періоду скорочення та фази скорочення м'яза у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ; див. рис. 4), тоді як при ізольованому застосуванні дексаметазону тривалість цих фаз після 5 ін'єкцій не відрізнялася від контрольних значень, а після 10 – подовжувалася. На користь прискорювальної дії тестостерону на одиночне скорочення м'яза на початкових етапах введення стероїдної гормональної пари свідчать і результати двовибіркового F-тесту для дисперсій, який виявив статистично вірогідну різницю в латентному періоду скорочення м'яза та фазі вкорочення між групами, що одержали 5–15 ін'єкцій дексаметазону і таку саму кількість ін'єкцій дексаметазону в комплексі з тестостероном ( $P = 0,04$ ). Прискорення одиночного скорочення є одним із доказів можливого збільшення частки швидких м'язових волокон у м'язі за рахунок трансформації оксидативних або проміжних волокон у швидкі під дією тестостерону.

Водночас при подальшому введенні тестостерону

Рис. 4. Характер зміни тривалості періодів одиночного скорочення переднього великогомілкового м'яза зі збільшенням кількості ін'єкцій дексаметазону, застосованого ізольовано та в комплексі з тестостероном. \* Різниця статистично вірогідна ( $P < 0,05$ ) відносно відповідних значень контрольної групи; кожна точка на кривій відображає середнє значення з 10 окремих варіантів

стерону з дексаметазоном (після 20–25 ін'єкцій пари стероїдних препаратів) спостерігалось подовження фаз одиночного скорочення (латентного періоду вкорочення та фази вкорочення,  $P < 0,05$  відносно контролю; див. рис. 4). Це говорить про збільшення питомої частки працюючих повільних волокон м'яза при викликаному його скороченні.

Таким чином, при комплексному застосуванні дексаметазону з тестостероном уже після 15 ін'єкцій пари стероїдних гормонів спочатку підвищені швидкісні характеристики м'яза нормалізувалися, а після 20–25 – знижувалися і не відрізнялися від таких при ізольованому застосуванні дексаметазону. Отриманий факт, мабуть, зумовлений збереженням на тлі введення андрогенного анаболіка деякого катаболічного ефекту дексаметазону на швидкі м'язові волокна, у зв'язку з чим можливе первинне підвищення їх частки під дією тестостерону змінюється частковою дистрофією, індукованою дексаметазоном, і, як наслідок, частковим виключенням зі скорочувального акту, що й спричинює зниження швидкісних характеристик м'яза при тривалому введенні дексаметазону в комплексі з тестостероном.

Після 30 ін'єкцій комбінації стероїдних гормонів, спостерігалась нормалізація швидкісних характеристик переднього великогомілкового м'яза (латентного періоду скорочення, фази вкорочення), крім фази розслаблення, котра залишалася подовженою відносно контролю ( $P < 0,05$ ; див. рис. 4). Нормалізація тривалості латентного періоду скорочення м'яза й фази скорочення побічно свідчать про нормалізацію гістохімічного профілю м'яза, тоді як подовжена фаза розслаблення служить проявом збереження підвищеної стомлюваності м'яза [3].

Підводячи підсумок викладеному, слід зробити висновок, що дексаметазон у разі ізольованого його застосування призводив до зниження швидкості синаптичної передачі (після 15–25 ін'єкцій), погіршення силових (після 5–25 ін'єкцій) і швидкісних (після 10–25 ін'єкцій) характеристик досліджуваного м'яза, котрі прагнули до нормалізації тільки по закінченні 2-місячного періоду його введення. Комплексне застосування дексаметазону

й тестостерону запобігло зниженню швидкості нервово-м'язової передачі та амплітуди скорочення м'яза, викликаному введенням дексаметазону, а на початкових етапах уведення гормональної пари (після 5–10 ін'єкцій) зумовлювало навіть деяке поліпшення його швидкісних характеристик. Разом із тим, уже після 10 ін'єкцій дексаметазону у разі ізольованого його застосування та після 5 ін'єкцій при комплексному його застосуванні з тестостероном спостерігались ознаки підвищеної стомлюваності м'яза, які зберігалися й після 30 ін'єкцій пари стероїдів і проявлялися в скороченні тривалості максимальної стійкої працездатності м'яза.

## ВИСНОВКИ

1. Тестостерон у комплексі з дексаметазоном запобігає зниженню максимальної амплітуди скорочення м'яза та подовженню латентного періоду його збудження, викликаних уведенням дексаметазону.

2. На початкових етапах уведення гормональної пари «дексаметазон і тестостерон» (після 5–10 ін'єкцій) анаболічний стероїд зумовлював поліпшення швидкісних характеристик м'яза, тоді як надалі (після 15–25 ін'єкцій) спостерігалось їхнє погіршення, яке було й після 10–25 ін'єкцій дексаметазону у разі ізольованого його застосування. Після 30 ін'єкцій дексаметазону, застосовуваного, як ізольовано, так і в комбінації з тестостероном, відзначалась нормалізація швидкісних характеристик переднього великогомілкового м'яза.

3. Тестостерон у комбінації з дексаметазоном не згладжував негативний вплив дексаметазону на стійкість м'яза до розвитку стомлення, що проявлялося в скороченні періоду максимальної стійкої його працездатності й подовженні фази розслаблення.

**В.В. Труш, В.И. Соболев**

## МОДУЛЯЦИЯ ТЕСТОСТЕРОНОМ ЭФФЕКТОВ ДЕКСАМЕТАЗОНА В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ У КРЫС

В експериментах на молодых белых крысах-самках с помощью методов электромиографии и эргографии ис-

следовали эффективность пропionato тестостерона для сглаживания негативных эффектов дексаметазона на скелетную мышцу. Установлено, что хроническое введение дексаметазона вызвало снижение амплитуды сокращения передней большеберцовой мышцы на 29,7–59,3 % (после 5–25 инъекций) и удлинение латентного периода возбуждения мышцы на 18,5–16,5 % (после 15–25 инъекций), тогда как комплексное применение тестостерона и дексаметазона предотвратило изменение этих показателей. Вместе с тем тестостерон не обеспечил сглаживания негативного влияния дексаметазона на устойчивость мышцы к развитию утомления.

Ключевые слова: дексаметазон, тестостерон, скелетная мышца, одиночное сокращение мышцы.

**V.V. Trush, V.I. Sobolev**

### **MODULATION OF THE EFFECTS OF DEXAMETHASONE IN RAT SKELETAL MUSCLE BY TESTOSTERONE**

In experiments on young females white rats by means of methods of electromyography and ergography we investigated the efficiency of a testosterone-propionate for smoothing of negative effects of dexamethasone on skeletal muscle. It has been established that the chronic injection of dexamethasone causes the decreasing of amplitude of contraction of forward tibial muscle on 29,7-59,3% (after 5-25 injections) and the lengthening of the latent period of muscle's excitation on 18,5-16,5% (after 15-25 injections), whereas the complex application of testosterone and dexamethasone prevents the changing of these parameters. At the same time testosterone didn't provide the smoothing of negative influence of dexamethasone on muscle's resistance to fatigue development.

Key words: dexamethasone, testosterone, skeletal muscle, solitary muscle's contraction.

*Donetsk National University*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Гиниатуллин А.Р., Гришин С.Н., Гиниатуллин Р.А. Влияние гидрокортизона на модулирующие эффекты пуринов в нервно-мышечном соединении // Рос. фи-

зиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2000. – **86**, №10. – С. 1293–1299.

2. Дзамуков Р.А., Валиуллин В.В. Ответ скелетных мышц на анаболический стероид индивидуален и не зависит от режима двигательной активности // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1999. – №8. – С. 406–408.
3. Мак-Комас А.Дж. Скелетные мышцы (строение и функции). – К.: Олимп. лит-ра, 2001. – 406 с.
4. Темин П.А., Герасимова О.И. Стероидные миопатии: Обзор // Журн. невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1980. – №11. – С. 1734–1737.
5. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы: пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 656 с.
6. Яковлев Н.Н., Макарова Т.Н. Обзор: функциональная и метаболическая дифференциация волокон скелетных мышц // Физиол. журн. СССР им И.М. Сеченова. – 1980. – №8. – С. 1129–1144.
7. Bouzat C., Bouzat C., Barrantes F.J. Assigning function to residues in the acetylcholine receptor channel region // Mol. Membr. Biol. – 1997. – №14. – P. 167–177.
8. Bowes S.B., Jackson N.C., Papachristodoulou D. Effect of corticosterone on protein degradation in isolated rat soleus and extensor digitorum longus muscles // J. Endocrinol. – 1996. – №3. – P. 501–507.
9. Cheema I.R., Wadley A.M., Prospere V. Comparison of the effect of acute and chronic glucocorticoid excess on protein synthesis in rat skeletal muscles of different fibre composition // Biomed. Lett. – 1994. – №196. – P. 303–310.
10. Kaasik P., Seene T., Umnova M. The mechanism of action of glucocorticoids in the rat skeletal muscle // Balt. J. Lab. Anim. Sci. – 2000. – №3–4. – P. 185–193.
11. Riso E.M. The effect of glucocorticoid myopathy, unloading and reloading on the skeletal muscle contractile apparatus and extracellular matrix // Dis. PhD of Exercise and Sport Sci.: 10.12.07. – Tartu, Estonia, 2007. – 114 p.
12. Savary I. / I. Savary, E. Debras, D. Dardevet. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats // Brit. J. Nutr. – 1998. – №3. – P. 297–304.
13. Sinha-Hikim I., Roth S.M. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men // Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2003. – **285** (Jul., 1). – P. E197–E205.

*Донецьк. нац. ун-т*  
E-mail: ver.trush@yandex.ru

*Матеріал надійшов до редакції 03.02.2012*

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

## Зв'язок між м'язовою активністю та кінематикою нижньої кінцівки в повільних рухах присідання людини

*Присідання може виконуватися за гомілковостопною стратегією, коли більше згинається гомілковостопний суглоб, ніж кульшовий, та кульшовою, коли більші зміни відбуваються в кульшовому суглобі. У п'яти здорових чоловіків вивчали зв'язок між змінами суглобних кутів та показниками електроміограми (ЕМГ) м'язів ноги при гомілковостопній та кульшовій стратегіях присідання при повільній зміні кута в колінному суглобі на 40 та 60°. Встановлено, що при гомілковостопній стратегії першими активувалися м'язи гомілки, випереджаючи зміни суглобних кутів та зміщення центру тиску (ЦТ) на стабілографічну платформу, тоді як активація м'язів стегна починалась одночасно зі зміною суглобних кутів, демонструючи чітку адаптацію в послідовних рухових спробах і лінійний зв'язок між статичним компонентом ЕМГ та змінами кута в гомілковостопному суглобі. При кульшовій стратегії присідання м'язи стегна активувалися одночасно зі зміною в суглобних кутах і зміщенням ЦТ, тоді як м'язи гомілки активувались пізніше ніж м'язи стегна, особливо передній великогомілковий м'яз, демонструючи певну адаптацію в послідовних реалізаціях. За амплітудою ЕМГ у разі гомілковостопної стратегії переважали м'язи стегна, відтворюючи контур змін суглобних кутів, тоді як м'язи гомілки активувалися тільки при змінах суглобних кутів. У разі кульшової стратегії за амплітудою ЕМГ домінував передній великогомілковий м'яз, який активувався при русі тулуба вниз та фіксації суглобних кутів, що супроводжувалася незначною коактивацією литкового м'яза при східцеподібних змінах зростання амплітуди ЕМГ м'язів стегна. Вибір м'язів ноги для початку присідання за обома стратегіями відбувався без певної закономірності, що може вказувати на існування широкого набору варіантів м'язової активності в межах однієї стратегії. Ключові слова: біомеханіка, присідання, нижня кінцівка, суглобні кути, електроміограма.*

### ВСТУП

Розуміння співвідношення біомеханіки скелета та відповідної активності ЦНС у вигляді електроміограм м'язів при виконанні рухів залишається одним з важливих наукових завдань [1]. Його складність зумовлена тим, що в реальному житті рухові акти відбуваються за участю численних сегментів тіла, що призводить до змін в кутах багатьох суглобів. Присідання є одним з багатосуглобних рухів, які часто виконуються в повсякденному житті як невід'ємна складова переходу людини від вертикального стояння до сидіння. Крім того, присідання як фізична вправа широко використовується в спорті та фітнесі, для роз-

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

витку м'язів нижньої половини тіла, а також як ефективний засіб для завдань реабілітації та фізичної терапії [10, 18, 21]. При виконанні присідання, як і кожного руху, відбувається координація цілеспрямованого довільного компонента руху та його постурального коригування [1, 5] внаслідок випереджального мимовільного компонента руху, який забезпечує рівновагу тіла і підґрунтя для виконання довільного компонента руху [4, 15].

Незважаючи на численні дослідження присідання, деякі аспекти цього багатосуглобного руху залишаються суперечливими або нез'ясованими [9, 10, 18, 21]. У нашій попередній роботі [3] встановлений зв'язок між постуральним компонентом присідання

у вигляді зміщення центру тиску (ЦТ) на стабілографічну платформу та цілеспрямованим компонентом руху у вигляді змін кутів в гомілковостопному та кульшовому суглобах нижньої кінцівки.

Мета цієї роботи – з'ясувати організацію пострурального та цілеспрямованого компонентів присідання за допомогою вивчення зв'язку між показниками електроміограми (ЕМГ) м'язів ноги людини та змінами в кутах гомілковостопного та кульшового суглобів, а також зміщенням ЦТ на стабілографічну платформу при повільному присіданні з відстеженням динаміки кута в колінному суглобі.

## МЕТОДИКА

В обстеженні брали участь 5 чоловіків-добровольців віком  $41,8 \pm 6,0$  років, зростом  $178,2 \pm 2,8$  см, масою  $75,8 \pm 3,1$  кг, дані яких щодо зміщення ЦТ на стабілографічну платформу та змін суглобних кутів нижніх кінцівок були представлені в нашій попередній роботі [3], в якій детально описано методику вивчення вказаних показників та їх обробку. Тому в цій роботі наведено короткий опис тільки тих процедур, які необхідні для розуміння протоколу дослідження, а також пов'язані з реєстрацією ЕМГ. Під час експерименту обстеженим треба було вертикально стояти, впираючись обома ступнями на стабілографічну платформу та виконувати довільні рухи присідання, відслідковуючи зміни кута в колінному суглобі. Тестовий сигнал, за яким особа виконувала рухи, був у вигляді рівнобічної трапеції, більша основа якої відповідала загальній тривалості руху, а менша дорівнювала тривалості фіксації суглобних кутів при присіданні (8–10 с). Боки трапеції задавали траєкторію змін суглобних кутів, тривалість яких була 2 с. Для самоконтролю вертикальності положення тіла в просторі, як у роботі Діонісіо та співавт. [7], перед обстеженим на відстані 1 м стояла вертикальна штанга та передбачалося, що у

вихідному стані і під час присідання відстань між головою обстежуваного та штангою була однаковою. Три особи виконували рухи присідання за гомілковостопною стратегією, утримуючи тулуб у вертикальному положенні, один обстежений присідав за кульшовою стратегією, утримуючи тулуб вертикально, і ще одна особа використовувала цю саму стратегією рухів, але для дотримання рівноваги нахиллялася вперед. ЕМГ-активність реєстрували з використанням поверхневих електродів ("Biopac System EL503", США) від п'яти м'язів ноги: переднього великогомілкового м'яза – *m. tibialis anterior (m. t. a.)*, латеральної голівки литкового м'яза – *caput lateralis m. gastrocnemius (m. g. l.)*, медіальної голівки литкового м'яза – *caput medialis m. gastrocnemius (m. g. m.)*, прямого м'яза стегна – *m. rectus femoris (m. r. f.)*, широкого латерального м'яза стегна – *m. vastus lateralis (m. v. l.)* та двоголового м'яза стегна – *m. biceps femoris (m. b. f.)*.

Смуга пропускання підсилювача була в межах 0,1–1000 Гц. Присідання повторювали по 10 разів у серіях при змінах кута в колінному суглобі на 40 та 60°. Сигнали гоніометричних датчиків, стабілографа та ЕМГ після відповідного підсилення вводили на жорсткий диск комп'ютера для подальшого аналізу. Аналогово-цифрове перетворення відбувалося за допомогою пристрою РСІ 6071Е ("National Instruments", США), при цьому частота дискретизації сигналів становила 2000 с<sup>-1</sup>. Для цифрової фільтрації використовували низькочастотний фільтр Баттерворта четвертого порядку з частотою зрізу 15 Гц. В режимі off-line виготовлені нами програми виконували низькочастотну фільтрацію запам'ятовуваних сигналів. Сигнали ЕМГ перед фільтрацією додатково піддавали двонапівперіодному випрямленню. Всі оброблені таким чином сигнали усереднювали за записами усієї серії. Отримані результати аналізу ЕМГ м'язів нижньої кінцівки оцінювали з використанням програми Origin 7 і представляли у вигляді середніх значень



та їх похибки. Для характеристики ЕМГ м'язів ноги в різні часові періоди присідання визначали динамічні і статичний компоненти м'язової активності. Динамічний компонент ЕМГ збігався в часі зі зміною в розташуванні сегментів тіла під час присідання як при русі тулуба вниз, так і вгору, а статичний компонент ЕМГ характеризував м'язову активність при фіксації суглобних кутів після руху тулуба вниз і після повернення до вертикального положення після закінчення присідання. Статичний компонент ЕМГ дорівнював різниці між значеннями амплітуди ЕМГ при утриманні суглобного кута після руху тулуба вниз (або у вертикальному положенні після закінчення

вставання) та у вихідному стані. Динамічний компонент визначався як середнє значення ЕМГ на етапі вставання/присідання. Достовірність відмінностей між середніми значеннями різних компонентів ЕМГ м'язів ноги визначали за допомогою парного двовибіркового критерію *t* Стьюдента для середніх при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 наведені усереднені результати змін суглобних кутів, зміщення ЦТ та ЕМГ м'язів ноги при повільному присіданні зі зміною кута в колінному суглобі на  $40^\circ$  у двох чоловіків, один з яких виконував присідання

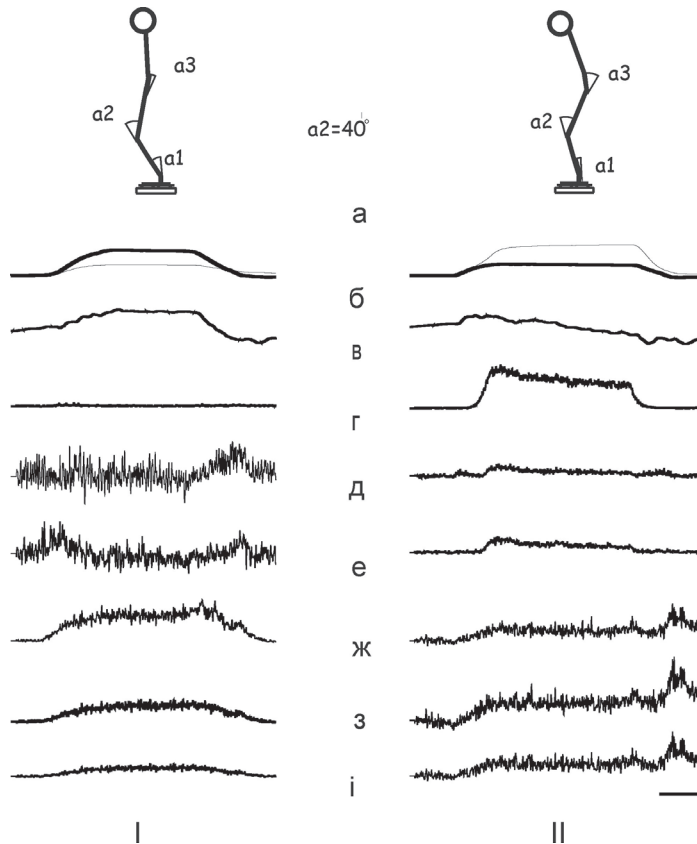


Рис. 1 Відмінності в електроміограмах (ЕМГ) м'язів ноги та зміщеннях центру тиску на стабілографічну платформу у двох осіб, які виконували повільне присідання при зміні кута в колінному суглобі на  $40^\circ$  ( $\alpha_2 = 40^\circ$ ) за гомілковостопною (I) та кульшовою (II) стратегіями. а – зміни кутів у гомілковостопному ( $\alpha_1$ ), колінному ( $\alpha_2$ ) та кульшовому ( $\alpha_3$ ) суглобах, б – гоніограми гомілковостопного (товста лінія) і кульшового (тонка лінія) суглобів, в – стабілограми в сагітальній площині, г – ЕМГ m. t. a., д – ЕМГ m. g. m., е – ЕМГ m. g. l., ж – ЕМГ m. r. f., з – ЕМГ m. v. l., і – ЕМГ m. b. f. Калібрівка часу – 2 с. Калібрівка амплітуди: гоніограм –  $40^\circ$ , стабілограми – 4 мм. Калібрівка амплітуди ЕМГ м'язів в мікрвольтах – м. t. a. – 200, м. g. l., m. g. m., m. v. l., m. r. f., m. v. l. та m. b. f. – 100. Кожна крива була результатом усереднення 10 реалізацій

за гомілковостопною стратегією (I), а інший (II) – за кульшовою. У особи, яка присідала за гомілковостопною стратегією (див. рис. 1, I), першим активувався м. g. l., випереджаючи на 150 мс як зміни в суглобних кутах, так і зміщення ЦТ та початок ЕМГ м’язів стегна. Амплітуда ЕМГ м. g. m. та м. t. a. не перевищувала 20–40 мкВ і була в 2–7 разів менше, ніж амплітуда ЕМГ м. g. l. Часовий перебіг форми ЕМГ м’язів стегна відтворював зміни в суглобних кутах нижньої кінцівки.

У особи, яка виконувала повільне присідання за кульшовою стратегією (див. рис. 1, II), м’язи стегна активувалися одночасно зі змінами в суглобних кутах. ЦТ зміщувався на 100 мс

раніше ніж початок активації зазначених м’язів та змін суглобних кутів. М’язи гомілки активувалися пізніше м’язів стегна з затримкою 600 мс для м. t. a. та 1000 мс – для м. g. m. і м. g. l. Форма ЕМГ м’язів гомілки була подібною до контура змін суглобних кутів, тоді як у м’язів стегна відбувалося східцеподібне зростання амплітуди ЕМГ протягом руху тулуба вниз, а потім вверх. Амплітуда ЕМГ м. t. a. сягала 220 мкВ і була найбільшою серед відповідних значень усіх досліджених м’язів.

Показники динамічних та статичних складових ЕМГ м’язів ноги виявили значні відмінності у двох зазначених осіб (рис. 2). Так, у разі виконання рухів за гомілко-

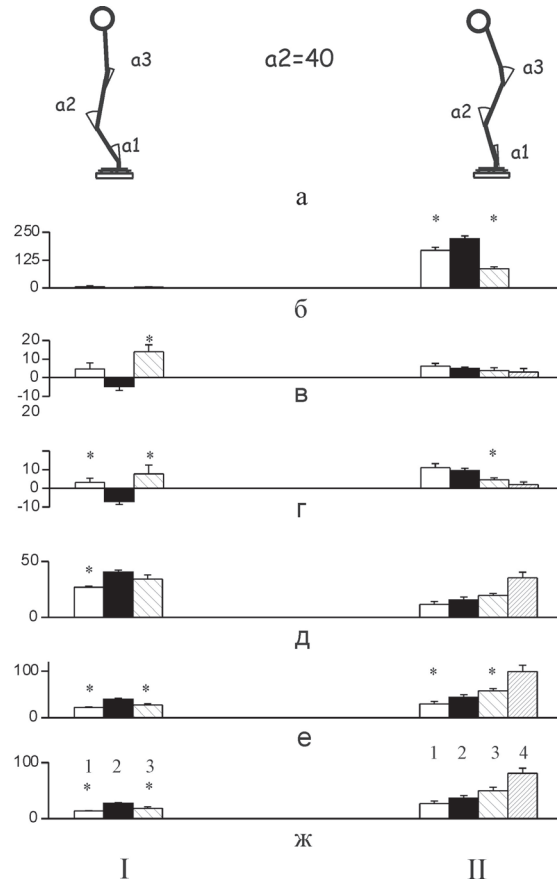


Рис. 2. Середні значення та їх похибки для амплітуди динамічних і статичних компонентів електроміограм (ЕМГ) м’язів ноги у двох осіб при виконанні повільного присідання за гомілковостопною (I) та кульшовою (II) стратегіями при зміні кута в колінному суглобі на 40°. а – зміни кутів у гомілковостопному ( $\alpha_1$ ), колінному ( $\alpha_2$ ) та кульшовому ( $\alpha_3$ ) суглобах, б – м. t. a., в – м. g. m., г – м. g. l., д – м. r. f., е – м. v. l., ж – м. b. f. 1 – динамічний компонент при русі тулуба вниз, 2 – статичний компонент у положенні присівши, 3 – динамічний компонент при вставанні, 4 – статичний компонент у вертикальному положенні після вставання. Зірочками позначені ті динамічні компоненти ЕМГ, амплітуди яких були достовірно відмінні від амплітуд відповідних статичних компонентів у положенні присівши

востопною стратегією т. т. а. був найменш активним порівняно з іншими м'язами нижньої кінцівки (див. рис. 2, I, а), тоді як при присідання за кульшовою стратегією він був найбільш активним (див. рис. 2, I, б). Амплітуди динамічних та статичного компонентів ЕМГ цього м'яза достовірно не відрізнялися, коли обстежуваний здійснював рухи за гомілковостопною стратегією, але у іншої особи, яка виконувала рухи за кульшовою стратегією, різниця між цими величинами була статистично значущою ( $P < 0,01$ ). Можливо, значне збільшення амплітуди ЕМГ т. т. а. в останньому випадку було потрібне для забезпечення рівноваги внаслідок зміщення ЦТ назад за допомогою відносно постійної дорзофлексії стопи.

Відмінності в ЕМГ литкового м'яза також спостерігалися при різних стратегіях присідання. У особи, яка присідала за гомілковостопною стратегією (див. рис. 2, I, в, г), динамічні і статичний компоненти обох голівок литкового м'яза були різноспрямовані, відображаючи скорочення цих м'язів як при рухах тулуба вниз, так і вгору та їх розслаблення при утриманні тіла в положенні фіксації суглобних кутів після руху тулуба вниз. Достовірні відмінності між амплітудами статичного і динамічних компонентів встановлені як при присіданні, так і вставанні для т. г. l., а для т. г. m. – тільки для амплітуди динамічного компонента під час вставання порівняно з амплітудою статичного компонента ( $P < 0,01$ ). Вірогідно значущих відмінностей між амплітудами динамічних компонентів при присіданні та вставанні не встановлено.

У разі присідання за кульшовою стратегією (див. рис. 2, II, в, г) ЕМГ обох голівок литкового м'яза збільшувалася при виконанні рухового завдання, виявляючи достовірні відмінності тільки для т. г. l. між амплітудами динамічних компонентів при присіданні і вставанні ( $P < 0,05$ ), а також статичних компонентів в положенні присівши і після повернення до вихідного стану ( $P < 0,01$ ) та

між динамічним та статичним компонентам у положенні фіксації суглобних кутів після руху тулуба вниз ( $P < 0,01$ ).

Характерною ознакою ЕМГ м'язів стегна у особи, яка присідала за гомілковостопною стратегією (див. рис. 2, I, д–ж), були достовірно менші значення амплітуд динамічних компонентів порівняно зі статичним компонентом ЕМГ відповідного м'яза, за винятком т. г. f., для якого такі співвідношення встановлені тільки між амплітудами статичного та динамічного компонента ЕМГ при русі тулуба вниз. Середні значення динамічних і статичних компонентів т. б. f. були в 1,5–2 рази меншими від відповідних значень ЕМГ т. в. l. та т. г. f. Це відповідає даним літератури, що при присіданні в м'язах задньої частини стегна необхідна відносна невелика активність для балансу переднього зсувного зусилля, яке діяло на проксимальну частину великої гомілкової кістки і запобігало значному згинанню стегна та збільшувало стабільність колінного суглоба [6, 16]. За даними Айсіара та співавт. така активність була в межах 4–12 % [14] від рівня максимального довільного скорочення для м'язів задньої частини стегна, тоді як для м'язів передньої частини стегна ці величини були значно більшими і становили 21–63 %.

При кульшовій стратегії ЕМГ м'язів стегна збільшувалась східцеподібно під час присідання та при поверненні до вертикального положення після вставання (див. рис. 2, II, д–ж). Амплітуда статичного компонента в цей час утричі та більше перевищувала амплітуду динамічного компонента при русі тулуба вниз ( $P < 0,01$ ). Достовірні відмінності між амплітудами статичного компонента і динамічними компонентами ЕМГ при рухах тулуба вниз і вгору встановлені тільки для т. в. l. та т. г. f. Статистично значуща різниця встановлена між усіма тими “східцями” ЕМГ, тобто амплітудами динамічних компонентів при присіданні та вставанні ( $P < 0,05$ ), а також між статичними компонентами при присіданні і після закінчення вставання ( $P < 0,005$ ) та

між динамічним компонентом при вставанні і статичним компонентом після закінчення вставання ( $P < 0,01$ ). Подібні відмінності амплітуди динамічних і статичних компонентів ЕМГ м'язів стегна встановлені і для іншої особи, яка виконувала рухи за кульшовою стратегією.

Різниця м'язової активності при двох стратегіях присідання підтверджується аналізом динаміки компонента ЕМГ м'язів ноги в послідовних реалізаціях у двох раніше розглянутих осіб (рис. 3, I, II). Встановлено, що чіткі зміни м'язової активності в послідовних рухах присідання виявлені тільки для статичного компонента ЕМГ м'язів стегна

або гомілки в положенні фіксації суглобних кутів при присіданні залежно від стратегії виконання рухів. Відомо, що гомілковостопна стратегія є оптимальною для підтримання вертикальності тулуба, що забезпечується активацією спочатку м'язів гомілки, а потім стегна [12, 13]. Саме м'язи стегна демонстрували в наших дослідах найбільшу активність при гомілковостопній стратегії, зменшуючи закономірно свою активність від першої до останньої реалізації (див. рис. 3, I, г–е) і, можливо, виконуючи постуральну корекцію присідання. Водночас амплітуда ЕМГ м'язів гомілки змінювалася без певного порядку і різноспрямованно (див. рис. 3, I, а), можли-

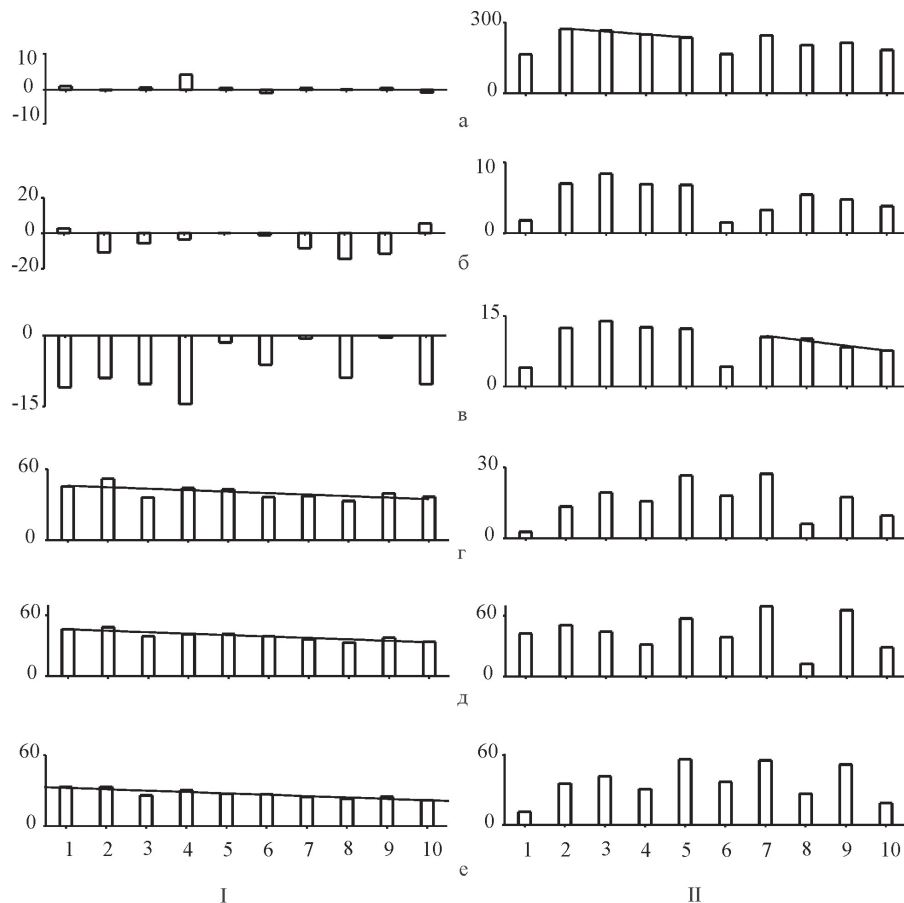


Рис. 3. Адаптація статичного компонента електроміограм (ЕМГ) м'язів стегна та гомілки в положенні присівши у двох осіб, які виконували повільне присідання за гомілковостопною (I) та кульшовою (II) стратегіями при зміні кута в колінному суглобі на  $40^\circ$ , у вигляді стовпчикових діаграм амплітуди статичного компонента ЕМГ м'язів ноги в послідовних реалізаціях рухів. За віссю абсцис – номер реалізації, за віссю ординат – амплітуда ЕМГ в мікрвольтах – а – т. т. а., б – т. г. т., в – т. г. l., г – т. г. f., д – т. v. l., е – т. b. f. Прямі лінії на графіках вказують на лінійний зв'язок між значеннями, коли коефіцієнт кореляції був статистично значущий ( $P < 0,05$ )

во, забезпечуючи тільки початок довільного руху присідання через розмикання колінного суглоба. Динамічний компонент ЕМГ м'язів гомілки при русі тулуба вниз в послідовних реалізаціях виникав без певної закономірності, як і статичний компонент відповідних м'язів. За даними інших авторів [8, 11, 12], існує багато комбінацій м'язової активності в межах однієї стратегії виконання рухів, що відповідає довільному способу початку виконання присідання.

При кульшовій стратегії присідання встановлено, що тенденція до зниження м'язової активності в послідовних рухах (з другого до десятого) присідання виявлена тільки для статичного компонента ЕМГ при присіданні у м'язів гомілки (див. рис. 3, II, а–в), тоді як для м'язів стегна такої тенденції не спостерігали (див. рис. 3, II, г–е). Слід зазначити, що в разі виконання рухів за гомілковостопною стратегією варіабельність статичного компонента м'язів стегна (коефіцієнт варіації  $< 0,14$ ) була меншою, ніж у м'язів гомілки (коефіцієнт варіації становив  $0,67-2,5$ ); тоді як при кульшовій стратегії присідання варіабельність зазначеного показника для м'язів стегна була більшою (коефіцієнт варіації був у межах  $0,41-0,51$ ) порівняно з м'язами гомілки (коефіцієнт варіації складав  $0,1-0,37$ ). Зменшення статичного компонента ЕМГ у *m. t. a* (див. рис. 3, II, а) під час виконання послідовних присідань була у вигляді лінійного зниження цього показника в 2–5-й реалізаціях, а з 7 по 10 реалізацію така тенденція була близькою до лінійної ( $R=-0,88$ ,  $P=0,11$ ). Закономірне зниження статичного компонента ЕМГ *m. g. l.* було в 7–10-й реалізаціях, а в 3–5-й – для обох голівок цього м'яза його зменшення було близьким до лінійного.

Відомо, що гравітаційний момент відносно гомілковостопного суглоба маси тіла при вертикальному положенні тулуба лінійно зв'язаний з синусом кута згинання у гомілковостопному суглобі [19, 22]. Можливо, що моменти сил, які виникають при присідання внаслідок скорочення м'язів ноги компенсу-

ють такі гравітаційні моменти сил і тим самим забезпечують рівновагу тіла. При гомілковостопній стратегії присідання найбільш причетними до забезпечення постурального контролю можуть бути м'язи стегна. На користь цього міркування свідчить наявність лінійного зв'язку між значеннями статичного компонента ЕМГ *m. v. l.* і *m. b. f.* і кутом згинання в гомілковостопному суглобі (рис. 4, I). Така залежність встановлена і для інших двох осіб, які виконували тестові завдання за гомілковостопною стратегією. При кульшовій стратегії присідання не встановлено лінійної залежності між значеннями статичного компонента м'язів ноги в положенні фіксації суглобних кутів при присіданні та кутом згинання в гомілковостопному суглобі (див. рис. 4, II).

У однієї особи при великій глибині присідання, коли кут у колінному суглобі змінювався на  $60^\circ$ , окремі реалізації мали ознаки, характерні для гомілковостопної стратегії, а інші – для кульшової (рис. 5). Так, в одній із спроб подібно до гомілковостопної стратегії ЦТ зміщувався вперед (див. рис. 5, I, а), хоча кут згинання в гомілковостопному суглобі ( $29^\circ$ ) був практично таким самим, як і в кульшовому ( $31^\circ$ ). В інших реалізаціях, одна з яких наведена на рис. 5, II, простежувалися властивості, характерні для присідань, які виконуються за кульшовою стратегією. Так, кут згинання в кульшовому суглобі ( $48^\circ$ ) був майже вдвічі більшим в порівнянні з кутом згинання в гомілковостопному суглобі ( $25^\circ$ ), а ЦТ зміщався назад при значному збільшенні амплітуди ЕМГ *m. t. a.* під час руха тулуба вниз та фіксації суглобних кутів. В обох спробах активація м'язів стегна і обох голівок литкового м'яза була приблизно однаковою та розпочиналась одночасно, тоді як збільшення амплітуди ЕМГ *m. t. a.* виникало пізніше від усіх м'язів, хоча за величиною вона була найбільшою. Наведений приклад свідчить про те, що організація м'язової активності в рухах присідання може одночасно складатися з елементів гомілковостопної та кульшової стратегій.



Однак у інших чотирьох осіб при великій глибині присідання зі зміною кута в колінному суглобі на  $60^\circ$  практично всі реалізації виконувались однаково в залежності від обраної стратегії виконання рухів. При цій глибині присідання чітко виявлялися характерні ознаки в організації повільних рухів відповідно до двох розглянутих стратегій (рис. 6). Так, для гомілковостопної стратегії присідань можна вважати типовими зміщення ЦТ вперед, більше згинання в гомілковостопному суглобі в порівнянні з кульшовим, не-

значна активація м'язів гомілки при значно більшому збільшенні амплітуди ЕМГ м'язів стегна (див. рис. 6, I). Кульшова стратегія виконання повільних присідань характеризується зміщенням ЦТ назад, більшими змінами в кульшовому суглобі в порівнянні з гомілковостопним, потужною активацією *m. t. a.* та східцеподібними змінами амплітуди ЕМГ м'язів стегна (див. рис. 6, II).

Літературні дані [9, 10, 20, 21] та результати наших досліджень щодо співвідношення кінематичних і електроміографічних

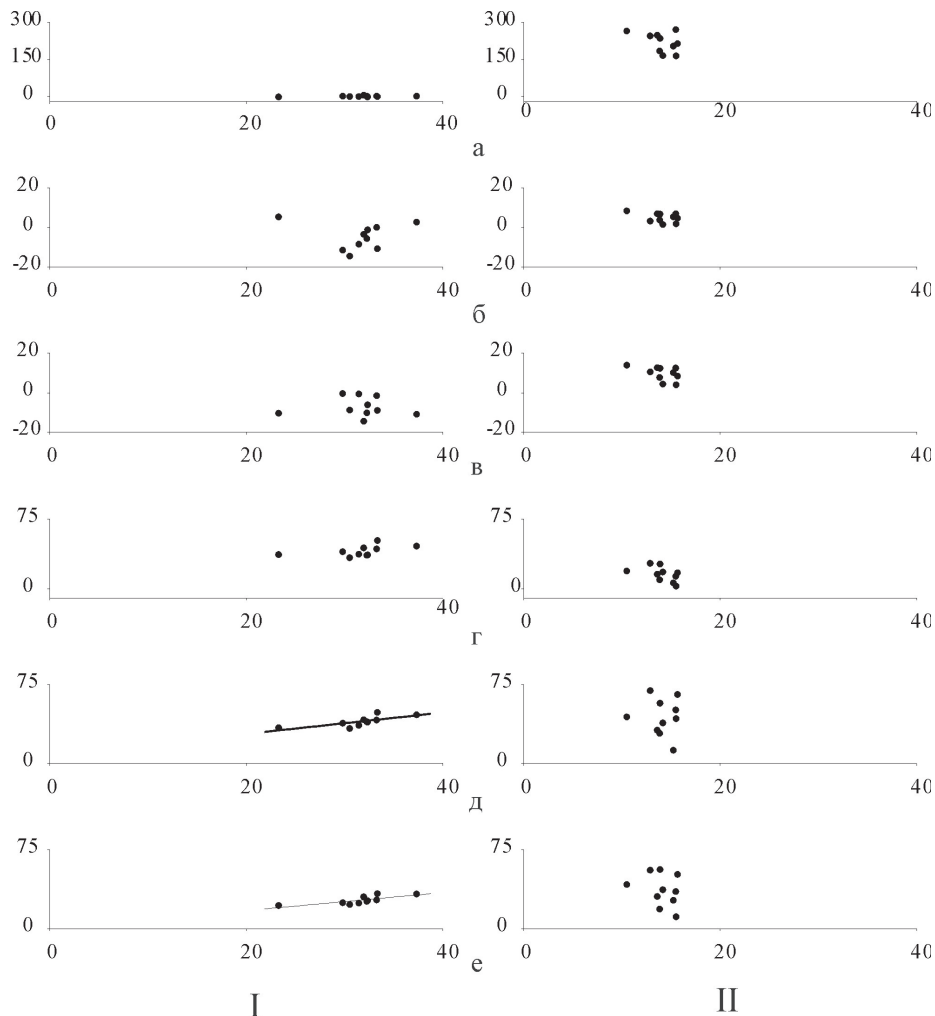


Рис. 4. Співвідношення амплітуди статичного компонента електроміограми (ЕМГ) в положенні присівши м'язів ноги та змін кута в гомілковостопному суглобі у двох осіб, які виконували присідання за гомілковостопною (I) та кульшовою (II) стратегіями. За віссю абсцис – зміни кута в гомілковостопному суглобі в градусах, за віссю ординат – амплітуда ЕМГ в мікрівольтах – а – *m. t. a.*, б – *m. g. m.*, в – *m. g. l.*, г – *m. g. f.*, д – *m. v. l.*, е – *m. g. f.* Прямі лінії на графіках вказують на лінійний зв'язок між значеннями, коли коефіцієнт кореляції був статистично значущий ( $P < 0,05$ )

показників нижньої кінцівки при присіданні вказують на таку організацію м'язової активності при виконанні вказаних рухів. У разі гомілковостопної стратегії присідання м'язи гомілки ініціюють рух тулуба вниз, збільшуючи в 2–5 разів свою активність відносно вихідного рівня при змінах суглобових кутів. У разі їх фіксації в положенні напочіпки литковий м'яз розслабляється, або як і т. а. демонструє незначну активність, подібну до вихідного стану. Це відповідає даним літератури, що у разі виконання рухів за гомілковостопною стратегією підтримання рівноваги в вертикальному положенні під час перебування на опорі, що рухається, м'язи стегна відіграють вирішальну роль, а м'язи

гомілки виявляють незначну активність [12, 13]. За нашими результатами, м'язи стегна генерують таку ЕМГ, форма якої з одного боку подібна до траєкторії заданого руху, а з іншого – забезпечує постуральне коригування руху тіла навколо осі гомілковостопного суглоба у разі присідання. Така корекція відбувається за рахунок статичного компонента ЕМГ стегнових м'язів у положенні фіксації суглобних кутів, який пропорційний змінам кута в гомілковостопному суглобі, що призводить до генерації моментів сил, які необхідні для підтримання рівноваги тіла внаслідок зміщення ЦТ вперед. Таке міркування відповідає існуючим уявленням, що моменти сил в гомілковостопному суглобі пропорційні

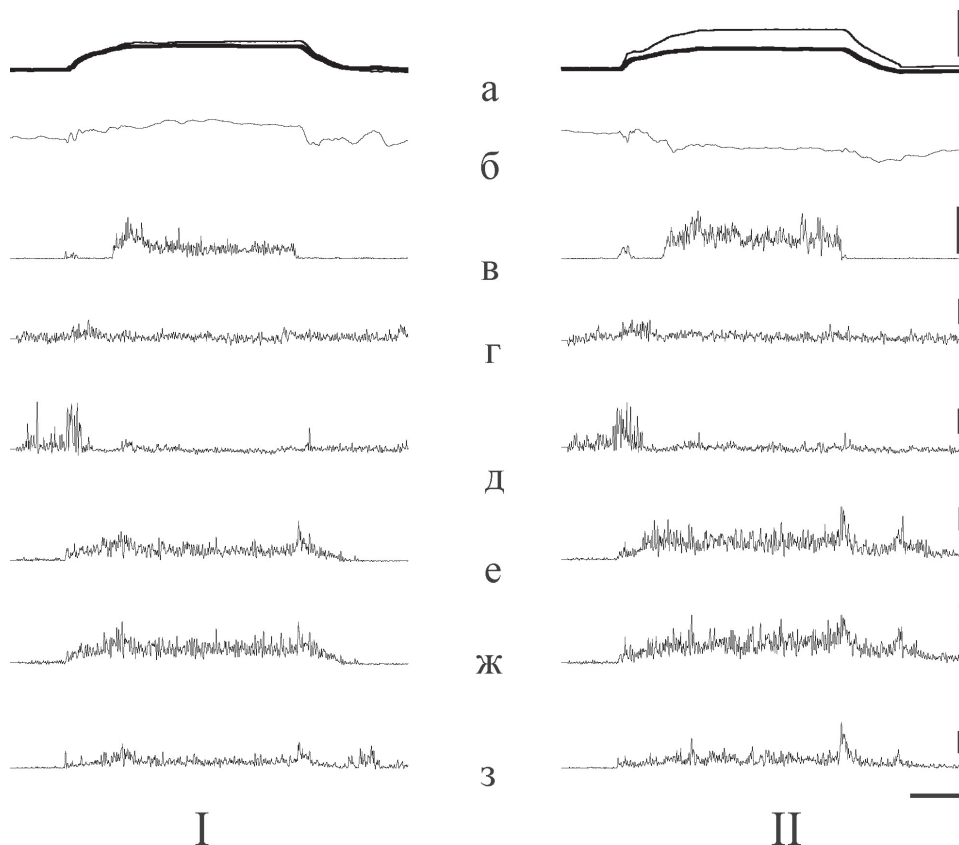


Рис. 5. Різниця в рисунках електроміограм (ЕМГ) м'язів ноги в двох різних спробах у однієї особи, яка повільно присідала зі зміною кута в колінному суглобі на  $60^\circ$ , використовуючи гомілковостопну (I) і кульшову (II) стратегії. а – гоніограми гомілковостопного (товста лінія) і кульшового (тонка лінія) суглобів, б – стабілограма в сагітальній площині, в – ЕМГ м. т. а., г – ЕМГ м. г. м., д – ЕМГ м. г. л., е – ЕМГ м. р. ф., ж – ЕМГ м. в. л., з – ЕМГ м. б. ф. Калібровка амплітуди: гоніограм –  $20^\circ$ , стабілограм – 4 мм, ЕМГ м'язів в мікрвольтах – м. т. а. – 500, м. г. л. та м. г. м. – 50, м. в. л. та м. б. ф. – 100. Калібровка часу – 2 с

невеликому куту згинання [19, 21]. Водночас можливо, що жорсткість гомілковостопного суглоба у разі присідання за гомілковостопною стратегією, забезпечується переважно властивостями самого суглоба за рахунок еластичності стопи та ахілового сухожилля [17] при певній участі м'язів гомілки.

При кульшовій стратегії ініціація руху присідання забезпечується м'язами стегна, ЕМГ яких східцеподібно змінюються від початку руху тулуба вниз і до повернення в звичайне положення. Вибір м'язів для ініціації руху як при кульшовій, так і при гомілковостопній стратегії відбувається без певної закономірності, ще може бути на-

слідком того, що у формуванні рухів в разі присідання беруть участь крім досліджених м'язів стегна також інші м'язи ноги та тазу, нижньої половини тулуба та спини [2, 9, 18].

Відхилення ЦТ назад, яке спостерігається у разі кульшової стратегії виконання рухів, компенсується потужною активацією *m. t. a.* Вона є найбільшою серед інших досліджених м'язів ноги, це призводило до стійкої фіксації стопи в положенні невеликої дорзофлексії. Згинання гомілковостопного суглоба на  $10\text{--}30^\circ$  забезпечує відносно вертикальне положення гомілки та виконання руху за допомогою значних змін кута в кульшовому суглобі. Це пояснює східцеподібні зміни ак-

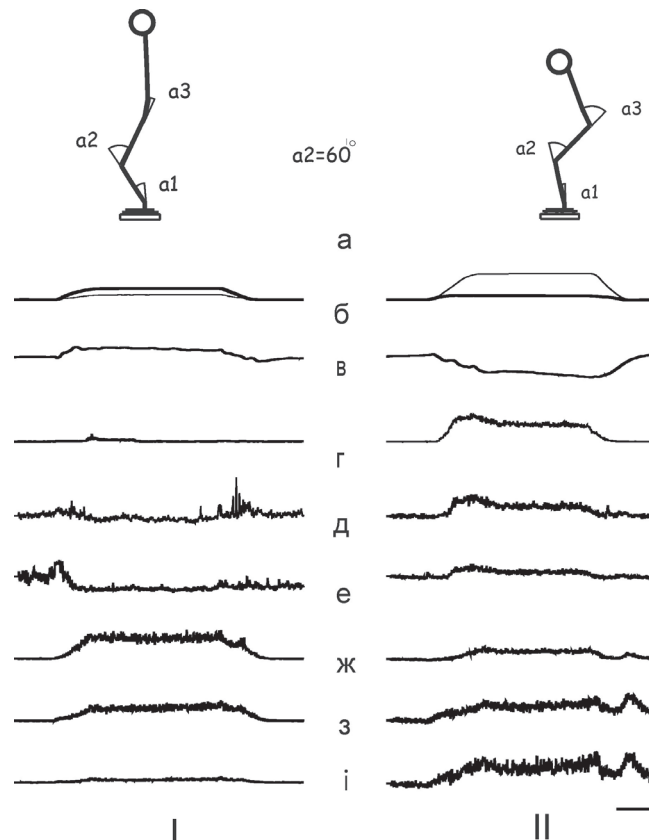


Рис. 6 Відмінності в електроміограмах (ЕМГ) м'язів ноги та зміщеннях центру тиску на стабілографічну платформу у двох осіб, які виконували повільне присідання при зміні кута в колінному суглобі на  $60^\circ$  ( $\alpha_2=60^\circ$ ) за гомілковостопною (I) та кульшовою (II) стратегіями. а – схеми змін кутів в гомілковостопному ( $\alpha_1$ ), колінному ( $\alpha_2$ ) та кульшовому ( $\alpha_3$ ) суглобах, б – гоніограми гомілковостопного (товста лінія) і кульшового (тонка лінія) суглобів, в – стабілограми в сагітальній площині, г – ЕМГ *m. t. a.*, д – ЕМГ *m. g. m.*, е – ЕМГ *m. g. l.*, ж – ЕМГ *m. r. f.*, з – ЕМГ *m. v. l.*, і – ЕМГ *m. b. f.* Калібрівка часу – 2 с. Калібрівка амплітуди: гоніограм –  $80^\circ$ , стабілограми – 4 мм. Калібрівка амплітуди ЕМГ м'язів в мікрвольтах – *m. t. a.* – 300, *m. g. l.* та *m. g. m.* – 25, *m. r. f.*, *m. v. l.* та *m. b. f.* – 100. Кожна крива була результатом усереднення 10 реалізацій

тивності м'язів стегна упродовж усіх етапів присідання, яке необхідне як для забезпечення рівноваги через зміщення ЦТ назад, так і для подолання сил тяжіння. Одночасно відбувається коактивація m. t. a. та литкового м'яза, форма ЕМГ яких відтворює контур змін суглобних кутів, що може вказувати на причетність м'язів гомілки до виконання як самого цілеспрямованого руху присідання, так і до його постурального супроводу через забезпечення стійкої фіксації гомілковостопного суглоба.

Результати нашої роботи доповнюють існуючі уявлення щодо взаємовідношень постурального та цілеспрямованого складових руху при повільних присіданнях з відстеженням однакових змін кута в колінному суглобі. Встановлено, що такі характеристики присідання, як послідовність активації м'язів, зміни їх амплітуди та величин суглобних кутів певним чином пов'язані з постуральними характеристиками руху у вигляді зміщень ЦТ в сагітальній площині вперед або назад.

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

#### **СВЯЗЬ МЕЖДУ МЫШЕЧНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И КИНЕМАТИКОЙ НИЖНЕЙ КОНЕЧНОСТИ В МЕДЛЕННЫХ ДВИЖЕНИЯХ ПРИСЕДАНИЯ У ЧЕЛОВЕКА**

Приседание может выполняться по голеностопной стратегии, когда больше сгибается голеностопный сустав, чем тазобедренный, и тазобедренной, когда большие изменения происходят в тазобедренном суставе. У пяти здоровых мужчин изучали связь между изменениями суставных углов и показателями электромиограммы (ЭМГ) мышц ноги при голеностопной и тазобедренной стратегиях приседания при медленном изменении угла в коленном суставе на 40 и 60°. Установлено, что при голеностопной стратегии первыми активировались мышцы голени, опережая изменения суставных углов и смещения центра давления (ЦТ) на стабильнографическую платформу, тогда как активация мышц бедра начиналась одновременно с изменением суставных углов, демонстрируя четкую адаптацию в последовательных двигательных попытках и линейную связь между статическим компонентом ЭМГ и изменениями угла в голеностопном суставе. В случае тазобедренной стратегии приседания мышцы бедра активировались одновременно с изменением в суставных углах и смещением ЦТ, тогда как мышцы голени активировались

позднее мышц бедра, особенно передняя большеберцовая мышца, демонстрируя определенную адаптацию в последовательных реализациях. При голеностопной стратегии амплитуда ЭМГ была наибольшей у мышц бедра, воспроизводя контур изменений суставных углов, тогда как мышцы голени незначительно активировались только при изменениях суставных углов. В случае тазобедренной стратегии по величине амплитуды ЭМГ доминировала передняя большеберцовая мышца, которая активировалась при движении туловища вниз и фиксации суставных углов, что сопровождалось незначительной коактивацией икроножной мышцы при ступенеобразном увеличении амплитуды ЭМГ мышц бедра. Выбор мышц ноги для начала приседания при обеих стратегиях происходил без определенной закономерности, что может указывать на существование широкого набора вариантов мышечной активности в пределах одной стратегии.

Ключевые слова: биомеханика, приседание, нижняя конечность, суставные углы, электромиограмма.

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

#### **RELATIONSHIP BETWEEN MUSCLE ACTIVITY AND KINEMATICS OF THE LOWER EXTREMITY IN SLOW MOTIONS OF SQUATS IN HUMANS**

Squatting can be performed on ankle strategy when ankle joint is flexed more than a hip joint and on hip strategy when large changes occur at the hip joint. The relationships between changes of joint angles and electromyogram (EMG) of the leg muscles were studied in five healthy men during squatting that was performed at the ankle and hip strategies with a slow changes in the knee angle of 40 and 60°. It is established that at ankle strategy the ankle muscles were activated ahead of joint angle changes and shifting the center of pressure (CT) on stabilographic platform, whereas activation of the thigh muscles began simultaneously with the change of the joint angles, showing the clear adaptation in successive trials and a linear relationships between the static EMG component and the angle changes of the ankle joint. In the case of hip strategy of squatting the thigh muscles were activated simultaneously with the change in the joint angles and the displacement of CT, whereas the ankle muscles were activated later than the thigh muscles, especially the muscle tibialis anterior, showing some adaptations in consecutive attempts. At the ankle strategy the EMG amplitude was greatest in thigh muscles, reproducing contour of changes in joint angles, whereas the ankle muscles were activated only slightly during changes of joint angles. In the case of hip strategy dominated the EMG amplitude of the muscle tibialis anterior, which was activated when driving down the trunk and fixation of the joint angles that was accompanied by a slight coactivation of the calf muscles with the step-like increase in the amplitude of the EMG of the thigh muscles. Choice of leg muscles to start the squatting on both strategies occurred without a definite pattern, which may

indicate the existence of a wide range of options for muscle activity in a single strategy.

Key words: biomechanics, squat, lower extremity, joint angles, and electromyogram.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гурфинкель В.С., Коц Я.М., Шик М.Л. Регуляция позы человека. – М.: Наука, 1965. – 256 с.
2. Синельников Р.Д. Атлас анатомии человека. – М.: Гос. изд-во мед. литературы. – Том 1. – 1963. – 477 с.
3. Хоревін В.І., Горковенко А.В., Верещака І.В.. Зміщення центру тиску на опору та зміна кутів у суглобах нижньої кінцівки при присіданні людини // Фізіол. журн. – 2012. – 58, №3. – С. 32–42.
4. Belenkii V.Ye., Gurfinkel V.S., Paltsev YeI. Control elements of voluntary movements//Biofizika. – 1967. – 12, №1. – P.135–141.
5. 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.
6. Cheron G., Bengoetxea A., Pozzo T., Bourgeois M., Draye J.P. Evidence of a preprogrammed deactivation of the hamstring muscles for triggering rapid changes of posture in humans // Electroenceph. Clin. Neurophysiol. – 1997. – 105, №1. – P. 58–71.
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. Escamilla R.F. Knee biomechanics of the dynamic squat exercise// Med. Sci. Sports Exerc. – 2001. – 33, №1. – P.127–141.
10. Frank J.S., Earl M. Coordination of posture and movement // Physiol. Therap. – 1990. – 70, №12. – P. 855–863.
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. Horak F.B., Henry S.M., Shumway-Cook A. Postural perturbations: new insights for treatment of balance disorders // Physiol. Therap – 1997. – 77, № 5. – P.517–533.
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. Isear J.A. Jr., Erickson J.C., Worrell T.W. EMG analysis of lower extremity muscle recruitment patterns during an unloaded squat// Med. Sci. Sport Exerc. – 1997. – 29, № 4. – P.532–539.
15. Jones G.M. Posture. in “Principles of Neural Sciences”/ Eds E.Kandel, Schwartz J.H., Jessell T. M. Fourth Edition The McGraw-Hill Companies. Health Professions Divisions. New York, St. Louis etc.: 2000. – P. 816–831.
16. Karst G.M., Willet G.M. Onset timing of electromyographic activity in vastus medialis oblique and vastus lateralis muscles in subjects with and without patellofemoral pain syndrome // Physiol. Therap. – 1995. – 75, № 6. – P.813–823.
17. Loram I. D., Lakie M. Direct measurement of human ankle stiffness during quiet standing: the intrinsic mechanical stiffness is insufficient for stability // J. Physiol. – 2002. – 545, Pt. 3 – P.1041–1053.
18. McKean M.R., Dunn P.K., Burkett B.J. Quantifying the movement and the influence of load in the back squat exercise // J. Strength Cond. Res. – 2010. – 24, № 6. – P.1671–1679.
19. Morasso P.G., Schieppati, M. Can muscle stiffness alone stabilize upright standing? // J. Neurophysiol. – 1999. – 82, №3. – P. 1622–1626.
20. 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.
21. Schoenfeld B.J. Squatting kinematics and kinetics and their application to exercise performance//J. Strength. Cond. Res. – 2010. – 24, №12. – P. 3497 – 3506.
22. 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, Київ*  
E-mail: [vkhor@biph.kiev.ua](mailto:vkhor@biph.kiev.ua)

*Матеріал надійшов до редакції 16.04.2012*



Л.М.Гуніна, І.С.Чекман, Т.Ю.Небесна, Н.О.Горчакова

## Ефективність застосування $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот за фізичних навантажень

*На підставі результатів квантово-хімічних досліджень з аналізом атомної структури молекули показано, що поліненасичені  $\omega$ -3-жирні кислоти мають виразні антиоксидантні та мембрано-протективні властивості, котрі схожі з біоантиоксидантами каротиноїдами – токоферолами. Епадол, препарат на основі  $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот водночас гальмує активність ліпопероокиснення, яка віддзеркалюється зменшенням вмісту малонового діальдегіду, та сприяє підвищенню ступеня антиоксидантного захисту, що відображається збільшенням концентрації відновленого глутатіону в мембранах еритроцитів. Під дією цього препарату про-антиоксидантний коефіцієнт у спортсменів знижується з 2,44 до 1,34, що вказує на антиоксидантні властивості епадолу. Водночас сорбційна здатність еритроцитів, яка характеризує функціональні властивості їхніх мембран, під впливом епадолу знижується з  $35,04 \pm 2,23$  до  $25,3\% \pm 1,07\%$ , що протидіє агрегації червоних клітин крові. Обговорюється доцільність застосування вітчизняного препарату епадолу в практиці підготовки спортсменів для покращення структурно-функціонального стану клітинних мембран і профілактики розвитку неконтрольованого апоптозу.*

*Ключові слова:*  $\omega$ -3 поліненасичені жирні кислоти, епадол, клітинні мембрани, фізичні навантаження.

### ВСТУП

Вирішення проблеми раціонального застосування сучасних високоефективних фармакологічних засобів стимуляції фізичної працездатності (ерогенних), зокрема лікарських препаратів і дієтичних (біологічно активних) харчових добавок, неможливе без проведення фундаментальних і прикладних наукових досліджень [3].

У сучасному спорті вищих досягнень, з його неухильно зростаючим обсягом фізичних навантажень, виконання яких дуже часто супроводжується граничною мобілізацією функціональних можливостей організму спортсмена, з великою ймовірністю може виникати стан фізичного та психічного перевантаження, наслідком чого є зниження фізичної працездатності та гальмування процесів відновлення. Ці стани ґрунтуються насамперед на активізації вільнорадикального або пере-

кисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [4, 5, 16]. За умов звичайних стресових ситуацій, незначної відносної гіпоксії при помірних фізичних навантаженнях активація ПОЛ обмежена, що забезпечується постійним функціонуванням достатньо надійної антиоксидантної системи, яка протидіє ліпопероксидації в усіх ланках [25]. Проте характерні для спорту вищих досягнень понадінтенсивні фізичні навантаження у сполученні з емоційним стресом, наприклад у змагальній діяльності, викликають значну активацію ПОЛ [4, 16]. Руйнування накопиченими у процесі ПОЛ вільними радикалами клітинних мембран – один з важливих чинників стомлення з порушенням ресинтезу АТФ і перебігу відновлювальних процесів. До того ж, в останні роки показано, що тривалі інтенсивні фізичні навантаження можуть викликати апоптоз клітин крові людини [27]. Пригнічення активності ферментних систем, зокрема антиоксидантних і детоксикаційних,

© Л.М.Гуніна, І.С.Чекман, Т.Ю.Небесна, Н.О.Горчакова

яке відбувається, на рівні цілісного організму подовжує період відновлення після тренувальних занять, що ускладнює формування необхідної підготовленості [4, 16].

Тому пошук нових антиоксидантних засобів постійно триває, і для цього наразі все частіше застосовують сучасні технології, зокрема з використанням спеціальних комп'ютерних програм і баз даних різноманітних фармакологічних субстанцій [12, 13].

Останнім часом фармакологи все більшу увагу приділяють  $\omega$ -3 поліненасиченим жирним кислотам (ПНЖК), які є незамінними для людини природними субстанціями [17, 18], а також лікарським засобам на їх основі [9, 28]. Фармакологічні дослідження ПНЖК інтенсивно проводяться в усьому світі, однак молекулярні механізми розвитку їхніх біологічних і терапевтичних ефектів остаточно не встановлено [19], а у спорті кількість таких досліджень, на жаль, дуже незначна [23].

Більшість з препаратів (макЕРА, ньюлайф, ейконол), що випускаються за кордоном, містять не більше ніж 30 різних  $\omega$ -3 ПНЖК [17]. Українськими вченими декілька років тому розроблений препарат епадол, який перевершує зарубіжні аналоги за кількісним вмістом  $\omega$ -3 ПНЖК (не менше ніж 43 найменувань) та якісним складом (містить значно менше кислот сімейства  $\omega$ -6) [9]. Проте попередня оцінка складових цього препарату з позиції сучасного розвитку науки недостатня, а тонкі механізми його дії на організм спортсменів майже невідомі.

Проведення попередньої оцінки властивостей фармакологічних засобів, які можна вважати кандидатами на роль ергогенних, тобто тих, що стимулюють фізичну працездатність, скорочує економічні витрати та час, необхідний для створення нових біологічно активних субстанцій. Одними з дуже ефективних у плані прогнозування у фармакологічних субстанцій біологічних властивостей, навіть таких, що раніше не були описані, є саме нові комп'ютерні технології.

Зокрема, всі сучасні комп'ютерні програми для моделювання процесів взаємодії ферментів із субстратами та рецепторів із лігандами розраховують розподіл молекулярного електростатичного потенціалу як інтегральну величину, що характеризує реакційну активність молекул. Для ейкозапентаєнової (ЕПК) і докозагексаєнової (ДГК) кислот – основних представників  $\omega$ -3 ПНЖК – механізми розвитку фармакологічної активності остаточно не з'ясовано, тому детальний опис параметрів молекул є важливим при встановленні молекулярних мішеней цих сполук.

Метою роботи стало прогнозування біологічних властивостей ЕПК і ДГК за допомогою квантово-хімічного аналізу для обґрунтування подальшого впровадження препаратів на їх основі в практику спортивної фармакології та оцінка ефективності епадолу на етапах підготовки спортсменів.

## МЕТОДИКА

Для прогнозування властивостей ПНЖК, зокрема їх основних представників ЕПК і ДГК, що мають важливе значення для функціонування системи антиоксидантного захисту та цитопротекції, був застосований один з методів квантової фармакології. Зокрема, під час дослідження щодо прогнозування просторової та електронної структури  $\omega$ -3 ПНЖК проведено пошук найбільш стабільної конформації послідовно методами молекулярної механіки (ММ) та неемпіричним методом ВЗLYP/6-31G (d, p) за допомогою програми FireFly (PC GAMESS) version 7.1.G [1, 12]. Дослідження проведено на кафедрі фармакології та клінічної фармакології НМУ ім. О.О.Богомольця під керівництвом члена-кореспондента НАН і АМН України І.С.Чекмана. Розраховано квантово-хімічні показники для молекул ЕПК і ДГК загальні розміри молекул, відстані між атомами; розміри кутів між зв'язками; розподіл електростатичного потенціалу в молекулах; заряди на атомах (атомна одиниця); енергії та ло-

калізація вищої зайнятої (ВЗМО) та нижчої вакантної (НВМО) молекулярних орбіталей [12, 13]. Результати досліджень структурних взаємодій окремих атомів у молекулах, що зумовлює біологічні властивості речовин, наведено на рисунках.

Антиоксидантні та ергогенні властивості епадолу оцінювали *in vivo*, обстеживши 18 висококваліфікованих важкоатлетів (чоловіки віком  $20 \pm 1,5$  роки). Цей вид спорту був обраний тому, що саме у важкоатлетів спостерігаються значні зміни з боку реологічних властивостей крові, пов'язаних з порушеннями в еритроцитарній ланці [7]. Методом випадкової вибірки створені однакові за антропометричними характеристиками та спортивною кваліфікацією (по 9 осіб) групи. Спортсмени основної групи приймали епадол по 2 капсули 4 рази на добу протягом 21 доби протягом підготовки до змагань, контрольної – отримували плацебо (капсули з крохмалем). Обстеження здійснювали до початку та по закінченні прийому препарату. Для порівняння такі самі лабораторні дослідження крові проводили у 10 здорових нетренованих осіб аналогічної статі та віку (донорів).

У стані спокою натщесерце у спортсменів забирали кров (5,0 мл) з ліктьової вени. Комплекс біохімічних досліджень включав оцінку про- – антиоксидантної рівноваги (ПАР) на рівні клітинних мембран (на моделі мембран еритроцитів) [4]. Для цього після триразової обробки зразка крові, стабілізованої 3,8%-м розчином цитрату натрію, за допомогою ізотонічного розчину хлориду натрію з наступним центрифугуванням при  $3000 \text{ хв}^{-1}$  протягом 10 хв отримували суспензію еритроцитів. Осад еритроцитів відмивали від залишків плазми в  $155 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$  розчині хлориду натрію та центрифугували ще раз за тих самих умов, отримуючи суспензію мембран еритроцитів [8, 11]. У ній досліджували структурного-функціональний стан мембран, який характеризували за допомогою комплексу методів, що включав спектрофотометричне визначення активнос-

ті ПОЛ за вмістом одного з ТБК-активних продуктів малонового діальдегіду (МДА) за різницею величин поглинання при довжинах хвиль 532 і 580 нм [2] та антиоксидантного захисту – за вмістом відновленого глутатіону (GSH). Останній визначали після інкубації еритроцитарної суспензії з реактивом Елмана при вимірюванні оптичної густини утвореного продукту реакції (тіонітрофенольні аніони) при довжині хвилі 412 нм [6]. Також розраховували про- – антиоксидантний коефіцієнт ( $K_{\text{па}}$ ) як відношення вмісту МДА до GSH [4]. Досліджували сорбційну здатність еритроцитів як відображення функціональних властивостей їхніх мембран. [8].

У динаміці дослідження для визначення ефективності впливу препарату на основі ПНЖК на показники фізичної працездатності оцінювали рівень спеціальної, так званої швидкісно-силової тренованості спортсменів (тестували стрибучість на основі вимірювання висоти та часу стрибка вгору з місця, а також визначали висоту підйому штанги у ривковій тязі та час виконання вправи). Спортсмени виконували по 3 спроби обох вправ із визначенням також часу, затраченого на виконання вправи. Для подальшого аналізу в кожного спортсмена були використані середні значення результатів трьох спроб за кожним показником.

Результати обробляли загальноприйнятими методами за допомогою прикладних пакетів програм Statgraphics, Excel 97, Statistica і ліцензійної програми GraphPadInStat (США). Вірогідність різниці розраховували за допомогою критерію *t* Стьюдента та непараметричного критерію Вілкоксона–Манна–Уїтні.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1,а представлено структуру молекули ЕПК з позначенням типів атомів та їхніх номерів, прийнятих при квантово-хімічних розрахунках. Згідно з результатами досліджень розміри молекули ЕПК за осями координат становлять:  $X - 6,53 \text{ \AA}$ ;  $Y - 4,76^\circ \text{ \AA}$ ;  $Z$

– 10,64°А відповідно. На рис. 1,б аналогічно представлено структуру молекули ДГК, розміри якої за осями координат становлять: X – 6,84 А; Y – 3,55°А; Z – 13,23°А.

Відстані між атомами та розміри кутів між зв'язками належать до топологічних дескрипторів фармакологічної активності. Можливість розрізнявати дуже близькі за будовою та складом сполуки робить топологічні індекси одними з найбільш розповсюджених молекулярних дескрипторів у QSAR-аналізі [24]. Статистично достовірні кореляції топологічних дескрипторів із певними видами

фармакологічної активності застосовують у разі спрямованого пошуку лікарських засобів навіть тоді, коли немає логічного пояснення причин таких кореляцій [1, 13].

Найбільш негативні заряди в молекулі ЕПК спостерігаються на атомах O1 (-0,48 ат. од.), O3 (-0,47 ат. од.) та C45 (-0,32 ат. од.). Найбільша електронна густина (густина ймовірності знаходження електрона в даній точці простору) характерна для атомів O1 (290,05 ат. од.) та O3 (290,35 ат. од.). Найбільш негативний електростатичний потенціал мають атоми O1 (-22,27 ат. од.) та O3 (-22,33 ат.

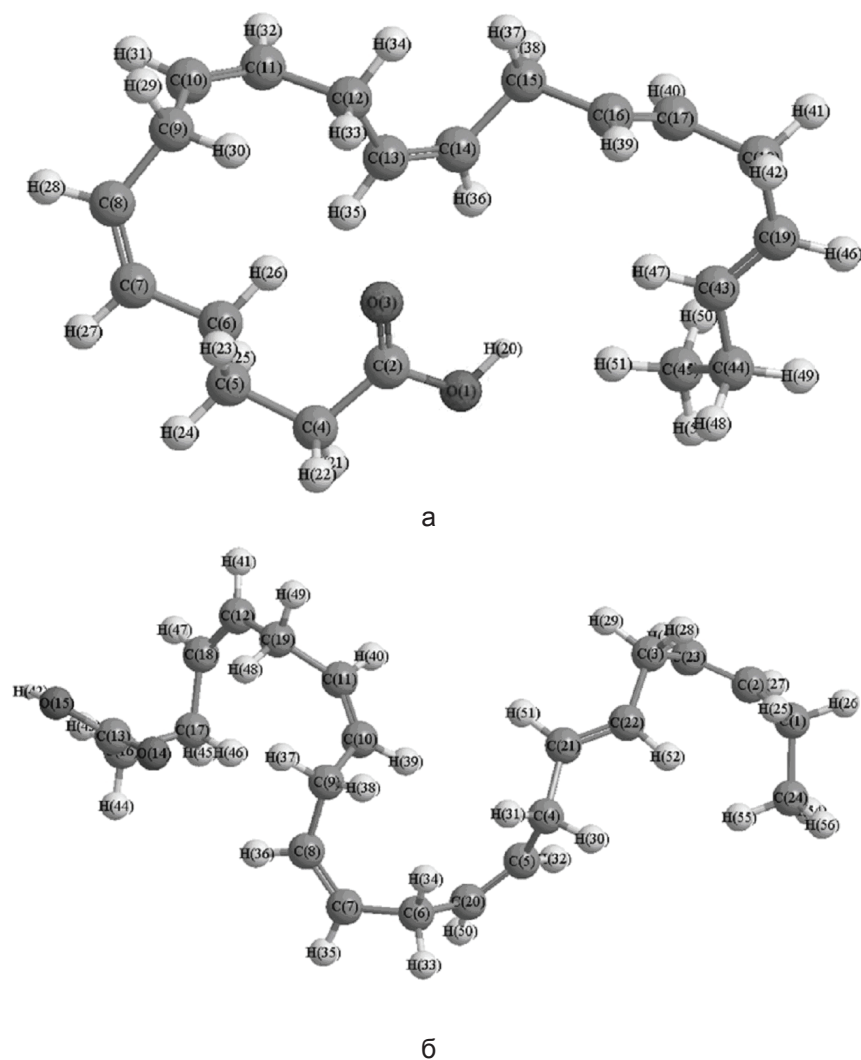


Рис. 1. Структура молекули ейкозапентаєнової (а) докозагексаєнової (б) кислоти, з позначенням типів атомів та їх номерів, прийнятих при розрахунках

од.). У молекулі ДГК найбільш негативні заряди встановлені на атомах O14 (-0,45 ат. од.), O15 (-0,47 ат. од.), C24 (-0,31 ат. од.), а найбільшу електронну густину та негативний електростатичний потенціал мають атоми O14 та O15.

На рис. 2, 3 показана локалізація граничних орбіталей у молекулах ЕПК і ДГК. ВЗМО характеризує взаємодію молекули з електроакцепторами, а НВМО – з електродонорами. Позитивна енергія НВМО визначає нуклеофільні властивості молекули, негативна – електрофільні. Відповідно до теорії Купменса, енергії граничних орбіталей

із протилежними знаками відповідають значенням потенціалу іонізації молекули (енергія ВЗМО) або її спорідненості до електрона (енергія НВМО) [12].

Значення енергій граничних орбіталей є найважливішим дескриптором антиоксидантної активності [23]. Установлено, що редокс-потенціал антиоксидантів фенольної природи підвищується зі збільшенням негативної енергії НВМО, антиоксидантна активність похідних вітаміну Е – при зменшенні негативної енергії ВЗМО [21]. За структурою ПНЖК більше подібні до антиоксидантів – похідних каротину. Антиоксидантна ак-

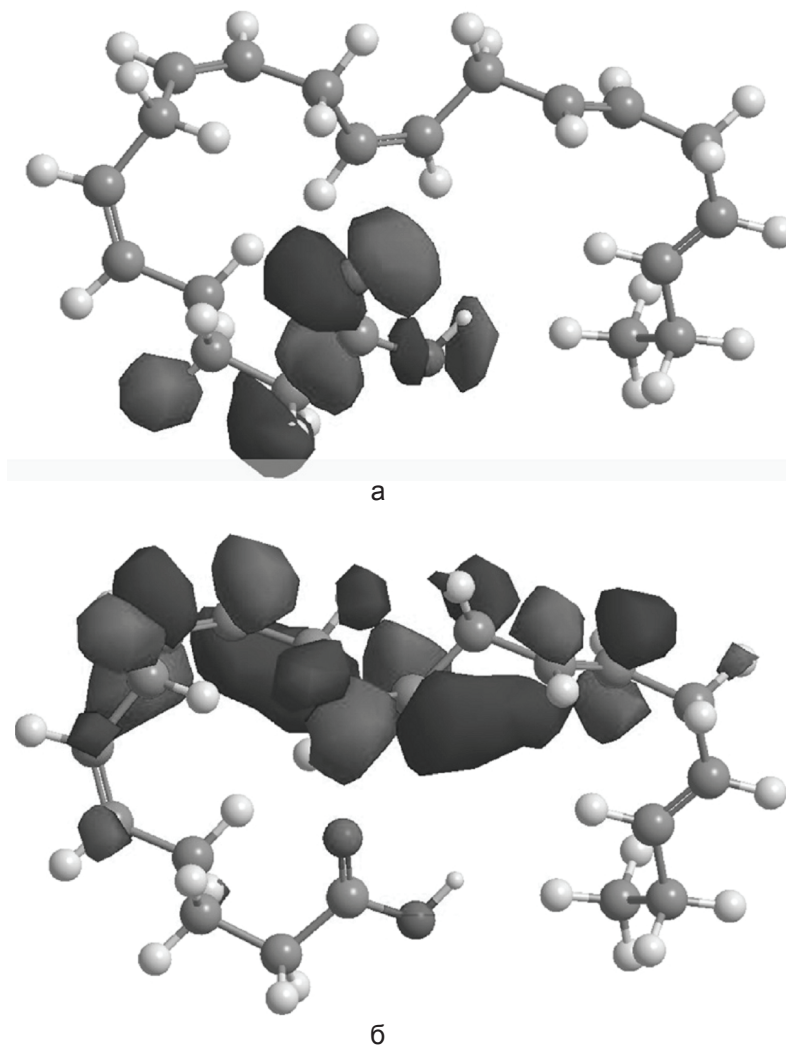


Рис. 2. Локалізація вищезайнятої (а) та нижчої вакантної (б) молекулярної орбіталі у молекулі ейкозапентаєнової кислоти



тивність каротиноїдів залежить від різниці енергій ВЗМО та НВМО (ЕВ-Н), а також потенціалу іонізації. При зменшенні значення ЕВ-Н і потенціалу іонізації вона зростає [26].

У молекулі ЕПК нараховується 111 молекулярних орбіталей. ВЗМО (№ 61) локалізується на карбоксильній групі та має енергію -12,82 еВ. НВМО (№ 62) займає атоми вуглецю в центрі молекули та має енергію -0,34 еВ. У молекулі ДГК нараховується 116 молекулярних орбіталей. ВЗМО (№ 66) має енергію -12,71 еВ, НВМО (№ 67) – -0,24 еВ. Локалізація граничних орбіталей подібна до ЕПК. Цікаво, що в молекулах антиоксидантів

групи каротиноїдів локалізація НВМО, як і в молекулах ПНЖК, відбувається також на ділянці вуглецевого ланцюга з ненасиченими зв'язками [13]. Таким чином, можна припустити, що кількість і взаємне розташування ненасичених зв'язків у молекулах ПНЖК, як і каротиноїдів, визначають розподіл НВМО, що впливає на антиоксидантні властивості цих сполук та їхні біологічні властивості.

На другому етапі дослідження на рівні цілісного організму оцінено вплив епадолу на активність процесів ПОЛ та антиоксидантного захисту в клітинних мембранах (таблиця). Було встановлено, що тривалі

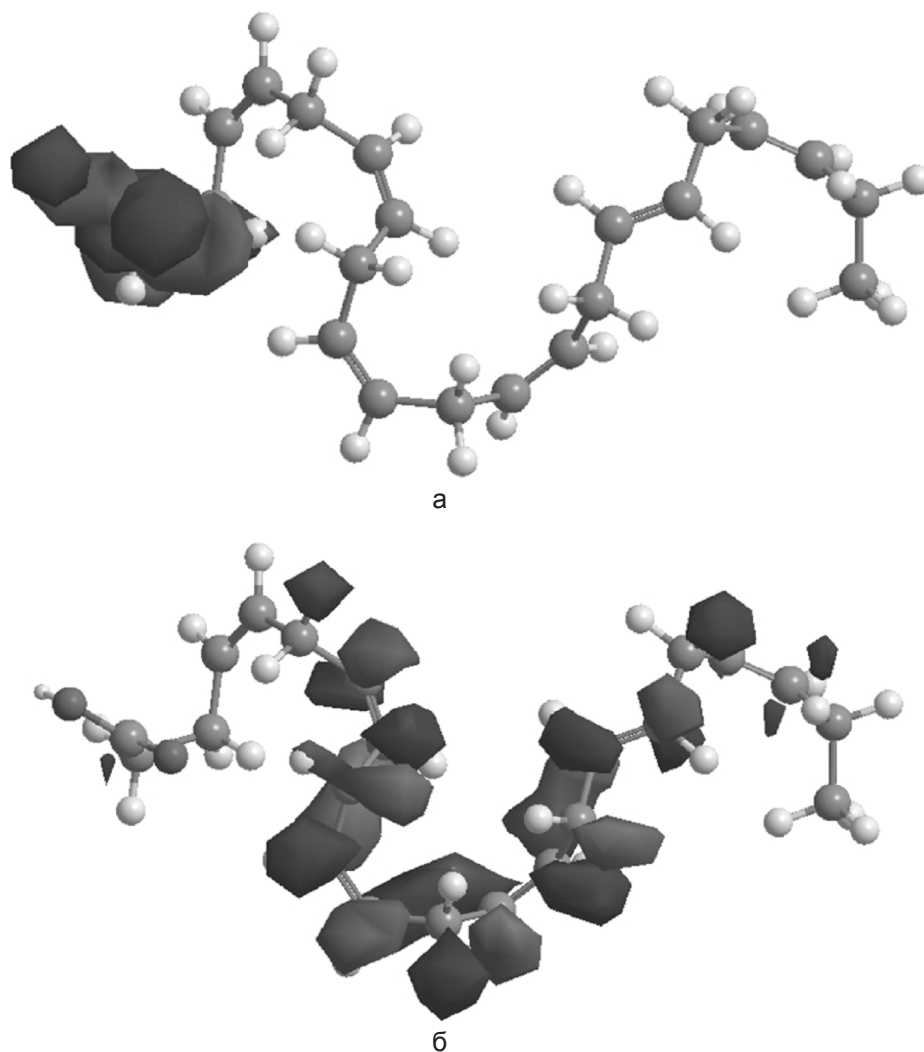


Рис. 3. Локалізація вищезайнятої (а) та нижчої вакантної (б) молекулярної орбіталі у молекулі докозагексаснової кислоти

фізичні навантаження приводять до зсуву ПАР у мембранах у бік накопичення продуктів ПОЛ, на що вказує збільшення вмісту МДА та зниження – GSH. Про зміни стану ПАР у клітинних мембранах свідчить також зростання  $K_{па}$ : якщо у здорових нетренованих осіб його значення становить 2,0 ум. од., що узгоджується з нашими більш ранніми працями [4], то за інтенсивних фізичних навантажень він підвищується до 2,44 ум. од., що вказує на активацію окиснювальних процесів у плазматичних мембранах і узгоджується з даними сучасної літератури [16].

Застосування епадолу водночас гальмує активність ліпоперекиснення, що віддзеркалює зменшення вмісту МДА як одного з проміжних його продуктів, та сприяє збільшенню антиоксидантного захисту, яке відображається підвищенням концентрації GSH у мембранах еритроцитів. Під дією цього препарату  $K_{па}$  у спортсменів знижується до 1,34 ум.од., що говорить про наявність у нього антиоксидантних властивостей. Покращення біохімічних показників у мембрані супроводжується стабілізацією її функціональних властивостей, про що свідчить суттєве зниження сорбційної здатності еритроцитів, тобто препарат має також мембранопротективну дію. Водночас у контрольній групі під впливом навантажень зростаючої інтенсивності

продовжується накопичення продуктів ПОЛ і зменшується антиоксидантний захист.  $K_{па}$  у спортсменів, що не застосовували антиоксидант епадол, у кінці дослідження зростає до 2,69 ум.од. (див. таблицю).

Водночас застосування епадолу збільшує фізичну працездатність. Якщо у спортсменів контрольної групи по закінченні дослідження показники спеціальної тренованості погіршуються – знижується висота стрибка та зростає час його виконання, то під впливом препарату, навіть після змагань, середня висота стрибка збільшується на 14,3 %, а час його виконання зменшується в середньому на 9,1 %.

На останньому етапі роботи було проаналізовано кореляційні залежності між показниками ПАР та спеціальної тренованості в основній групі спортсменів. Установлено, що наприкінці дослідження між вмістом МДА в клітинних мембранах і показниками спеціальної тренованості існують такі залежності: між МДА, з одного боку, та висотою і часом виконання тяги ривкової та висотою та часом виконання стрибка, з іншого, відповідно  $r_1 = -0,79$ ,  $r_2 = +0,54$ ,  $r_3 = -0,48$ ,  $r_4 = +0,87$  ( $P < 0,05$ ).

Знайдено також кореляційні залежності між вмістом GSH, що віддзеркалює напруженість антиоксидантного захисту

**Зміни показників про- – антиоксидантної активності і функціонального стану мембран еритроцитів у спортсменів під впливом епадолу ( $M \pm m$ )**

Показники	Здорові нетреновані особи (n=10)	Спортсмени		
		до початку дослідження (n=18)	контрольна група по закінченні дослідження (n=9)	основна група по закінченні дослідження (n=9)
Малоновий діальдегід, нмоль · 10 <sup>6</sup> ер.	3,67±0,10	5,43±0,16*	5,88±0,11*	4,20±0,09*,**
Відновлений глутатіон, 10 <sup>-12</sup> ммоль · ер. <sup>-1</sup>	1,83±0,11	2,26±0,12*	2,18±0,13	3,21±0,17*,**
Сорбційна здатність еритроцитів, %	21,6±1,4	35,04±2,23*	33,9±2,19*	25,3±1,07*,**
Про- – антиоксидантний коефіцієнт, ум. од.	2,01±0,02	2,44±0,03*	2,69±0,05*	1,34±0,05*,**

\* $P < 0,05$  порівняно з даними у здорових нетренованих осіб; \*\* $P < 0,05$  порівняно з контролем.

в клітинних мембранах, з одного боку, та вищезгаданими показниками спеціальної тренованості  $r_1 = +0,94$ ,  $r_2 = -0,49$ ,  $r_3 = +0,83$ ,  $r_4 = -0,78$  відповідно ( $P < 0,05$ ). Тобто, ПОЛ та антиоксидантний захист спричиняють прямо протилежний вплив на показники спеціальної тренованості важкоатлетів: чим вище інтенсивність ПОЛ, тим нижчі показники спеціальної працездатності і тим більший час виконання вправ. Зростання вмісту GSH, навпаки, призводить, до збільшення висоти здійснених вправ-тестів і зменшення часу їх виконання. Між одним з функціональних показників стану мембрани еритроцитів, а саме сорбційною здатністю та показниками спеціальної тренованості теж існують кореляційні залежності, але не такої сили, як у попередніх випадках.

Тобто на основі проведеного нами квантово-хімічного прогнозування зі значною часткою вірогідності можна припустити, що кількість і взаємне розташування ненасичених зв'язків у молекулах ПНЖК визначають антиоксидантні та ергогенні властивості цих сполук [22, 29], зокрема, при застосуванні у практиці підготовки спортсменів [23]. Отримані у нашому дослідженні *in vivo* результати дають змогу резюмувати, що позитивний ефект застосування епадолу стосовно показників спеціальної тренованості спортсменів як відображення фізичної працездатності значною мірою ґрунтується на гальмуванні процесів ПОЛ та зростанні антиоксидантного захисту в клітинних мембранах, тобто на нормалізації ПАР, що призводить до покращення структурно-функціонального стану клітинної поверхні та сприяє кращому проходженню біохімічних процесів, які базуються на мембранних реакціях [25]. Включення до програм фармакологічного забезпечення спорту лікарських засобів на основі ПНЖК, як свідчать дані сучасних досліджень, знижує ризик коронарних захворювань і раптової коронарної смерті [14], особливо в юних спортсменів, та, поліпшуючи структурно-функціональний стан мембран, сприяє поліпшенню механізмів

енергозабезпечення [4, 5].

У нашій роботі не визначалися маркери апоптозу (у цьому випадку – ериптозу), проте неможливо не зазначити, що в умовах окисного стресу, який є дуже виразним за тривалих понадінтенсивних фізичних навантажень у висококваліфікованих спортсменів [20], шлях від порушення структурно-функціонального стану клітинних мембран до апоптозу клітин може бути дуже коротким [23, 27]. Перебування мембрани за окисного стресу супроводжується зниженням об'єму клітин і змінами активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпи, активацією сигнальних шляхів, що неодмінно призводить до неконтрольованого апоптозу [10, 15]. Водночас показано, що кон'юговані ізомери ПНЖК відіграють визначену роль у регуляції активності PPAR- $\gamma$  and NF- $\kappa\text{B}$  зі зростанням активності ДНК та відповідною експресією антиоксидантних ферментів в ендотеліальних клітинах людини [17]. Тобто застосування  $\omega$ -3 ПНЖК для корекції пошкоджених під час окисного стресу за інтенсивних фізичних навантажень клітинних мембран може стати доцільним не тільки в умовах інтенсивних фізичних навантажень для зростання фізичної працездатності, але й для попередження неконтрольованого апоптозу.

## ВИСНОВКИ

1. Результати квантово-хімічних досліджень із застосуванням сучасних квантово-хімічних технологій дають змогу стверджувати, що ЕПК та ДГК, як одні з найважливіших представників  $\omega$ -3 ПНЖК, мають виразні антиоксидантні і мембранопротекторні властивості, подібні до таких у токоферолів.

2. Застосування епадолу на основі ПНЖК призводить до покращення ПАР у клітинних мембранах з гальмуванням процесів ПОЛ та активізацію неферментативної ланки антиоксидантного захисту в спортсменів в умовах інтенсивних фізичних навантажень.

3. Застосування препарату на основі ПНЖК позитивно відображається на фізичній

працездатності і може бути рекомендовано для впровадження в практику спортивної фармакології для застосування на етапах підготовки кваліфікованих спортсменів.

**Л.М. Гунина, И.С. Чекман, Т.Ю. Небесная, Н.А. Горчакова**

### **ЭФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ $\omega$ -3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ У СПОРТСМЕНОВ**

На основании результатов квантово-химических исследований с анализом атомной структуры молекулы показано, что полиненасыщенные  $\omega$ -3-жирные кислоты имеют выраженные антиоксидантные и мембранопротекторные свойства, сходные с биоантиоксидантами каротиноидами – токоферолами. При применении у спортсменов препарата на основе полиненасыщенных жирных кислот  $\omega$ -3 – эпадола – показано, что он одновременно тормозит активность перекисного окисления липидов (отображается уменьшением содержания малонового диальдегида) и способствует улучшению антиоксидантной защиты, обусловленной увеличением концентрации восстановленного глутатиона в мембранах эритроцитов. Под действием этого препарата значение про- – антиоксидантного коэффициента у спортсменов снижается с 2,44 до 1,34. Это указывает на наличие у эпадола антиоксидантных свойств. В то же время сорбционная способность эритроцитов, характеризующая функциональные свойства их мембран под воздействием эпадола снижается с 35,04±2,23 до 25,3% ± 1,07%, что противодействует агрегации красных клеток крови. Обсуждается целесообразность применения в практике подготовки спортсменов отечественного препарата на основе полиненасыщенных жирных кислот эпадола для улучшения структурно-функционального состояния клеточных мембран и предупреждения неконтролируемого апоптоза.

Ключевые слова:  $\omega$ -3-полиненасыщенные жирные кислоты, эпадол, клеточные мембраны, физические нагрузки.

**L. Gunina, I. Chekman, T. Nebesna, N. Gorchakova**

### **EFFECTIVENESS OF USE OF $\omega$ -3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AT PHYSICOL LOADS**

On the basis of results of quantum-chemical researches with the analysis of atomic structure of molecule, it is shown that polyunsaturated  $\omega$ -3 fatty acids have the expressed antioxidant and membranoprotective properties that with bioantioxidants karotenoids – tocopherols – are similar. At application in the sportsmen of medical drug Epadol on the basis of polyunsaturated  $\omega$ -3 fatty acids it is shown that it

brakes the activity of lipid peroxidation simultaneously, that is represented by reduction of maintenance of malonic dialdehyde as one of his eventual foods, and assists the improvement of antioxidant defence, that it contingently the increase of concentration of recovered glutathione in the membranes of red blood cells. Under the action of this medical drug the prooxidative-antioxidative coefficient for sportsmen goes down from 2.44 to 1.34 that specifies on a presence at Epadol of antioxidant properties. At the same time sorption ability of erithrocytes, characterizing functional properties of their membranes under act of Epadol goes down from 35.04±2.23 % to 25.3±1.07 % that counteracts to aggregating of red blood cells. An expediency of application of Ukrainian medical drug Epadol on the basis of polyunsaturated fatty acids in practice of preparation of sportsmen for normalization of structural and functional status of cell membranes as well as of prophylaxis noncontrolled apoptosis come into question. Key words:  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids, Epadol, cellular membranes, physical activities.

*National Institute of Physical Education and Sport, Ukraine, Kyiv.*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Апостолова Е.С., Михайлюк А.И., Цирельсон В.Г. Квантово-химическое описание реакций. – М.: РХТУ, 1999.– 61 с.
2. Банкова В.В., Прищепова Н.Ф., Авратинский О.И. Способ оценки патологических изменений плазматической мембраны у детей при различных заболеваниях // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1987. – № 3. – С. 78–81.
3. Горчакова Н.А., Гудивок Я.С., Гунина Л.М. Фармакология спорта / Под общ. ред. С.А.Олейника, Л.М.Гуниной, Р.Д.Сейфуллы – К.: Олимп. лит-ра, 2009. – 615 с.
4. Гунина Л.М. Вплив суццинату натрію на еритроцити за окисного стресу при інтенсивних фізичних навантаженнях // Фізіол. журн. – 2011. – 5–6, № 6. – С. 71–79.
5. Гунина Л.М., Олійник С.А., Иванов С.В. Зміни показників крові та прооксидантно-антиоксидантного балансу в мембранах еритроцитів під впливом Ритмокору при фізичному навантаженні // Мед. хімія. – 2007. – 9, № 1. – С. 95–99.
6. Зайцев В.Г., Закревский В.И., Давыдов А.И. Уровень гипергликемии у больных сахарным диабетом // Клін. лаб. діагностика. – 1999. – № 11. – С.32–33.
7. Мельников А.А., Викулов А.Д. Особенности гемодинамики и реологических свойств крови у спортсменов с разной направленностью тренировочного процесса // Теория и практика физ. культуры. – 2003. – № 1.– С. 43–46.
8. Михайлович В.А., Марусанов В.Е., Бичун А.Б. Проницаемость эритроцитарной мембраны и ее сорбционная способность – оптимальные критерии тяжести эндогенной интоксикации // Анестезиология и реаниматология. – 1993. – № 5. – С.66–69.
9. Омега-3 ПНЖК. Новый лекарственный препарат Те-

- ком / Под ред. Ю.И. Фещенко и В.К. Гаврисюка. – К., 1996. – 124 с.
10. Рубашкин А.А., Юринская В.Е., Веренинов А.А. Расчет потоков  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$  через плазматическую мембрану животной клетки с  $Na^+/K^+$ -насосом, котранспортерами НКСС и НС и ионными каналами с учетом невольмановского выпрямления в  $K^+$ -каналах. Норма и апоптоз // Цитология. – 2010. – **52**, №7. – С. 568–573.
  11. Семко Г.А. Структурно-функциональные изменения мембран и внешних примембранных слоев эритроцитов при гиперэпидермопозе // Укр. биохим. журн. – 1998. – **70**, № 3. – С.113–118.
  12. Чекман І.С., Казакова О.О., Небесна Т.Ю. Методи комп'ютерних розрахунків у квантовій фармакології // Фармакологія та лікар. токсикологія. – 2008. – № 1. – С. 48–56.
  13. Чекман І.С., Небесна Т.Ю., Казакова О.О., Сімонов П.В. Фармакофори: створення лікарських засобів (огляд літератури та власних досліджень) // Журн. АМН України. – 2010. – **16**, № 3. – С. 424–437.
  14. Akbartartoori M., Lean M.E., Hankey C.R. The associations between current recommendation for physical activity and cardiovascular risks associated with obesity // Eur. J. Clin. Nutr. – 2008. – **62**, № 1. – P. 1–9.
  15. Das J., Vasan V., Sil P.C. Taurine ameliorates alloxan-induced diabetic renal injury, oxidative stress-related signaling pathways and apoptosis in rats // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2012. – **258**, № 2. – P. 296–308.
  16. Deminice R., Sicchieri T., Mialich M.S., Milani F., Ovidio P.P., Jordao A.A. Oxidative stress biomarker responses to an acute session of hypertrophy-resistance traditional interval training and circuit training // J. Strength Cond. Res. – 2011. – **25**, № 3. – P. 798–804.
  17. Dyerberg J., Bang H.O. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis // Lancet. – 2008. – **32**. – P. 117–119.
  18. Harris W.S. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans // J. Lipid. Res. – 2009. – **40**. – P. 785–807.
  19. Hunter D.J., Kazda I., Chockallngam A. Fish consumption and cardiovascular mortality in Canada: an interregional comparison // Amer. J. Prev. Med. – 2008. – **14**. – P. 4–5.
  20. Kamandulis S., Skurvydas A., Snieckus A., Masiulis N., Aagaard P., Dargeviciute G., Brazaitis M. Monitoring markers of muscle damage during a 3 week periodized drop-jump exercise programme // J. Sports Sci. – 2011. – **29**, № 4. – P. 345–353.
  21. Kleinoval M., Hewitt M., Brezova V. Antioxidant properties of carotenoids: QSAR prediction of their redox potentials // Gen. Physiol. Biophys. – 2007. – **26**, № 2. – P. 97–103.
  22. Meneses F., Ney J.G., Torres A.G., Trugo N.M. Erythrocyte membrane and plasma non-esterified  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids of pregnant and non-pregnant Brazilian adolescents // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. – 2009. – **80**, № 2-3. – P. 137–142.
  23. Ney J.G., Koury J.C., Azeredo V.B., Casimiro-Lopes G., Trugo N.M., Torres A.G. Associations of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and tocopherols with proxies of membrane stability and subcutaneous fat sites in male elite swimmers // Nutr. Res. – 2009. – **29**, № 9. – P. 623–630.
  24. Nicolle E., Boumendjel A., Macalou S. QSAR analysis and molecular modeling of ABCG2-specific inhibitors // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2009. – **61**. – P. 34–46.
  25. Rowlands D.S., Pearce E., Aboud A., Gillen J.B., Gibala M.J., Donato S., Waddington J.M., Green J.G., Tarnopolsky M.A. Oxidative stress, inflammation, and muscle soreness in an 894-km relay trail run // Eur. J. Appl. Physiol. – 2011. – **46**, № 11. – P. 245–452.
  26. Sun Y-J., Pang J., Ye X-Q. Quantitative Structure-activity Relationship Study on the Antioxidant Activity of Carotenoids // Chinese J. Struct. Chem. – 2009. – **28**, № 2. – P. 2163–2170.
  27. Wang J.-S., Huang Y.-H. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men // Eur. J. Appl. Physiol. – 2005. – **95**. – P. 290-291.
  28. Weber P., Fisher S., von Schaky C. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and eicosanoids formation in man // Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods. Eds. F. Simopoulos, R.Kifer. – Orlando, FL: Acad. press, 1986. – P. 227–238.
  29. Zhu Y.J., Zeng T., Zhu Y.B. Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat // Neurochem. Res. – 2008. – **33**, № 11. – P. 2310–2317.

НДІ Нац. ун-ту фіз. виховання і спорту України, Київ  
E-mail: [gunina-sport@yandex.ru](mailto:gunina-sport@yandex.ru)

Матеріал надійшов до редакції 12.06.2012



І.М. Михейцева

## Протекторна дія мелатоніну за експериментальної глаукоми у щурів

*Вивчали вплив мелатоніну на вміст амінокислотних нейротрансмітерів сітківки при глаукомній нейропатії у щурів. Глаукому викликали тривалим системним введенням адреналіну. У експерименті брали участь три групи щурів: інтактні; з моделлю глаукоми; з моделлю глаукоми, яких лікували мелатоніном. Мелатонін щурам на тлі розвинутої моделі вводили упродовж 1 міс у дозі 0,1 мг/кг. У склоподібному тілі, як місці накопичення медіаторів сітківки, визначали вміст вільних амінокислот методом іонообмінної хроматографії. Встановлено, що при глаукомній нейропатії, викликаній хронічним адреналіновим стресом, змінювався нейромедіаторний профіль сітківки, а саме, збільшувався вміст збудливих амінокислот глутамату і аспартату і знижувався гальмівних ГАМК і гліцину, призводячи до підвищення індексу збудження на 55 %. Дисбаланс амінокислотних медіаторів значною мірою нормалізувався тривалим введенням мелатоніну. Зниження під впливом останнього вмісту збудливих амінокислот і підвищення гальмівних призвело до зниження індексу збудження на 27 % порівняно з нелікованою групою. Таким чином, зменшення збудливих посилаць у сітківці під впливом мелатоніну може визначати його нейропротекторну активність при глаукомній нейропатії.*

*Ключові слова: мелатонін, амінокислотні медіатори, сітківка, глаукомна нейропатія.*

### ВСТУП

Вивчення нейрохімічної активності в сітківці є одним з ключових завдань як у цілому при дослідженні зору, так і конкретно для розуміння патогенезу глаукомної нейропатії. Участь механізму ексайтотоксичності в апоптотичній загибелі нейронів сітківки при цьому захворюванні широко обговорюється у світовій літературі [7, 14]. Нами вперше було встановлено на моделі хронічної стресіндукованої глаукоми у щурів не лише збільшення вмісту нейротоксичних збудливих амінокислот – глутамату і аспартату, але й зниження концентрації у відповідних структурах ока гальмівних амінокислот – ГАМК і гліцину [3].

Порушення процесів нейротрансмісії в сітківці при глаукомній нейропатії потребує патогенетичної корекції. Мелатонін, як нейрогормон – антистресор, може становити значний інтерес у розробці такого напрямку нейропротекції при глаукомі. Його анти-

стресова дія виявляється впливом, в першу чергу, на гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозну систему і імункомпетентні клітини [1]. При хронічному стресі, передусім, розузгоджуються біологічні ритми, а також порушується секреція деяких біологічно активних речовин. Мелатонін здатний обмежувати ці збої біологічного годинника. Було експериментально доведено, що у відповідь на дію стресорів епіфіз відповідає різким підвищенням синтезу мелатоніну незалежно від освітлення [2].

Рецептори мелатоніну широко представлені в периферичних тканинах ссавців. Для тканин ока – сітківки, ціліарного тіла, хороїда, кришталика, склери – характерна наявність  $MT_3$ -рецепторів [6].

Нейропротекторні властивості мелатоніну багато в чому пов'язані з його дією на нейрональні медіатори. Він здатен знижувати глутаматну нейротоксичність, забезпечуючи нейропротекторну активність при таких

нейродегенеративних захворюваннях, як хвороба Альцгеймера і паркінсонізм [12]. У низці експериментальних робіт на різних видах тварин, птахів і риб, доведена здатність мелатоніну підвищувати виживання нервових клітин, у тому числі нейронів сітківки, за рахунок обмеження глутаматної ексайтотоксичності. Діючи через  $MT_3$ -рецептори в сітківці очей коропа, мелатонін модулював глутаматні рецептори і міняв глутаматергічну трансмісію [9]. У нейронах сітківки курей він демонстрував нейропротекторний ефект щодо глутаматвикликаного ексайтотоксичності [10].

У щурів, яким викликали ішемічно-реперфузійне ушкодження нейронів сітківки різкими підвищеннями внутрішньоочного тиску, застосування 0,5%-го розчину мелатоніну, введеного в передню камеру, збільшувало кількість гангліозних клітин сітківки в порівнянні з нелікованими очима. Автори також спостерігали збільшення їх виживання і відновлення ушкодження нейронів сітківки [13].

Нейропротекторні властивості мелатоніну можуть бути пов'язані зі впливом на головний гальмівний медіатор нервової системи – ГАМК. Близько 30 років тому було показано, що цей гормон здатний підвищувати вміст ГАМК у мозку [8]. Він також спроможний диференціально модулювати функцію А-рецепторів ГАМК [11]. Вважають, що деякі ефекти екзогенного мелатоніну у людей – седативний, анальгезуючий, антиконвульсивний – можуть бути пов'язані з ГАМК-системою.

Метою нашого дослідження було вивчення впливу мелатоніну, що тривало вводився, на вміст амінокислотних нейротрансмітерів сітківки при стресіндукованій глаукомній нейропатії у щурів.

## МЕТОДИКА

Експерименти проведені на 25 щурах, розділених на 3 групи. До I контрольної групи

ввійшло 5 інтактних щурів (10 очей); до II і III – по 10 тварин (20 очей) з моделлю глаукоми. Глаукому моделювали внутрішньоочеревинним введенням адреналіну (15 мкг/100 г) упродовж 6 тиж [4]. Тваринам III групи на фоні глаукомної нейропатії вводили рег ос мелатонін в дозі 0,1 мг/кг протягом одного місяця. Амінокислотний профіль вивчали в склоподібному тілі ока, проби якого відбирали на холоді відразу після декапітації. Зразки поміщали в рідкий азот. До проведення тесту їх зберігали в холодильній камері при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Вміст вільних амінокислот визначали методом іонообмінної хроматографії на автоматичному амінокислотному аналізаторі “Hitachi L – 8800”.

Окрім абсолютного вмісту амінокислот проводили аналіз розрахункового «індексу збудливості» (ІЗ), який визначали як відношення суми концентрацій збудливих амінокислот глутамату і аспартату до суми концентрацій гальмівних – гліцину і ГАМК.

Внутрішньоочний тиск (ВОТ) вимірювали за допомогою апланатичного тонометра масою 2 г, вимір відбитків у лінійних одиницях проводили за допомогою окуляр-лінзи зі вбудованою лінійкою (МПБ-2). Перерахунок на одиниці ртутного стовпа проводили за формулою Головіна.

Статистичну обробку отриманих результатів дослідження здійснювали з використанням пакету програм Statistica.7 методом дисперсійного аналізу, парні порівняння – з використанням критерію множинного порівняння Ньюмана-Кейлса. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Хронічний симпато-адреналовий стрес викликав у експериментальних тварин стійке підвищення ВОТ і морфологічно підтверджену зміну нервового апарату ока, що характеризується загибеллю гангліозних нейронів сітківки і їх аксонів, тобто вираженою

картиною глаукомної нейропатії. Лікування мелатоніном призвело до зниження ВОТ у тварин с моделлю стресіндукованої глаукоми на 28 % ( $P < 0,001$ ; рис. 3,б) і певного нейропротекторного впливу на структури нервового апарату ока [5].

Ці функціональні і структурні зміни в очах експериментальних тварин супроводжувалися патохімічними зрушеннями нейротрансмітерного профілю сітківки. Як об'єкт вивчення нами було використано склоподібне тіло – міжклітинний матрикс ока. Наш вибір зумовлений тим фактом, що саме в ньому накопичуються медіатори сітківки у разі їх надмірного виділення в постсинаптичних терміналях. Проведений дисперсійний аналіз результатів хроматографічного визначення вмісту медіаторних амінокислот склоподібного тіла в трьох групах щурів показав помітну різницю при моделюванні глаукоми (рис. 1, 2).

Вміст досліджуваних амінокислот у II групі тварин статистично значимо відрізнявся від контрольних значень. При експериментальній глаукомі, що індукується хронічним симпато-адреналовим стресом, в екстрацелюлярному просторі ока, який безпосередньо прилягає до сітківки, розвився амінокислотний дисбаланс у бік переважання кислот збудливої дії. У тварин цієї групи була збільшена концентрація глутамату на 17,6 % і аспартату – на 24 % порів-

няно з очима контрольних тварин ( $P < 0,001$ ; див. рис. 1). Відмічено також зниження концентрації гальмівних медіаторів: ГАМК на 25 % і гліцину – на 22,6 % ( $P < 0,001$ ; див. рис. 2).

У щурів III групи з моделлю глаукоми, яких лікували мелатоніном, вміст глутамату і аспартату в склоподібному тілі був практично на рівні контрольних значень (див. рис. 1), вміст гліцину був нижчим на 10 % ( $P < 0,001$ ), а вміст ГАМК перевищував контрольний рівень на 14,5 % ( $P < 0,001$ ; див. рис. 2). Порівняно зі значеннями у тварин II групи вміст ГАМК був вищим на 52,8 % ( $P < 0,001$ ), а гліцину на 15,8 % ( $P < 0,001$ ; див. рис. 2). Вміст глутамату знижувався під впливом мелатоніну на 12 % ( $P < 0,001$ ), а аспартату, сягнувши контрольних значень, був нижчий, ніж при глаукомі без лікування на 19,4 % ( $P < 0,001$ ; див. рис. 1).

Враховуючи, що при вивченні дії антагоністичних регуляторів у організмі найбільш важливо знати їх баланс, а амінокислоти, що вивчали, є медіаторами з антагоністичною дією, окрім оцінки абсолютних значень концентрації цих нейроактивних медіаторів було вираховано їх співвідношення – ІЗ. При глаукомній нейропатії останній був статистично значимо підвищеним на 55,4 % ( $P < 0,001$ ) у порівнянні з контролем. Мелатонін знижував значення цього індексу на 27 % ( $P < 0,001$ ; див. рис. 3,а).

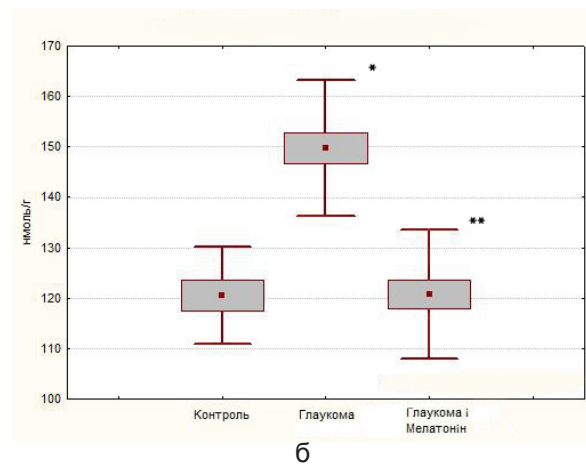
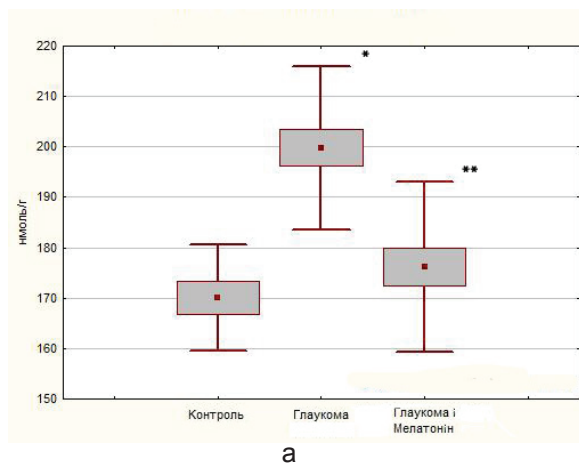


Рис. 1. Вміст збудливих амінокислот глутамату (а) та аспартату (б) у склоподібному тілі очей щурів. \* різниця достовірна відносно значення у контрольних тварин, \*\* різниця достовірна до значення у тварин з глаукомою

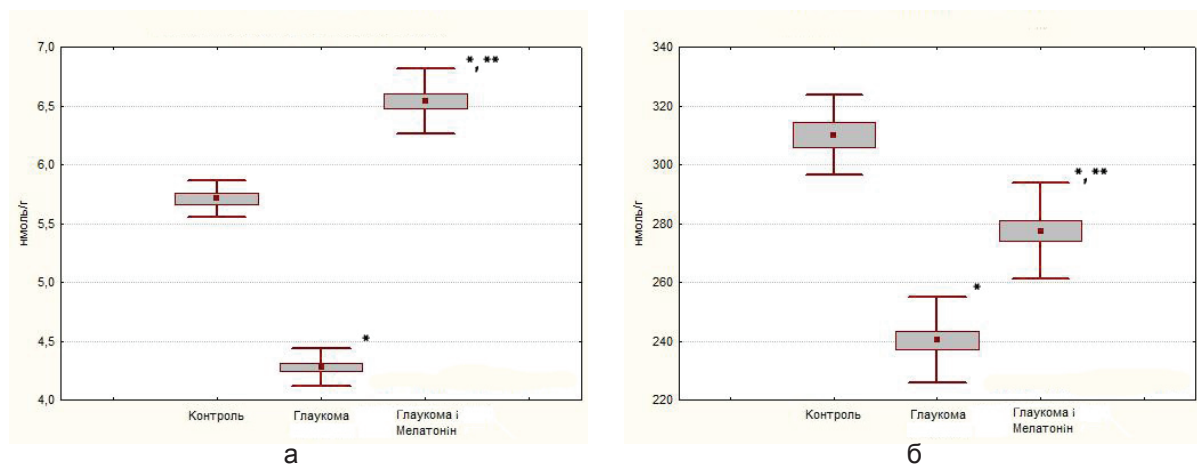


Рис. 2. Вміст гальмієвих амінокислот ГАМК (а) та гліцину (б) в склоподібному тілі очей щурів. \* різниця достовірна відносно значення у контрольних тварин, \*\* різниця достовірна до значення у тварин з глаукомою

Кореляційний аналіз виявив сильний зв'язок офтальмотонусу і ІЗ сітківки в І групі щурів ( $r=0,8586$ ,  $P<0,05$ ). Для II групи щурів з моделлю глаукоми кореляційний зв'язок ВОТ і ІЗ був середньої сили ( $r=0,6914$ ,  $P<0,05$ ). Для III групи щурів з моделлю глаукоми, яких лікували мелатоніном, сила зв'язку була статистично значущою, але низькою ( $r=0,2278$ ,  $P<0,05$ ). Отже, у тварин з моделлю захворювання паралельно зі змінами функціональної ознаки глаукоми, а саме підвищенням ВОТ, змінювався склад медіаторів терміналей сітківки. Порушення балансу гальмієвих і збудливих амінокислот і збільшення ІЗ могло

бути пов'язано з підвищенням ВОТ. Грунтуючись на отриманих результатах, ми можемо говорити, що при стресіндукованій глаукомі з високим офтальмотонусом нейрональні структури ока знаходяться в середовищі зі значно підвищеним збудливим посиленням, зумовленим як підвищеним вмістом збудливих амінокислот глутамату і аспартату, так і зниженням гальмієвих – гліцину і ГАМК. Введення мелатоніну значною мірою знижувало напруженість збудження, в якому перебувають нейрони сітківки, нормалізуючи баланс амінокислотних медіаторів. Стрес-протекторний вплив мелатоніну проявлявся

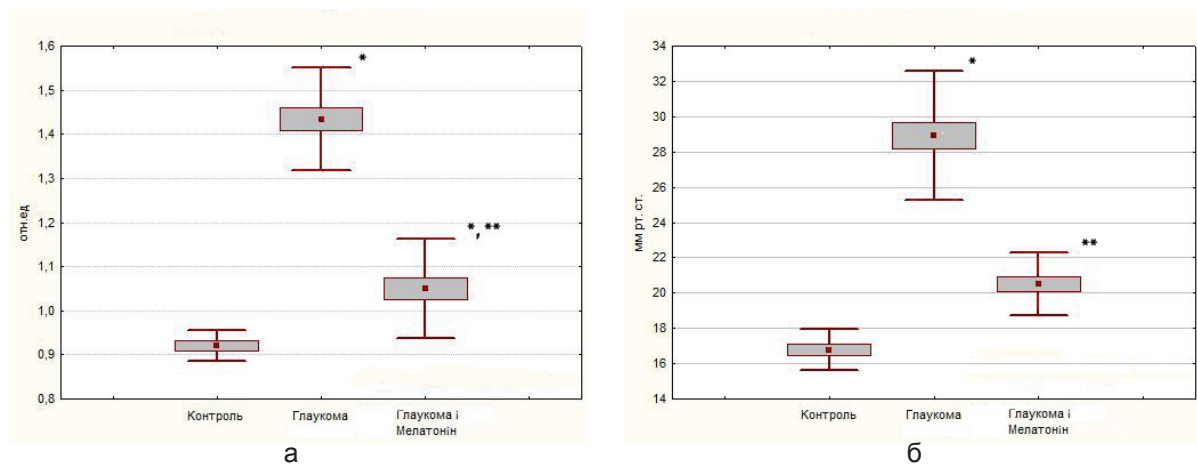


Рис. 3. Індекс збудження для сітківки (а) та внутрішньоочний тиск (б) щурів. \* різниця достовірна відносно значення у контрольних тварин, \*\* різниця достовірна до значення у тварин з глаукомою

в зниженні накопичування в середовищі, яке прилегає до сітківки, збудливого глутамату і аспартату та підвищенні гальмівних ГАМК і гліцину. Зниження у результаті цього впливу ІЗ створює більш фізіологічні умови функціонування нейронів сітківки, забезпечуючи захист нейрооптичного апарату ока при глаукомній нейропатії.

## ВИСНОВКИ

1. При експериментальній глаукомній нейропатії, що індукується хронічним симпатoadреналовим стресом, в екстрацелюлярному просторі ока, яке безпосередньо прилягає до сітківки, розвивається амінокислотний дисбаланс у бік переважання кислот збудливої дії. У тварин з моделлю глаукоми була збільшена концентрація збудливих медіаторів глутамату (на 17,6 %) і аспартату (на 24 %) та одночасно понижена концентрація гальмівних медіаторів ГАМК (на 25 %) і гліцину (на 22,6 %). Ці зміни супроводжувалися зростанням ІЗ сітківки (на 55,4 %) і підвищенням ВОТ (на 69 %).

2. Застосування тваринам з експериментальною глаукомою впродовж 1 міс мелатоніну в дозі 0,1 мг/кг значною мірою нормалізувало амінокислотний медіаторний профіль. Вміст збудливих амінокислот глутамату і аспартату в склоподібному тілі у цих шурів був практично на рівні контрольних значень, а вміст гальмівних амінокислотних медіаторів сітківки підвищувався – ГАМК на 52,8 % і гліцину на 15,8 %. ІЗ знижувався на 27 %. Ці зміни зумовлювали нейропротекторну дію мелатоніну стосовно нейронів сітківки при експериментальній глаукомі, яка супроводжувалась зниженням ВОТ на 28 %.

**И.Н. Михейцева**

### ПРОТЕКТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ У КРЫС

Изучали влияние мелатонина на содержание аминокис-

лотных нейротрансмиттеров сетчатки при глаукомной нейропатии у крыс. Глаукому вызывали длительным системным введением адреналина. В эксперименте участвовало три группы крыс: интактные; с моделью глаукомы; с моделью глаукомы, леченных мелатонином, который вводили на протяжении 1 мес в дозе 0,1 мг/кг. В стекловидном теле, как месте накопления медиаторов сетчатки, определяли свободные аминокислоты методом ионообменной хроматографии. Установлено, что при глаукомной нейропатии, вызванной хроническим адреналиновым стрессом, изменялся нейромедиаторный профиль сетчатки, а именно, увеличивалось содержание возбуждающих аминокислот глутамата и аспартата и снижалось содержание тормозных ГАМК и глицина, приводя к повышению индекса возбуждения на 55 %. Дисбаланс аминокислотных медиаторов в значительной мере нормализовался длительным введением мелатонина. Снижение под его влиянием содержания возбуждающих и повышение тормозных аминокислот привело к снижению индекса возбуждения на 27 % в сравнении с нелеченной группой. Таким образом, уменьшение возбуждающих посылов в сетчатке под влиянием мелатонина может определять его нейропротекторную активность при глаукомной нейропатии.

Ключевые слова: мелатонин, аминокислотные медиаторы, сетчатка, глаукомная нейропатия.

**I.N. Mikheyitseva**

### PROTECTIVE ACTION OF MELATONINE IN EXPERIMENTAL GLAUCOMA IN RATS

We explored the melatonin influence on the level of amino acid neurotransmitters of the retina in glaucoma neuropathy in rats. Glaucoma was caused by the prolong systemic introduction of adrenalin. In the study 3 groups were participated: control animals; the model of glaucoma; the model of glaucoma treated with melatonin (M) in the dose 0,1 mg/ kg during 1 month. In a vitreous body, as place of retina neuromediator accumulation, free amino acids (AA) were determined with the method of ion-exchange chromatography. It was revealed that in adrenalin-induced glaucoma neuropathy the retina mediator profile was changed, namely, exciting glutamate and aspartate levels were increased and inhibit GABA and glycine levels were decreased, resulting in a rise of excitatory index (EI) by 55 %. The disbalance of AA neuromediators to a great extent was normalized by prolonged M introduction. A decrease under M influence of excitatory AA gutamate and aspartate and an increase of inhibitory AA resulted in the decline of EI by 27 % when compared to the untreated group. Thus, reduction of excitatory impuls in retina under influence of M can determine its neuroprotective activity in glaucoma neuropathy.

Key words: melatonin, amino acid mediators, retina, glaucoma neuropathy.

*Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy, Odessa*



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анисимов В.Н. Мелатонин. Роль в организме, применение в клинике. – СПб: Система, 2007. – 40 с.
2. Арушанян Э.Б., Арушанян Л.Г. Модуляторные свойства эпифизарного мелатонина // Пробл. эндокринологии. – 1991. – 37, №3. – С.65–68.
3. Михейцева И.Н. Дисбаланс нейротрансмиттеров сетчатки глаз крыс при экспериментальной глаукомной нейропатии // Нейрофизиология. – 2011. – вып.43, №5. – С.457–459
4. Михейцева І.М. “Спосіб моделювання хронічного підвищеного внутрішньоочного тиску у шурів”, Патент на корисну модель №38446, 2009. – Бюл. №1.
5. Михейцева И.Н. Молекулярные механизмы нейродегенерации в патогенезе первичной глаукомы, ретино-нейропротекция при воздействии на них мелатонина // Тавр. медико-биол. вестник. – 2012. – 15, №3. – ч.1(59). – С.231–234.
6. Alarma-Estrany P., Pintor J. Melatonin receptor in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology // Pharm. Ther. – 2007. – 113, №3 – P.507–522.
7. Carter-Dawson L., Crawford M.L., Harwerth R.S. Vitreal glutamate concentration in monkeys with experimental glaucoma // Invest Ophthalmol. Vis. Sci. – 2002. – 43, №8 – P.2633–2640.
8. Datta P.C., King M.G. Melatonin: effects on brain and behavior // Neurosci. Biobehav. Rev. – 1980. – №4. – P.451–458.
9. Hai Huang, Shu-Chen Lee, Xiong-Li Yang Modulation by melatonin of glutamatergic synaptic transmission in the carp retina // J. Physiol. – 2005. – 569, №3. – P.857–871.
10. Lima A.C., Louzada P.R., De Mello F.G., Ferreira S.T. Neuroprotection against Abeta and glutamate toxicity by melatonin: are GABA receptor involved? // Neurotox Res. – 2003. – №5. – P.323–327.
11. Simonneaux V., Ribelayga Ch. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters // Pharmacol. Rev. – 2003. – 55, №2. – P.325–395.
12. Srinivasan V., Pandi-Perumal S.R., Cardinali D.P. Melatonin in Alzheimer’s disease and other neurodegenerative disorders // Behav. Brain Funct. – 2006. – 2.
13. Tang Q., Hu Y., Ca O.Y. Neuroprotective effect of melatonin on retinal ganglion cells in rats // J. Huazhong Univ. Sci. and Technol. – 2006. – 26, №2. – P.235-237
14. Wamsley S., Gabelt T., Dahl D. Vitreous glutamate concentration and axon loss in monkeys with experimental glaucoma // Arch. Ophthalmol. – 2005. – 123, №1. – P.64–70.

*ДУ “Ін-т очних хвороб і тканинної терапії  
ім. В.П. Філатова” НАМН України  
E-mail: mda@soborka.net*

*Матеріал надійшов до  
редакції 23.10.2012*

І.В. Компанець, О.Г. Короткий, В.В. Нікольська, Л.І. Остапченко, С.В. Пилипенко

## Продукція інтерферону лімфоцитами селезінки й тимуса щурів за умов тривалої гіпоацидності

*Досліджено продукцію інтерферону лімфоцитами тимуса й селезінки щурів при гіпоацидності шлункового соку, змодельованої введенням омепразолу впродовж 28 діб. Показано, що при дії омепразолу в супернатантах клітинних культур тимоцитів і спленоцитів підвищується титр як спонтанного, так і індукованого фітогемаглютиніном А й циклофероном інтерферону, причому ефект є найбільш вираженим для тимоцитів. Це може свідчити про стимуляцію секреції інтерферону клітинами досліджених лімфоїдних органів. Можливо, при гіпоацидності посилюються синтез цитокіну, що може бути реакцією імунної системи на запальний процес у шлунково-кишковому тракті.*

*Ключові слова: інтерферон, лімфоцити, селезінка, тимус, омепразол, гіпоацидність*

### ВСТУП

Гіпергастринемія – патологічний стан, який виникає на тлі гіпоацидності, спровокованої дією інгібіторів  $H^+$ ,  $K^+$ -АТФази плазматичної мембрани парієтальних клітин шлунка, наприклад, омепразолу [9, 11, 16].

Роль цитокінів у механізмах імунної відповіді, що розвивається в організмі при гіпергастринемії на тлі гіпоацидності, досліджена недостатньо. Згідно з літературними даними, за умов гіпоацидності у слизовій шлунка розвивається хронічний запальний процес, при якому утворюються лімфоїдні агрегати, посилюється секреція прозапальних цитокінів, зокрема, інтерферону- $\gamma$  (ІФН- $\gamma$ ) і, меншою мірою фактору некрозу пухлин- $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ) [13]. Попередні дослідження на моделі омепразолвикликаного гіпергастринемії показали підвищення вмісту прозапальних цитокінів (ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$ , інтерлейкіну- $1\beta$  (ІЛ- $1\beta$ )) у сироватці крові щурів [3, 5, 16], у відповідь на запалення в шлунку. Остаточне не з'ясована реакція лімфоїдних органів на розвиток гіпоацидності. Актуально дослідити продукцію ІФН клітинами селезінки й тимуса, які відіграють провідну роль у процесах імунного реагування.

ІФН (I, II і III типів) – родина структурно споріднених цитокінів, які беруть участь у захисті організму від вірусних і бактеріальних інфекцій, мають протипухлинні властивості та викликають потужні імуномодулювальні ефекти: активацію й експансію регуляторних Т-лімфоцитів, стимуляцію продукції антитіл [10, 17].

Метою нашої роботи було дослідити продукцію ІФН лімфоїдними клітинами тимуса й селезінки щурів на тлі гіпоацидності, викликаного 28-добовим впливом омепразолу.

### МЕТОДИКА

Дослідження було проведено на білих нелінійних щурах-самцях віком до 2 міс і масою 170–200 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Експерименти здійснювали згідно з міжнародними рекомендаціями (Страсбург, 1986). Тварин було розділено на 2 групи по 10 тварин у кожній. Шлункову гіпоацидність моделювали введенням омепразолу упродовж 28 діб, оскільки у попередніх дослідженнях було показано, що саме у цей термін у шлунку вперше проявляються цитоморфологічні зміни як реакція на запальний процес, викликаний гіпоацидністю

© І.В. Компанець, О.Г. Короткий, В.В. Нікольська, Л.І. Остапченко, С.В. Пилипенко

[1]. Щурам контрольної групи протягом 28 діб вводили внутрішньоочеревинно 0,2 мл води для ін'єкцій, щурам дослідної групи внутрішньоочеревинно вводили препарат «Омез®» («Dr.Reddy's», Індія) раз на добу у дозі 14 мг/кг (препарат був розчинений у 0,2 мл води для ін'єкцій) [5]. Евтаназію тварин здійснювали дислокацією шийних хребців через добу після останнього введення препарату, видаляли тимус і селезінку, отримували суспензію клітин, використовуючи середовище 199 («Sigma», США). Тимоцити виділяли [6], центрифугуючи суспензію клітин тимуса при швидкості 1500 г упродовж 10 хв. Спленоцити отримували центрифугуванням клітинної суспензії на градієнті Ficoll-Paque (густина 1,077) («Sigma», США) [8]. Визначення кількості життєздатних клітин проводили фарбуванням 0,2%-м трипановим синім у камері Горяєва, життєздатні клітини в усіх експериментах становили не менше ніж 92 %.

Ізольовані з селезінки й тимуса лімфоцити у кількості  $5 \cdot 10^6$  клітин / мл інкубували *in vitro* для індукції ІФН упродовж 24 год при 37°C у 5 мл живильного середовища, яке містило DMEM/F12, 10%-ну ембріональну сироватку теляти, 2 ммоль/л L-глутаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину і канаміцину, 10 мкг/мл флуконазолу. Паралельно лімфоцити інкубували *in vitro* з фітогемаглютиніном А (ФГА) у концентрації 20 мкг/мл і циклофероном у концентрації 50 мкг/мл. Клітини осаджували центрифугуванням при швидкості 200 г упродовж 5 хв, у супернатантах визначали титр сумарного ІФН мікрометодом за пригніченням цитопатогенної дії вірусу везикулярного стоматиту на перевивну культуру фібробластів щурів [15].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили на персональному комп'ютері, оцінку достовірності здійснювали за допомогою програми Statistica 7.0 з використанням критерію t Стьюдента, відмінності вважали достовірними при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було вивчено вплив гіпергастринемії на тлі викликані омепразолом шлункової гіпоацидності на продукцію сумарного ІФН лімфоцитами селезінки й тимуса щурів. У попередніх дослідженнях на моделі гіпоацидності встановлено, що при 28-добовому введенні щурам омепразолу у шлунку тварин з гіпоацидністю виникають дисбіотичні зміни, а у крові зростає концентрація гастрину та вміст ІФН- $\gamma$  [5]. Нами встановлено, що при введенні щурам омепразолу секреція спонтанного ІФН тимоцитами посилюється: його титр у супернатанті їх клітинних культур підвищувався порівняно з контрольною групою у 2,5 раза (рисунок, а). Індукована циклофероном продукція ІФН була більш вираженою у тварин з гіпоацидністю, ніж у контролі. При інкубації ізольованих тимоцитів з цим препаратом досліджуваній показник зростав відносно спонтанного ІФН на 163 % у контрольній групі та у 2 рази у дослідній. Індукована фітогемаглютиніном (ФГА) продукція ІФН тимоцитами змінювалася протилежним чином: була більшою у контролі порівняно з гіпоацидністю. Титр ІФН у супернатанті клітинної культури тимоцитів, інкубованих з ФГА, збільшувався відносно спонтанного ІФН на 138 % у тварин контрольної та на 50 % у щурів дослідної груп відповідно.

Дослідження впливу омепразолу на лімфоцити селезінки щурів показало, що продукція ІФН цими клітинами посилюється, але в лімфоцитах тимуса вона стимулюється набагато більше. Титр спонтанного ІФН у супернатанті клітинної культури спленоцитів щурів, яким вводили омепразол, підвищувався на 31 % (див.рисунок, б). Водночас як для тимоцитів цей показник збільшувався на 150 %. Індукована обома використаними препаратами (циклофероном і ФГА) продукція цього цитокіну спленоцитами була більш вираженою при дії омепразолу, ніж у контролі.

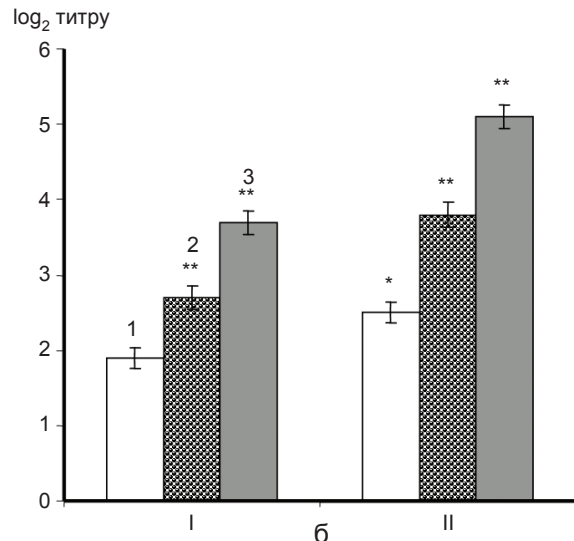
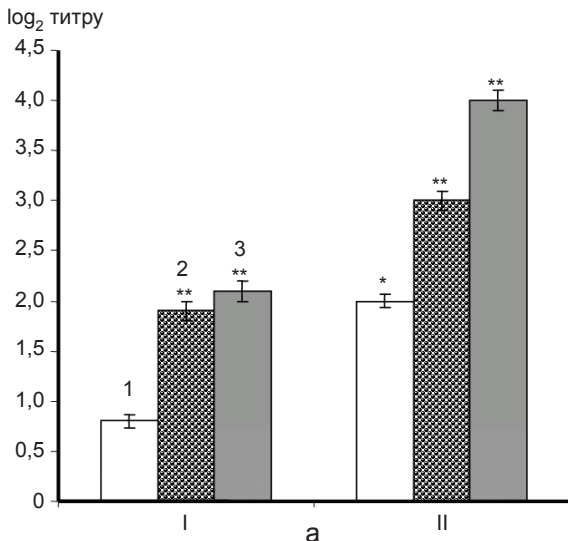
При інкубації з циклофероном титр ІФН у супернатантах клітинних культур спленоци-

тів щурів контрольної групи збільшувався на 95 % відносно спонтанного ІФН, а в тварин з гіпоацидністю – на 104 %. Інкубація цих клітин з ФГА призводила до збільшення досліджуваного показника на 42 % у контролі та 52 % при гіпоацидності.

Таким чином, ми показали, що у щурів при шлунковій гіпоацидності, яка викликана введенням омепразолу, посилюється секреція сумарного ІФН лімфоцитами тимуса й селезінки. Було виявлено підвищення титру не тільки індукovanого, а й спонтанного ІФН. Імовірно, процеси, які виникають в організмі у відповідь на гіпоацидність, індують синтез ІФН у клітинах лімфоїдних органів. До того ж, за цих умов підвищується здатність лімфоїдних клітин виробляти ІФН у відповідь на індукцію (дію циклоферону та ФГА). Отже, ми припускаємо, що в тимоцитах і спленоцитах при дії омепразолу стимулюється синтез ІФН. На користь цього свідчать експериментальні дані, отримані іншими авторами, які проводили дослідження на мишах: було показано, що при гіпохлоргідрії у 12 разів посилюється експресія ІФН- $\gamma$  у лімфоцитах слизової шлунка [13].

На нашу думку, синтез ІФН лімфоцитами при гіпоацидності посилюється внаслідок розвитку дисбактеріозу. Як було показано на обраній нами моделі гіпоацидності, в результаті тривалого пригнічення омепразолом шлункової секреції у шлунку з'являється умовно-патогенна мікрофлора [5, 7]. У відповідь на це в лімфоцитах слизової вірогідно стимулюється синтез ІФН. Експериментально підтверджено, що компоненти клітинної стінки бактерій, взаємодіючи з Toll-подібними рецепторами на лімфоцитах, індують синтез ІФН- $\gamma$  [18]. Не виключено, що запальний процес, котрий, як було показано Вороніною та співавт. [1], виникає при зміні складу шлункової мікрофлори, впливає на стан клітин лімфоїдних органів.

Ми також припускаємо, що секреція ІФН тимоцитами і спленоцитами щурів підвищується в результаті дії самого гастрину. Експериментально доведено посилення його синтезу в G-клітинах шлунка при зниженні секреції соляної кислоти [11]. Цей гормон є фактором росту шлункового епітелію і також викликає розвиток запалення. На обраній нами моделі омепразолвикликаній



Титр інтерферону (ІФН) у супернатантах клітинних культур лімфоцитів тимуса (а) і селезінки (б) щурів із гіпоацидністю шлункового соку, викликаню 28-добовим введенням омепразолу: I – тварини контрольної групи; II – тварини, яким вводили омепразол; 1 – без індуктора, 2, 3 – лімфоцити інкубували *in vitro* з фітогемаглютиніном А і з циклофероном відповідно. \*P<0,05 порівняно з контролем (клітини інтактних тварин), \*\*P<0,05 порівняно з клітинами, не інкубованими з індукторами ІФН

гіпергастринемії продемонстровано гіперплазію парієтальних клітин слизової оболонки шлунка на тлі запалення [1]. Згідно з даними літератури, метапластичні зміни у слизовій шлунка супроводжуються розповсюдженням запальних інфільтратів і посиленням експресії ІФН- $\gamma$  у лімфоцитах [12]. У мишей при хронічному запаленні шлункового епітелію внаслідок гіпохлоргідрії посилюється секреція ІФН- $\gamma$  [13]. Останній індукує експансію клітин фундального відділу шлунка, що в решті-решт призводить до гіперплазії [13].

Крім вищезгаданого, ми пов'язуємо стимуляцію продукції ІФН лімфоцитами тимуса і селезінки щурів з гіпоацидністю з підвищенням вмісту прозапальних цитокінів ІФН- $\gamma$ , ФНП- $\alpha$ , та ІЛ-1 $\beta$  у сироватці крові, яке було показано у попередніх дослідженнях [3, 5, 16]. Лімфоцити, які інфільтрують у шлунок у відповідь на запалення, зумовлене дисбактеріозом, секретують прозапальні цитокіни. Результатом цього є поява у кровотоці ІФН- $\gamma$ , ФНП- $\alpha$ , та ІЛ-1 $\beta$ . Це, ймовірно, призводить до змін функціонального стану лімфоїдних органів (тимуса й селезінки), проявом яких є посилення продукції ІФН їх клітинами.

Слід зазначити, що стимуляція секреції ІФН лімфоцитами тимуса і селезінки може відбуватися за різними механізмами. Відомо, що тимус дуже чутливий до зрушень в імунонейроендокринній системі, особливо до змін вмісту різних цитокінів в організмі та гормонального фону [2]. На нашу думку, порушення складу шлункової мікрофлори і зміна продукції цитокінів, при гіпоацидності, впливає на стан тимоцитів, внаслідок чого посилюється секреція ними ІФН. Показано, що при тривалій дії омепразолу у тимусі підвищувався відносний вміст лімфоїдних клітин поряд зі зменшенням відносної маси органа [4]. Автори пов'язували такі зміни з посиленням проліферації Т-лімфоцитів, які будуть надходити в органи периферичної імунної системи для участі в імунній відповіді. Отже, лімфоцити тимуса реагують на запальний процес, що виникає на тлі гіпоа-

цидності внаслідок дисбактеріозу у шлунку, виробляючи підвищені кількості ІФН. Можливо, це буде одним з ініціюючих факторів запуску процесів імунного реагування, пов'язаного з тимусозалежними зонами вторинних лімфоїдних органів.

Селезінка – вторинний лімфоїдний орган, який є головним джерелом циркулюючих лімфоцитів [2]. Вона є високочутливою до змін імунологічного статусу організму. Ми показали, що при гіпоацидності посилюється секреція спонтанного та індукованого ІФН спленоцитами щурів, хоча є менш вираженою (на 31 %), ніж для тимоцитів (на 150 %). Це узгоджується з даними, що були отримані в попередній роботі [4]: при 28-добовій дії омепразолу у щурів спостерігаються помірно збільшення селезінки та зростання вмісту в ній лімфоїдних клітин.

Можливо, процеси, які ініціюються чужорідними антигенами при дисбактеріозі внаслідок гіпоацидності (зокрема, продукція прозапальних цитокінів, посилення міграції дозрілих Т-лімфоцитів з тимуса, підвищення продукції ІФН- $\gamma$ ) призводять до активації імунної відповіді. Це проявляється у стимуляції вироблення ІФН лімфоцитами селезінки та, ймовірно, супроводжується експансією на периферію лімфоцитів, сенсibiliзованих антигенами.

Таким чином, підвищення секреції ІФН лімфоцитами на омепразолвикликаній моделі гіпоацидності слід вважати реакцією імунної системи на запальний процес у шлунку, до якої залучені не тільки клітини лімфоїдної тканини, асоційованої зі шлунком, а й клітини лімфоїдних органів тимуса й селезінки.

**И.В. Компанец, О.Г. Короткий,  
В.В. Никольская, Л.И. Остапченко,  
С.В. Пилипенко**

#### **ПРОДУКЦИЯ ИНТЕРФЕРОНА ЛИМФОЦИТАМИ СЕЛЕЗЕНКИ И ТИМУСА КРЫС ПРИ УСЛОВИИ УСЛОВНОЙ ГИПОАЦИДНОСТИ**

Исследована продукция интерферона лимфоцитами тимуса и селезенки крыс при гипoaцидности желудочного сока,



моделюємою введенням омепразола в течение 28 сут. Показано, що при действии омепразола в супернатантах клеточных культур тимоцитів и спленоцитів підвищується титр як спонтанного, так и індуцированного фітогемаглютиніном А и циклофероном інтерферона, причем ефект являється найбільше вираженим для тимоцитів. Это свідечує о стимуляції секреції інтерферона клетками изучених лімфоїдних органів. При гіпоацидності посилюється синтез цитокина, что может быть реакцией иммунной системы на воспалительный процесс в желудочно-кишечном тракте.  
Ключевые слова: інтерферон, лімфоцити, селезенка, тимус, омепразол, гіпоацидність.

**I.V. Kompanets, O.G. Korotkiy, V.V. Nikolska,  
L.I. Ostapchenko, S.V. Pilipenko**

### THE INTERFERON PRODUCTION BY RAT SPLEEN AND THYMUS LYMPHOCYTES IN CONDITONS OF HYPOACIDITY

The interferon production by rat spleen and thymus lymphocytes in conditions of gastric juice hypoacidity, evoked by 28 days of omeprazole treatment, was studied. It was shown that the spontaneous and induced by PHA and cycloferone interferon titer increases in thymocyte and spleenocyte cell cultures under the action of omeprazole. This effect was more expressed in thymocytes. It might be a result of stimulation of interferon secretion by lymphoid cells. Probably the interferon synthesis intensifies in conditions of hypoacidity. This effect may be considered as the reaction of immune system on inflammation in gastro-intestinal tract.

Key words: interferon, lymphocytes, spleen, thymus, omeprazole, hypoacidity.

*SSC Institute of Biology Taras Shevchenko National Medical University, Kyiv*

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вороніна О.К., Гришук В.М. Динаміка змін в слизовій оболонці шлунка щурів при гіпергастринемії різної тривалості // Тези доп. III Всеукр. наук. конф. «Психологічні та вісцеральні функції в нормі і патології». – К., 4–6 жовтня 2006 р. – С. 24.
2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – Одесса: Астропринт, 1999. – 603 с.
3. Короткий О.Г., Карповець Т.П., Пилипенко С.В., Берегова Т.В., Остапченко Л.І. Концентрація фактору некрозу пухлин альфа в сироватці крові щурів з тривалою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотиків // Мед. хімія. – 2009. – 11, № 4. – С. 89–91.
4. Короткий О.Г., Пилипенко С.В., Компанець І.В., Остапченко Л.І. Реакція лімфоїдних органів щурів на ве-

дення мультипробіотика «Симбітер» ацидофільний» концентрований за умов тривалого зниження шлункової секреції соляної кислоти // Вісн. проблем біології і медицини. – 2010. – Вип. 3. – С. 55–60.

5. Короткий О., Пилипенко С., Цирюк О., Остапченко Л., Берегова Т. Вплив мультипробіотиків на вміст інтерферону-гамма в сироватці крові щурів за умов тривалої гіпоацидності // Вісн. Київ. нац. ун-ту. Біологія. – 2009. – вип. 54. – С. 47–49.
6. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Иммунологическая функция тимуса // Успехи совр. биологии. – 1985. – 97, № 1. – С. 36–49.
7. Цирюк О.І., Берегова Т.В. Вплив омепразол-викликаної гіпергастринемії на базальну шлункову секрецію у щурів // Вісн. проблем біології і медицини. – 2007. – Вип. 3. – С. 38–43.
8. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // Scand. J.Clin. Lab. Invest. – 1968. – 21. – P. 28–30.
9. Brett S. Science review: The use of proton pump inhibitors for gastric acid suppression in critical illness // Critical Care. – 2005. – 9. – P. 45–50.
10. Content J. Mechanisms of induction and action of interferons // Verh. K. Acad. Geneesk. Belg. – 2009. – 71, № 1–2. – P. 51–71.
11. Creutzfeldt W., Lamberts R. Is hypergastrinaemia dangerous to man? // Scand. J. Gastroenterol. – 1991. – 180. – P. 179–191.
12. Jain R.N., Al-Menhali A.A., Keeley Th.M., Ross T.S., Chew C.S. and Samuelson L.C. Hypergastrinemia and hypertrophic gastritis in Hip1r-deficient mice // The FASEB J. – 2007. – 21. – P. 925–930.
13. Kang W., Rathinavelu S., Samuelson L.C., Merchant J.L. Interferon gamma induction of gastric mucous neck cell hypertrophy // Lab. Invest. – 2005. – 85, № 5. – P. 702–715.
14. Korotkiy O., Karpovets T., Pilipenko S., Bereгова T., Ostapchenko L. Proinflammatory cytokines concentrations in blood serum of rats with the long-term suppression of gastric secretion of hydrochloric acid in conditions of injection of probiotic // 35th FEBS Congress Goteborg (Gothenburg), Sweden, June 26 – July 1, 2010. – P. 65.
15. Nikolskaya V.V., Nikolskii I.S., Shulkevich T.P. Stimulation of the interferon synthesis in mice with various tumors by the thymic factor thymoinduction // 3rd Balkan Congress of Immunology. – Athens, Greece, 2001. – P. 77.
16. Prewett E.J., Hudson M., Nwokolo C.U., Sawyerr A.M., Pounder R.E. Nocturnal intragastric acidity during and after a period of dosing with either ranitidine or omeprazole // Gastroenterology. – 1991. – 100, № 4. – P. 873–877.
17. Takaoka A., Yanai H. Interferon signalling network in innate defence // Cell. Microbiol. – 2006. – 8, № 6. – P. 907–922.
18. Uematsu S., Akira S. Toll-like receptors and type I interferons // J. Biol. Chemistry. – 2007. – 282, № 21. – P. 15319–15324.

*ННЦ Ін-т біології Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка  
E-mail: ir\_kot@ukr.net*

*Матеріал надійшов до редакції 14.12.2012*

Ю.О. Тіщенко, В.В. Кірошка

## Динаміка морфогенезу і функціонального розвитку алотрансплантата оваріальної тканини щурів

*В організмі кастрованих тварин-реципієнтів після алотрансплантації оваріальної тканини досліджували динаміку її фолікулогенезу та ендокринну функцію протягом 100 діб. Встановлено, що ріст і розвиток оваріальної тканини, а також її стероїдогенна функція при гетеротопічній трансплантації визначається її початковою морфологічною організацією. При алотрансплантації статевозрілої оваріальної тканини виявлено збереження її морфологічної структури, тоді як при трансплантації неонатальної оваріальної тканини відзначалося формування фолікулярних кіст. На 100-ту добу спостереження у кастрованих тварин-реципієнтів спостерігали відновлення вмісту статевих гормонів до фізіологічної норми при трансплантації як статевозрілої оваріальної тканини, так і неонатальної тканини 10-ї доби постнатального розвитку.*

*Ключові слова: неонатальні яєчники, трансплантація, оваріоектомія, реципієнт, морфологічний розвиток.*

### ВСТУП

У сучасній фізіології репродукції одним з найбільш не вивчених механізмів залишається гістогенез оваріальної тканини, оскільки практично відсутні дані про фактори, що контролюють цей процес. Згідно з сьогодинішнім уявленням, морфологічний розвиток оваріальної тканини у щурів завершується в ранній постнатальний період [1]. Яєчники щурів 1-ї доби після народження представлені гетерогенними типами клітин: первинними статевими (оогоніями), епітеліальними та мезенхімальними. Упродовж перших тижнів після народження щурів у яєчниках відбувається комплекс трансформацій, а саме міграція і диференціація клітин, у результаті чого формується пул примордіальних фолікулів [9]. Утворення фолікулярної одиниці в ранній постнатальний період контролюється багатьма ендокринними, паракринними і аутокринними факторами, тонка координація яких регулює численність фолікулів в яєчниках, що надалі визначає репродуктивну функцію у статевозрілих тварин [7].

Одним із сучасних експериментальних методів *in vivo*, який дає змогу вивчити ріст, морфологічний розвиток і функціонування оваріальної тканини неоднакових стадій гістогенезу в умовах різного ендокринного оточення, є гетеротопічна трансплантація [12]. Нині у літературі існують суперечливі дані про можливість повноцінного розвитку неонатальної оваріальної тканини при порушенні ендокринної та паракринної регуляції, а саме в організмі статевозрілого реципієнта при гетеротопічній трансплантації [5].

Також залишаються відкритими питання про значення стадії морфологічного розвитку оваріальної тканини для її тривалого функціонування в організмі статевозрілої особини.

Метою нашої роботи було визначити динаміку фолікулогенезу алотрансплантатів оваріальної тканини, різної за морфологічним розвитком, а також їх ендокринну функцію в організмі кастрованих тварин-реципієнтів упродовж тривалого спостереження.

## МЕТОДИКА

Експерименти проведено на 72 самицях щурів лінії Вістар віком 3 міс, масою 120–165 г, які перебували в стандартних умовах віварію ІПКіК НАН України. Утримання та використання лабораторних тварин відповідало положенням «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986) і загальноприйнятим Національним нормам біоетики [15].

Тварини були розділені на 4 групи. До I групи ввійшли щури, яким трансплантували статевозрілу оваріальну тканину, до II, III і IV – неонатальну оваріальну тканину 1-, 3- і 10-ї доби постнатального розвитку відповідно. Контролем були інтактні тварини та тварини з двобічною оваріоектомією.

Операції тваринам проводили в стерильних умовах під комбінованим наркозом (кетамін – 0,1 мг, ксилазін – 0,25 мг на 100 г маси тіла), який вводили внутрішньоочеревинно.

Усім тваринам трансплантацію оваріальної тканини здійснювали одночасно з двобічною оваріоектомією. Для трансплантації статевозрілої оваріальної тканини яєчники фрагментували (до 1 мм<sup>3</sup>) і трансплантували по 3–4 фрагменти. Неонатальні яєчники виділяли на 1-, 3- або 10-ту добу після народження щурів та трансплантували за допомогою мікроскопа МБС-10 з холодним освітленням операційного поля.

Сайтом гетеротопічної трансплантації була капсула лівої нирки, оскільки вона є ідеальним місцем для трансплантації оваріальної тканини [18] у зв'язку з тим, що має інтенсивне кровопостачання. Вибір саме лівої нирки зумовлений її анатомічною рухливістю та зручністю для проведення процедури трансплантації. Час проведення трансплантації становив 30 хв. На 30-ту і 100-ту добу після трансплантації здійснювали евтаназію тварин за допомогою ефірного наркозу.

Для аналізу стероїдогенної функції трансплантатів оваріальної тканини внутріш-

ньосерцевою пункцією брали кров, центрифугували її при 3000 г 20 хв для отримання плазми. Вміст естрадіолу, прогестерону та тестостерону в плазмі крові тварин-реципієнтів визначали методом радіоімунологічного аналізу з використанням стандартних тест-наборів РІА-естрадіол-СТ I РІА-прогестерон-СТ (Білорусь) згідно з інструкцією.

Для морфологічних досліджень виділяли нирку з трансплантатом. Фіксували їх в 10-відсотковому розчині формаліну протягом 48 год, дегідрували і поміщали в парафінові блоки [8]. З кожного зразка робили серійні зрізи всього трансплантата товщиною 10 мкм. Кожен третій зріз фарбували гематоксилін-еозинном. Аналізували гістологічні зрізи, вивчаючи тільки фолікули з видимим ядром ооцита для виключення повторного рахунку одного і того ж фолікула в аналізованому зрізі.

Ідентифікацію стадії розвитку фолікулів здійснювали згідно з класифікацією Oktay [9], модифікованою Gougeon [10]:

примордіальний – ооцит оточений одним шаром сплосчених гранульозних клітин;

первинний – ооцит оточений поодиноким шаром кубічних клітин гранульози;

преантральний – ооцит оточений більш ніж двома шарами гранульозних клітин, розташованих на базальній мембрані, навколо якої знаходяться поодинокі тека-клітини;

антральний – ооцит збільшений в об'ємі, оточений кількома шарами гранульозних клітин, формується порожнина, яка містить фолікулярну рідину

Дослідження гістологічних препаратів здійснювали за допомогою світлового мікроскопа при збільшеннях об'єктива у 20 і 40 разів. Мікрофотографії робили за допомогою мікроскопа Carl Zeiss Axio спостерігача Z1 і пакета прикладних програм для обробки зображення. Морфометрію аналізували за допомогою комп'ютерної програми AxioVision. Здійснювали вимірювання загальної площі зрізів трансплантатів і площі функціонуючої тканини, а також визначали фолікулярну щільність як кількість фолікулів на одиницю



площі функціонуючої тканини. Структуру естрального циклу вивчали за цитологією щоденних ранкових вагінальних мазків [3].

Статистичний аналіз був проведений за допомогою пакетів програм Microsoft Office 2003 Excel з використанням критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис.1 представлена морфологія оваріальної тканини на 30-ту добу після трансплантації. Видно, що структура тканини алотрансплантатів має якісні відмінності залежно від початкової морфологічної організації яєчників. Так, при трансплантації фрагментів статевозрілої оваріальної тканини (І група) на 30-ту добу спостерігалася структура морфологічно відповідна нормі яєчників (рис. 1,а). Відзначено фолікули різного ступеня зрілості, характерні як для ранніх стадій фолікулогенезу (примордіальні та первин-

ні), так і для більш пізніх (преантральні та антральні), а також жовті тіла.

При трансплантації неонатальних яєчників на 30-ту добу у всіх тварин відзначався розвиток фолікулярних кіст різного розміру (рис. 1,в,в,г). Морфологічно кісти являли собою порожнини з прозорим або зі слабо забарвленим еозином секретом, оточені кількома шарами витягнутих фібробластоподібних клітин. Слід зазначити, поряд з фолікулярними кістами наявні ділянки тканини, морфологія якої характерна для яєчників статевозрілих тварин (див. рис. 1,б,в,г). На гістологічних препаратах відзначалися як примордіальні, так і зростаючі фолікули діаметром  $167,77 \text{ мкм} \pm 20,85 \text{ мкм}$  (преантральні фолікули) і  $358,55 \text{ мкм} \pm 57,91 \text{ мкм}$  (антральні фолікули). Відповідно до морфометричного аналізу (таблиця), площа оваріальної тканини зі структурними елементами, відповідними фізіологічній нормі, при трансплантації яєчників 3-ї і 10-ї доби постнатального роз-

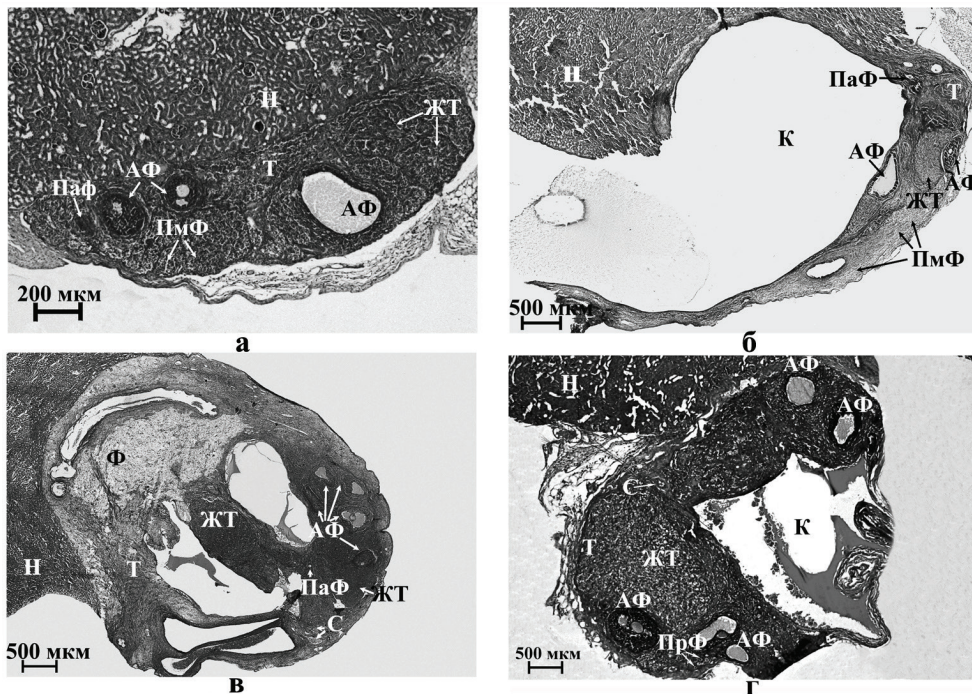


Рис. 1. Морфологія трансплантатів оваріальної тканини на 30-ту добу спостереження: а – трансплантати статевозрілої оваріальної тканини, б, в, г – трансплантати оваріальної тканини 1, 3 і 10-ї доби відповідно; ПмФ – примордіальний фолікул, ПаФ – преантральний фолікул, АФ – антральний фолікул, ЖТ – жовте тіло, С – судина, К – кіста, Ф – фіброз, Н – нирка, Т – трансплантат

витку (III і IV групи) була подібна такої при трансплантації статевозрілих яєчників (I група), тоді як при трансплантації яєчників 1-ї доби постнатального розвитку (II група) площа цієї ділянки тканини була в 5-6 разів меншою. При цьому кількість фолікулів на одиницю площі функціонуючої тканини в цих групах не мала достовірних відмінностей і становила  $111,80 \pm 25,72$  (II група),  $69,43 \pm 19,15$  (III група) та  $90,58 \pm 12,68$  (IV група).

Аналіз ендокринної функції трансплантатів показав, що на 30-ту добу спостереження

концентрація естрадіолу та прогестерону у тварин I групи знаходяться в межах фізіологічної норми, тоді як у тварин усіх інших груп ці показники були достовірно нижчими від значень інтактних тварин, проте істотно вищими у порівнянні зі значеннями тварин після оваріоектомії (рис. 2).

У разі цитологічного аналізу вагінальних мазків виявлено наявність епітеліальних і ороговілих клітин, характерних для стадій проєструсу та еструсу, у тварин I групи вже на 12–14-ту добу, у тварин III і IV груп – на

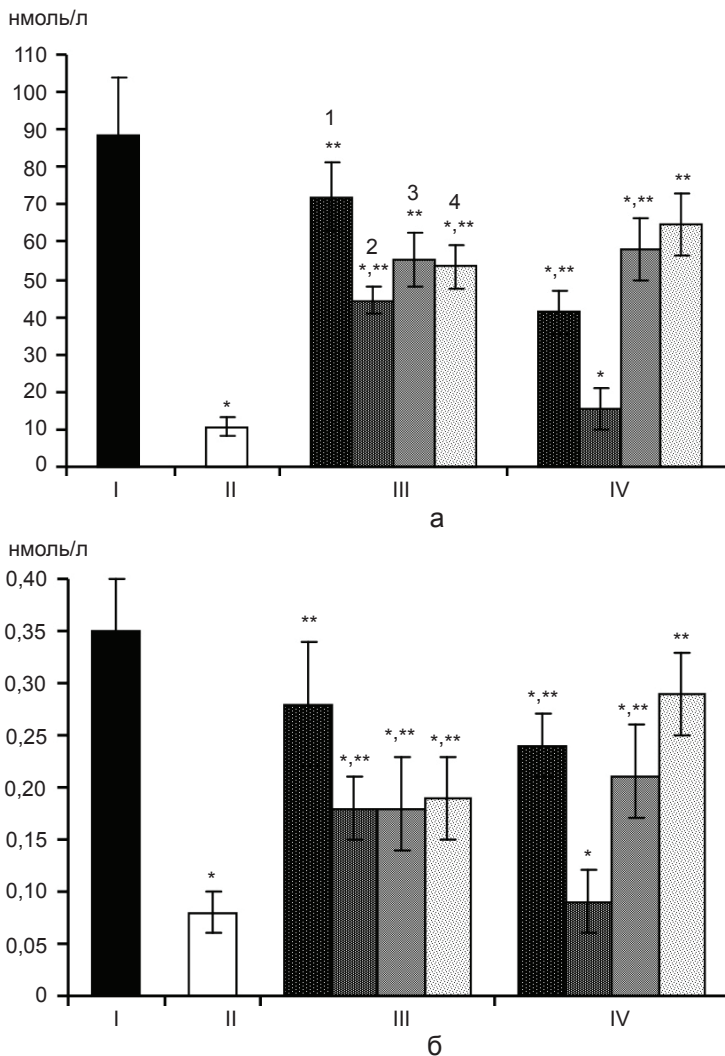


Рис. 2. Концентрація естрадіолу (а) та прогестерону (б) у тварин, яким трансплантували статевозрілу оваріальну тканину (1), неонатальну оваріальну тканину 1-ї доби (2), 3-ї доби (3) та 10-ї доби (4) постнатального розвитку на 30-ту (III) і 100-ту добу спостереження; I – інтактні тварини, II – тварини після оваріоектомії. \* $P < 0,05$  відносно значень у інтактних тварин, \*\* $P < 0,05$  відносно значень тварин після оваріоектомії



12–15-ту добу, тоді як у тварин II групи – лише на 17–20-ту добу після трансплантації. Слід зазначити, що у тварин I, III і IV груп спостерігалось циклічне чергування стадій естрального циклу на відміну від самиць II групи.

Ріст і розвиток трансплантатів оваріальної тканини залежно від початкової морфологічної організації на тривалих строках після трансплантації (100 дб) представлено на рис. 3. На 100-ту добу трансплантати статевозрілої оваріальної тканини продовжували розвиватись і зберігати морфологічну структуру, відповідну фізіологічній нормі (див. рис. 3,а). Проте площа функціонуючої тканини та кількість фолікулів на її одиницю (див. таблицю) були значно нижчими у порів'янні з 30-ю добою спостереження у цій групі тварин. Морфологічна структура трансплантатів неонатальних яєчників на тривалих строках залежала від термінів постнатального розвитку оваріальної тканини. На

100-ту добу у тварин II групи трансплантати були представлені склерозованою тканиною, тоді як у тварин III і IV групи відзначалося збільшення площі функціонуючої тканини порівняно з раннім терміном спостереження внаслідок утворення значної кількості жовтих тіл і зниження розмірів фолікулярних кіст (див. рис. 3,в,г). Згідно з результатами, представленими у таблиці, фолікулярна щільність у трансплантатах тварин IV групи була подібною до такої у тварин I групи.

Вивчення ендокринної функції на 100-ту добу спостереження показало, що вміст естрадіолу і прогестерону тільки у тварин після трансплантації неонатальної оваріальної тканини 10-ї доби постнатального розвитку (IV група) був у межах фізіологічної норми ( $0,29 \pm 0,04$  і  $64,74$  нмоль/л  $\pm 8,33$  нмоль/л відповідно; див. рис. 2). Слід зазначити, що концентрації статевих гормонів у тварин після трансплантації як статевозрілої, так і неонатальної оваріальної тканини 3-ї доби (I і III

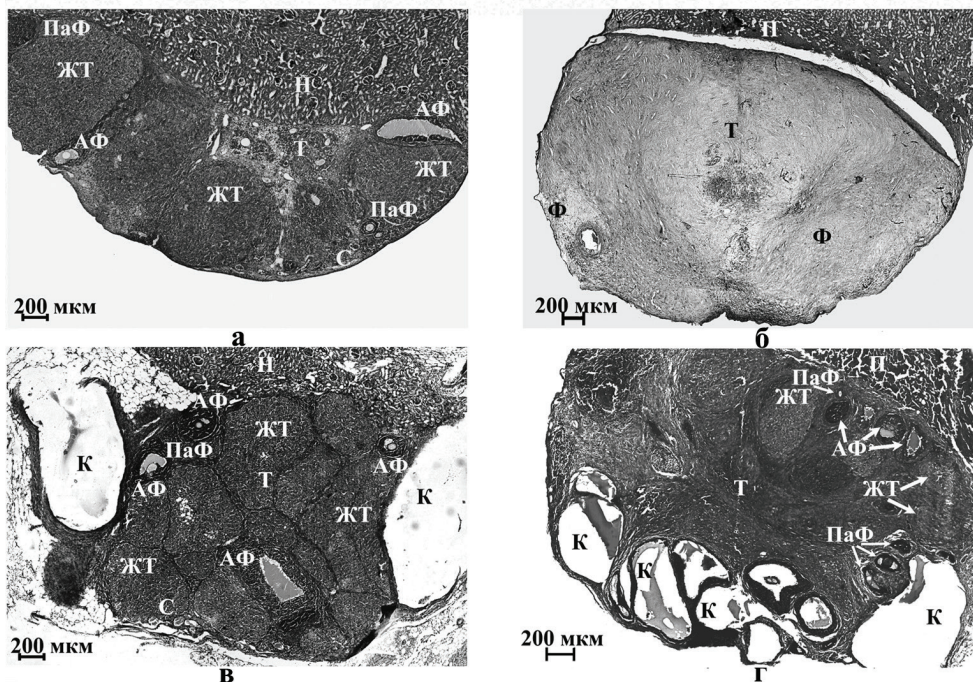


Рис. 3. Морфологія трансплантатів оваріальної тканини на 100-ту добу спостереження: а – трансплантати статевозрілої оваріальної тканини, б, в, г – трансплантати оваріальної тканини 1, 3 і 10-ї доби відповідно; ПмФ – примордіальний фолікул, ПаФ – преантральний фолікул, АФ – антральний фолікул, ЖТ – жовте тіло, С – судина, К – кіста, Ф – фіброз, Н – нирка, Т – трансплантат

групи) були достовірно вищими від значень щурів після оваріоектомії. Тоді як у тварин, яким трансплантували неонатальні яєчники 1-ї доби (II група), ці показники були в межах значень кастрованих щурів ( $0,09 \pm 0,03$ ,  $15,50$  нмоль/л  $\pm 5,74$  нмоль/л відповідно).

Цитологічний аналіз вагінальних мазків показав, що упродовж 100 діб естральний цикл тривалістю 6–8 діб зберігався у всіх тварин I і IV груп, а також у 30 % тварин III групи, тоді як у більшості тварин II групи спостерігався ациклічний характер естрального циклу.

Наші результати вказують на те, що динаміка росту і розвитку оваріальної тканини, а також її стероїдогенна функція в умовах гетеротопічної трансплантації залежать від її початкової морфологічної організації. Так, характерною рисою морфологічного розвитку неонатальних яєчників (II, III і IV групи) після їх трансплантації статевозрілим тваринам було утворення фолікулярних кіст (див. рис. 1, 3). Цей факт, вочевидь, можна пояснити порушенням ендокринної регуляції на завершальних стадіях гістогенезу неонатальної оваріальної тканини в умовах гетеротопічної трансплантації, а саме виникненням гормонального дисбалансу гіпофізарних і статевих гормонів. З одного боку, в наших експериментальних умовах виникає дефіцит фолікулолестимулювальних гормонів (ФСГ),

потрібний для формування пулу примордіальних фолікулів [16]. Так, у нормі його вміст у 8–16-добових щурів у кілька разів вищий, ніж у статевозрілих [8]. З іншого боку, в такій постановці експерименту ми маємо відхилення від концентрацій статевих гормонів, необхідних для формування неонатальної оваріальної тканини. Наприклад, підвищений вміст фетальних андрогенів призводить не тільки до розвитку полікістозних яєчників, а й до виснаження фолікулярного пулу, оскільки спостерігається атрезія на стадії утворення преантрального фолікула [17]. Згідно з даними Kezele та Skinner [11], підвищена концентрація естрадіолу в ранній постнатальний період призводить до зміни морфології яєчників, а саме до зменшення загального фолікулярного пулу, гіперплазії стромальних елементів і виникнення полікістозних утворень. Прогестерон інгібує апоптоз у неонатальній оваріальній тканині та пов'язаний з цим процес трансформації примордіальних фолікулів у первинні [11].

Динаміка розвитку неонатальних яєчників в організмі статевозрілих тварин, що показана в нашій роботі, а саме формування фолікулярних кіст, також є характерною рисою для трансгенної лінії мишей, в яких спостерігається дефіцит рецепторів до ФСГ [16], та для мишей з мутацією  $\alpha$ -субодиниць естрогенчутливих рецепторів [4]. Отже, мож-

**Морфометричні показники трансплантатів оваріальної тканини на 30-ту і 100-ту добу спостереження**

Трансплантати	Площа зрізу трансплантатів, мм <sup>2</sup>		Площа функціонуючої тканини, мм <sup>2</sup>		Фолікулярна щільність	
	30 діб	100 діб	30 діб	100 діб	30 діб	100 діб
Статевозрілої оваріальної тканини	3,15 $\pm$ 1,6	1,96 $\pm$ 0,63	3,15 (100%)	1,17 (60 %)	50,48 $\pm$ 7,45	18,71 $\pm$ 1,45
Неонатальної оваріальної тканини						
1-ї доби	8,05 $\pm$ 1,75	3,24 $\pm$ 1,74	0,56 (7 %)	0	111,80 $\pm$ 15,72	0
3-ї доби	6,94 $\pm$ 0,49	6,56 $\pm$ 4,72	3,05 (44 %)	4,26 (65 %)	69,43 $\pm$ 9,15	12,08 $\pm$ 2,58
10-ї доби	5,35 $\pm$ 3,45	7,83 $\pm$ 3,54	2,78 (52 %)	7,83 (100%)	90,58 $\pm$ 12,68	20,22 $\pm$ 1,73

на припустити, що утворення фолікулярних кіст у трансплантах неонатальних яєчників зумовлено гормональним дисбалансом, який в свою чергу, призводить до порушення регуляції гістогенезу оваріальної тканини.

Аналізуючи представлені вище експериментальні результати, слід вказати на те, що при трансплантації яєчників 3-ї та 10-ї доби постнатального розвитку на 30-ту добу на гістологічних препаратах площа функціонуючої тканини в кілька разів вище, ніж при трансплантації неонатальних яєчників 1-х діб постнатального розвитку (див. таблицю). Збільшення термінів спостереження до 100 діб призвело до більш виражених морфологічних відмінностей трансплантатів у тварин II, III і IV груп (рис. 3). Якісні відмінності росту та розвитку неонатальних яєчників різних термінів гістогенезу в умовах трансплантації статевозрілим тваринам-реципієнтам, очевидно, можна пояснити порушенням регуляції процесу утворення пулу одиничних примордіальних фолікулів під час розриву кластерів, який відбувається протягом перших 48 год після народження тварини [18]. Ймовірно, значно більший пул фолікулів у неонатальних яєчниках у тварин III і IV груп зумовлений тим, що розрив кластерів і формування основного пулу фолікулів, а також диференціація клітин гранульози відбулися в організмі неонатальної тварини до моменту їх трансплантації. Це і визначило динаміку фолікулогенезу, а також стероїдогенну функцію трансплантатів оваріальної тканини в тривалому періоді. Слід зазначити, що у тварин IV групи відновлюється гормональний статус до фізіологічної норми до 100-ї доби спостереження.

Аналіз динаміки розвитку статевозрілої оваріальної тканини при гетеротопічній трансплантації виявив збереження її морфологічної структури та ендокринної функції на всьому терміні спостереження (до 100 діб), що, цілком імовірно, пов'язано з відновленням як мікроциркуляторного русла, так і нейроендокринної регуляції.

На закінчення, можна сказати, що зростання, розвиток і ендокринна функція оваріальної тканини в умовах гетеротопічної трансплантації визначається її морфологічною організацією, з одного боку, і гормональною регуляцією, з іншого. При алотрансплантації статевозрілої оваріальної тканини зазначалося збереження її морфологічної структури і відновлення гормонального статусу тварин-реципієнтів за весь період спостереження. У разі трансплантації неонатальної оваріальної тканини виявлені відхилення її морфологічного розвитку від фізіологічної норми на початковому етапі (30 діб), а саме формуються фолікулярні кісти, які характеризують виникнення гормонального дисбалансу і порушення системи регуляції формування оваріальної тканини в ранній постнатальний період. На тривалих термінах після трансплантації оваріальної тканини 10-ї доби постнатального розвитку фолікулярний профіль трансплантатів подібний до таких при трансплантації статевозрілої тканини, при цьому відновлюється гормональний статус кастрованих тварин-реципієнтів.

**Ю.О. Тищенко, В.В. Кірошка**

#### **ДИНАМИКА МОРФОГЕНЕЗА И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ КРЫС**

В организме кастрированных животных-реципиентов после аллотрансплантации оварияльной ткани исследовали динамику ее фолликулогенеза и эндокринную функцию в течение 100 сут. Установлено, что рост и развитие оварияльной ткани, а также ее стероидогенная функция при гетеротопической трансплантации определяется ее первоначальной морфологической организацией. При аллотрансплантации половозрелой оварияльной ткани выявлено сохранение ее морфологической структуры, тогда как при трансплантации неонатальной оварияльной ткани отмечалось формирование фолликулярных кист. На 100-е сутки наблюдения у кастрированных животных-реципиентов восстанавливалось содержание половых гормонов до физиологической нормы при трансплантации как половозрелой оварияльной ткани, так и неонатальной ткани 10-х суток постнатального развития.

Ключевые слова: неонатальные яичники, трансплантация, овариоэктомия, реципиент, морфологичний розвиток.

**Yu.O.Tischenko, V.V.Kiroshka**

### **DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL DEVELOPMENT OF OVARIAN TISSUE ALLOGRAFTS**

We examined the dynamics of folliculogenesis in ovarian tissue allograft and its endocrine function in an organism of castrated recipient rats during 100 days. Growth and development of ovarian tissue and its steroidogenic function in heterotopic transplantation were determined by its initial morphological organization. Allograft transplantation of mature ovarian tissue was found to cause preservation of its morphological structure, whereas the transplantation of neonatal ovarian tissue caused formation of follicular cysts. At 100<sup>th</sup> day of observation, we observed a recovery of the levels of sex hormones to the physiological norm after transplantation of both mature ovarian tissue and neonatal tissue of 10-days of postnatal development. Key words: neonatal ovary, transplantation, ovariectomy, recipient, morphological development.

*Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the National academy of sciences of Ukraine, Kharkiv*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Боярский К.Ю. Молекулярные основы формирования фетального яичника и получение гамет из стволовых клеток // Пробл. репродукции. – 2004. – № 5. – С. 15–21.
2. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 645 с.
3. Эскин И.А. Основы физиологии эндокринных желез. – М.: Высш. школа, 2-е изд., 1975.
4. Abbott D.H., Padmanabhan V., Dumesic D.A. Contributions of androgen and estrogen to fetal programming of ovarian dysfunction // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2006. – **17**, № 4. – P. 1–8.
5. Abir R., Biron-Shental T., Orvieto R. Transplantation of frozen-thawed late-gestational-age human fetal ovaries into immunodeficient mice. – *Fertil. and Steril.* – 2009. – **92**, № 2. – P. 770–777.
6. Balla A., Danilovich N., Yang Y., Sairam M.R. Dynamics of ovarian development in the FORKO immature mouse: structural and functional implications for ovarian reserve // *Biol. Reprod.* – 2003. – № 69. – P. 1281–1293.

7. Demeestere I., Centner J., Gervy C., Englert Y., Delbaere A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents // *Reproduction.* – 2005. – № 130. – P. 147–156.
8. Hirshfield A.N., DeSanti A.M. Patterns of ovarian cell proliferation in rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum // *Biol. Reprod.* – 1995. – № 53. – P. 1208–1221.
9. Hirshfield A.N. Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats // *Ibid.* – 1992. – № 47. – P. 466–472.
10. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results // *Hum. Reprod.* – 1986. – № 1. – P. 81–87.
11. Kezele P., Skinner M.K. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly // *Endocrinology.* – 2003. – № 144. – P. 3329–3337.
12. Marano J., Sun D., Zama A.M. Orthotopic transplantation of neonatal GFP rat ovary as experimental model to study ovarian development and toxicology // *Reprod. Toxicol.* – 2008. – № 26. – P. 3–4.
13. Oktay K., Newton H., Mullan J., Gosden R.G. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone // *Hum. Reprod.* – 1998. – **13**, № 5. – P. 1133–1138.
14. Pepling M.E., Spradling A.C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles // *Dev. Biol.* – 2001. – № 234. – P. 339–351.
15. Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for the experimentation and other scientific purposes – Strasbourg, 1998.
16. Roy S.K., Albee L. Requirement for follicle-stimulating hormone action in the formation of primordial follicles during perinatal ovarian development in the hamster // *Endocrinology.* – 2000. – № 141. – P. 4449–4456.
17. Uzumcu M., Zachow R. Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function // *Reprod. Toxicol.* – 2007. – **23**, № 3. – P. 337–352.
18. Yang H.Y., Cox S.L., Jenkin G. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts // *Reproduction.* – 2006. – **131**, № 5. – P. 851–859.

*Ин-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків*  
E-mail: tischenko.kh@gmail.com

*Матеріал надійшов до редакції 07.06.2012*



**В.В. Верещака**

## **Зовнішні ознаки вікових змін лиця як маркер дегенеративних змін колагену**

*Вивчали сенільні зміни шкіри лиця у 120 практично здорових осіб обох статей, які зверталися з приводу їх профілактики. Для оцінки рельєфу лиця використані методи комп'ютерного зображення із застосуванням програм системного вивчення лиця і комбінованої стереокамери з оптичним пристроєм. Утворення зморщок є реакцією сполучної тканини на дозоване направлене напруження в м'яких тканинах лиця і пов'язане з компенсаторними реакціями збереження архітекτονіки сполучної тканини. Звичні артикуляційні уклади, скорочення лімічних м'язів сприяють виникненню зморщок. Зовнішні чинники, зокрема сонячне опромінення є, на нашу думку, індуючим фактором ступеня зморшкоутворення.*

*Ключові слова: зморшки, вік, лице, шкіра.*

### **ВСТУП**

Сенільні зміни у м'яких тканинах лиця виявляються набагато раніше, ніж у інших органах і тканинах, що пов'язано з анатомо-фізіологічними особливостями цих ділянок [2, 7, 9, 10, 13]. Це дало змогу нам вважати вікові особливості рельєфу лиця одним з біологічних критеріїв старіння людини. Існує низка праць, що відображують окремі особливості вікових змін лиця [5, 6, 12], а саме вираження зморщок, типи старіння, топографічні ділянки деформації рельєфу. Показано, що зовнішні ознаки старіння лиця різні [3, 14]. Однак можливо виділити групи аналогічних ознак, що мають відмінності за ступенем вираження. У свою чергу зміни рельєфу лиця поділялися на пов'язані з деформацією лицевого скелета (дефекти щелеп, прикусу, оклюзії тощо) і не пов'язані (зміни м'яких тканин). Одним з факторів, які беруть участь у підтриманні скелетного гомеостазу, є механічне напруження. Особи, які втратили зуби, позбавляються значної кількості кісткової маси, що призводить до деформації щелеп і, як наслідок, до змін прилеглих м'яких тканин [6]. Умовно можна вважати, що пе-

© В.В. Верещака

редчасне старіння лиця розпочинається у віці до 50 років, а фізіологічне старіння охоплює вікові групи, які перевищують цю вікову межу [5]. На вираження змін у м'яких тканинах лиця впливають як екзогенні (надлишкова сонячна інсоляція, метеорологічні фактори, шкідливі звички тощо), так і ендогенні чинники (порушення мікроциркуляції, соматична патологія) [5]. Питання старіння, де- і регенерації шкіри тісно пов'язані з вивченням колагенових білків. Доведена участь сполучнотканинної частини дерми у виконанні таких функцій, як захисна, опорна, обмінна, накопичення біологічно активних речовин, формування та підтримання специфічної структури органів і тканин [2, 3, 4, 14]. Колагенові волокна є головним компонентом позаклітинного простору дерми [9, 11]. Відомо, що молекулярна будова колагену, особливості орієнтації колагенових волокон створюють досить досконалу структуру, яка має велику механічну міцність і функціональну активність [3, 5, 9]. Однак ці досягнення залишаються маловідомими широкому колу дерматологів.

Метою нашого дослідження було вивчення сенільних змін шкіри лиця у практично здорових людей та осіб з ознаками її старечої в'ялості.



## МЕТОДИКА

Обстежено 120 осіб обох статей, які зверталися з приводу профілактики вікових змін на шкірі обличчя у вигляді витончення, локалізованих пігментних плям, незначної пористості шкіри лица, поодиноких зморшок, кератом, телеангіектазій і ангиом. Згідно з віковою періодизацією [9], практично здорові люди були розподілені на чотири групи по 30 осіб у кожній. Перші три групи – практично здорові особи, які не мали ознак старечої в'ялості шкіри лица: I група – обстежені зрілого віку (22–35 років), II група – особи зрілого віку (36–55 років), III група – люди похилого віку (61–74 роки) з віковими змінами шкіри лица. До IV групи ввійшли особи зрілого віку (36–55 років), які мали ознаки старечої в'ялості шкіри лица у вигляді зморшок, зниження еластичних властивостей шкіри, телеангіектазій, ангиом, посиленої пігментації, сенільних кератом. Для оцінки рельєфу лица використані методи комп'ютерного аналізу фотопортретів із застосуванням програм системного вивчення лица, а також комбінованої стереокамери з оптичним пристроєм та напівкількісна оцінка вікових змін шкіри. Виділені вторинні зміни рельєфу лица, що не мають первинного морфологічного субстрату в м'яких тканинах лица і шкі. У зв'язку з цим ми вважаємо доцільним розрізняти передчасне старіння, пов'язане з деформацією лицевого скелета. У свою чергу ознаки передчасного старіння, не пов'язаного зі змінами кісткової основи, логічно поділити на певні типи, залежно від зовнішніх проявів. При фізіологічному старінні лица розподіли на варіанти, пов'язані і непов'язані зі змінами лицевого скелета, є недоцільним, оскільки після 60 років виникає виражена вікова інволюція кісток черепа. Ми розрізняли ранній, середній і пізній варіанти, які залежали від віку обстежених і збігалися з основними типами старіння. Фізико-механічні випробування проводили відповідно до ДСТУ 338-45 на зразках, що мали форму дво-

бічної лопатки, довжина робочої частини – 50 мм, ширина – 10 мм [3]. Форма вирізаного зразка забезпечувала його розрив у вузькій (середній) частині та попереджувала виривання широкої частини з затискачів розривної машини. Перед виробуваннями робочу частину зразка розділяли перманентним олівцем на п'ять рівних ділянок, які нумерували, а потім вимірювали товщину кожної ділянки шкіри з використанням товщинометра. Випробування шкіри проводили на розривній машині РТ-250.

Вірогідність відмінностей при порівнянні середніх арифметичних значень визначали за критерієм *t* Стьюдента, а при порівнянні частоти ознаки у відсотках – методом альтернативного варіювання [8].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Механічні властивості шкіри характеризували за межею міцності при розтягуванні (табл. 1). Встановлено, що у осіб II групи зразок у привушній зоні руйнування при малому навантаженні ( $1,27 \text{ кг/мм}^2 \pm 0,1 \text{ кг/мм}^2$ ) порівняно з I групою ( $P < 0,05$ ). У осіб похилого віку (III група, пупкова зона) межа міцності, навпаки, збільшувалася, що призвело до відмінностей у пупковій зоні порівняно зі значеннями у I групі ( $P < 0,05$ ). Волокна дерми розташовані у різних напрямках відносно розтягувального зусилля, тому можливість їх орієнтації у щільній сітці сполучної тканини обмежена. У пацієнтів, що страждали на старечу в'ялість шкіри лица (IV група), зразок руйнувався при навантаженні  $1,28 \text{ кг/мм}^2 \pm 0,1 \text{ кг/мм}^2$  щодо значень у I групі ( $P < 0,05$ ). Зменшення межі міцності при розтягуванні у осіб IV групи вказує на деструктивні зміни у колагенових волокнах і їх пучках. При розтягненні цей показник прямо пропорційно залежить від вмісту колагену. У бокових ланцюгах амінокислотних залишків молекул колагену містяться альдегідні карбоніли, у результаті реакцій яких з іншими структурно-функціональними групами виникають ковалентні

зв'язки, що стабілізують структуру на різних рівнях. Збільшення цих зв'язків призводить до підвищення межі міцності та жорсткості шкіри у старості. З віком укріплюються ковалентні містки колагену та збільшується їх число. У результаті взаємодії двох бокових ланцюгів поліпептидів колагену, що містять альдегідні функціональні групи, виникає альдольна конденсація і утворюються містки. На нашу думку, збільшення сили міжструктурної взаємодії пов'язане зі зменшенням вмісту вологи. При розтягненні пучки та волокна спочатку випрямляються, а тільки після цього розповзаються, подовжуються і рвуться. Внаслідок цього шкіра пупкової зони має більший запас міцності при розтягненні, ніж шкіра привушної ділянки.

Відносно видовження визначали одночасно з межею міцності при розтягуванні. Встановлено, що видовження при розриві у осіб похилого віку (III група) збільшувалося щодо значень у привушній ділянці у осіб II групи ( $P<0,05$ ) і у пупковій зоні осіб I групи ( $P<0,05$ ). Відносно видовження при напруженні 9,8 МПа мало істотні відмінності у різних вікових групах: у осіб II групи – між різними анатомічними ділянками ( $P<0,05$ ), у осіб похилого віку (III група) значення показника збільшилося у пупковій зоні на 46 % відносно I групи ( $P<0,05$ ), у хворих на старечу в'ялість шкіри лица (IV група) зменшувалося відносно I–III груп ( $P<0,05$ ). Відносно залишкове видовження у осіб похилого віку (III група) становило лише  $34,5\% \pm$

**Таблиця 1. Фізико-механічні властивості шкіри практично здорових людей різного віку та осіб з ознаками старечої в'ялості шкіри лица ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Показник	I група	II група	III група	IV група
Межа міцності, кг/мм <sup>2</sup>				
- привушна зона	1,58±0,09	1,27±0,1*	1,59±0,13	1,28±0,1*
- пупкова зона	1,03±0,1****	1,26±0,09	1,59±0,14*	1,34±0,14
Відносне видовження при розриві, %				
- привушна зона	87,2± 8,4	71,4±7,1	95,42±8,48**	68,0± 10,1
- пупкова зона	73,4± 6,5	93,4± 10,8	107,0±12,11*	91,7± 12,5
Відносне видовження при напруженні, %				
- привушна зона	65,2± 4,6	53,0± 3,9	72,2± 6,19	50,2± 6,96***
- пупкова зона	55,0± 3,5	69,6± 6,51****	80,8± 7,18*	69,2± 7,47
Залишкове відносне видовження, %				
- привушна зона	51,0± 4,3	39,6± 4,1	34,5± 4,6*	37,2± 6,2
- пупкова зона	33,1± 3,6****	32,6± 4,3	32,5±3,7	30,6± 4,41
Відносне пружне видовження, %				
- привушна зона	14,2± 2,38	13,4± 3,2	37,66±3,56*,**	12,96± 2,14***
- пупкова зона	21,88± 2,87	37,0± 5,1*,****	48,34± 8,38*	38,6±7,31*,****
Модуль пружності, Н/м <sup>2</sup>				
- привушна зона	0,16±0,01	0,19±0,01*	0,14±0,01**	0,22±0,02*,***
- пупкова зона	0,18±0,01	0,15±0,01*,****	0,13±0,01*	0,16±0,01****
Жорсткість шкіри, 10 <sup>-6</sup> Н				
- привушна зона	1,9±0,1	2,4±0,14*	1,9±0,15**	2,4±0,23
- пупкова зона	3,0±0,24****	2,3±0,13*	1,78±0,16*	2,29±0,22*

\*  $P<0,05$  відносно I групи, \*\* $P<0,05$  відносно II групи, \*\*\* $P<0,05$  відносно III групи, \*\*\*\* $P<0,05$  відносно привушної зони в межах однієї групи.

4,6% порівняно з привушною зоною I групи ( $P<0,05$ ). Можна констатувати, що пружне і високоеластичне видовження – зворотні процеси, тобто зникають після припинення дії розтягувальної сили. На відміну від них, пластичне видовження зберігається навіть тоді, коли навантаження зняте. Неповна зворотність деформації пояснюється, ймовірно, деструкцією колагенових фібрил дерми. Відносно пружне видовження у осіб II групи збільшилося на 69,1 % у пупковій зоні порівняно з I групою ( $P<0,05$ ) і значеннями, отриманими у привушній ділянці (II група,  $P<0,05$ ). У осіб похилого віку (III група) зворотна початкова деформація підвищувалася відносно I групи ( $P<0,05$ ). Збільшення відносного пружного видовження у привушній ділянці осіб III групи в 2,8 раза більше щодо II групи ( $P<0,05$ ). У пацієнтів, що страждали на старечу в'ялість шкіри лица (IV група), цей показник мав значення, подібні до II групи, однак у привушній зоні дещо зменшувався ( $12,96\% \pm 2,14\%$ ) відносно III групи ( $P<0,05$ ). Таким чином, під дією розтягувальної сили на колагенові волокна виникає взаємне пружне зміщення атомів і молекул волокон; зміна форми молекулярних ланцюгів волокна на ділянках, що розташовані між точками міжмолекулярної взаємодії (високоеластична деформація); взаємне переміщення молекулярних ланцюгів (пластичність) і більш великих елементів структури волокна (повзучість); релаксація (молекулярне перегрупування) у напрямку встановлення рівноважної (ненапруженої) структури. Результати фізико-механічних випробувань шкіри показали, що межа міцності шкіри лица та видовження при розриві зумовлені, на нашу думку, ромбоподібною архітектонікою колагенових пучків, значною кількістю їх значень (не менше ніж три в межах однієї площини). Це зумовлено тим, що міцність при розтягуванні та видовження при розриві зумовлені здатністю структурних елементів дерми до орієнтації та характером переплетення колагенових волокон.

Умовний модуль пружності шкіри у осіб II групи збільшився на 18,8 % у привушній ділянці і зменшився на 16,7 % у пупковій зоні відносно I групи ( $P<0,05$ ), а також мав відмінності від значень у несуміжних анатомічних зонах ( $P<0,05$ ). У осіб похилого віку (III група) зазначений модуль зменшився відносно показника II групи у привушній ділянці ( $P<0,05$ ) і значеннями осіб I групи у пупковій зоні ( $P<0,05$ ). У пацієнтів з ознаками старечої в'ялості шкіри лица (IV група) у привушній зоні виявлено збільшення модуля пружності на 37,5% відносно I групи ( $P<0,05$ ). У пупковій зоні він відповідав віковій нормі в межах однієї групи ( $P<0,05$ ). Зменшення умовного модуля пружності пов'язано зі зволоженням шкіри (див. табл. 1). Підвищення пружності у осіб, що страждали на старечу в'ялість шкіри лица (IV група) свідчить, на нашу думку, про збільшення ступеня зшивання структури шкіри і про підвищення температури зварювання. Жорсткість шкіри при розтягненні у осіб I групи мала відмінності у різних анатомічних зонах ( $P<0,05$ ). У пацієнтів II групи цей показник збільшився на 26,3 % у привушній ділянці і зменшився на 23,3 % у пупковій зоні відносно I групи ( $P<0,05$ ). У осіб похилого віку (III група) він також зменшився порівняно зі значеннями осіб II групи у привушній ділянці ( $P<0,05$ ) і I групи у пупковій зоні ( $P<0,05$ ). У пацієнтів з ознаками старечої в'ялості шкіри лица (IV група) у привушній зоні виявлено тенденцію до збільшення жорсткості шкіри, однак статистичних відмінностей не виявлено відносно I групи ( $P>0,05$ ). У пупковій зоні жорсткість шкіри відповідала віковій нормі.

Зморшкуватий тип старіння лица. Домінуючою ознакою цього типу є зморшки як постійні, так і ті, що формуються при міміко-артикуляційних рухах. За цим типом старіють переважно астеніки і нормостеніки, у яких підшкірно-жирова клітковина не є вираженою навіть у молодому віці. Поступово, на окремих ділянках лица (лобова, очноямкова та підочноямкова), а потім на всьому обличчі

та шиї з'являється сітка поверхневих і більш глибоких зморщок. Шкіра легко зміщується, може бути взята у складку, нагадує пергамент. Ми виділяли 4 ступеня вираження зморщок у основних анатомічних зонах (переніссі, верхніх повіках підчочномковій, носовій, скроневої, щічній ділянках, носогубній, підборідно-губній борозні, мочці вуха, привушно-жувальній ділянці, передній поверхні шиї) за запропонованою нами методикою [3].

Ознаки атонії лица, що проявлялося зменшенням пружності м'яких тканин обличчя та шиї, втратою округлості овалу, дрібними зморшками, які виникали при рухах, виявлялися практично з однаковою частотою у II–IV групах (23,3–36,7%). Це свідчило про ознаки фізіологічних вікових змін (див. табл. 2).

Клінічне дослідження структури зморщок лоба показало (див. табл. 2), що сумарний показник їх вираження у осіб II (66,6 %) і IV (60,0 %) груп перевищив аналогічний показник I групи втричі ( $P < 0,001$ ), а в III групі – більше ніж у 4 рази ( $P < 0,001$ ), що говорить про вікові зміни м'яких тканин. У осіб цих груп I ступінь вираження не мав статистично достовірних відмінностей, хоча у II–IV групах виявлялася тенденція до його збільшення. Найчастіше в осіб цих груп був II ступінь вираження (33,3–38,5 % значень сумарного показника), рідше – III ступінь (15,0–23,1 % від значень сумарного показника), що можна пояснити поступовими змінами рельєфності шкіри лоба. Лише у III і IV групах незначно виявлявся (3,3 %) IV ступінь вираження зморщок. Утворення зморщок лоба частково пов'язане з підняттям брів за рахунок *m. occipitofrontalis* та *pars orbitalis m. Orbicularis oculi*.

Сумарний показник вираження зморщок перенісся у III і IV групах був більшим порівняно з I групою майже у 5 разів ( $P < 0,001$ ), а порівняно з II групою – удвічі ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,05$  відповідно). У осіб II–IV груп спостерігалася тенденція до збільшення частоти II ступеня вираження зморщок, однак незначні статистично достовірні відмінності порівняно

з I групою виявлено лише у III і IV групах ( $P < 0,01$ ). У III групі III і IV ступінь вираження зморщок, які становили 22,8 і 18,2 % відповідно від загального показника та зумовили статистично достовірні відмінності порівняно з I групою ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,05$  відповідно). У осіб IV групи IV ступінь вираження зморщок виявлявся у 20,0 % випадків щодо значень у I і II групах ( $P < 0,01$ ). Утворення зморщок перенісся частково пов'язане з натягненням шкіри брови у медіальному напрямку і утворенням вертикальної складки за рахунок *m. Corrugator supercilii* та формуванням горизонтальних глабеллярних складок за допомогою скорочення *m. procerus*.

У III і IV групах сумарний показник вираження зморщок верхньої повіки перевищив аналогічний показник I групи більше ніж удвічі ( $P < 0,001$ ), а в II групі – на 42,8 % ( $P < 0,05$ ). Тенденцію до збільшення I і II ступенів вираження зморщок виявлено у обстежених II–IV груп, однак статистично достовірні відмінності порівняно з I групою були лише у III групі. Переважно III ступінь вираження зморщок верхньої повіки виявлявся у IV групі, що зумовило відмінності зі значеннями I групи ( $P < 0,05$ ). Це частково пов'язане з підняттям повіки за рахунок *m. levator palpebrae superioris*.

Сумарний показник вираження зморщок у підчочномковій ділянці в III і IV групах перевищив аналогічний показник I і II груп більше ніж у 2,5 рази ( $P < 0,001$ ). Вираження зморщок I ступеня у осіб III групи (56,7 %) було більшим щодо значень у I групі у 5,7 рази ( $P < 0,001$ ), а у II і IV – більше ніж удвічі ( $P < 0,01$ ). Стривальність II ступеня вираження зморщок підчочномкової ділянки у I, II і III групах не перевищила 13,3 %, а в IV групі вона становила 36,7 %, що характеризує зміни рельєфу, зумовлені актинічними факторами. Вираження зморщок III ступеня в осіб III і IV груп виявилася більше ніж у 36,7 % випадків порівняно з I і II групами ( $P < 0,001$ ). У осіб II і III груп зміни рельєфу спричинені, зменшенням об'єму жирового тіла очної

Таблиця 2. Частота (%) структурних змін м'яких тканин лица у практично здорових людей різного віку та осіб з ознаками старечої шкіри лица (n = 30)

Показник	I група	II група	III група	IV група
<b>Лобна ділянка</b>				
Сумарний показник вираження зморщок	23,3	66,7 $P_1 < 0,001$	86,6 $P_1 < 0,001$	60,0 $P_1 < 0,001$ $P_3 < 0,05$
I ступінь	23,3	33,3	30,0	26,7
II ступінь	0	23,4 $P_1 < 0,01$	33,3 $P_1 < 0,001$	20,0 $P_1 < 0,01$
III ступінь	0	10,0	20,0 $P_1 < 0,01$	10,0
IV ступінь	0		3,3	3,3
<b>Перенісся</b>				
Сумарний показник вираження зморщок	13,3	33,3	73,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$	63,4 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,05$
I ступінь	13,3	20,0	23,3	16,7
II ступінь	0	6,7	20,0 $P_1 < 0,01$	20,0 $P_1 < 0,01$
III ступінь	0	6,6	16,7 $P_1 < 0,05$	6,7
IV ступінь	0	0	13,3 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	20,0 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
<b>Верхня повіка</b>				
Сумарний показник вираження зморщок	20,0	46,7 $P_1 < 0,05$	66,6 $P_1 < 0,001$	63,3 $P_1 < 0,001$
I ступінь	20,0	36,7	43,3 $P_1 < 0,05$	30,0
II ступінь	0	10,0	13,3 $P_1 < 0,05$	10,0
III ступінь	0	0	6,7	20,0 $P_1 < 0,01$
IV ступінь	0	0	3,3	3,3
<b>Підчоямкова ділянка</b>				
Сумарний показник вираження зморщок	20,0	36,6	96,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	93,4 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
I ступінь	10,0	23,3	53,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$	16,7 $P_3 < 0,01$
II ступінь	10,0	13,3	6,7	36,7 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,02$ $P_3 < 0,01$
III ступінь	0	0	36,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	36,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
IV ступінь	0	0	0	3,3



Показник	I група	II група	III група	IV група
<b>Носова ділянка</b>				
Сумарний показник вираження зморщок	0	0	93,4 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	93,4 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
I ступінь	0	0	46,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	36,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
II ступінь	0	0	6,7	20,0 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
III ступінь	0	0	36,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	36,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
IV ступінь	0	0	3,3	0
<b>Скронева ділянка</b>				
Сумарний показник вираження зморщок	0	20,0 $P_1 < 0,05$	76,6 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	83,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
I ступінь	0	13,3 $P_1 < 0,05$	36,7 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,05$	53,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$
II ступінь	0	6,7	23,3 $P_1 < 0,01$	20,0 $P_1 < 0,05$
III ступінь	0	0	13,3 $P_1 < 0,05$	10,0
IV ступінь	0	0	3,3	0
<b>Щічна ділянка</b>				
Сумарний показник вираження зморщок	0	6,7	70,0 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	83,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
I ступінь	0	6,7	20,0 $P_1 < 0,01$	46,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
II ступінь	0	0	20,0 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$	33,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,05$
III ступінь	0	0	16,7 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	3,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
IV ступінь	0	0	13,3 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	0 $P_3 < 0,05$

Показник	I група	II група	III група	IV група
Носогубна борозна Сумарний показник вираження зморщок	6,7	20,0	70,0 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	83,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
I ступінь	6,7	20,0	46,7 $P_1 < 0,001$	23,3
II ступінь	0	0	16,7 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	33,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
III ступінь	0	0	3,3	16,7 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
IV ступінь	0	0	3,3	10,0
Підборідно-губна борозна Сумарний показник вираження зморщок	0	10,0	86,7 $P_1 < 0,001$	46,6 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$ $P_3 < 0,01$
I ступінь	0	10,0	36,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,05$	23,3 $P_1 < 0,01$
II ступінь	0	0	20,0 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	23,3 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$
III ступінь	0	0	20,0 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	0 $P_3 < 0,05$
IV ступінь	0	0	10,0	0
Верхня губа Сумарний показник вираження зморщок	0	6,7	96,6 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	69,9 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,01$
I ступінь	0	6,7	36,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$	46,6 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
II ступінь	0	0	23,3 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$	20,0 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
III ступінь	0	0	23,3 $P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$	3,3 $P_3 < 0,05$
IV ступінь	0	0	13,3 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$	0 $P_3 < 0,05$

Показник	I група	II група	III група	IV група
Нижня губа				
Сумарний показник вираження зморщок	0	0	76,7	86,6
	0	0	$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$
I ступінь	0	0	36,7	46,6
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$
II ступінь	0	0	26,7	36,7
			$P_1 < 0,01$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,01$	$P_2 < 0,001$
III ступінь	0	0	10,0	3,3
IV ступінь	0	0	3,3	0
Підборідна ділянка				
Сумарний показник вираження зморщок	0	0	86,6	93,2
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$
I ступінь	0	0	26,7	69,9
			$P_1 < 0,01$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,01$	$P_2 < 0,001$
				$P_3 < 0,001$
II ступінь	0	0	46,6	23,3
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,01$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,01$
III ступінь	0	0	10,0	0
IV ступінь	0	0	3,3	0
Мочка вуха				
Сумарний показник вираження зморщок	0	13,3	76,6	70,0
		$P_1 < 0,05$	$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$
I ступінь	0	10,0	46,7	53,3
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,01$	$P_2 < 0,001$
II ступінь	0	3,3	23,3	16,7
			$P_1 < 0,01$	$P_1 < 0,05$
			$P_2 < 0,05$	
III ступінь	0	0	3,3	0
IV ступінь	0	0	3,3	0
Привушно-жувальна ділянка				
Сумарний показник вираження зморщок	0	0	86,6	93,2
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,001$
I ступінь	0	0	26,7	69,9
			$P_1 < 0,01$	$P_1 < 0,001$
			$P_2 < 0,01$	$P_2 < 0,001$
				$P_3 < 0,001$
II ступінь	0	0	46,6	23,3
			$P_1 < 0,001$	$P_1 < 0,01$
			$P_2 < 0,001$	$P_2 < 0,01$
III ступінь	0	0	10,0	0
IV ступінь	0	0	3,3	0

Показник	I група	II група	III група	IV група
Передня поверхня шиї				
Сумарний показник вираження зморшок	3,3	16,6	83,2 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	70,0 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
I ступінь	3,3	13,3	46,6 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$	53,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$
II ступінь	0	3,3	23,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,05$	16,7 $P_1 < 0,05$
III ступінь	0	0	10,0	0
IV ступінь	0	0	3,3	0

ямки і свідчать про старіння м'яких тканин лица [7].

Слід відмітити, що зморшки у носовій ділянці утворювались у осіб III (93,1 %) і IV (93,4 %) груп. У осіб IV групи II ступінь вираження зморшок був збільшеним порівняно з I і II групами ( $P < 0,05$ ). Поверхневі борозни скатів і спинки носа III ступеня вираження визначалися з однаковою частотою у III і IV групах (36,7 %;  $P < 0,001$ ) порівняно з I і II групами. Утворення зморшок носа частково пов'язане зі звуженням носового отвору за рахунок dilatator et compressor nasalis та підняття крила носа через скорочення m. Levator labii superioris alaeque nasi.

У скроневої ділянці віком поступово збільшувався сумарний показник зморшкоутворення: у осіб III і IV груп він наближався до 80 % ( $P < 0,001$ ) порівняно з I групою, а в II групі – до 20 % ( $P < 0,05$ ). У II і IV групах зморшки мали переважно I ступінь вираження, а у III групі значною мірою були представлені зміни рельєфу II і III ступенів вираження, що становили 34,7 % від значень загального показника. IV ступінь вираження зморшок виявлявся лише у III групі (3,3 %).

На щічній ділянці зморшки спостерігались у III і IV групах, де їх стрівальність відносно I і II груп перевищила 70,0 % ( $P < 0,001$ ).

У осіб III групи розподіл зморшок за I – IV ступенем вираження був приблизно однаковим (13,3–20,0 %), а у IV групі зміни рельєфу переважно відносилися до I і II ступенів.

Сумарний показник вираження зморшок носогубної борозни був збільшеним у III і IV групах, де його частота відносно I і II груп була підвищена майже в 4 рази ( $P < 0,001$ ). Слід зазначити, що у осіб III групи борозна мала переважно I ступінь вираження, а у IV групі II–IV ступені її вираження становили 72,0 % від значень загального показника. Утворення носогубної борозни частково пов'язане з підняттям верхньої губи за рахунок m. Levator labii superioris та її заглиблення через скорочення m. zygomaticus minor.

Підборідно-губна борозна була більш вираженою у III (86,7 %) і IV (46,6 %) щодо I і II груп ( $P < 0,01$ ). У осіб III групи борозни мали I–III ступені вираження, а у IV групі I–II ступені.

На верхній губі у III групі зморшки виявлені у 96,6% осіб ( $P < 0,001$  відносно I і II груп), які мали I–IV ступені вираження. У IV групі їх стрівальність не перевищила 69,9 % і була представлена I і II ступенями. Утворення зморшок верхньої губи частково пов'язане зі стисканням і витягуванням губ вперед за рахунок m. orbicularis oris.

На нижній губі зморшки виявлялися лише у III (76,7 %) і IV (86,6 %) групах порівняно з I і II групами ( $P < 0,001$ ). Їх вираження було в основному розподілене між I і II ступенями.

Підборідно-губна борозна була чіткою у III (86,7 %) і IV (46,6 %) групах ( $P < 0,01$ ) щодо I і II груп. У осіб III групи борозни мали I–III ступені вираження, а у IV групі I–II ступені.

На підборідній ділянці зморшки I–II ступенів були вираженими у III (86,6 %) і IV (93,2 %) групах порівняно з I і II групами ( $P < 0,001$ ). У осіб III групи більшість з них мала II ступінь вираження, а у IV групі, навпаки, I ступінь.

На мочці вуха відмічалось поступове вікове збільшення сумарного показника зморшкоутворення: у осіб III і IV груп він становив понад 70 % ( $P < 0,001$ ) порівняно з I групою, а в II групі – до 13,3 % ( $P < 0,05$ ). У II–IV групах зморшки мали переважно I ступінь вираження, III і IV ступені виявлялися лише у III групі (по 3,3 %).

Слід відмітити, що зморшки у привушно-жувальній ділянці спостерігались у осіб III (86,6 %) і IV (93,2 %) груп, що зумовило відмінності з I і II групами ( $P < 0,001$ ). Зморшки I ступеня вираження були у III (26,7 %) і IV групах (69,9 %) порівняно з I і II групами ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  відповідно). II ступінь вираження зморшок у осіб III (46,6 %) і IV (23,3 %) груп був збільшеним порівняно зі значеннями I і II груп ( $P < 0,01$ ). Зморшки привушно-жувальної ділянки III (10,0 %) і IV (3,3 %) ступенів вираження визначалися лише у III групі.

На передній поверхні шиї сумарний показник вираження зморшок був збільшеним у III (83,2 %) і IV (62,2 %) групах порівняно з I і II групами ( $P < 0,001$ ). Зморшки мали переважно I і II ступені вираження. Зморшки передньої поверхні шиї III (10,0 %) і IV (3,3 %) ступенів вираження визначалися лише у III групі. Утворення зморшок на передній поверхні шиї частково пов'язане з опущенням нижньої щелепи за рахунок *m. platysma*.

Гіпоеластичний (атонічний) тип старіння лица (табл. 3) характеризувався зменшенням пружності м'яких тканин лица та шиї. Дрібні зморшки виявлялися лише при рухах лица, а у спокої зникали. Форма лица звичайна, однак відмічається незначна втрата округлості овалу. Зранку після відпочинку лице виглядає молодим, однак, ввечері після фізичних і нервових навантажень набуває втомленого вигляду. Цей тип вікових змін є межею між зрілістю і початком старіння. Регресивні процеси ще купіруються резервними можливостями організму. Проте він не є довготривалим і змінюється на інший (індивідуально детермінований). Гіпоеластичний тип є перехідним, не має стадій, триває приблизно 1–2 роки.

Деформація м'яких тканин лица виявлялася переважно у III групі, де її I і II ступені вираження становили по 23,3 % ( $P < 0,01$  відносно I і II груп), а III ступінь 16,7 % ( $P < 0,05$  відносно I і II груп). У пацієнтів IV групи виявлявся лише I ступінь вираження зморшок (26,7 %), щодо I і II груп. Слід зазначити, що її самостійний прояв (за умов відсутності інших проявів старіння) не перевищив 10,0 %.

Рельєфний тип старіння лица спостерігався переважно у III (46,6 %) і IV (26,7 %) групах, де він був представлений I і II стадіями. Як самостійна ознака у обстежених усіх груп він не виявлявся і завжди супроводжувався зморшкоутворенням.

Неопластико-диспігментаційний тип старіння лица був характерним для III (43,3 %) і IV (53,4 %) групи і представлений I і II стадіями. Як самостійна ознака старіння він виявлявся лише у 20 % обстежених і зазвичай супроводжувався зморшкоутворенням.

Таким чином, утворення зморшок є реакцією сполучної тканини на дозоване направлене напруження у м'яких тканинах лица і пов'язане з компенсаторними реакціями збереження архітектоніки колагену, звичними артикуляційними укладами зі скороченням м'язів.



**Таблиця 3. Частота (%) клінічних ознак старіння лица у практично здорових людей різного віку та осіб з ознаками старечої в'ялості шкіри лица (n=30)**

Показник	I група	II група	III група	IV група
Гіпоеластичний (атонічний) тип старіння лица	3,3	23,3 P <sub>1</sub> <0,05	30,0 P <sub>1</sub> <0,01	36,7 P <sub>1</sub> <0,01
Вираження деформації м'яких тканин лица				
- I стадія	0	6,7	23,3 P <sub>1</sub> <0,01	26,7 P <sub>1</sub> <0,01
- II стадія	0	0	23,3 P <sub>1</sub> <0,01 P <sub>2</sub> <0,01	0 P <sub>2</sub> <0,05 P <sub>3</sub> <0,01
- III стадія	0	0	16,7 P <sub>1</sub> <0,05	0 P <sub>3</sub> <0,05
- IV стадія	0	0	3,3 P <sub>2</sub> <0,05	0
Рельєфний тип старіння лица				
- I стадія	0	10,0	23,3	16,7
- II стадія	0	0	16,7 P <sub>1</sub> <0,05	10,0 P <sub>1</sub> <0,05
- III стадія	0	0	3,3 P <sub>2</sub> <0,05	0
- IV стадія	0	0	3,3	0
Неопластико-диспигментаційний тип старіння лица				
- I стадія	0	0	23,3	26,7
- II стадія	0	0	16,7 P <sub>1</sub> <0,01 P <sub>2</sub> <0,01	26,7 P <sub>1</sub> <0,01 P <sub>2</sub> <0,01
-III стадія –	0	0	16,7 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05	26,7 P <sub>1</sub> <0,01 P <sub>2</sub> <0,01
	0	0	3,3	0

P – достовірність відмінностей показників порівняно з I групою, P<sub>1</sub> – порівняно з II групою, P<sub>2</sub> – порівняно з III групою.

### В.В. Верещака

#### ВНЕШНИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛИЦА КАК МАРКЕР ДЕГЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЛАГЕНА

Изучали сенильные изменения кожи лица у 120 практически здоровых людей разного возраста, которые обращались по поводу их профилактики. Для оценки рельефа лица были использованы методы компьютерного анализа фото-

портретов с применением программ системного изучения лица и комбинированной стереокамеры с оптическим устройством и полуколичественная оценка возрастных изменений кожи. Образование морщин является реакцией соединительной ткани на дозированное направленное напряжение в мягких тканях лица и связанное с компенсаторными реакциями сохранение архитектоники соединительной ткани. Привычные артикуляционные укладки, сокращение мимических мышц способствует образованию морщин.

Внешние факторы, а именно солнечное излучение являются, по нашему мнению, индуцирующим фактором степени морщинообразования.

Ключевые слова: морщины, возраст, лицо, кожа.

**V.V. Vereshchaka**

### **EXTERNUS CHANGES IN THE FACE SOFT TISSUES IS THE MARKER OF DEGENERATIVE CHANGES OF COLLAGEN**

It was examined 120 persons of both sexes who had some problems with face skin. It was investigated the degree of face age changes in persons with the symptoms of skin slacses and practically healthy persons of different ages. Some methods of investigation were involved: computer analysis of photo graphes using the programmes of systemic face investigation in the combined stereocamera with optic device; it was involved semiquantitay estimation of age skin changes which was introduced by us. Skin wrinkle creation is the reaction of collagene on the dose tention in soft tissues of the face and it is connected with compensatore reactions of collagen earchitectonicp reservation. Traditional articulare movements create conditions for wrinkle development. Mimic muscule contraction lead to the wrinkle development which are determined in genetic level. External factors, particulatory solar radiation is the induction factor of wrinkle degree.

Key words: wrinkle, age, face, skin.

*Taras Shevchenko National University of Kyiv*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии: учеб. пособие. – М.: Медицина, 2012. – 240 с.
2. Белоусов А. Е. Пластическая, реконструктивная и эсте-

3. Верещака В. В. Етіологія та патогенез старечої в'ялості шкіри лица і механізми формування його структурних змін у сучасної людини європеїдного типу. – К.: Наук. думка, 2008. – 481 с.
4. Казинникова О.Г., Адамян А.А. Возрастные изменения тканей шейно-лицевой области // *Анналы пластич., реконструкт. и эстетич. хирургии.* – 2010. – № 1. – С. 52–61.
5. Кольгуненко И.И. Основы геронтокосметологии. – М.: Медицина, 1974. – 222 с.
6. Куприянов В.В., Стовичек. Г.В. Лицо человека // *Там само*, 2008. – 272 с.
7. Медико-криминалистическая идентификация. Настольная книга судебно-медицинского эксперта / Под ред. В.В. Томилина. – М.: Норма-инфра М, 2000. – 472 с.
8. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2011. – 256 с.
9. Добрев Х. Възрастови изменения в механичните свойства на човешката кожа // *Дерматол. венерология.* – 1999. – № 2. – С. 21–26.
10. Calleja-Agius J., Muscat-Baron Y., Brincat M. P. Skin ageing // *Menopause Int.* – 2007. – 13, № 2. – P. 60–64.
11. Cesarone M., Laurora G., Belcaro G.V. Microcirculation in systemic hypertension // *Angiology.* – 2012. – 43, № 11. – P. 899–903.
12. Farage M.A., Miller K.W., Elsner P., Maibach H.I. Structural characteristics of the aging skin: a review // *Cutan. Ocul. Toxicol.* – 2007. – 26, № 4. – P. 343–357.
13. Ghersetich I., Troiano M., De Giorgi V., Lotti T. Receptors in skin ageing and antiageing agents // *Dermatol.Clin.* – 2007. – 25, № 4. – P. 655–662.
14. Weinkle S. Facial assessments: identifying the suitable pathway to facial rejuvenation // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* – 2006. – 20, Suppl. 1. – P. 7–11.

*Київ.нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, Київ*  
*E-mail: www090675@mail.ru*

*Матеріал надійшов до редакції 24.04.2012*

С.П. Бесчасний

## Стресорний вплив вродженої сенсоневральної туговухості на імунну систему дітей 7–11 років

*Досліджували вплив хронічної двобічної сенсоневральної туговухості III–IV ступеня на вміст інтерлейкінів, імуноглобулінів сироватки крові й слини, функціональну активність гранулоцитарно-моноцитарної ланки імунітету та оцінювали активність гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи дітей 7–11 років. Встановлено, що внаслідок стресорної активації гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи пригнічується функція гранулоцитарно-моноцитарної ланки імунітету із відповідним переважанням продукції протизапальних інтерлейкінів. Продукція гранулоцитами та Т-хелперами 2-го типу протизапальних інтерлейкінів ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10 та ІЛ-13 спричинює активацію В-клітин. Таким чином, у дітей 7–11 років, із вродженою двобічною сенсоневральною туговухістю, відбувається стресорне послаблення неспецифічного імунітету з переважанням гуморального типу імунної відповіді з підвищеним вмістом ІgG.*

*Ключові слова:* сенсоневральна туговухість, інтерлейкіни, гранулоцити, фагоцитоз.

### ВСТУП

Поширення алергічних реакцій, вторинних ускладнень після вірусних інфекцій, застосування ототоксичних антибіотиків і поява резистентних мікроорганізмів – усе це щорічно призводить до збільшення в Україні показників ураження слухового аналізатора на 3,3 % серед дитячого населення [7].

У 1969 р. Гюллінг уперше висловив припущення про роль алергічних реакцій у генезі порушень слухового аналізатора, а через десять років McCabe увів термін „аутоімунне захворювання внутрішнього вуха”. Нині застосовують термін „імуноопосередковане зниження слуху” [5, 9].

Залучення імунної системи до розвитку хронічної сенсоневральної туговухості (СНТ) підтверджує наявність у крові сенсibiliзованих лімфоцитів-ефекторів, антитіл до мієліну і нейроспецифічної енолази [2, 4, 6, 9]. Це явище передусім пов’язують із циркуляцією нейроспецифічних білків у крові внаслідок

© С.П. Бесчасний

збільшення проникності гематоенцефалічного та гематолабиринтного бар’єрів [10, 12].

Встановлено, що за умов гострої форми СНТ у крові підвищується вміст фактора некрозу пухлин, ІЛ-1 і природних кілерів. Після переходу СНТ у хронічну форму, навпаки, констатують зниження цих показників у декілька разів [9, 10, 12]. Також за умов хронічної СНТ у крові виявлено підвищений вміст Т-хелперів [1, 7, 9].

Однак залишається невивченим питання залучення неспецифічної ланки імунної системи, її взаємодія з імунокомпетентними клітинами та станом активності гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи у дітей із вродженою двобічною СНТ. Особливої уваги заслуговують дослідження впливу хронічної СНТ у молодшому шкільному віці, оскільки цей період характеризується становленням гуморальної ланки імунітету (відповідно до рівня дорослих), завершенням розвитку системи неспецифічного захисту та підвищенням частоти аутоімунних процесів.

Мета роботи – дослідити особливості функціонування імунної системи в залежності від стану активності гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи у дітей 7–11 років в умовах вродженої СНТ.

## МЕТОДИКА

Обстежено 120 дітей, яких розділили на дві групи по 60 осіб у кожній: основну – діти із вродженою двобічною СНТ III–IV ступеня, ускладненою двобічним кохлеарним невритом і, контрольну – діти з нормальним слухом. Особливості міжлейкоцитарної взаємодії вивчали за вмістом прозапального ІЛ-2 і протизапальних ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10, ІЛ-13 у сироватці крові та слині. Стан гуморального імунітету оцінювали за вмістом ІgА, ІgМ та ІgG у сироватці крові та слині, гранулоцитарно-моноцитарну ланку – за допомогою показників фагоцитозу, вмісту лужної фосфатази (ЛФ), мієлопероксидази, катіонних білків і фосфоліпідів. Активність гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи визначали за вмістом адреналіну та 17-кетостероїдів у добовій порції сечі.

Функціональний стан гранулоцитарно-моноцитарної ланки вивчали, досліджуючи фагоцитарну активність нейтрофілів і моноцитів периферичної крові за методикою Кост, Стенко. [3]. Під час мікроскопії підраховували число фагоцитуючих лейкоцитів, розраховували показник фагоцитарного індексу (відсоток лейкоцитів, які брали участь у фагоцитозі) та фагоцитарного числа (середня кількість фагоцитованих мікроорганізмів одним фагоцитом).

Для визначення ефекторних впливів сенсоневральної туговухості на метаболічну активність гранулоцитів периферичної крові, досліджували вміст мієлопероксидази, катіонних білків, ліпідів і ЛФ. Вміст виражали за допомогою принципу Astaldi, заснованого на оцінці інтенсивності специфічної цитохімічної реакції із використанням чотирибальної шкали [3].

Активність ЛФ визначали методом азосполучення, який оснований на явищі розще-

плення ЛФ  $\alpha$ -нафтил-фосфату із вивільненням  $\alpha$ -нафтолу, котрий вступає у реакцію азосполучення з сіллю діазонію [3]. В результаті реакції у місцях активності ферменту випадає осад азобарвника.

Вміст катіонних білків виявляли за методикою Шубича, основою на вибіркового забарвленні катіонних білків бромфеноловим синім. Катіонний білок у цитоплазмі гранулоцитів був у вигляді синіх гранул [3].

Вміст мієлопероксидази досліджували за методом Graham, Knoll, який оснований на явищі окиснення бензидину пероксидом водню за наявності пероксидази у коричневий оксидбензидин [3]. Препарати дофарбовували барвником Романовського–Гімзи.

Цитохімічне виявлення фосфоліпідів периферичної крові проводили за методом Гольдмана із фарбуванням нейтрального жиру Суданом III у помаранчевий колір [3].

Вміст імуноглобулінів визначали із використанням стандартних наборів реагентів твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА), виготовлених НВЛ “Гранум” (м. Харків, Україна). Кров забирали за стандартною методикою за допомогою пробірок “Vacuete” для сироватки з активатором згортання. Для запобігання помутніння сироватки забір крові проводили натщесерце.

Для визначення вмісту саліварних імуноглобулінів протягом 5 хв збирали змішану нестимульовану слину (після полоскання ротової порожнини фізіологічним розчином) у стерильні пронумеровані мікробіологічні пробірки. Зразки слини заморожували і зберігали у морозильній камері.

Вміст інтерлейкінів ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10 та ІЛ-13 сироватки крові та слини також визначали за допомогою ІФА з використанням стандартних наборів реагентів “ProCon ІЛ-2”, “ProCon ІЛ-4”, “ProCon ІЛ-5”, “ProCon ІЛ-10”, “ProCon ІЛ-13” виробництва “Протеиновый контур” (м. Санкт-Петербург, Росія). Взяття та підготовку сироватки крові і слини здійснювали аналогічно методиці визначення вмісту імуноглобулінів. Детекцію результатів

ІФА сироватки і слини проводили за допомогою стрипового аналізатора Stat Fax 303 plus («Awareness Technology», США).

Добову порцію сечі для визначення вмісту адреналіну та 17 - кетостероїдів збирали у спеціальну ємність із консервантом. Під час усього періоду збору посудину зберігали у холодильнику при +10 °С. Перед проведенням аналізу діти не приймали препарати, які могли впливати на результати досліджень.

Вміст адреналіну у зразках добової сечі визначали колориметричним методом із використанням реактиву Фоліна [3]. Вміст 17-кетостероїдів також розраховували колориметричним методом із використанням спиртового розчину М-динітробензену.

Проводили статистичний і графічний аналіз результатів із використанням програми Statistica 6.0. Достовірність відмінностей визначали за непараметричним критерієм Манна–Уїтні. Характеристику набору бальних оцінок здійснювали за допомогою медіани. Критичний рівень достовірності був при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що вміст адреналіну у добовій порції сечі дітей із СНТ був вищим (46,04 мг/добу)

порівняно з контролем (16,78 мг/добу; рис. 1,а).

Аналогічна ситуація спостерігалася із вмістом 17-кетостероїдів. У основній групі він був достовірно вищим і становив 5,62 мг/добу порівняно з контролем – 4,54 мг/добу ( $P \leq 0,05$ ; див. рис. 1,б). Отримані результати вказують на наявність стрес-реакції у дітей із СНТ.

Функціональна активність лейкоцитів периферичної крові дітей із СНТ також відрізнялася ( $P \leq 0,05$ ) від значень у дітей контрольної групи. У дітей із СНТ показники фагоцитозу були зниженими зокрема, фагоцитарний індекс у основній групі становив 70,8 %, у контрольній – 93,8 % (рис. 2,а). Фагоцитарне число у основній групі сягало 3,6 %, у контролі – 10,4 % (див. рис. 2,б).

Відомо, що ЛФ лейкоцитів, здійснюючи дефосфорилування, бере безпосередню участь у процесах внутрішньоклітинної передачі сигналів з мембранних рецепторів. У гранулоцитах ЛФ безпосередньо локалізована у плазматичній мембрані та мембранах гранул [11].

Вміст ЛФ у гранулоцитах периферичної крові дітей із СНТ був вищим ( $P \leq 0,05$ ; рис. 3), що вказує на пригнічення функції гранулоцитів за рахунок впливу підвищеної кількості адреналіну та 17-кетостероїдів. Наше припущення підтверджується відомостями про те,

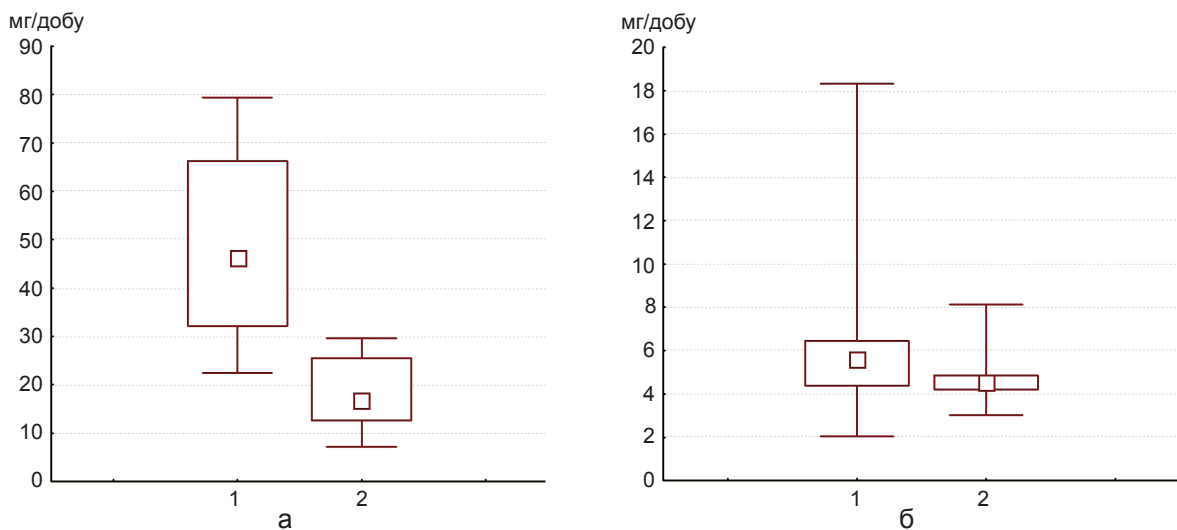


Рис. 1. Вміст адреналіну (а) та 17-кетостероїдів (б) у добовій порції сечі основної (1) та контрольної (2) груп.  $P \leq 0,05$



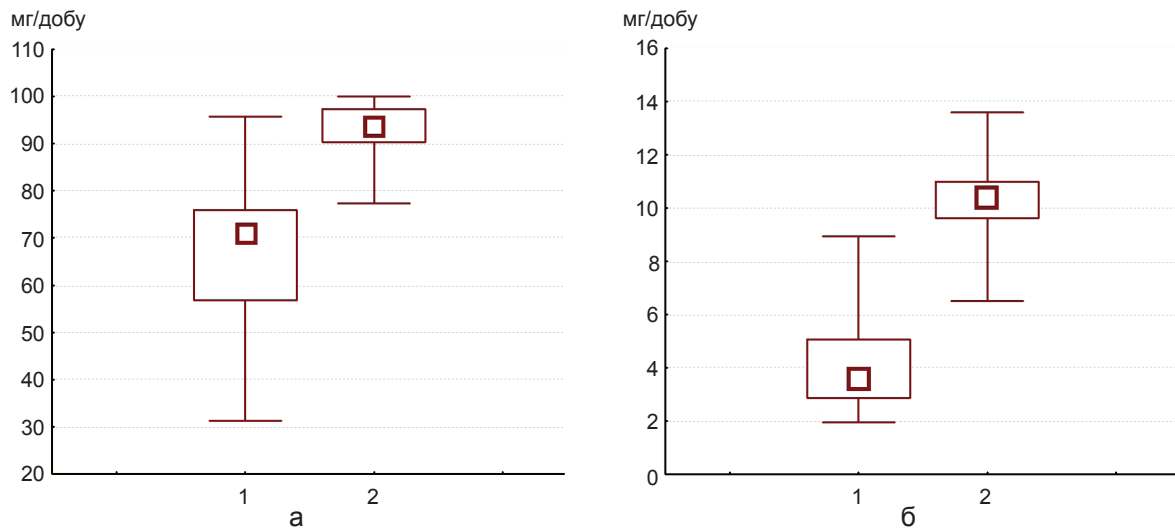


Рис. 2. Фагоцитарний індекс (а) та фагоцитарне число (б) дітей основної (1) та контрольної (2) груп.  $P \leq 0,05$

що вміст ЛФ підвищується при стресорних станах, внаслідок уведення стресорних гормонів [8].

У дітей основної групи порівняно з контрольною слід відмітити зниження вмісту мієлопероксидази (0,65 щодо 2,2 ум.од.), катіонних білків (0,9 щодо 1,25 ум.од.) і фосфоліпідів (2,1 щодо 2,4 ум.од.).

Згідно з літературними даними, високий вміст ЛФ блокує утворення активних форм кисню активованими клітинами, змінює рН і призводить до блокування активних центрів катіонних білків [30, 31]. Ми припускаємо, що подібний механізм лежить в основі зниження показників фагоцитозу в групі дітей із туговухістю, оскільки антимікробна здатність гранулоцитів забезпечується внаслідок так званого „респіраторного вибуху”, який реалізується за безпосередньої участі мієлопероксидази. Знижений вміст фосфоліпідів, що становлять 10–20 % сухої маси у лейкоцитах, вказує на знижену ефективність захисних реакцій, які здійснюються цими клітинами.

При порівнянні вмісту імуноглобулінів сироватки крові у дітей дослідної групи було виявлено вищий вміст IgA (2,5 г/л;  $P \leq 0,05$ ) та IgG дослідної (21,5 г/л) у порівнянні з контролем: 1,5 і 12,5 г/л відповідно. Водночас спостерігали знижений вміст IgM (0,88 г/л

порівняно з 1,3 г/л у контролі; рис. 4).

Підвищення вмісту IgG ми вважаємо ознакою аутоімунних процесів у дітей із СНТ, вмісту IgA – про запальні процеси слизової слухової труби та внутрішнього вуха. Зниження вмісту IgM, що пояснюється переключенням плазмоцитів на синтез IgG у дітей із СНТ, також є несприятливим фактором, оскільки основна функція цих імуноглобулінів полягає у хемотаксисі та активації фагоцитуючих клітин.

Вивчення вмісту саліварних імуноглобулінів важливе, оскільки цей метод не потребує інвазійного втручання, що має особливе

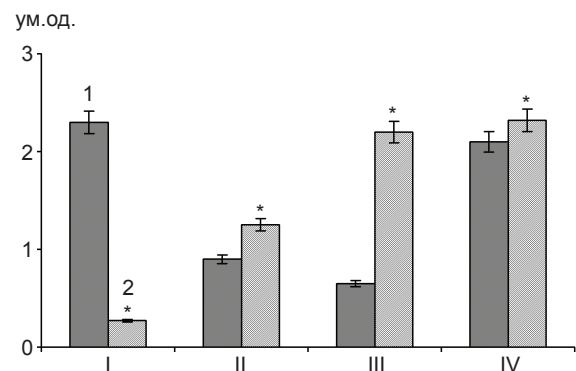


Рис. 3. Вміст лужної фосфатази (I), катіонних білків (II), мієлопероксидази (III), фосфоліпідів (IV) у гранулоцитах периферичної крові дітей основної (1) та контрольної (2) груп (середній цитохімічний коефіцієнт). \* $P \leq 0,05$  порівняно з контролем

значення при скринінгових дослідженнях стану місцевого імунітету у школярів. Ці імуноглобуліни мають подвійне походження: за рахунок місцевого синтезу плазматичними клітинами та трансудації через ясенний жолобок, який являє собою головне джерело лейкоцитів у ротовій порожнині.

Порівняння вмісту саліварних імуноглобулінів показало, що вміст IgA основної групи був нижчим (0,26 г/л;  $P \leq 0,05$ ) у порівнянні з контролем (1,3 г/л). У слині дітей із СНТ встановлено зниження вмісту IgM (0,48 г/л) відносно контролю (0,8 г/л). Разом з тим вміст саліварного IgG був вищим (1,8 г/л) порівняно із контрольною групою (0,98 г/л; див. рис. 4). Отримані нами результати вказують на дисбаланс продукції імуноглобулінів IgA, IgM та IgG у дітей молодшого шкільного віку із СНТ.

Відомо, що інтерлейкіни – білкові або поліпептидні продукти активованих клітин імунної системи, які відіграють роль медіаторів взаємодії у розвитку імунної відповіді. Їхня основна біологічна функція полягає у регуляції імунної відповіді на етапах проліферації, диференціації попередників функціональноактивних імунокомпетентних клітин, активації проліферації антигенчутливих лімфоцитів, диференціації В-лімфоцитів у плазматичні клітини, переключенні синтезу різних типів імуноглобулінів.

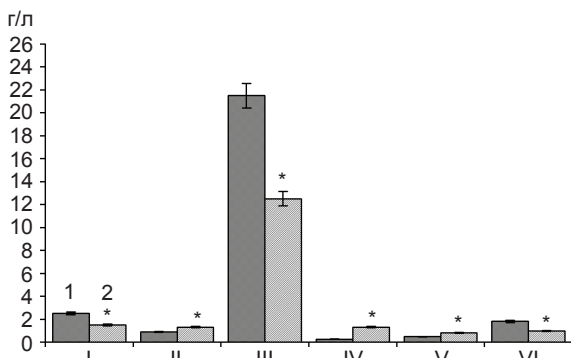


Рис. 4. Вміст імуноглобулінів IgA (I), IgM (II), IgG (III) у сироватці крові та IgA (IV), IgM (V), IgG (VI) у слині дітей основної (1) та контрольної (2) групи. \* $P \leq 0,05$  порівняно з контролем

При дослідженні вмісту інтерлейкінів сироватки крові у дітей із СНТ було виявлено певні особливості їх розподілу. Вміст прозапального ІЛ-2 у основній групі був нижчим (2,3 пг/мл;  $P \leq 0,05$ ), ніж у контрольній (3,64 пг/мл). На протипагу цьому вміст протизапальних ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10 та ІЛ-13 у основній групі був вищим. Слід відмітити високий вміст ІЛ-13 у сироватці крові дітей із туговухістю (29,95 пг/мл) при порівнянні з контролем (8,01 пг/мл), який є потужним стимулятором для диференціації Т-хелперів 0-го типу у Т-хелпери 2-го типу (рис. 5).

При дослідженні вмісту інтерлейкінів у слині було встановлено аналогічний розподіл показників. У основній групі вміст саліварного ІЛ-2 становив 0,01 пг/мл, у контрольній – 1,23 пг/мл. У дослідній групі, вміст ІЛ-4 (54,2 пг/мл), ІЛ-5 (3,82 пг/мл), ІЛ-10 (0,02 пг/мл) був вище, ніж у контрольній (0,31 пг/мл, 1,04 пг/мл та 0,02 пг/мл відповідно). Також зафіксовано підвищений вміст ІЛ-13 у основній групі (9,47 пг/мл) на відміну від контрольної (2,25 пг/мл; рис. 6).

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що у дітей молодшого шкільного віку під впливом хронічної двобічної СНТ спостерігається стресорна активація гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи. Адреналін і кортикостероїди, діючи на гранулоцитарно-моноцитарну ланку імунітету, пригнічують їх функції та спричиняють

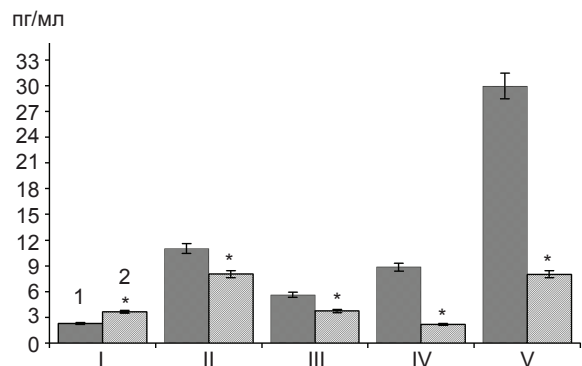


Рис. 5. Вміст інтерлейкінів ІЛ-2 (I), ІЛ-4 (II), ІЛ-5 (III), ІЛ-10 (IV), ІЛ-13 (V) у сироватці крові дітей основної (1) та контрольної (2) групи. \* $P \leq 0,05$  порівняно з контролем

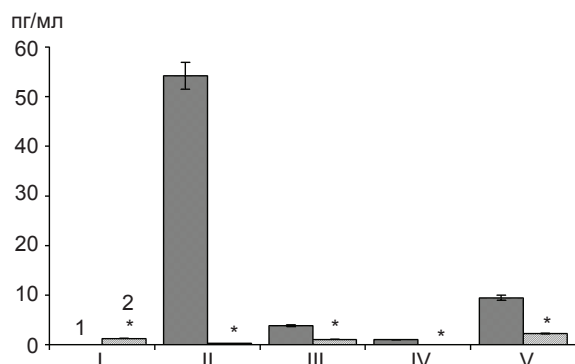


Рис. 6. Вміст саліварних інтерлейкінів ІЛ-2 (І), ІЛ-4 (ІІ), ІЛ-5 (ІІІ), ІЛ-10 (ІV), ІЛ-13 (V) дітей основної (1) та контрольної (2) групи. \* $P \leq 0,05$  порівняно з контролем

переважання протизапальних інтерлейкінів. Внаслідок підвищення вмісту протизапальних інтерлейкінів переважають Т-хелпери 2-го типу, що узгоджується з літературними даними [1, 7, 9]. Продукція гранулоцитами та Т-хелперами 2-го типу відповідних інтерлейкінів спричиняє активацію В-клітин і перетворення їх у плазматичні клітини – активні продуценти імуноглобулінів. Таким чином, у дітей 7–11 років в умовах СНТ послаблюється неспецифічний імунітет із переважанням гуморального типу імунної відповіді з підвищеним вмістом IgG.

## ВИСНОВКИ

1. У дітей молодшого шкільного віку із двобічною СНТ встановлено підвищення вмісту адреналіну та 17-кетостероїдів, що вказує на наявність стрес-реакції.

2. Після дослідження функціонального стану гранулоцитарно-моноцитарної ланки імунітету зафіксовано підвищений вміст ЛФ з одночасним зниженням вмісту мієлопероксидази, катіонних білків і фосфоліпідів у гранулоцитах на тлі знижених показників фагоцитозу.

3. У сироватці крові виявлено підвищений вміст IgA, IgG та знижений вміст IgM. Вміст саліварних IgA та IgM – знижений, IgG – підвищений. Встановлений дисбаланс імуноглобулінів (із підвищенням вмісту IgG)

вказує на латентний запальний процес.

4. Внаслідок впливу підвищених концентрацій адреналіну та 17-кетостероїдів на лейкоцити-продуценти інтерлейкінів у сироватці крові та слині дітей із туговухістю переважають протизапальні інтерлейкіни, які модулюють імунну відповідь за гуморальним типом із активацією В-лімфоцитів і переключенням на синтез IgG.

## С.П. Бесчасний

### СТРЕССОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ВРОЖДЕННОЙ СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТИ НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ ДЕТЕЙ 7–11 ЛЕТ

Исследовали влияние хронической двухсторонней сенсоневральной тугоухости III–IV степени на содержание интерлейкинов, иммуноглобулинов сыворотки крови и слюны, функциональную активность гранулоцитарно-моноцитарной ячейки иммунитета, оценивали активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы детей 7–11 лет. Установлено, что вследствие стрессорной активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы угнетается функция гранулоцитарно-моноцитарной ячейки иммунитета с соответствующим преобладанием продукции противовоспалительных интерлейкинов. Продукция гранулоцитами и Т-хелперами 2-го типа интерлейкинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13 приводит к активации В-лимфоцитов. Таким образом, у детей 7–11 лет с хронической двухсторонней сенсоневральной тугоухостью ослабляется неспецифический иммунитет с преобладанием гуморального типа иммунного ответа с повышенным содержанием IgG.

Ключевые слова: сенсоневральная тугоухость, интерлейкины, гранулоциты, фагоцитоз.

## S.P. Beschasniu

### EFFECT OF CHRONIC SENSORINEURAL HEARING LOSS AT SEVERAL INDICATORS OF IMMUNE AND ENDOCRINE SYSTEMS OF CHILDREN 7–11 YEARS

We investigated the effects of chronic bilateral sensorineural hearing loss of III–IV degree on the performance of interleukins, immunoglobulins serum and saliva, the functional activity of granulocyte-monocyte cell immunity, evaluated the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in children aged 7–11 years. It was found that due to stress activation of the sympathetic-adrenal system the function of granulocytes and monocytes is suppressed, with a predominance of production of anti-inflammatory interleukins. This leads to the dominance of T-helper type 2. Products granulocytes and T-helper type-2

anti-inflammatory interleukins IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 leads to the activation of B-cells. Thus, in children 7-11 years of age with congenital bilateral sensorineural hearing loss is a decrease of non-specific humoral immunity dominated type of immune response to increased levels of IgG.

Keywords: sensorineural hearing loss, interleukins, granulocytes, phagocytosis.

*Kherson State University*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гребенюк И.Э. Этиопатогенетические аспекты сенсоневральной тугоухости: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2007. – 22 с.
2. Золотова Т. В. Дифференциальный подход к лечению сенсоневральной тугоухости: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2004. – 41 с.
3. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / под ред. В.В. Меншикова. – М.: Медицина, 1987. — 368 с.
4. Мельников О.Ф., Сидоренко Т.Ф., Заяц Т.А., Тимен Г.Э., Чашева Е.Г. Аутоиммунные реакции гуморального и клеточного типов на антигены нервной ткани у детей с сенсоневральной тугоухостью // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2003. – №6. – С. 5–8.
5. Нугуманов А.А. Аутоиммунные заболевания внутреннего уха и методы их лечения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Санкт-Петербург, 2008. – 28 с.
6. Тимен Г.Э. Мельников О.Ф., Писанко В.Н., Самбур М.Б., Голод А.Н. Клинико-аудиологические признаки аутоиммунной СНТ // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2000. – №6. – С. 105–108.
7. Чашева О.Г. Клініко-імунологічні аспекти в діагностиці та лікуванні дітей з сенсоневральною приглухуватістю: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 2007. – 20 с.
8. Bednarska K., Klink M., Sulowska Z. Application of intracellular alkaline phosphatase activity measurement in detection of neutrophil adherence in vitro // Mediators Inflamm. – 2006. – 4. – P. 19307–19312.
9. Broughton S.S., Meyerhoff W.E., Cohen S.B. Immune-mediated inner ear disease: 10-year experience // Semin. Arthritis. Rheum. – 2004. – 34, №2. – P.544–548.
10. Garcia Berrocal J.R., Berrocal, R. Ramirez-Camacho Sudden sensorineural hearing loss: supporting the immunologic theory // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. – 2002. – №111. – P. 989–997.
11. Pellme S., Dahlgre N.C., Karlsson A. The two neutrophil plasma membrane markers alkaline phosphatase and HLA class I antigen localize differently in granule-deficient cytoplasts. An ideal plasma membrane marker in human neutrophils is still lacking // J. Immunol. Methods. – 2007. – 325. – P. 1562–1570.
12. Reddy M.V., Satyanarayana V.V., Hemabindu L. Immunological studies in children with hearing impairment // Indian. Med. Assoc. – 2005. – 103, №10. – P.520–521.

*Херсон. ун-т*

*E-mail: [beschasniu@yandex.ru](mailto:beschasniu@yandex.ru)*

*Матеріал надійшов до редакції 22.11.2012*

М.С. Шипшина, М.С. Веселовський

## Пре- та постсинаптичні механізми довготривалої депресії глутаматергічної нейропередачі в синапсах нейронів спінальних гангліїв на нейронах дорсальних рогів спинного мозку щурів у кокультури

*У кокультури нейронів спінальних гангліїв (СГ) і дорсальних рогів (ДР) спинного мозку щурів досліджували механізми дієзалежної довготривалої депресії (ДТД) глутаматергічної нейропередачі внаслідок низькочастотної ( $5\text{ с}^{-1}$ ) стимуляції (НЧС) нейронів СГ. Аналізували опосередковані активацією АМПА-рецепторів викликані збуджувальні постсинаптичні струми (вЗПСС) у нейронах ДР у відповідь на потенціал дії поодиноких нейронів СГ. Стимуляція останніх тривалістю від 60 до 360 с впливала на рівень ДТД і на залучення механізмів її експресії. Амплітуда та значення коефіцієнта варіації (CV) мініатюрних ЗПСС не змінювалися після стимуляції різних тривалостей. НЧС протягом 60 с не призводила до змін амплітуд вЗПСС, але збільшувала CV на  $56,8\% \pm 11,5\%$  ( $n=5$ ), коефіцієнт парної стимуляції (КПС) на  $37,8\% \pm 11,4\%$  ( $n=5$ ) і зменшувала ймовірність вивільнення глутамату ( $p$ ) на  $21,9\% \pm 5,6\%$  ( $n=5$ ). Результати свідчать про можливе залучення пресинаптичних механізмів депресії. Стимуляція нейронів СГ протягом 120 с зменшувала амплітуду вЗПСС на  $14,3\% \pm 3,9\%$  ( $n=13$ ), але не змінювала CV, КПС та  $p$ . ДТД за таких умов експресується постсинаптично. НЧС протягом 160, 200, 240 та 360 с зменшувала амплітуду вЗПСС на  $37,3 \pm 4,3$  ( $n=9$ ),  $48,1 \pm 3,5$  ( $n=7$ ),  $58,3 \pm 2,5$  ( $n=8$ ) та  $57,3\% \pm 2,8\%$  ( $n=8$ ) відповідно, але не змінювала КПС та  $p$ . При цьому рівень ДТД після НЧС цих тривалостей корелював зі збільшенням значень CV ( $r=0,96$ ). Можливо, в реалізації ДТД задіяні механізми, що “вимикають” функціональні синапси без зміни  $p$ . Ключові слова: синаптична передача, довготривала депресія, низькочастотна стимуляція, спінальні ганглії, дорсальні роги, кокультура, глутамат, АМПА-рецептори.*

### ВСТУП

Перші сенсорні синапси, сформовані між центральними терміналами нейронів спінальних гангліїв (СГ) і нейронами дорсальних рогів (ДР) спинного мозку, відіграють визначальну роль у передачі соматосенсорної інформації з периферії в ЦНС. Дієзалежна синаптична пластичність у цих синапсах призводить до зміни ефективності нейропередачі і може впливати на параметри сенсорних сигналів, що надходять до мозку [9]. Відомо, що електрична стимуляція соматосенсорних шляхів призводить до збільшення або зменшення чутливості у ноцицептивній системі. Так, низькочастотна

© М.С. Шипшина, М.С. Веселовський

черезшкірна електроакупунктурна стимуляція при низьких або середніх інтенсивностях, що продукують терпимий біль, чинить гіпоалгезивну та аналгезивну дію [2, 17, 18]. Такий ефект може бути пов'язаний з індукцією довготривалої депресії (ДТД) у синапсах первинних аферентів [13]. Однак цей аспект досліджений недостатньо.

Відомо, що ноцицептивні нейрони СГ щурів реагують на природні стимули (укол, защемлення ділянки шкіри, сильне нагрівання) генерацією потенціалів дії (ПД) з частотою  $5\text{--}20\text{ с}^{-1}$  (при електричному відведенні від соми) [6, 7]. Вочевидь, для таких нейронів генерація ПД з частотою  $5\text{ с}^{-1}$  може біти



інтерпретована як реакція на стимули, що викликають терпимий біль. Наші попередні дослідження довели, що тривала умовна стимуляція саме з такою частотою індукує ДТД глутаматергічної нейропередачі в синапсах поодиноких нейронів СГ на нейронах ДР у кокультурі [14]. Мета нашої роботи – визначити вплив тривалості НЧС з частотою  $5 \text{ с}^{-1}$  на рівень ДТД глутаматергічної нейропередачі та визначити основні локуси експресії цієї форми пластичності.

## МЕТОДИКА

Кокультуру нейронів ДР і СГ шурів отримували згідно з методикою, що була описана раніше [15]. З використанням методу patch-clamp у конфігурації “ціла клітина” у парі синаптично зв’язаних нейронів, у нейронах ДР реєстрували викликані збуджувальні постсинаптичні струми (вЗПСС) внаслідок генерації ПД у нейроні СГ поштовхами струму тривалістю 30 мс та амплітудою 50 пА. ДТД у досліджуваних синапсах викликали низькочастотною стимуляцією (НЧС): на сому нейрона СГ протягом 60–360 с з частотою  $5 \text{ с}^{-1}$  подавали серію поштовхів струму, кожен з яких викликав ПД. У контролі та після НЧС вЗПСС викликали з частотою 0,1 або  $0,05 \text{ с}^{-1}$ . Як показники стабільності фіксації потенціалу на нейронах ДР розраховували амплітуду струму витoku ( $I_{\text{вит}}$ ) та значення сталої часу емнісного струму ( $\tau_{\text{емн}}$ ) у відповідь на стимул тривалістю 10 мс та амплітудою -10 мВ. Під час експериментів варіації значень  $\tau_{\text{емн}}$  та  $I_{\text{вит}}$  не перевищували 20 %.

Внутрішньоклітинний розчин у patch-піпетках містив (ммоль/л): калію глюконату – 155; EGTA – 0,5;  $\text{MgCl}_2$  – 1; NEPES – 20 (рН доводили до 7,4 додаванням КОН). Зовнішньоклітинний розчин такого складу (ммоль/л):  $\text{NaCl}$  – 140;  $\text{KCl}$  – 3;  $\text{CaCl}_2$  – 2;  $\text{MgCl}_2$  – 2; глюкози – 12; NEPES – 20 (рН доводили до 7,4 додаванням  $\text{NaOH}$ ). Аплікація та зміна розчинів, що мали блокатори, відбувалася

безупинно (швидкість зміни розчинів 2 мл/хв). Реактиви були отримані від фірми “Sigma” (США), а SYM 2081 від фірми “Tocris” (Велика Британія).

Аналіз результатів виконували за допомогою програмних пакетів “Clampfit 9.0” (“Axon Instruments”, США), “Excel 2007” (“Microsoft Corporation”, США). Просту біноміальну модель [4, 16] використовували для визначення ймовірності вивільнення нейро-медіатора (p) у досліджуваних синапсах:  $p = 1 + CV_q^2 - m \cdot CV^2$ , де  $CV_q$  – коефіцієнт варіації амплітуд одиничних квантових подій, (q), m – квантовий вміст (середня кількість квантів медіатора, що вивільняється на один пресинаптичний ПД);  $m = \text{вЗПСС}_{\text{сер.}}/q$ . Розмір кванта q визначали, як середню амплітуду мініатюрних ЗПСС (мЗПСС). Коефіцієнт варіації вЗПСС розраховували за наступним рівнянням:  $CV = \sigma/\text{вЗПСС}_{\text{сер.}}$ , де  $\sigma$  – стандартне відхилення амплітуд вЗПСС,  $\text{вЗПСС}_{\text{сер.}}$  – середнє значення амплітуд вЗПСС. Коефіцієнт парної стимуляції (КПС) розраховували як співвідношення другого вЗПСС до першого в парі, виміряних з міжімпульсним інтервалом 200 мс. Результати представлені як середнє значення  $\pm$  середньо-квадратична похибка середнього.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як пресинаптичні обирали нейрони СГ із середнім діаметром  $17,09 \text{ мкм} \pm 0,54 \text{ мкм}$  ( $n=45$ ). Значення потенціалу спокою нейронів СГ ( $-50,1 \text{ мВ} \pm 0,9 \text{ мВ}$ ;  $n = 43$ ), входного опору ( $0,41 \text{ ГОм} \pm 0,02 \text{ ГОм}$ ) та клітинної ємності ( $38,79 \text{ пФ} \pm 1,15 \text{ пФ}$ ) не значно відрізнялись у досліджуваних нейронів СГ. Вони генерували ПД з характерною плато-подібною компонентою у фазі реполяризації. Середні значення ширини (на піввисоті) окремого ПД, амплітуд ПД і слідової гіперполяризації та порога виникнення ПД становили:  $3,27 \text{ мс} \pm 0,13 \text{ мс}$  ( $n = 43$ ),  $83,75 \pm 4,16$  ( $n = 43$ ),  $-16,93 \pm 2,97$  ( $n = 34$ ) та  $27,51 \text{ мВ} \pm 1,07 \text{ мВ}$  ( $n = 43$ ) відповідно.

Генерація ПД цих нейронів викликала вЗПСС у клітинах ДР у режимі парної реєстрації. Враховуючи діапазон розмірів клітинних тіл, електричні характеристики нейронів СГ узгоджуються з такими, описаними в літературних джерелах для ноцицептивних первинних аферентних нейронів [5, 8, 12].

Швидка збуджуюча нейропередача в синапсах нейронів СГ на нейронах ДР у кокультурі відбувається завдяки пресинаптичному вивільненню глутамату [15]. При підтримуваному потенціалі  $-70$  мВ глутаматергічні вЗПСС були опосередковані активацією постсинаптичних АМПА-рецепторів. Аплікації селективних блокаторів НМДА-рецепторів  $D_L$ -AP5 (10 мкмоль/л) і каїнатних рецепторів SYM 2081 (10 мкмоль/л) не впливали на амплітуду та кінетику спаду вЗПСС. Прикладання антагоніста неНМДА-рецепторів DNQX (10 мкмоль/л) повністю блокувало вЗПСС (не показано).

Ми визначали вплив НЧС тривалістю 60, 120, 160, 200, 240 та 360 с на рівень ДТД у синапсах поодиноких нейронів СГ. НЧС протягом 60 с не призводила до достовірного зменшення амплітуд вЗПСС ( $n=5$ ), а впродовж 120 с викликала вірогідне зменшення амплітуди вЗПСС на  $14,3 \pm 3,9 \%$  ( $n=13$ ). Після НЧС протягом 160, 200, 240 та 360 с в усіх випадках спостерігалось достовірне зменшення середньої амплітуди вЗПСС у порівнянні зі значеннями в контролі на  $37,3 \pm 4,3$  ( $n=9$ ),  $48,1 \pm 3,5$  ( $n=7$ ),  $58,3 \pm 2,5$  ( $n=8$ ) та  $57,3 \pm 2,8 \%$  ( $n=8$ ) відповідно (рис.1).

Для визначення локусу експресії ДТД внаслідок НЧС різних тривалостей аналізували значення коефіцієнтів варіації (CV) вЗПСС, коефіцієнтів парної стимуляції (КПС) та власне  $r$  в досліджуваних синапсах [4, 16]. Пресинаптична експресія ДТД пов'язана зі зниженням  $r$ , про що свідчать дос-

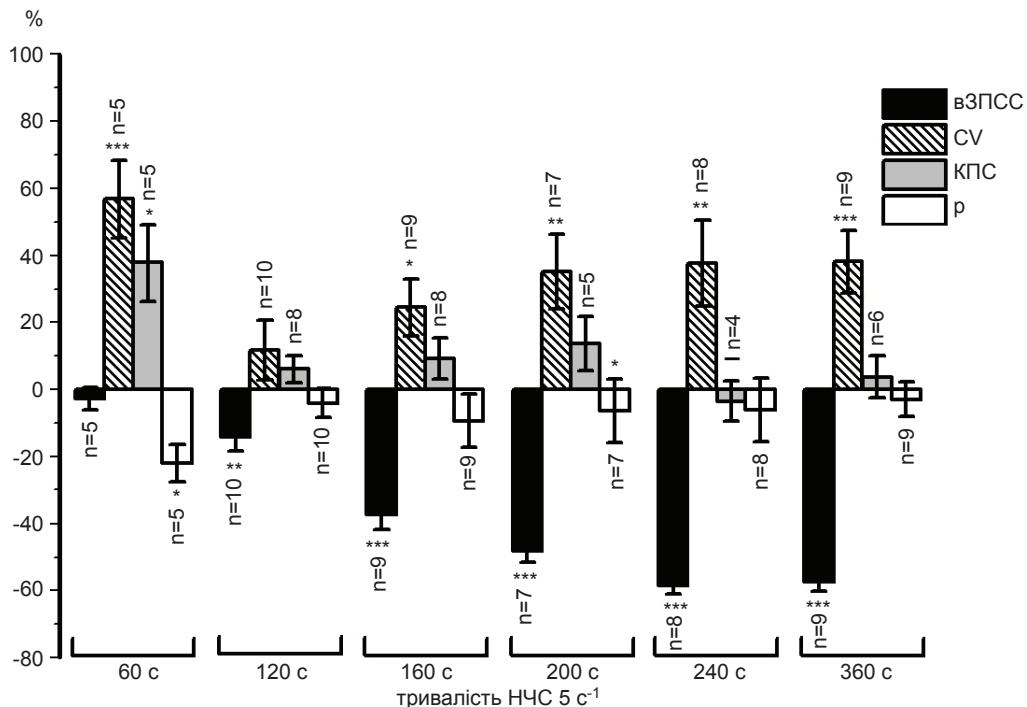


Рис. 1. Статистичне порівняння показників довготривалої депресії (ДТД) глутаматергічної нейропередачі в синапсах поодиноких нейронів спінальних гангліїв (СГ) залежно від тривалості їх низькочастотної стимуляції (НЧС) з частотою  $5\text{ с}^{-1}$ . За 0 % приймали 100%-ве значення кожного параметра в контролі. На графіку позначені: вЗПСС – середнє значення амплітуди вЗПСС; CV – коефіцієнт варіації амплітуд вЗПСС; КПС – коефіцієнт парної стимуляції; r – ймовірність вивільнення глутамату в синапсах поодинокого нейрона СГ. \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,005$ ; \*\*\* $P<0,001$  порівняно з контролем

товірні зміни у значеннях CV, КПС, або зі зменшенням кванта медіатора, що відображує зменшення амплітуди мЗПСС після індукції ДТД.

мЗПСС реєстрували в нейронах ДР при підтримуваному потенціалі -70 мВ на фоні аплікації ТТХ (0,25 мкмоль/л). Глутаматергічні мЗПСС блокувалися антагоністом неНМДА-рецепторів DNQX (10 мкмоль/л), характеризувалися унімодальним розподілом амплітуд. Квант  $q$  глутамату, визначений як середнє значення амплітуд мЗПСС, становив  $19,47 \text{ пА} \pm 0,69 \text{ пА}$  ( $n = 25$ ). Моді амплітудних розподілів мЗПСС відповідали значенням перших мод двох або тримодальних розподілів амплітуд спонтанних ЗПСС ( $20,56 \text{ пА} \pm 0,42 \text{ пА}$ ;  $n=25$ ), зареєстрованих у тих самих нейронах ДР. На підставі цього, в експериментах з індукції ДТД ефект вивільнення одиничного кванта глутамату визначався за першою модою амплітудних гістограм сЗПСС. Значення  $q$  та  $CV_q$ , виміряні для різних пар досліджуваних нейронів при аналізі сЗПСС, у контролі та після дії НЧС різних тривалостей достовірно не відрізнялися (рис.2). Отже, ДТД не супроводжувалася зменшенням кванта нейромедіатора в досліджуваних синапсах.

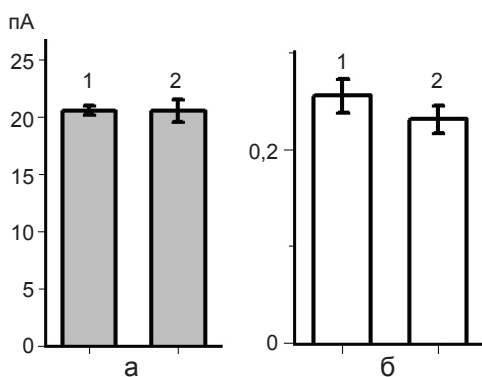


Рис. 2. Статистичне порівняння значень ефекту вивільнення кванта глутамату в синапсах поодиноких нейронів спінальних гангліїв у контролі – 1 ( $n=23$ ) та після індукції довготривалої депресії – 2 ( $n=12$ ). На а – усереднені значення амплітуд одиничних квантових подій ( $q$ ), на б – усереднені значення коефіцієнтів варіації квантових амплітуд ( $CV_q$ )

Різні тривалості НЧС з частотою  $5 \text{ с}^{-1}$  призводили до змін CV і КПС після індукції депресії у порівнянні з відповідним значеннями у контролі. Після НЧС протягом 60 с спостерігалася вірогідне збільшення CV вЗПСС на  $56,8 \pm 11$  та КПС на  $37,8 \% \pm 11,4 \%$  ( $n=5$ ; див. рис.1),  $p$ , розрахована за біноміальним законом, вірогідно знижувалася на  $21,9 \% \pm 5,6 \%$  ( $n=5$ ). Отримані результати вказують на залучення пресинаптичних механізмів ДТД після НЧС протягом 60 с, які, враховуючи незмінність середньої амплітуди вЗПСС, вочевидь пов'язані зі збільшення числа зон вивільнення медіатора. Можливо НЧС призводить до активації раніше незадіяних у нейропередачі синапсів поодинокого нейрона СГ, оскільки не всі синапси первинних аферентів беруть участь у синаптичній передачі за нормальних умов. Внаслідок НЧС упродовж 120 с ДТД не супроводжувалася зміною CV, КПС та  $p$  ( $n=13$ ; див. рис.1). Отже, при НЧС такої тривалості до експресії ДТД залучалися постсинаптичні механізми, що спричиняли ефективно зменшення сили синаптичної передачі в досліджуваних синапсах. ДТД, викликана НЧС протягом 160, 200, 240 та 360 с, пов'язана з вірогідним збільшенням значень CV на  $24,4 \pm 8,6$  ( $n=6$ ),  $35,1 \pm 11,2$  ( $n=6$ ),  $37,7 \pm 12,8$  ( $n=7$ ) та  $38,1 \% \pm 9,3 \%$  ( $n=8$ ) відповідно. При цьому різниця у значеннях  $p$  та КПС у контролі та після індукції ДТД не сягала статистично значущого рівня (див. рис.1), що свідчить про постсинаптичну експресію ДТД.

За даними деяких досліджень, збільшення значень CV при незмінності  $p$  і КПС є показником редукції кількості активних синапсів, що роблять внесок у реалізацію інтегрального вЗПСС, тобто про “замовкання” окремих синапсів [1, 3, 11]. У літературі описаний механізм забезпечення процесу “замовкання” синапсів, пов'язаний із зменшенням кількості функціональних постсинаптичних АМПА-рецепторів через їх інтерналізацію [10]. Такі ефекти пластичності відомі в глутаматергічних синапсах

на ранніх стадіях постнатального розвитку в різних регіонах мозку [1, 11, 19]. Очевидно, що зниження числа постсинаптичних рецепторів повинно призводити до зменшення одиничної квантової події, чого не спостерігалось в наших експериментах. Отже, найбільш імовірним механізмом експресії ДТД внаслідок тривалої (160 – 360 с) пресинаптичної НЧС є зменшенням кількості залучених до нейропередачі синапсів у результаті їх стомлення після тривалої активності. В такому разі ДТД є наслідком змін у пресинаптичних зонах первинних аферентних терміналей на нейронах ДР. При збільшенні тривалості НЧС від 160 до 360 с рівень ДТД лінійно залежав від збільшення значень CV ( $r=0,96$ ; рис.3), що свідчить про залежність процесу “замовкання” глутаматергічних синапсів від тривалості умовної стимуляції з частотою  $5 \text{ с}^{-1}$ .

Зараз відомо, що аферентна стимуляція може полегшувати або стримувати (гальмувати) синаптичну передачу ноцицептивної інформації в спинному мозку. Наведені ре-

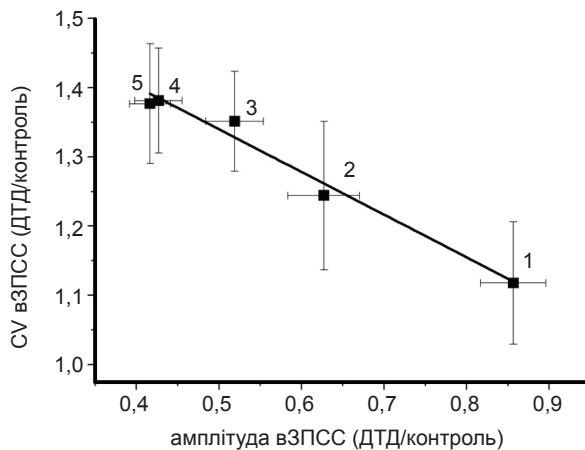


Рис. 3. Лінійна залежність змін відносних значень середніх амплітуд викликаних збуджуючих постсинаптичних струмів (вВПСС) і коефіцієнтів варіації (CV) вВПСС після індукції довготривалої депресії (ДТД) внаслідок низькочастотної стимуляції (НЧС) нейронів СГ. Цифрами позначені усереднені значення показників, отриманих при аналізі ефектів ДТД, викликаного НЧС  $5 \text{ с}^{-1}$  наступних тривалостей: 1 – 120 с ( $n=8$ ), 2 – 160 с ( $n=6$ ), 3 – 200 с ( $n=6$ ), 4 – 240 с ( $n=7$ ), 5 – 360 с ( $n=8$ ). Експериментальні результати апроксимовані лінійною функцією ( $r=0,96$ )

зультати демонструють, що маніпуляції тривалістю низькочастотної стимуляції нейронів СГ можуть забезпечити спрямовану корекцію ефективності глутаматергічної нейропередачі в первинних аферентних синапсах.

*Результати, представлені в роботі, частково фінансувалися за проектом НАНУ «Функціональна геноміка міжнейронної взаємодії та субнейронних процесів за нормальних та патологічних умов» і сумісним російсько-українським проектом «З'ясування природи нейротропних ефектів пептидів групи гліпролінів у нормі та на моделях пошкодження нейронів».*

**М.С. Шипшина, Н.С. Веселовский**

### **ПРЕ- И ПОСТСИНАПТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ДЕПРЕССИИ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОПЕРЕДАЧИ В СИНАПСАХ НЕЙРОНОВ СПИНАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ НА НЕЙРОНАХ ДОРСАЛЬНЫХ РОГОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫС В КОКУЛЬТУРЕ**

В кокультуре нейронів спинальних ганглієв (СГ) і дорсальних рогов (ДР) спинного мозку крыс исследовали механизмы долговременной депрессии (ДВД) глутаматергической нейропередачі в синапсах нейронів СГ вследствие их низькочастотной ( $5 \text{ с}^{-1}$ ) стимуляції (НЧС). Анализировали опосредованные активацией АМ-ПА-рецепторов вызванные возбуждающие постсинаптические токи (вВПСТ) в нейронах ДР в ответ на потенциал действия одиночных нейронів СГ. НЧС нейронів СГ длительностью от 60 до 360 с влияла на амплитуду ДВД и на вовлечение механизмов ее экспресии. Амплитуда и значения коэффициента вариации (CV) миниатюрных постсинаптических токов достоверно не изменялись после индукции депрессии. НЧС на протяжении 60 с не приводила к изменениям амплитуд вВПСТ, но вызывала увеличение CV на  $56,8\% \pm 11,5\%$  ( $n=5$ ), коэффициента парной стимуляції (КПС) на  $37,8\% \pm 11,4\%$  ( $n=5$ ) и снижение вероятности выброса глутамата (р) на  $21,9\% \pm 5,6\%$  ( $n=5$ ). Результаты свидетельствуют о вовлечении пресинаптических механизмов депрессии нейропередачі. НЧС на протяжении 120 с вызывала уменьшение амплитуды вВПСТ на  $14,3\% \pm 3,9\%$  ( $n=13$ ), но не изменяла CV, КПС и р. В таких условиях долговременная депрессия развивается постсинаптически. Стимуляция на протяжении 160, 200, 240 и 360 с вызывала снижение амплитуды вВПСТ на  $37,3\% \pm 4,3\%$  ( $n=9$ ),  $48,1\% \pm 3,5\%$  ( $n=7$ ),  $58,3\% \pm 2,5\%$  ( $n=8$ ) и  $57,3\% \pm 2,8\%$  ( $n=8$ ) соответственно, но не вызывала изменений значений КПС и р. При этом уровень депрессии после стимуляції указанных длительностей



коррелировал с увеличением значений CV ( $r=0,96$ ). Вероятно, в реализации долговременной депрессии задействованы механизмы, стимулирующие “умолкание” функциональных синапсов без изменения р.

Ключевые слова: синаптическая передача, долговременная депрессия, низкочастотная стимуляция, спинальные ганглии, дорсальные рога, кокультура, глутамат, АМПА-рецепторы.

**M.S. Shyphyna, M.S. Veselovsky**

**PRE- AND POSTSYNAPTIC EXPRESSION MECHANISMS OF LONG-TERM DEPRESSION AT RATS GLUTAMATERGIC PRIMARY AFFERENT SYNAPSES ON DORSAL HORN SPINAL CORD NEURONS IN CO-CULTURE**

In co-culture of dorsal root ganglion (DRG) and dorsal horn (DH) neurons we studied the long-term depression (LTD) caused by 5 sec<sup>-1</sup> low-frequency stimulation (LFS) of DRG neurons. Dual whole-cell patch clamp recording in the pairs of DRG and DH neurons was used. The monosynaptic AMPA-receptor mediated eEPSC initiated in DH neurons by LFS of DRG neurons were analyzed. LFS with durations from 60 to 360 sec affected the LTD magnitude and involved the different LTD expression mechanisms. The amplitude and variability of miniature EPSC were not changed during LTD. LFS during 60 sec did not alter the eEPSC amplitudes, but significantly increased the coefficient of variation (CV; 56,8%±11,5%, n=5; P<0,002) and the paired-pulse ratio (PPR; 37,8%±11,4%, n=5; P< 0,05), and decreased the release probability (p; 21,9%±5,6%, n=5; P< 0,05) calculated using binomial analysis. LFS for 120 sec led to LTD (eEPSC decreased to 14%±3,3%, n=13; P<0,005); no changes in CV, PPR and p were found. LFS for 160, 200, 240 and 360 sec induced robust LTD: eEPSC decreased to 37,3±4,3 (n=9); 48,1±3,5 (n=7); 58,3±2,5 (n=8) and 57,3%±2,8% (n=8), respectively; P<0,001. LTD induced by such LFS durations was not accompanied by significant changing in PPR and p, but showed an increase in CV: 24,4±8,6 (n=6); 35,1±11,2 (n=6); 37,7±12,8 (n=7), and 38,1%±9,3% (n=8), respectively. LTD magnitude was correlated with the enhancement in CV value at different LFS duration ( $r=0,96$ ). Our data suggest that the different mechanisms could be involved in LTD expression according to duration of LFS. Thus, 60 sec LFS induces presynaptic changes, but no change in eEPSC, whereas LTD elicited by 120 and 160 sec LFS affected the postsynaptic site. LTD initiated by longer LFS (200 – 360 sec) probably was caused by a silencing of functional synapses without changes in glutamate release probability.

Key words: synaptic transmission, long-term depression, low-frequency stimulation, DRG, DH, co-culture, glutamate, AMPA-receptors.

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv*

*International Center of Molecular Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv.*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Abrahamsson T., Gustafsson B., Hanse E. Synaptic fatigue at the naive perforant path-dentate granule cell synapse in the rat // *J. Physiol.* – 2005. – **569**, № 3. – P. 737–750.
2. Chesterton L.S., Barlas P., Foster N.E., Lundeberg T., Wright C.C., Baxter G.D. Sensory stimulation (TENS): effects of parameter manipulation on mechanical pain thresholds in healthy human subjects // *Pain.* – 2002. – **99**, № 1–2. – P. 253–262.
3. Choi S., Lovinger D.M. Decreased probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**, № 6. – P. 2665–2670.
4. D’Errico A., Prestori F., D’Angelo E. Differential induction of bidirectional long-term changes in neurotransmitter release by frequency-coded patterns at the cerebellar input // *J. Physiol.* – 2009. – **587**, № 24. – P. 5843–5857.
5. Fang X., McMullan S., Lawson S.N., Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo // *J. Physiol.* – 2005. – **565**, № 3. – P. 927–943.
6. Fitzgerald M. Cutaneous primary afferent properties in the hind limb of the neonatal rat // *J. Physiol.* – 1987. – **383**, № 1. – P. 79–92.
7. Fulton B.P. Postnatal changes in conduction velocity and soma action potential parameters of rat dorsal root ganglion neurons // *Neurosci. Lett.* – 1987. – **73**, № 2. – P. 125–130.
8. Harper A.A., Lawson S.N. Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities // *J. Physiol.* – 1985. – **359**, № 1. – P. 47–63.
9. Huettner J.E., Kerchner G.A., Zhuo M. Glutamate and the presynaptic control of spinal sensory transmission // *Neuroscientist.* – 2002. – **8**, № 2. – P. 89–92.
10. Lin J. W., Ju W., Foster K., Lee S.H., Ahmadian G., Wyszynski M., Wang Y.T., Sheng M. Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization // *Nat. Neurosci.* – 2000. – **3**, № 12. – P. 1282–1290.
11. Meng K., Li Y.H., Zhang L., Li P., Han T.Z. Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors mediate induction of test pulse depression of naive synapses in rat visual cortical slices at early postnatal stage // *Neuroscience.* – 2010. – **165**, № 3. – P. 684–691.
12. Petruska J.C., Napaporn J., Johnson R.D., Gu J.G., Cooper B.Y. Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents // *J. Neurophysiol.* – 2000. – **84**, № 1. – P. 2365–2379.
13. Sandkuhler J., Chen J.G., Cheng G., Randic M. Low-frequency stimulation of afferent Adelta-fibers induces long-term depression at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurons in the rat // *J. Neurosci.* – 1997. – **17**, № 16. – P. 6483–6491.



14. Shipshina M.S., Fedulova S.A., Veselovsky M.S. Induction of long-term depression of synaptic transmission in a co-culture of DRG and spinal dorsal horn neurons of rat // *Neirofiziologiya /Neurophysiology*. – 2011. – 43, № 4. – P. 356–368.
15. Shypshyna M.S., Veselovsky M.S. Characteristics of sensory neurotransmission in co-culture of neurons from the dorsal root ganglion and dorsal horn spinal cord in rats // *Fiziol. Zh.* – 2010. – 56, № 4. – P. 26–36.
16. Sola E., Prestori F., Rossi P., Taglietti V., D'Angelo E. Increased neurotransmitter release during long-term potentiation at mossy fibre-granule cell synapses in rat cerebellum // *J. Physiol.* – 2004. – 557, № 3. – P. 843–861.
17. Walsh D.M., Liggett C., Baxter D., Allen J.M. A double-blind investigation of the hypoalgesic effects of transcutaneous electrical nerve stimulation upon experimentally induced ischaemic pain // *Pain*. – 1995. – 61, № 1. – P. 39–45.
18. Ward L., Wright E., McMahon S.B. A comparison of the effects of noxious and innocuous counterstimuli on experimentally induced itch and pain // *Pain*. – 1996. – 64, № 1. – P. 129–138.
19. Wasling P., Strandberg J., Hanse E. AMPA receptor activation causes silencing of AMPA receptor-mediated synaptic transmission in the developing hippocampus // *PLoS. One*. – 2012. – 7, № 4. – e34474.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Міжнар. центр молек. фізіології НАН України, Київ  
E-mail: shypshyna.mariia@gmail.com*

*Матеріал надійшов до  
редакції 24.11.2011*

В.Г. Радченко

## Нові підходи до корекції гіперактивності сечового міхура

*Проаналізовано причини розвитку гіперактивних скорочень детрузора сечового міхура, розглянуто питання етіопатогенезу та лікування хворих із гіперактивним сечовим міхуром (ГАСМ). Обстежено дві групи пацієнтів із цим порушенням, проаналізовано його етіологію, патогенез і шляхи корекції. Запропоновано новий метод лікування ГАСМ через підвищення порога чутливості спинномозкових центрів сечового міхура стресовим локальним ураженням кінцевих М-холінорецепторів слизової оболонки та м'язів зони трикутника Льюто, шийки сечового міхура, простати та її капсули. Жінкам здійснювали електрокоагуляцію слизової оболонки та підлеглої поверхні м'язів зони трикутника Льюто, чоловікам – локальну мікрохвильову гіпертермію простати, її сполучнотканинну оболонку та прилеглих тканин шийки сечового міхура та його сфінктерів. Показано високу ефективність цих методів у подоланні ГАСМ.*

*Ключові слова: гіперактивність сечового міхура, трансуретральна мікрохвильова локальна гіпертермія простати.*

### ВСТУП

Гіперактивність сечового міхура (ГАСМ) – одне з найбільш частих захворювань людини. Зокрема, приблизно 1/6 частина дорослого населення розвинутих країн Європи та США мають симптоми цього захворювання [15,16]. На сьогодні основною ланкою етіопатогенезу ГАСМ вважається підвищена чутливість детрузора до ацетилхоліну – медіатора парасимпатичної нервової системи, на фоні інфравезикальної обструкції у пацієнтів [1,4]. При цьому в біоптатах сечового міхура визначається артеріосклероз, гіпертрофія й інфільтрація м'язової тканини, що призводить до підвищеної нервової збудливості й провідності [1,11]. Поріг відчуття змінюється при зміні стану центральної нервової системи [2].

Хронічний вплив подразнювальних патологічних імпульсів на рецептори сечового міхура (особливо зони трикутника Льюто й шийки сечового міхура) і, відповідно, на чуттєвий центр спинного мозку призводить до патологічного зниження порога чутливості спинномозкового центру.

© Радченко В.Г.

Таким чином, основною ланкою патогенезу ГАСМ є зниження порога чутливості спинномозкового центру.

У зв'язку з цим нами запропоновано новий підхід до вирішення проблеми лікування ГАСМ, а саме методи стресової дії на чутливий спинномозковий центр сечового міхура за допомогою подразнення кінцевих рецепторів зони трикутника Льюто, зони сфінктерів сечового міхура та простати й її капсули.

Впливаючи на рецептори сечового міхура, ми викликаємо їхнє переподразнення, що призводить до перезбудження спинномозкового чуттєвого центру з його наступним виснаженням і настанням позамежного гальмування (за О.О. Ухтомським).

Таким чином, підвищується поріг чутливості спинномозкового центру й всі багатомірні обширні різноманітно спотворені, але досить слабкі низькопорогові подразнення перестають сприйматися.

Метою дослідження був пошук та обґрунтування нових підходів до корекції ГАСМ.

## МЕТОДИКА ТА РЕЗУЛЬТАТИ

У зв'язку з анатомічною відмінністю сечостатевих систем у жінок і чоловіків проведені дослідження надаються окремо.

До першої групи обстежених з ГАСМ увійшли 43 жінки, віком від 24 до 38 років, середній вік  $33,0 \pm 1,6$  року. Усі жінки пройшли стандартне та фізикальне обстеження: оцінка скарг, даних анамнезу, визначення залишкової сечі, загальний аналіз крові та сечі, бакпосів сечі. Одним із критеріїв включення до групи була відсутність у пацієнок гормональних відхилень. Слід відмітити підвищену кількість плескатої епітелію в загальних аналізах сечі більшості пацієнок. Частота сечовипускань у пацієнок була від 8 до 22 разів удень і від 2 до 12 уночі. Із них у 18 хворих були прояви ургентності сечовипускання, а у 6 – ургентної інконтиненції сечі. Всім пацієнткам проведено трансуретральну електрокоагуляцію довільно обраних ділянок (2-3 ділянки загальною площею до  $1,5\text{-}2\text{ см}^2$ ) слизової оболонки та підлеглої поверхні м'язів сечового міхура в зоні трикутника Лъето. Процедура електрокоагуляції проводилася однократно за допомогою операційного цистоскопа й апарата діатермії (високочастотний електрохірургічний апарат ЕХВА «Надія») у режимі біполярної коагуляції при потужності не більше ніж 5 Вт при оптимальному навантаженні  $100 \pm 50$  Ом. Операцію проводили з 10-ї по 20-ту добу менструального циклу.

Усі пацієнтки вже протягом першої доби після процедури відзначили зникнення епізодів ургентності й ургентної інконтиненції. Знизилася й нівелювалася частота денних і особливо нічних сечовипускань – удень 4–5 разів, уночі – 0–1 раз. Починаючи з 3-4-ї доби усі пацієнтки відчували себе повністю здоровими. Лише у двох пацієнок виник рецидив ГАСМ (через 8 і 10 міс), який настав після різкого переохолодження й перенесеного гострого циститу, що лікувався хворими самостійно й не в повному обсязі.

Після самолікування в пацієнок збереглося прискорене сечовипускання, ніктурія, але не було ургентності й нетримання сечі. Обом було повторно проведено трансуретральну електрокоагуляцію слизової оболонки сечового міхура з позитивним результатом.

Контролем були дані дослідження Пташника [13]: брали участь 43 пацієнтки віком від 21 до 73 років, в середньому 42,4 року. Усім пацієнткам був призначений толтеродин у дозі 25 мг два рази на добу протягом 28 діб. 2 з них припинили лікування передчасно (одна через виражену побічну дію препарату, друга – через відсутність ефекту). У 19 пацієнок (44,2%) повністю зникли епізоди нетримання сечі до кінця дослідження; 33 пацієнтки (81%) задоволені результатами і висловили бажання продовжити лікування; 6 пацієнок (15%) вдалися до альтернативних методів лікування; 2 пацієнтки припинили будь які спроби подальшого лікування (табл. 1).

До другої дослідної групи увійшли 24 чоловіки віком 27-46 років (середній вік  $37,0 \pm 2,3$  роки). Усім проводили фізикальне обстеження, оцінку скарг і даних анамнезу, загальний аналіз крові та сечі, аналіз соку простати з бакпосівом, УЗ-сканування сечового міхура, простати, аналіз крові на простатичний специфічний антиген. Одним із критеріїв включення до групи була відсутність у пацієнтів загострення запалення в простаті. Основними скаргами були: постійні, без чіткої локалізації, тупі болі, що тягнуть та «жують», унизу живота, у паху, промежині; прискорене до 6–10 разів сечовипускання удень і 2–8 разів уночі. У 8 чоловіків були також імперативні позиви до сечовипускання, причому у 2 з них із частковим нетриманням сечі. Всім пацієнтам однократно проведено трансуретральну локальну мікрохвильову гіпертермію простати (ТУГП) для подразнення кінцевих М-3 холінорецепторів шийки сечового міхура, капсули простати та зони трикутника Лъето, на тлі прийому хворими per os двох уроантисептиків для профілактики уретральної лихоманки, загострення простатиту, уро-

**Таблиця 1. Порівняння вихідних і кінцевих значень симптомів, а також відсоток зниження їх вираженості при лікуванні стресовим ураженням (дослідна група) і толтероидом (контрольна група - за даними Пташника Т.Б.).**

Значення показника за добу	Симптоми		Зниження вираженості симптомів
	вихідні	кінцеві	
Кількість сечовипускань			
дослід	17,1	5,2	69,6
контроль	13,8	8,3	39,9
Імперативні позиви			
дослід	7,3	0	100,0
контроль	8,2	4,0	51,2
Нетримання сечі			
дослід	3,8	0	100,0
контроль	4,7	1,3	72,0
Ноктурія			
дослід	4,8	0,3	93,8
контроль	3,3	1,5	54,5

сепсису (за 1-2 доби до й протягом 7–10 діб після неї – абактал, бісептол, норфлоксацин, піпемідин тощо). ТУГП проводили апаратом «АЛМГП-01» (виробництва «Радмир», м. Харків) при потужності випромінювача 1,2-2,0 ум.од. і при експозиції 18–22 хв.

Методика проведення ТУГП стандартна: ректально встановлюється трьохканальний оптико-волоконний термодатчик, потім через сечовід у сечовий міхур вводиться операційний катетер. У ньому знаходиться антена – випромінювач тепла, оптико-волоконний термодатчик, трубка з ніпелем на зовнішньому кінці катетера й кулею Фолея усередині міхура, за допомогою яких катетер устанавлюється в оптимальному для проведення процедури місці (підтягуванням катетера назовні при роздутій кулі Фолея). По ще двом трубочкам, наявним у катетері, компресор апарата постійно прокачує охолоджену дистильовану воду (замкнений контур) для охолодження, як самого катетера, так і для охолодження слизової сечоводу. Максимальна температура в центрі прогріву 48°C. По закінченні прогріву куля Фолея здувається, катетер легко витягається, і, на завершення процедури,

видаляється ректальний термодатчик.

У всіх хворих частота сечовипускань у першу ж ніч після ТУГП знизилася до 0-1 разу, а через 3–4 доби повністю зникали прояви ГАСМ: біль, імперативні позиви до сечовипускання, часткове нетримання сечі тощо. Навіть у пацієнтів, яким цю процедуру нами було проведено ще сім років тому, рецидивів не спостерігається.

Для порівняння ефективності лікування ГАСМ стресовим ураженням мікрохвилями кінцевих рецепторів та ефективності лікування толтероидом у всіх пацієнтів із ГАСМ (2-га контрольна група) нижче наведені опрацьовані Пташником [13] дані дослідження STAR, опублікованого в 2005 р. С.Chapple із співавторами [17]. У дослідженні брали участь 1177 пацієнтів, 599 з яких були рандомізовані для отримання толтеродину. Оцінювали показники відносного зниження вираженості симптомів ГАСМ. Порівняльні дані наведені у таблиці 2.

У пацієнтів похилого віку з порушенням ЦНС (вони не включалися у цю групу дослідження), рецидиви виникали через 3–4 міс, а також 1–2 роки (у різних хворих з атрофічним інвалютивним простатитом).

**Таблиця 2. Порівняння вихідних і кінцевих значень симптомів, а також відсоток зниження їх вираженості при проведенні трансуретальної локальної мікрохвильової гіпертермії простати (дослідна група) і лікування толтероїном (контрольна група - за даними Пташника Т.Б.).**

Значення показника за добу	Симптоми		Зниження вираженості симптомів
	вихідні	кінцеві	
Кількість сечовипускань			
дослід	14,2	4,8	72,1
контроль	11,7	9,5	19,0
Імперативні позиви			
дослід	7,1	0	100,0
контроль	5,8	3,4	41,0
Нетримання сечі			
дослід	2,9	0	100,0
контроль	2,1	1,3	39,0
Ноктурія			
дослід	4,2	0,4	90,5
контроль	1,9	1,3	32,0

## ВИСНОВКИ

1. Причиною розвитку ГАСМ є множинні потоки подразнювальних сигналів від кінцевих рецепторів до чуттєвого спинномозкового центру, що призводить до патологічного зниження його порога сприйняття відчуттів. Виникає полакіурія й ніктурія. Надалі спостерігаються мимовільні скорочення детрузора, ургентне сечовипускання й ургентна інконтиненція сечі.

2. Стресовий вплив через кінцеві рецептори сечового міхура, його сфінктерів, простати та її капсули на чутливий спинномозковий центр за допомогою електрокоагуляції слизової оболонки трикутника Льюїса або через трансуретральну локальну мікрохвильову гіпертермію простати, її капсули та шийки сечового міхура, підвищує поріг чутливості спинномозкового центру та дає змогу повністю подолати гіперактивність сечового міхура.

**Radchenko V.G.**

### **OVERACTIVE BLADDER SYNDROME: ETIOLOGY, PATHOGENESIS, TREATMENT.**

The article analyzes the causes of hyperactive detrusory contractions, considered etiopathogenesis and treatment of patients with overactive bladder syndrome (OBS). Two groups

of patients with overactive bladder syndrome were examined, analyzed etiology, pathogenesis and treatment.

A new method for increasing the threshold sensitivity of spinal centers under the OBS by using the local lesions of the mucous membrane of the bladder by electrical coagulation or local microwave hyperthermia of the prostate are proposed. The high efficiency of these methods in dealing with OBS is shown. *Key words:* overactive bladder syndrome, sensitivity threshold, stress, electrocoagulation, transurethral local microwave hyperthermia of prostate.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонян И. М., Серняк Ю. П., Фуксзон А. С. Гиперактивность мочевого пузыря у больных с инфравезикальной обструкцией // *Здоровье мужчины*, 2006. – № 3. С. 14-18.
2. Боголепов Н. К. Клинические лекции по невропатологии. М: Медицина, 1971. – 432 с.
3. Боржівський А. Ц. Нові напрями в застосуванні толтероїду // *Здоровье мужчины*, 2006. – № 3. – С. 19.
4. Гузенко В. Н. Избранные лекции по урологии. – Донецк, 2007. – 530 с.
5. Костев Ф. И., Шостак М. В. Периферическая электроимпульсная терапия в комплексном лечении больных с гиперактивным мочевым пузырем // *Урология*, 2007. – № 1. – С. 21-27.
6. Мазо Е. Б., Школьников М. Е., Кривобородов Г. Г. Гиперактивный мочевой пузырь у больных пожилого возраста // *Consilium medicum*, 2006, Т. 8. №12.
7. Мазо Е. Б., Соколова А. А., Кривобородов Г. Г., Школьников М. Е., Моисеев П. П. Нейрофизиологическое исследование в прогнозе тиббиальной нейромодуляции у больных гиперактивным мочевым пузырем // *Рус.*



- мед. журн., 2007а, № 29. – С. 2225-2230.
8. Мазо Е. Б., Кривобородов Г. Г., Васильев А. В. Принципы диагностики и лечения нейрогенной детрузорной гиперактивности // Рус. мед. журн. 2007б, № 29. – С. 2248-2250.
  9. Миленевский Д. А., Ходос В. М. Сочетание физиотерапевтического лечения и применения свечей Диклоберл в терапии хронического простатита // Здоровье мужчины, 2007. № 1. – С. 24-25.
  10. Пепенин В. Р., Спиридоненко В. В., Пепенин С. В., Мусаб Шариф Виюд. Применение препарата Детрузитол у больных с гиперактивным мочевым пузырем // Здоровье мужчины, 2005. № 3, с 19-21.
  11. Переверзев А. С. Инфекции в урологии. – Харьков: Факт, 2006. – 352 с.
  12. Переверзев А. С. Ботулинический токсин типа А в терапии урологических заболеваний // Международ. мед. журн., 2008, № 3. – С. 67-75.
  13. Пташник Т.Б. Визначення ефективності толтеродину (Детрузитол) у пацієток із імперативним нетриманням сечі на фоні гіперактивного сечового міхура// Здоровье мужчины, 2008, №1 с.4-6.
  14. Amundsen CL, Webster GD. Sacral neuromodulation in an older, urge-incontinent population // Am. J. Obstet. Gynecol., 2002. – **187**. – P. 1462-1465.
  15. Milsom I., Abrams P., Cardozo L., Roberts R.G., Thuroff J., Wein A.J. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study // British J. Urol. International, 2001, Jun. – **87**. – № 9, P. 760–766.
  16. Stewart W.F., Van Rooyen J.B., Cundi G.W., Abrams P., Herzog A.R., Corey R., Hunt T.L. & Wein A.J. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States // World J. Urol. 2003. – **20**. – P. 327-336.
  17. Chapple C.R., Aribani W., Cardozo L.D., Castro – Dias D., Craggs M., Haab F., Khullar V., Versi E. The role of urinary urgency and its measurement in the overactive bladder symptom syndrome: current concepts and future prospects. BJU int. 2005 Feb; **95** (3); 335–340.

*Донецька обласна лікарня відновного лікування  
E-mail: rvg@nas.gov.ua*

*Матеріал надійшов  
до редакції 24.02.2012*

# ХРОНІКА

## VI Конгрес Наукового товариства патофізіологів України з міжнародною участю «Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології»

(Крим, Сімферополь – Місхор, 3–5 жовтня 2012 року)

VI Конгрес Наукового товариства патофізіологів України з міжнародною участю «Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології» відбувся 3–5 жовтня 2012 р. в АР Крим на базі санаторію «Місхор». Ініціаторами та організаторами конгресу виступили Національна академія наук України, Національна академія медичних наук України, Міністерство охорони здоров'я України, Міністерство охорони здоров'я АР Крим, Наукове товариство патофізіологів України, Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського.

Урочисто відкрив Конгрес президент Наукового товариства патофізіологів України, академік Національної академії наук України, професор О.О. Мойбенко. З вітаннями до учасників звернулися голова локального оргкомітету Конгресу, проректор з наукової роботи, завідувач кафедри патофізіології ДУ «Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського» професор А.В. Кубишкін, а також член ради міжнародного товариства патофізіологів професор Осаму Матсуо (Японія).

У роботі Конгресу взяли участь 178 делегатів від 15 областей України, в тому числі ректори медичних ВНЗ, директори НДІ, зав. кафедрами, голови обласних патофізіологічних товариств, провідні спеціалісти кафедр медичних ВНЗ, науково-дослідних інститутів та установ, а також 13 учених Росії з Москви, Санкт-Петербурга, Томська, Казані, Єкатеринбурга, Курська (в тому числі академік РАН і РАМН Черешнев Валерій Олександрович – директор Інституту імунології і

фізіології УрО РАН, голова комітету з науки та наукоємних технологій Держдуми РФ), представники Білорусії, Вірменії, Казахстану, Латвії, Молдови. З дальнього зарубіжжя прибули патофізіологи Польщі (Курпіш Мацей), Хорватії (Зденко Ковач), Японії (Осаму Матсуо). Серед присутніх були 3 члена Ради міжнародного товариства патофізіологів (Осаму Матсуо, Зденко Ковач, Гризельда Навасардян), 4 академіка НАНУ, НАМНУ, РАМН, 5 членів-кореспондентів НАН України, НАМН України, 37 докторів наук, 61 кандидат наук, 68 делегатів без ученого ступеня.

На трьох пленарних та 12 секційних засіданнях було заслухано та обговорено 118 наукових доповідей, а також представлено 96 стендових та Е-постерних доповідей, з яких 25 зробили молоді вчені-патофізіологи.

Центральними доповідями пленарних засідань стали виступи академіка НАН України О.О. Мойбенка «Молекулярно-генетичні аспекти ішемічної патології серця і нові шляхи кардіопротекції (від гена до інфаркту міокарда)»; академіка РАН і РАМН В.О. Черешнева «Системный подход в иммунопатофизиологии»; академіка НАМН України, члена-кореспондента НАН України О.Г. Резнікова «Сигнальні детермінанти імпринтингової патології нейроендокринних функцій і поведінки»; професора Осаму Матсуо (Японія) «Фибринолитические факторы играют ключевую роль при репарации печени»; член-кореспондента НАН України В.Ф. Сагача «Газові трансмітери, мітохондрії і функціональні порушення серцево-судинної

системи»; професора Курпіша Мацея (Польща) «Доклинические и клинические испытания метода регенерации постинфарктного сердца с помощью аппликации миобластов человека»; професора В.Є. Досенка «Нові механізми регуляції системи мікроРНК: роль протеасомного протеолізу, теломерази та ліпоксигенази»; професора Зденко Ковач (Хорватія) «Проблемы преподавания клинической патофизиологии»; професора С.П. Осинського «Патофізіологічні основи формування мікрооточення пухлинних клітин і його роль в пухлинній прогресії»; професора Ю.М. Колесника «Патогенетичні механізми пошкодження бета-клітин панкреатичних островців і вплив переривистої гіпоксії»; професора В.В. Чоп'як «Автоімунні хвороби та первинні імунodefіцити»; професора Г.Г. Скибо «Патофізіологічні аспекти нейродегенеративних захворювань»; академіка НАМН України В.К. Гриня «Патофізіологічні аспекти клітинної кардіоміопластики при експериментальному інфаркті міокарда»; професора А.В. Кубишкіна «Асоційоване запалення як чинник промоції і прогресії патології».

На секційних засіданнях розглядали такі актуальні питання, як: патофізіологія дихання, нирок, видільної та репродуктивної системи, серцево-судинної системи, атеросклерозу та інфаркту міокарда, нервової, травної системи і стоматологічних захворювань, ендокринної системи і вікова патофізіологія; патофізіологія екстремальних станів і стрес, запалення і імунопатологія, патофізіологічні основи розробки нових лікарських препаратів, методів діагностики та експериментальна терапія.

З доповідями і повідомленнями, які привернули найбільшу увагу присутніх, виступили: професори Шуба Я.М. (Київ), Янчій Р.І. (Київ), Книшов Г.В. (Київ), Єльський В.М., Зябліцев С.В., Гоженко А.І. (Одеса), Заморський І.І. (Чернівці), Євстаф'єва О.В. (Сімферополь), Непорада К.С. (Полтава), Левицький А.П. (Одеса), Казімірко Н.К. (Луганськ), Полоников А.В. (Курськ, Росія), Саві-

лов П.М. (Тамбов, Росія), доценти Михайліченко В.Ю. (Донецьк), Строев Ю.І., Чурілов Л.П. (Санкт-Петербург, Росія), Григорян А.С. (Єреван, Вірменія), Жексенова А.Н. (Актобе, Казахстан), Анда Кауліна, Дайна Войта (Рига, Латвія).

В рамках Конгресу було проведено нараду завідувачів кафедр, на якій обговорювались питання викладання патофізіології та проблеми її подальшого розвитку як науки.

За змістовні та прекрасно ілюстровані доповіді були премійовані молоді вчені: I премія – О.В. Носаль (Київ), II премія – І.І. Фомочкіна (Сімферополь), Ю.І. Стрельченко (Донецьк), III премія – А.О. Тюпка (Харків), М.Р. Герасимчук (Івано-Франківськ), І.І. Ченцова (Київ), О.В. Ткачук (Чернівці), Н.Д. Рикало (Вінниця). Винесено подяку та нагороджено цінними подарунками Г.В. Портніченка (Київ), С.В. Гончарова (Київ), А.В. Капустіну (Москва).

З великим успіхом пройшла виставка монографій, опублікованих патофізіологами України за період (2008–2012 рр.).

На заключному пленарному засіданні заслухано звіт про діяльність Наукового товариства патофізіологів України (доповідач – академік О.О. Мойбенко) та звіт Ревізійної комісії (доповідач – М.О. Клименко). Наголошено на необхідність більш ґлибоко розглядати питання кадрової політики на кафедрах патологічної фізіології медичних університетів. Проведено вибори правління Наукового товариства патофізіологів України та Ревізійної комісії. Президентом обраний академік НАН України О.О. Мойбенко, віце-президентами: академік НАМН України, член-кореспондент НАН України О.Г. Резніков, член-кореспондент НАМН України В.М. Єльський, професори Ю.М. Колесник, А.В. Кубишкін, вченим секретарем – ст.н.с. С.І. Павлович, головою Ревізійної комісії – професор С.Б. Французова.

Матеріали конгресу опубліковано в двох частинах журналу «Таврійський медико-біологічний вісник» (2012. – Том 15, №3.

– ч.1 та 2). Усього в матеріалах конгресу опубліковано 173 статті, 12 із яких вченими Росії та Білорусії, а також 246 тез доповідей, представлених як ученими України, так і закордонними учасниками.

Роботу конгресу супроводжували стендові експозиції компаній, які підтримували його організацію та проведення: ТОВ «МСД Україна», представництво «Ріхтер Гедеон Нрт.», ТОВ «Клініка сучасних медичних тех-

нологій «Гемокод», ТОВ «БіоЛабТех Лтд», Компанія «АЛТ Україна Лтд».

Оргкомітет висловлює щирі подяки організаторам конгресу, особливо ректору Кримського державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського члену-кореспонденту НАМН України А.А. Бабаніну, проректору з наукової роботи КДМУ професору А.В. Кубишкіну, які доклали великих зусиль для проведення VI Конгресу Наукового товариства патофізіологів України.

Президент Наукового товариства  
патофізіологів України  
академік НАН України  
О.О. Мойбенко

Вчений секретар  
Наукового товариства  
патофізіологів України  
ст. н. с.  
С.І. Павлович

## VII Міжнародний симпозіум «Актуальні проблеми біофізичної медицини»

Відповідно до плану науково-організаційних заходів, затверджених Президією НАН України, в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України у період з 17.05 по 20.05.2012 р. проведено VII Міжнародний симпозіум «Актуальні проблеми біофізичної медицини». Співорганізаторами симпозіуму були Державне Національне космічне агентство України, Міжнародна академія проблем гіпоксії, Національна академія медичних наук та МОЗ України. Необхідність проведення цього заходу вимагає сучасний стан теоретичної та практичної медицини.

У багатьох країнах світу, особливо в Україні, значно поширилися серцево-судинні, онкологічні, бронхо-легеневі та алергічні захворювання часто серед жінок фертильного віку та дітей. На думку медиків та екологів, це пов'язано з погіршенням умов повсякденного життя населення, негативним впливом екологічних, економічних, соціальних та інших факторів. У зв'язку з цим перед фізіологами і лікарями виникає нагальне завдання – пошук більш ефективних засобів збереження здоров'я та працездатності населення, подовження тривалості його активного життя. Одним із можливих шляхів досягнення цієї мети є розвиток нового лікувально-профілактичного напрямку – біофізичної (немедикаментозної) медицини. Особливість її полягає у активації адаптивних можливостей організму, відновленні його функціональних резервів, здатності компенсувати екологічні та біосоціальні негаразди більш широким застосуванням натуральних, фізичних чинників. Сучасна медицина орієнтована на розробку та застосування переважно фармакологічних засобів, кожний з яких викликає побічні ефекти. У багатьох препаратів перелік протипоказань довший, ніж показань до його застосування. Альтернативним

напрямком підвищення рівня здоров'я населення може бути використання саногенних природних та інструментальних біофізичних методів ранньої корекції донозологічних і патологічних станів організму. Саме цій меті присвячені основні пошуки дослідників у галузі медичної біофізики та біоінженерії.

Роботу з підготовки симпозіуму здійснював оргкомітет під головуванням академіка Європейської академії наук, академіка НАН України, члена-кореспондента РАН О.О. Криштала. До складу оргкомітету також увійшли академіки: Російської АМН М.О. Агаджанян (Москва), В.М. Баранов (Москва), НАН Киргизської Республіки А.А. Айдаралієв, НАН України М.С. Веселовський, О.О. Мойбенко, І.С. Магура, НАН та АМН України Ю.І. Кундієв, чл.-кор. НАН України В.Ф. Сагач, д.м.н., проф. Г.В. Белов (Бішкек, Киргизія), д.м.н., проф. В.Я. Березовський, д.м.н., проф. В. Валензи (Лугано, Швейцарія), проф. Е.А. Доценко (Мінськ), проф. М. Покорський (Варшава), д.ф.-т.н. О.П. Федоров (НКАУ). Відповідальний секретар оргкомітету д.б.н. І.Г. Літовка.

В оргкомітет надійшло більше 180 заявок і тез доповідей від науковців ближнього та дальнього зарубіжжя. Після їх рецензування було надруковано збірку, до якої увійшло 103 роботи. Відповідно до зазначеної тематики, програма симпозіуму складалася з 6 тематичних секцій, на засіданнях яких заслухано і обговорено 47 усних доповідей. На стендах було представлено матеріали 34 досліджень учасників симпозіуму.

У роботі симпозіуму взяли активну участь 112 осіб, у тому числі з України – 97, Росії – 8, Киргизії – 2, Іспанії – 1, Польщі – 1, Словачкиї – 1, США – 1, Швейцарії – 1. У дискусіях брали участь не тільки дипломовані вчені, а і наукова молодь. Наприкінці засідання кожної



секції головуючий підсумовував матеріали доповідей і представлених на стендах повідомлень.

Присутність серед учасників симпозіуму фізиків-теоретиків, хіміків, біохіміків і біофізиків, спеціалістів із розробки та створення сучасної електронної апаратури, біологів, фізіологів, патофізіологів, спеціалістів клінічної медицини, а також представників нового напрямку в науці – синергетики, дало змогу всебічно розглянути як теоретичні, так і практичні аспекти проблеми біофізичної медицини. В її завдання входить детальне обстеження здорової людини, оцінка його здоров'я, розробка заходів збереження природної резистентності організму до несприятливого впливу навколишнього середовища, профілактика та виявлення ранніх форм патології, створення новітніх методів та інструментів фізичної діагностики біологічних систем, розробка напрямків і способів корекції здоров'я людини.

У доповідях учасників симпозіуму розглянуто загальні підходи до оцінки здоров'я людини, новітні принципи та технології діагностики початкових форм патології. Особливу увагу приділено проблемам захисту біологічних систем від оксидативного стресу за допомогою природних саногенних чинників гірського клімату, бальнеологічних і кліматичних курортів, інструментальних методів відтворення здорового навколишнього середовища.

Детально розглянута нова парадигма медицини, в основі якої лежить недостатньо вивчена проблема дуалістичної природи води, структурна основа якої входить як до первинних форм життя, так і до сучасних видів рослин, тварин і людини. Обговорено фізико-хімічні основи використання структурно-упорядкованих станів води та інструментальні можливості управління її окисно-відновлювальними властивостями. Низку доповідей було присвячено проблемам фізіологічних механізмів природного антиоксидантного захисту, створенню препаратів,

здатних посилювати її потужність та біологічні ефекти.

Загальну увагу привернули матеріали спільних досліджень Вазіної А.А. (Москва) і Б.С. Патона (Київ), присвячені принципам наноструктурної організації біологічних тканин. Проф. Кольтовер В.К. (Черноголовка, Росія) зробив фундаментальний огляд вільнорадикальної теорії старіння. Узагальнюючу доповідь щодо принципу «доза–ефект» у біофізичній медицині зробив д.м.н., проф. В.Я. Березовський (Київ). Позитивний резонанс присутніх викликала доповідь д.б.н., проф. Т.Г.Щербатюк (Нижній Новгород, Росія) про особливості розвитку оксидативного стресу при пухлинних новоутвореннях. Змістовний огляд з аналізом матеріалів власного відкриття під назвою «Вода – фізико-хімічна основа нової парадигми медицини» зробив д.х.н., проф. В.І.Слесарев (Санкт-Петербург). Позапрограмна доповідь В.П. Грищука «Вода: екологія, економіка, здоров'я» була присвячена розробці технічних засобів, що дають можливість відновлювати та регулювати природну структуру води, змінювати її окисно-відновний потенціал. З увагою була сприйнята доповідь колективу дослідників Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна і «Радмир» ДППАО «АОНИИ-РИ» під керівництвом д.ф-мат.н., проф. Є.О. Баранника, яка була присвячена принципово новим засадам ультразвукової еластографії м'яких тканин, що уможливорює раннє виявлення патології сполучної тканини. Спеціальне засідання було присвячено проблемі мікроелементології в реконструктивній медицині. Від колективу дослідників її детально висвітлив чл.-кор.НАНУ, д.т.н., проф. С.П. Ошкадеров (Київ).

У рамках роботи симпозіуму проведено виставку новітніх досягнень медичного приладобудування. Серед них – апаратура для діагностики стану кровопостачання міокарда (Медичний центр «Doctor Vera», Київ), ультразвукової еластографії м'яких тканин для виявлення первинних ознак їх ущільнення

(«Радмир» ДППАО «АОНИИРИ», Харків), для оцінки порогу сенсорної чутливості («НОРТ» ДП НАН України). Продемонстровано обладнання для лікування хвороб цивілізації, у тому числі системи керованого пневмопресингу (Інженерно-технічне товариство «Новое в медицине», Київ), та обладнання для здійснення інструментальної оротерапії (ДП "Науково-дослідний медико-інженерний центр «НОРТ» НАН України (Київ), що базується на мембранній технології «молекулярного сита». Більшість учасників симпозіуму та співробітників Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця пройшли тестування на діючих діагностичних приладах та відчули цілющу дію «гірського» повітря.

На останньому засіданні заслухано, обговорено та одноставно прийнято резолюцію VII Міжнародного симпозіуму, яка наводиться нижче.

“Ми, представники медичних, фізико-хімічних і біофізичних дисциплін восьми країн Європи з великим задоволенням констатуємо, що проведення чергового VII Міжнародного симпозіуму Інститутом фізіології ім.О.О.Богомольця у м.Києві стало визначною подією для біофізичної медицини. Антропогенне забруднення довкілля, надмірне або неправильне вживання фармацевтичних препаратів істотно збільшили алергізацію населення континенту та кількість пацієнтів, які за реальним станом своїх детоксуючих систем не витримують перевантаження організму ксенобіотиками. Біофізичні методи профілактики, лікування та реабілітації для таких осіб – альтернативний шлях до поліпшення стану здоров'я. Біофізичні процедури дають змогу значно зменшити медикаментозне

навантаження на організм та на послаблені навколишнім забрудненням ферменти систем детоксикації. Вже сьогодні біофізичні технології оздоровлення зможуть знайти застосування у попередженні розвитку найбільш поширених хвороб цивілізації.

Зважаючи на перспективність залучення біофізичних методів впливу на організм людини та доцільність більш широкого впровадження біофізичних методів діагностики і лікування у практичну медицину для підвищення рівня здоров'я населення учасники симпозіуму вважають за необхідне:

1. Продовжити започатковану Інститутом фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України традицію регулярного проведення (через кожні 2–3 роки) міжнародних симпозіумів з проблем біофізичної медицини.

2. Просити Президію НАН України та дирекцію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця опублікувати відібрані оргкомітетом проблемні доповіді на сторінках одного з номерів «Фізіологічного журналу».

3. Зважаючи на високий рівень дитячої захворюваності, звернути увагу відповідної Комісії ВР та МОЗ України на доцільність більш ефективного використання рекреаційного потенціалу кліматотерапії юнацтва у Карпатському регіоні та більш широкого впровадження інноваційної технології інструментальної оротерапії для підвищення рівня здоров'я дитячого населення країни.

4. Опублікувати звіт про проведення симпозіуму на сторінках періодичної медичної преси.

5. Доручити Оргкомітету симпозіуму підготувати установчі документи для реєстрації неприбуткової громадської організації «Міжнародна академія біофізичної медицини»

Заст. голови оргкомітету,  
засл. діяч науки і техніки України,  
д. м. н., проф. В. Березовський

Відповідальний секретар оргкомітету,  
д.б.н. І. Літовка

## ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ



**В.Я. Березовський**  
(до 80-річчя з дня народження)

Провідному спеціалісту України і країн СНД у галузі клінічної патофізіології та космічної медицини, лауреату Премії ім. О.О. Богомольця НАН України та Державної премії України, кавалеру ордена князя Ярослава Мудрого V ст., заслуженому діячу науки і техніки України, доктору медичних наук, професору, віце-президенту Міжнародної академії проблем гіпоксії, куратору проблеми “Космічна медицина” Національного космічного агентства України, директору науково-дослідного медико-інженерного центру «НОРТ» НАН України, завідувачу відділу клінічної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України Вадиму Якимовичу Березовському 29 серпня 2012 р. виповнилося 80 років.

Вадим Якимович народився у Києві у 1932 р. У 1950 р. став студентом лікувального факультету Київського медичного інституту ім. О.О. Богомольця. Активно займався експериментальною фізіологією на кафедрі Г.В.

Фольборта під керівництвом С.І. Фудель-Осіпової. За дослідження проявів пессімуму Введенського на плантарному препараті *Rana Esculenta* був відряджений до Москви, де зробив доповідь на Всесоюзній науковій студентській конференції. На час закінчення навчання мав 6 наукових публікацій. Отримав диплом з відзнакою за фахом «лікувальна справа», почав працювати невропатологом у Луцькій дитячій лікарні та викладачем фізіології у Луцькому медичному училищі. Продовжував займатися клініко-фізіологічними дослідженнями.

Восени 1958 р. був прийнятий до аспірантури Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця. Захистив кандидатську, згодом – докторську дисертації. Пройшов шлях від молодшого до старшого наукового співробітника, завідувача лабораторії, згодом – завідувача відділу фізіології дихання, потім – відділу клінічної патофізіології. Підготував і протягом трьох років читав курс фізіології дихання на біологічному факультеті КДУ ім. Т.Г. Шевченка.

Експериментальні дослідження першого періоду його наукової діяльності були спрямовані на аналіз теплових ефектів збудження у різних ділянках головного мозку собак, а також їх зв'язок з функціональною активністю та локальним кровопостачанням нервової тканини. За порадою М.М. Сиротиніна вперше в Україні використав електрохімічний метод вимірювання напруження кисню в живих тканинах людини та лабораторних тварин. Розробив і впровадив у ці дослідження три важливі методичні прийоми: технологію калібрування індикаторного електрода, методику стабілізації його активної поверхні у біологічних середовищах, засоби запобігання каталітичному виділенню водню при роботі у кислому середовищі. Створив і впровадив у виробництво перший у СРСР прилад для вимірювань напруження кисню в тканинах

тварин та людини – «Окситензометр». Ця робота була відзначена премією Президії АН УРСР. Спільно з науковцями відділу кардіології сконструював і запатентував пристрій для дискретних вимірів систолічного та діастолічного напруження кисню у міокарді. Організував і провів у Києві три Всесоюзні симпозиуми «Полярнографічне визначення кисню у біологічних об'єктах» (1967, 1969, 1972).

Наявність у Інституті стаціонарних барокамер і щорічні високогірні експедиції дали можливість В.Я. Березовському накопичити достатній обсяг матеріалів щодо індивідуальних особливостей адаптації до нестачі кисню, які разом з результатами досліджень у клінічних установах м. Києва лягли в основу монографії «Напряжение кислорода в тканях животных и человека» (1975). Очолюючи відділ фізіології дихання, Вадим Якимович продовжував традиції попереднього керівника – проф. Є.В. Колпакова, проводячи дослідження реакцій на гіпоксію різних біологічних об'єктів, від мушок-дрозофіл до людини. Основні результати цих досліджень наведено в монографії «Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности» (1978).

Для з'ясування співвідношення вроджених і набутих у процесі онтогенезу особливостей реакцій на гіпоксію Вадим Якимович склав реєстр моно- та дизиготних близнюків м. Києва, провів їх обстеження на рівні моря та в умовах високогір'я. Ці дослідження показали, що генетично зумовлені риси реактивності дихальної та серцево-судинної систем відіграють домінуючу роль.

Особливе значення для фізіології дихання має недостатньо вивчена на той час сурфактантна система. В.Я. Березовський та В.Ю. Горчаков створили прилад «Сурфактометр», завдяки якому з'явилася можливість кількісних визначень активності сурфактантів. Результати досліджень впливу гіпоксії різного ступеня на стан системи узагальнено в монографії «Поверхностно-активные вещества легкого» (1982) та збірці «Сурфактанты легкого в норме и патологии» (1983).

Вивчаючи реакції організму на початкові етапи розвитку гіпоксії, В.Я. Березовський підкреслив її стимулювальну дію на секрецію еритропоетинів, ендорфінів, антиноцицептивних факторів, катехоламінів і загальну активацію енергетичного метаболізму. Людина, що перемістилася на висоту 2–2,5 тис. м над рівнем моря, у період адаптації втрачає значну частину надмірної маси тіла і отримує нові якості. Вони розвиваються внаслідок розгальмування «сплячих» генів та експресії синтезу білків-ферментів з високою афінністю до кисню. Ці дослідження дали змогу сформулювати положення про наявність двох діаметрально протилежних за ефектом дії типів кисневої депривації: саногенної гіпоксії, що сприяє здоров'ю та довголіттю людини, і патогенної гіпоксії, яка здатна зашкодити його здоров'ю.

Використовуючи сучасні мембранні технології та ефект «молекулярного сита», В.Я. Березовський створив генератори штучного гірського повітря, здатні забезпечувати індивідуальне дозування нормобаричної саногенної гіпоксії. Впровадження приладів типу «Оротрон» та «Борей» у медичну практику підтвердило їх високу ефективність. Результати цього циклу робіт узагальнено в монографіях «Физиологические механизмы саногенных эффектов горного климата» (1988), «Введение в оротерапию» (1998, друге видання 2002) та «Природная и инструментальная оротерапия» (2012).

Значну частину наукових доробок Вадима Якимовича присвячено дослідженню біофізичних феноменів життєдіяльності окремих клітин та організму в цілому. На підставі одержаних результатів висунуто положення про те, що крім фізичної дифузії, в транспорті кисню бере участь також прискорена дифузія та гідродинамічне перенесення кисню міжклітинною і внутрішньоклітинною рідинами. Результати цих досліджень опубліковано в журнальних статтях, довідниках «Словарь-справочник по физиологии и патологии дыхания» (1984) та «Биофизические харак-

теристики тканей человека» (1990).

Початок космічної ери та перші орбітальні польоти людини показали, що невагомість істотно впливає на метаболізм кальцію та змінює біомеханічні властивості скелета. Напередодні більш тривалих міжпланетних польотів за умов невагомості виникає необхідність пошуку шляхів стабілізації стану організму. Використовуючи спеціальні режими переривчастої нормобаричної гіпоксії, В.Я. Березовський і співробітники відділу клінічної патофізіології довели, що преадаптація в межах саногенної гіпоксії здатна гальмувати остеопенію бездіяльності. Технологію превентивного підвищення резистентності організму було використано в передпольотній підготовці першого космонавта незалежної України Л. Каденюка та його дублера Я. Пустового.

В останні роки Вадим Якимович запропонував нову, валеологічну класифікацію гіпоксії, розмежувавши її варіанти за ефектом біологічної дії на індіферентну, саногенну, патогенну та абіогенну форми. На відміну від традиційної точки зору про гіпоксію як головну причину патології, обстоює положення, що початкова фаза дозованої нормобаричної гіпоксії стимулює фізіологічну регенерацію, розгальмовує “сплячі”, неактивні гени, активує синтез білків-ферментів з високою афінністю до кисню та забезпечує преадаптацію організму людини до несприятливих умов існування, підвищує його неспецифічну резистентність. Природну оротерапію гірським кліматом Карпат варто ширше

використовувати для запобігання розвитку легеневих та серцево-судинних захворювань. Інструментальну оротерапію штучним гірським повітрям доцільно застосовувати як допоміжний лікувальний засіб, що прискорює реабілітацію юних пацієнтів, які страждають на дитячий церебральний параліч. Упровадження цієї технології забезпечує достатньо високу ефективність, що сягає 70–85 %.

В.Я. Березовський співпрацює з Інститутом високогірної медицини Болівії, Європейським центром гіпокситерапії, Міжнародною академією проблем гіпоксії. Кожні 2–3 роки регулярно проводить Міжнародні симпозиуми “Актуальні проблеми біофізичної медицини” (1998, 2000, 2002, 2005, 2007, 2009, 2012). Виконує обов’язки віце-президента міжнародної Академії проблем гіпоксії та куратора проблеми “Космічна медицина” Державного Космічного агентства України. Високий творчий і конструкторський потенціал ювіляра дав йому змогу опублікувати за роки дослідницької роботи понад 460 статей у вітчизняних і зарубіжних виданнях, 12 монографій, 6 методичних рекомендацій МОЗ України, одержати 46 авторських свідоцтв і патентів на винаходи, виховати 23 кандидатів і 5 докторів наук. Результати своїх досліджень він доповідав на 12 міжнародних конгресах і симпозиумах.

Щиро вітаємо ювіляра, бажаємо йому здоров’я, щастя та успіхів у реалізації подальших творчих задумів, суспільній активності щодо захисту природного середовища та безпечного для здоров’я людини довкілля.



## CONTENTS

N.A. Strutynska, N.Dorofeyeva, G.L.Vavilova, V.F. Sagach. Hydrogen sulfide Inhibits Ca <sup>2+</sup> -induced mitochondrial permeability transition pore opening in spontaneously hypertensive rats	3
R.B. Strutynskiy, R.A. Rovenets, N.A. Strutynska, A.P. Neshcheret, A.A.Moibenko. The influence of activation of the atp-sensitive potassium channels by flocalin on the function of the cardiovascular system	11
H.V. Opanasenko, L.V. Bratus, B.L.Gavenauskas, O.O. Gonchar, I.M. Mankovska, V.I. Nosar, S.B.Frantsuzova. Disturbances periodontal tissues oxygen dependet processes under prolonged immobilization stress and ways of their pharmacological correction	17
K.O.Tokarchuk, L.G. Kapustyanenko, S.G. Shandrenko. The role of aldehydes in development of oxidative stress under rhabdomyolysis in rats	25
Yu.V. Danylovych, A. Ju.Chunikhin, G.V. Danylovych. Investigation of the changes in uterine myocytes size depending on contractile activity modulators by photon correlation spectroscopy	32
T.V. Vovkun, P.I. Yanchuk, L.Y. Shtanova, S.P. Veselskyy, V.A. Baranovskyy. The influence of corvitin on secretory processes and blood flow in the rat gastric mucosa	40
V.V. Trush, V.I. Sobolev. Modulation of the effects of dexamethasone in rat skeletal muscle by testosterone	47
V.I. Khorevin, A.V. Gorkovenko, I.V. Vereshchaka. Relationship between muscle activity and kinematics of the lower extremity in slow motions of squats in humans	56
L. Gunina, I. Chekman, T. Nebesna, N. Gorchakova. Effectiveness of use of ω-3 polyunsaturated fatty acids at physicol loads	68
I.N. Mikheyteva. Protective action of melatonine in experimental glaucoma in rats	78
I.V. Kompanets, O.G. Korotkiy, V.V. Nikolska, L.I. Ostapchenko, S.V. Pilipenko. The interferon production by rat spleen and thymus lymphocytes in condititons of hypoacidity	84
Yu.O.Tischenko, V.V.Kiroshka. Dynamics of morphological and functional development of ovarian tissue allografts	89
V.V. Vereshchaka. Externus changes in the face soft tissues is the marker of degenerative changes of collagen	97
S.P. Beschasnyi. Effect of chronic sensorineural hearing loss at several indicators of immune and endocrine systems of children 7–11 years	110
M.S. Shypshyna, M.S. Veselovsky. Pre- and postsynaptic expression mechanisms of long-term depression at rats glutamatergic primary afferent synapses on dorsal horn spinal cord neurons in co-culture	117
Radchenko V.G. Overactive bladder syndrome: etiology, pathogenesis, treatment	124
<b>CHRONICLS</b>	129
<b>JUBILEE DATES</b>	
Vadim Berezovsky (on his 80th birthday)	135