

# Фізіологічний журнал

ТОМ 59 № 6 2013

---

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

---

Виходить 1 раз на 2 місяці

---

## Зміст

- Струтинська Н.А., Струтинський Р.Б., Чорна С.В., Семенихіна О.М., Мись Л.А.,  
Мойбенко О.О., Сагач В.Ф.* Нові фторвмісні активатори аденозинтрифосфат-  
чутливих калієвих каналів флокалін і тіофлокалін пригнічують  
кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці щурів . . . . . 3
- Goncharov S.V., Gurianova V.L., Stroy D.O., Drevytska T.I., Kaplinski S.P.,  
Nastenko E.A., Litvinenko M., Terletskiy R.V., Khaitovych M.V., Moibenko O.O.,  
Dosenko V.E.* Genetic predisposition to essential hypertension in children: analysis of  
17 single nucleotide polymorphisms . . . . . 12
- Колесник Ю.М., Каджарян Є.В., Абрамов А.В.* Вплив переривчастих гіпоксичних  
тренувань на функціональний стан кортиколіберин- і  $\beta$ -ендорфінсинтезуючих  
нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів . . . . . 25
- Бойчук Т.М., Савчук Т.П.* Морфофункціональні зміни ендотелію судин  
проміжного мозку щурів при експериментальній ішемії–реперфузії  
на тлі цукрового діабету . . . . . 30
- Пастер І.П., Левчук Н.І., Тронько М.Д.* Характеристика мікроінкапсульованої  
тканини кори надниркової залози людини при тривалому культивуванні . . . . . 37
- Янчук П.І., Виноградова О.О., Пасічніченко О.М., Костенко С.С.*  
Участь ейкозаноїдів у механізмі скоротливих реакцій ворітної вени  
на дію адреналіну і норадреналіну . . . . . 43
- Басов А.А., Барышев М.Г., Джимаєв С.С., Быков И.М., Сепиашвили Р.И.,  
Павлюченко И.И.* Влияние воды с модифицированным изотопным составом  
на показатели свободнорадикального окисления *in vivo* . . . . . 49
- Ходоровський Г.І., Дмитренко Р.Р., Ясінська О.В.* Роль ретино-гіпоталамо-епіфі-  
зарної системи в про- й антиоксидантних процесах у тканинах ясен статевозрі-  
лих самців білих щурів . . . . . 57

<i>Дроздовська С.Б., Лисенко О.М., Досенко В.Є., Льїн В.М., Мойбенко О.О.</i> T <sup>-786</sup> →C-поліморфізм промотору гена ендотеліальної NO-синтази та фізична працездатність у спорті . . . . .	63
<i>Ціпоренко С.Ю.</i> Вплив імунорекції на запальний процес уrogenітального тракту у чоловіків з безпліддям . . . . .	72
<i>Козявкіна Н.В., Баріляк Л.Г., Янчій О.Р., Фучко О.Л.</i> Тиреотропні ефекти води Нафтуса, їх вегетативний прояв і можливість прогнозування . . . . .	81
<i>Рыбникова Е.А., Баранова К.А., Глуценко Т.С., Ветровой О.В., Сидорова М.В., Портниченко В.И.</i> Участие транскрипционного фактора, индуцированного гипоксией, в нейрональных механизмах адаптации к психоэмоциональному и гипоксическому стрессу . . . . .	88
<i>Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д.</i> Фенотипические особенности экспрессии фактора, индуцированного гипоксией, и редокс-статус клеток неокортекса крыс на разных стадиях адаптации к гипоксии . . . . .	98
<i>Сидорова М.В., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В., Портниченко В.И., Самойлов М.О.</i> Влияние различных режимов умеренной гипобарической гипоксии на экспрессию фактора, индуцированного гипоксией, в неокортексе крыс . . . . .	111
<i>Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Глуценко Т.С., Пивина С.Г.</i> Влияние пренатальной гипок- сии на функцию гипофизарно-адренокортикальной системы и рабочую память у крыс . . . . .	116
<i>Портниченко А.Г., Лапикова-Бригинская Т.Ю., Василенко М.И., Портниченко Г.В., Маслов Л.Н., Мойбенко А.А.</i> Экспрессия киназы Akt в желудочках сердца при гипоксическом прекодиционировании и ремоделировании миокарда . . . . .	124
<i>Самойлов М.О., Чурилова А.В., Глуценко Т.С., Баранова К.А.</i> Паттерн нейрональной экспрессии транскрипционных факторов NF-kB при предъявлении различных режимов гипобарической гипоксии . . . . .	132
<b>ОГЛЯДИ</b>	
<i>Лукьянова Л.Д.</i> Сигнальная роль митохондрий при адаптации к гипоксии . . . . .	141
<i>Ткаченко М.М., Любарець Т.Ф.</i> Канцерогенні аспекти індетерміністичних ефектів опромінення . . . . .	155
<b>ІСТОРІЯ НАУК</b>	
<i>Ганіткевич Я.В.</i> Історія кафедри фізіології людини і тварин Чернівецького університету	165
<b>ПАМ'ЯТНІ ДАТИ</b>	
Михайло Михайлович Середенко (до 80-річчя з дня народження) . . . . .	169
<b>ХРОНІКА</b>	
Юрій Петрович Лиманський . . . . .	170

Н.А. Струтинська, Р.Б. Струтинський, С.В. Чорна, О.М. Семенихіна, Л.А. Мись, О.О. Мойбенко, В.Ф. Сагач

## Нові фторвмісні активатори аденозинтрифосфат-чутливих калієвих каналів флокалін і тіофлокалін пригнічують кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці щурів

*У досліджах in vitro на мітохондріях, ізольованих із тканини серця щурів, досліджували вплив активаторів аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів ( $K_{ATФ}$ -каналів) флокаліну і тіофлокаліну на кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори (МП) у серці щурів. Показано, що вони викликають характерне для активації  $K_{ATФ}$ -каналів помірне кальційнезалежне набухання мітохондрій, яке попереджається специфічним інгібітором 5-гідроксидеканоєвою кислотою, що дало змогу ідентифікувати ці сполуки як фармакологічні відкривачі саме мітохондріальних  $K_{ATФ}$ -каналів. Встановлена концентраційна залежність впливу як флокаліну, так і тіофлокаліну ( $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л) на величини кальційіндукованого набухання мітохондрій у серці з напівмаксимальними ефектами інгібування  $IC_{50}=50$  та  $IC_{50}=2,7$  мкмоль/л відповідно та більш потужною кардіопротекторною дією останнього. Так, флокалін у концентраціях  $10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  і  $10^{-4}$  моль/л попереджав кальційіндуковане відкривання МП на 23,89, 50,45 і 100 %, а тіофлокалін – на 20,18, 68,96 і 100 % у концентраціях  $10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  і  $10^{-5}$  моль/л відповідно. Показано, що введення цих сполук у досліджах in vivo знижує чутливість МП до дії  $Ca^{2+}$ . Отже, за фізіологічних умов активатори  $K_{ATФ}$ -каналів, ймовірно, чинять мембраностабілізуювальну дію на мітохондрії, підвищуючи тим самим резистентність органел до індуктора МП  $Ca^{2+}$ . Отримані результати дали змогу окреслити їх роль як кардіопротекторів і регуляторів утворення МП у серці, вказуючи на їх антиішемічний і антиапоптоичний ефекти, що може використовуватися для корекції мітохондріальної дисфункції при патологічних станах серцево-судинної системи.*

*Ключові слова:* флокалін, тіофлокалін,  $K_{ATФ}$ -канали, мітохондріальна пора, серце, щури.

### ВСТУП

Одним із найважливіших ендогенних механізмів кардіопротекції при ішемії міокарда є система аденозинтрифосфатзалежних калієвих каналів ( $K_{ATФ}$ -каналів) – сарколемальних і мітохондріальних, відкритих Noma [1] і Inoue [16]. Зокрема, такі ключові природні механізми кардіопротекції, як ішемічне пре-кондиціонування та ішемічне посткондиціонування опосередковуються активністю цих каналів [14, 23]. Gross [12] та Auchampach [7] в експериментах на серці собаки з використанням блокаторів  $K_{ATФ}$ -каналів глі-

бенкламиду і 5-гідроксидеканоєвої кислоти (5-ГД – специфічний інгібітор каналів саме мітохондріальної мембрани) вперше показали, що в механізмі розвитку ішемічного пре-кондиціонування беруть участь  $K_{ATФ}$ -канали як сарколемальної, так і внутрішньої мембрани мітохондрій. Загальною їх характеристикою й основним механізмом протекції є швидка реакція на зниження енергетичного потенціалу (вмісту АТФ) в кардіоміоциті – невідворотний наслідок порушення кровообігу серця. Ступінь антиішемічного захисту міокарда залежить від типу активованих  $K_{ATФ}$ -каналів:

© Н.А. Струтинська, Р.Б. Струтинський, С.В. Чорна, О.М. Семенихіна, Л.А. Мись, О.О. Мойбенко, В.Ф. Сагач

сарколемальної та мітохондріальної мембран кардіоміоцитів, гладеньком'язових та ендотеліальних клітин судин [1, 13].

Як виявилось, відкривати  $K_{ATP}$ -канали можливо і фармакологічним шляхом за допомогою активаторів цих каналів, а їх екзогенна активація призводить до реалізації потужних кардіопротекторних механізмів [8, 17, 20]. Разом з тим використання відомих активаторів цих каналів у клініці малопоширене у світовій практиці та практично відсутнє в Україні [17], що стало поштовхом до створення низки нових вітчизняних активаторів цих каналів [22]. Встановлено, що найбільш перспективними щодо створення лікарського засобу та введення в широку клінічну практику є флокалін та тіофлокалін. Проте, якщо їх вплив на калієві канали сарколемальної мембрани та антиішемічні властивості були показані (зокрема для флокаліну) в електрофізіологічних та інших експериментах [1, 4–6, 19], то про їх дію на канали мітохондріальної мембрани досі судять опосередковано, опираючись на інгібування їх ефектів 5-ГД [1].

Навантаження  $Ca^{2+}$  і оксидативний стрес є відомими індукторами неселективної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП) (від англ. mitochondrial permeability transition pores, mPTP), яка є важливим регулятором функціонування мітохондрій як за фізіологічних, так і патологічних умов. Варто відмітити, що МП відіграє ключову роль у клітинних порушеннях, спричинених насамперед перевантаженням органел  $Ca^{2+}$  і виникненням оксидативного стресу [11, 21].

Мета нашої роботи – ідентифікація механізму дії нових вітчизняних фторвмісних активаторів мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів – флокаліну та тіофлокаліну в експериментах на суспензії ізольованих мітохондрій і дослідити їх вплив на кальційіндуковане відкривання МП у серці щурів.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, масою 220–250 г) щурах лінії Вістар. Всі ек-

периментальні процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (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 КСІ (4°C). Мітохондрії виділяли диференційним центрифугуванням [2], і в суспензії органел визначали вміст білка за методом Лоурі.

Відкривання МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): КСІ – 120, тріс – НСІ – 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 5 хв до і впродовж 10 хв їх набухання за наявності індуктора  $Ca^{2+}$ . У дослідях на ізольованих мітохондріях для визначення відкривання МП у серці щурів використовували природний індуктор  $Ca^{2+}$  у концентрації  $10^{-4}$  моль/л. Зміну рівня набухання органел визначали як різницю у відсотках ( $\Delta, \%$ ) між показником набухання мітохондрій на 15 хв відносно вихідного значення. Концентрація білка в інкубаційному середовищі становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з подальшою реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв. В експериментах *in vivo* одноразове введення щурам флокаліну чи тіофлокаліну у дозі 2 мг/кг здійснювали за 30 хв до декапітації тварин.

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

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що при активації мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів іони калію надходять до мітохондрій, що викликає деполяризацію

їх внутрішньої мембрани та одночасне пасивне надходження аніонів слабких кислот: (Cl<sup>-</sup>), ортофосфату та води, що в свою чергу призводить до набухання мітохондріального матриксу [1]. Отже, набухання (ресструється при  $\lambda=520$  нм), що відбувається при введенні фармакологічних активаторів цих каналів можна використовувати для ідентифікації механізму їх дії як відкривачів цих каналів в ізольованих мітохондріях. Флокалін і тіофлокалін викликали характерне для активації згаданих каналів помірне набухання ізольованих мітохондрій серця щури з максимальним рівнем за концентрації  $10^{-5}$  та  $10^{-7}$  моль/л відповідно (рис. 1,а). Ці ефекти попереджалися специфічним інгібітором саме мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів 5-ГД (рис. 1,б,в), що вказує на залежність набухання від відкривання вищезгаданих каналів. Водночас класичний інгібітор МП циклоспорин А (ЦсА) у концентрації  $10^{-5}$  моль/л не впливав на активатори калієвих каналів, що може свідчити про здатність нових фторвмісних аналогів пінацидилу (активатора обох типів каналів: сарколемальних і мітохондріальних) відкривати  $K_{ATP}$ -канали внутрішньої мембрани мітохондрій.

Відомо, що за фізіологічних умов МП функціонує в режимі низької провідності та характеризується циклічністю роботи, подібною за механізмом до кальційіндукованого вивільнення у цитозоль  $Ca^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулума. Функціонування МП у режимі високої провідності – явище незворотне і пов'язане з глибокими наслідками для функції та структури мітохондрій і клітини в цілому. Цей режим ініціюється зокрема масивним некерованим входом кальцію в клітину і призводить до осмотичних змін в органелах і утворення в них зон набухання та деструкції. При цьому в цитоплазму вивільнюється фактор індукції апоптозу (AIF) і цитохром с, які є тригерами апоптозу [10].

Характерні криві спонтанного (контроль у безкальцієвому середовищі) та кальційіндукованого набухання мітохондрій, що відбува-

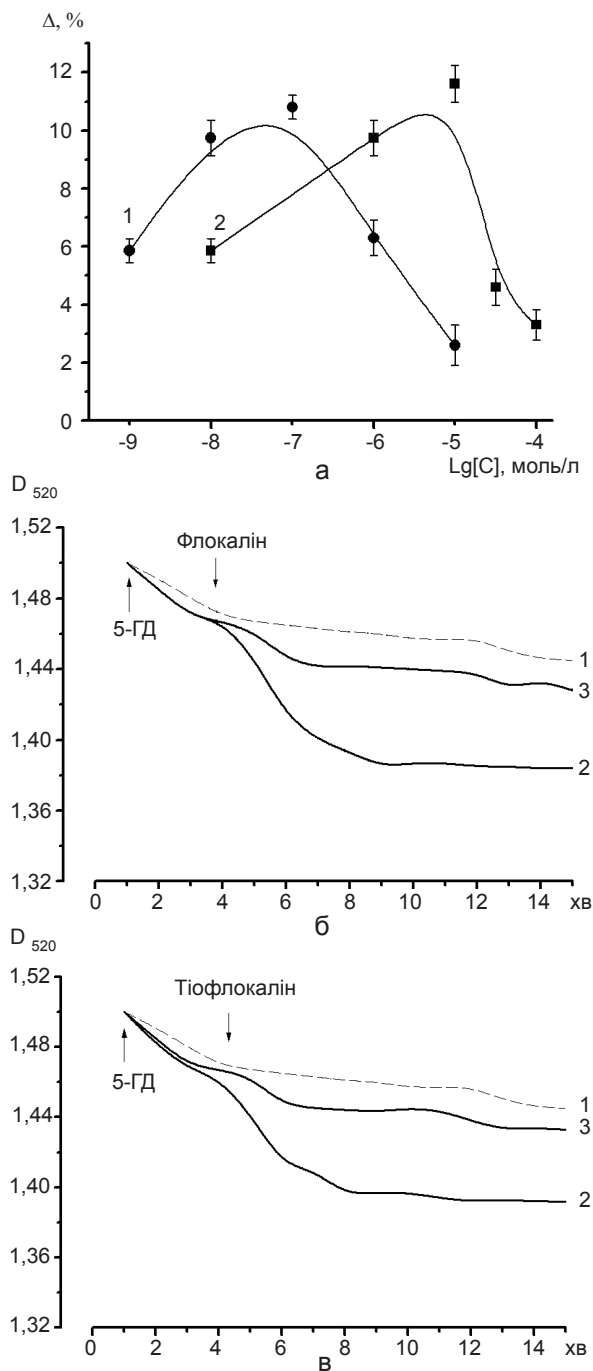


Рис. 1. Концентраційна залежність набухання мітохондрій серця щури при дії нових фторвмісних активаторів  $K_{ATP}$ -каналів тіофлокаліну (1) та флокаліну (2) без блокади (а) та за умов дії інгібітора вищезгаданих каналів мітохондріальних мембран – 5-гідроксидеканоєвої кислоти (5-ГД,  $10^{-4}$  моль/л); б – для флокаліну,  $10^{-5}$  моль/л; в – для тіофлокаліну,  $10^{-7}$  моль/л, для б і в: 1 – контроль; 2 – дія активаторів  $K_{ATP}$ -каналів; 3 – преінкубація з 5-ГД, дія активаторів  $K_{ATP}$ -каналів

лося внаслідок відкриття МП у серці шурів показані на рис. 2. У контролі зміна рівнів набухання ( $\Delta$ ) становила 7,28 %. В умовах навантаження мітохондрій кальцієм відбувалося високоамплітудне набухання ( $\Delta$ , = 17,96 %). Слід зауважити, що останнє практично повністю попереджалося ЦсА у концентрації  $10^{-5}$  моль/л (див. рис. 2,а). Преінкубація ізольованих мітохондрій з інгібіторами мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів 5-ГД ( $10^{-4}$  моль/л) та глібенкламідом (ГБК) ( $10^{-4}$  моль/л) не змінювала набухання органел, що було індуковане іонами

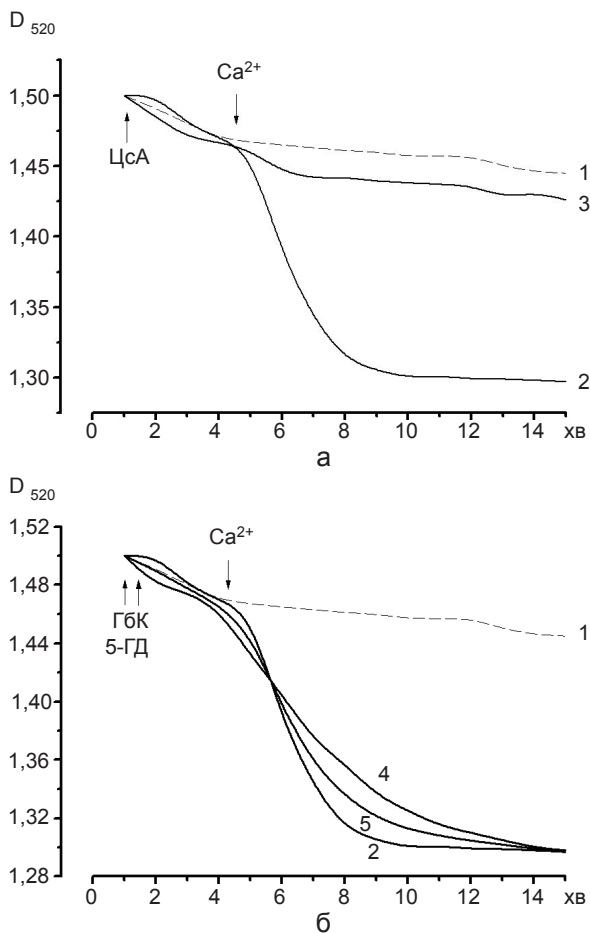


Рис. 2. Вплив інгібітора мітохондріальної пори циклоспорину А (ЦсА) (а) та блокувачів  $K_{ATP}$ -каналів – глібенкламїду (ГБК) та 5-гідроксидеканоевої кислоти (5-ГД) (б) на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця шурів: 1 – контроль; 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л), 3 – преінкубація з ЦсА ( $10^{-5}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$ , 4 – преінкубація з ГБК ( $10^{-4}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$ ; 5 – преінкубація з 5- ГД ( $10^{-4}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$

$Ca^{2+}$  (див рис. 2, б). Цей факт може свідчити про те, що інгібування згаданих каналів не впливає на кальційіндуковане відкриття МП та збільшення матриксу мітохондрій, тому що початково вони знаходяться в закритому стані.

Показано, що в умовах преінкубіції мітохондрій з флокаліном чи тіофлокаліном спостерігали зменшення кальційіндукованого набухання органел у серці шурів (рис. 3). Отже, попереднє відкриття мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів новими фторвмісними активаторами попереджало кальційіндуковане відкриття МП у серці тварин. Причому їх ефекти мали дозозалежний характер (рис. 4). Зокрема, введення у інкубаційний розчин флокаліну у концентраціях  $10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  і  $10^{-4}$  моль/л зменшувало величину набухання ізольованих мітохондрій серця шурів, що було індуковане іонами кальцію на 23,89, 50,45 і 100 % відповідно. Додавання тіофлокаліну ( $10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  і  $10^{-5}$  моль/л) пригнічувало це набухання на 20,18, 68,96 і 100 % відповідно (див. рис. 4,а,б). Ми встановили напівмаксимальні ефекти інгібування кальційіндукованого набухання мітохондрій і, як наслідок, відкриття МП, при концентрації 50 та 2,7 мкмоль/л для флокаліну та тіофлокаліну

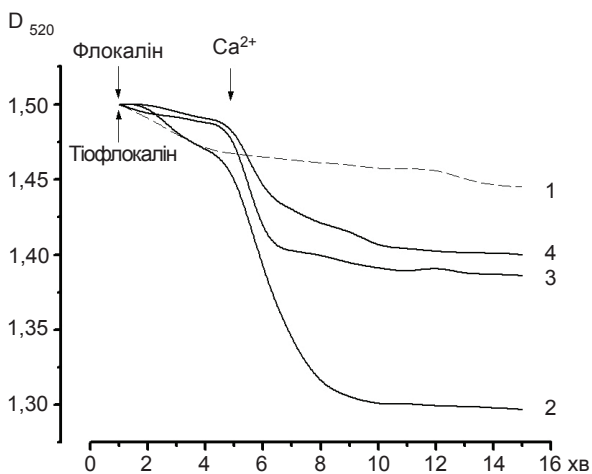


Рис. 3. Вплив попередньої активації мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів флокаліну та тіофлокаліну на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця шурів: 1 – контроль, 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л), 3 – преінкубація з флокаліном ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$ , 4 – преінкубація з тіофлокаліном ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л), дія  $Ca^{2+}$

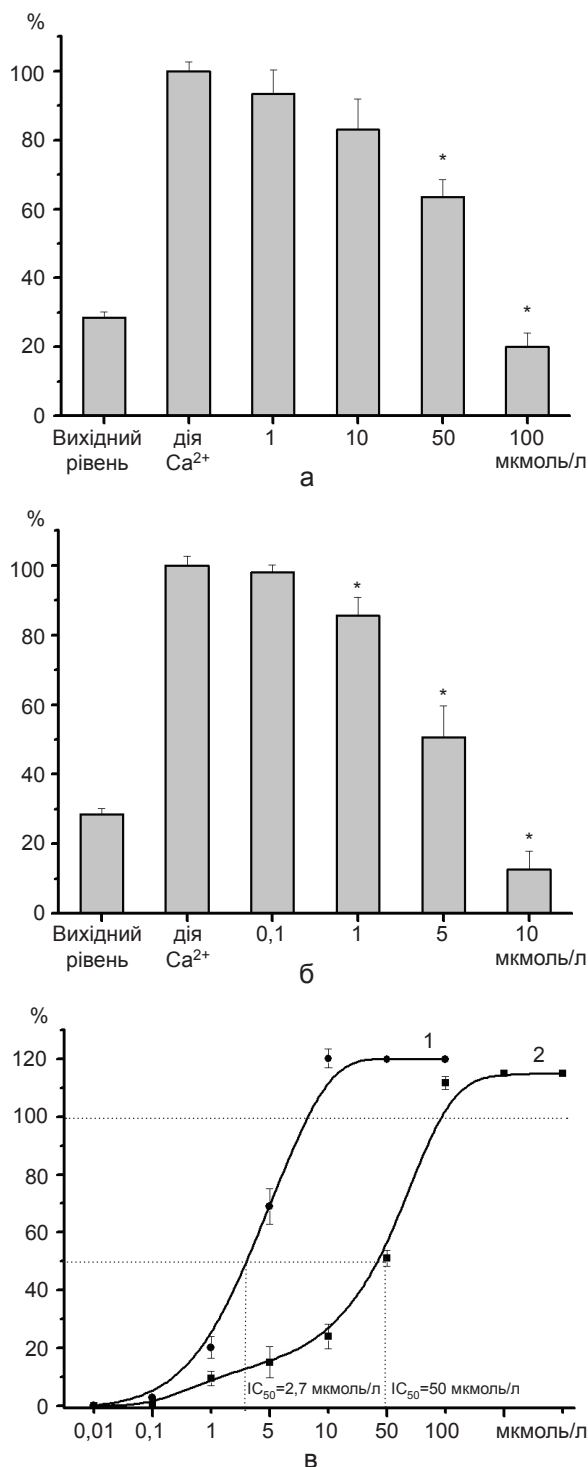


Рис. 4. Дія різних концентрацій флокаліну (а) та тіофлокаліну (б) на  $Ca^{2+}$ -індуковане ( $10^{-4}$  моль/л) набухання мітохондрій серця щури та криві доза – ефект (від 0 до 100%) (в) для тіофлокаліну (1) та флокаліну (2) відповідно. \* $P < 0,05$  порівняно з дією  $Ca^{2+}$  (для а і б)

відповідно (див. рис. 4,в). Їх відомий закордонний аналог пінацидил мав такі впливи за концентрації 128 мкмоль/л [15]. Таким чином, нові фторвмісні похідні пінацидилу значно краще попереджують кальційіндуковане відкриття МП. Слід зауважити, що аналогічні напівмаксимальні ефекти відомого активатора  $K_{ATP}$ -каналів і кардіопротектора діазоксиду були близькими до дії флокаліну та спостерігалися за його концентрації 65 мкмоль/л [15]. Проте тіофлокалін попереджав відкриття МП у концентраціях на порядок нижчих, ніж діазоксид (2,7 і 50 мкмоль/л відповідно).

Повне інгібування кальційіндукованого набухання мітохондрій у серці спостерігали за дії флокаліну та тіофлокаліну в концентраціях 100 і 10 мкмоль/л відповідно. Отже, отримані результати вказують на те, що тіофлокалін на порядок сильніше попереджає кальційіндуковане набухання МП, ніж флокалін та інші відомі активатори  $K_{ATP}$ -каналів. Більш потужна дія тіофлокаліну підтвердилася і в наступних експериментах з попередньою індукцією набухання за допомогою кальцію та подальшим введенням цих активаторів.

Отже, нові фторвмісні активатори калієвих каналів є потужними інгібіторами відкриття МП і, таким чином, процесів апоптозу та некрозу кардіоміоцитів. Прямі впливи флокаліну а, отже, і активації  $K_{ATP}$ -каналів, на розвиток цих механізмів було нами показано раніше в експериментах з аноксією (30 хв) та реоксигенацією (60 хв) ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура [6]. Зокрема, виявлено, що у дозі 5 мкмоль/л він спричиняв зсув співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин у бік живих, відсоток яких практично не відрізнявся від контрольних експериментів без аноксії – реоксигенації. Відкриття калієвих каналів флокаліном зменшувало процеси некрозу у два рази та повністю запобігало розвитку апоптозу, що був індукований аноксією – реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів.

Наступним етапом нашої роботи було до-

слідження впливу активації мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів за допомогою нових сполук на процес набухання мітохондрій на тлі попередньої індукції МП. Флокалін і тіофлокалін вводили в інкубаційне середовище через 5 та 60 с після додавання кальцію. Виявлено, що у першому випадку, в умовах попереднього відкриття МП, дія досліджуваних активаторів призводила до часткового припинення високоамплітудного кальційзалежного набухання мітохондрій серця (рис. 5). А інгібітор  $K_{ATP}$ -каналів глібенкламід запобігав описаним ефектам. Водночас відкриття згаданих каналів через 60 с після індукції МП не мало суттєвого протекторного впливу і скасовувало патологічне розширення матриксу мітохондрій незначно (див. рис. 5).

Процес пороутворення тісно пов'язаний зі зміною проникності мітохондріальних мембран, що характеризується різною їх чутливістю до дії індукторів. Оскільки МП є структурною організацією мембран, то однією з характерних її властивостей – це чутливість до індукторів її відкриття, зокрема до  $Ca^{2+}$  та окисників. Як раніше нами було показано, чутливість МП до індуктора  $Ca^{2+}$  була підвищеною за старіння та гіпертензії [2, 3]. В експериментах *in vivo* досліджували одноразове введення щурам нових активаторів для встановлення чутливості МП до індуктора кальцію у серці (рис. 6). Так, показано, що ін'єкція як флокаліну, так і тіофлокаліну зменшує чутливість МП до кальцію ( $10^{-4}$  та  $10^{-5}$  моль/л), з більш потужною кардіпротекторною дією останнього.

Відомо, що мітохондріальні  $K_{ATP}$ -канали відіграють центральну роль у захисті серця від ішемічно/реперфузійних пошкоджень (явище ішемічного прекодиціювання). Активатори мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів (діазоксид, пінацидил, нікоранділ, міноксиділ та ін.) зв'язуються з їх SUR-субодиницею та, відкриваючи канали, можуть значно покращувати стан клітин за патологічних умов, зокрема гіпоксії та ішемії тканин. Ми намагалися з'ясувати, яким чином активування

цих каналів може здійснювати протекцію у постішемічних пошкодженнях серця, зокрема досліджуючи вплив активаторів каналів на відкриття неселективної циклоспоринчутливої МП, яка є важливим регулятором функціонування мітохондрій як за фізіологічних, так і патологічних умов, ініціюючи розвиток патологічних станів, що супроводжуються некротичними й апоптотичними процесами [10, 21].

У літературі існує декілька пояснень можливого протекторного механізму дії відкривачів мітохондріальних  $K_{ATP}$ -каналів. По-перше, їх активація викликає деполяризацію потенціалу внутрішньої мембрани мі-

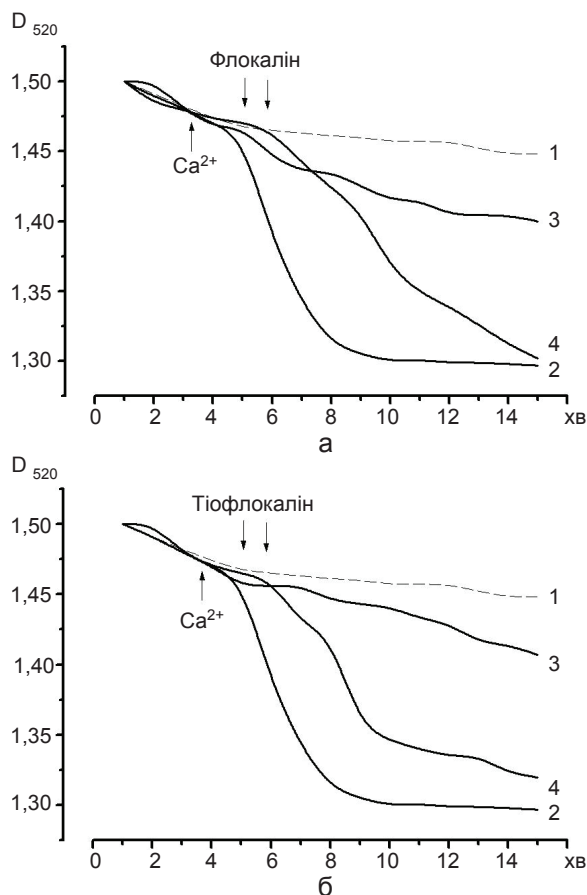


Рис. 5. Вплив активаторів  $K_{ATP}$ -каналів флокаліну ( $10^{-4}$  моль/л) (а) та тіофлокаліну ( $10^{-5}$  моль/л) (б) на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця щурів: 1 – контроль; 2 – дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); 3 – введення активаторів через 5 с після додавання  $Ca^{2+}$ , 4 – введення активаторів через 60 с після додавання  $Ca^{2+}$



тохондрій ( $\Delta\Psi_m$ ), наслідком чого є зменшення рушійної сили для транспортування іонів кальцію у органели, що в свою чергу захищає мітохондріальний матрикс від їх перевантаження. З іншого боку, навантаження  $\text{Ca}^{2+}$  і оксидативний стрес є відомими індукторами МП. Згідно з альтернативною гіпотезою, активація мітохондріальних  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів може викликати помірне мітохондріальне набухання, яке певною мірою захищає мітохондрії, зберігаючи структуру та функцію їх міжмембранного простору. Інша гіпотеза стосовно кардіопротекторної дії одного з активаторів мітохондріальних  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів діазоксиду припускає, що останній може модулювати продукування мітохондріями реактивних видів кисню [9].

Таким чином, у цій роботі ми розглянули один із механізмів дії нових вітчизняних фторвмісних сполук. Індукція характерного для активації  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів помірного набухання ізольованих мітохондрій серця та його попередження специфічним інгібітором саме  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналів мітохондріальної мембрани – 5-ГД дало змогу ідентифікувати флокалін та тіофлокалін як фармакологічні відкривачі цих каналів. В експериментах з кальційіндукованим набуханням мітохондрій показано,

що активація калійселективної проникності у внутрішній мембрані мітохондрій цими активаторами призводить до дозозалежного інгібування відкривання МП у серці з більш потужною кардіопротекторною дією тіофлокаліна. Отримані результати дали змогу окреслити роль флокаліну та тіофлокаліну як кардіопротекторів і регуляторів утворення МП у серці, вказуючи на їх антиішемічний і антиапоптотичний ефекти, що може використовуватися для корекції мітохондріальної дисфункції при патологічних станах серцево-судинної системи.

**Н.А. Струтинская, Р.Б. Струтинский,  
С.В. Черная, Е.Н. Семенихина, Л.А. Мись,  
А.А. Мойбенко, В.Ф. Сагач**

#### **НОВЫЕ ФТОРСОДЕРЖАЩИЕ АКТИВАТОРЫ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ФЛОКАЛИН И ТИОФЛОКАЛИН ИНГИБИРУЮТ КАЛЬЦИЙИНДУЦИРОВАННОЕ ОТКРЫВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ В СЕРДЦЕ КРЫС**

В опытах *in vitro* на митохондриях, изолированных из ткани сердца крыс, исследовали влияние активаторов аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов ( $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов) флокалина и тиофлокалина на кальцийиндуцированное открывание митохондриальной поры (МП) в сердце крыс. Они вызвали характерное для активации  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов умеренное кальцийнезависимое набухание митохондрий, которое предупреждалось специфическим ингибитором 5-гидроксидекановой кислоты, что позволило идентифицировать эти соединения как фармакологические открыватели именно митохондриальных  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов. Установлена концентрационная зависимость влияния как флокалина, так и тиофлокалина ( $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л) на величины кальцийиндуцированного набухания митохондрий в сердце с полумаксимальными эффектами ингибирования  $\text{IC}_{50}=50$  и  $\text{IC}_{50}=2,7$  мкмоль/л соответственно, и более мощным кардиопротекторным действием последнего. Так, флокалин в концентрациях  $10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  и  $10^{-4}$  моль/л предупреждал кальцийиндуцированное открывание МП на 23,89, 50,45 и 100 %, а тиофлокалин – на 20,18, 68,96 и 100 % в концентрациях  $10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  и  $10^{-5}$  моль/л соответственно. Показано, что введение этих соединений в опытах *in vivo* снижает чувствительность МП к действию  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким образом, в физиологических условиях активаторы  $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов, вероятно, оказывают мембраностабилизирующее воздействие на митохондрии, повышая тем самым резистентность органелл к индуктору

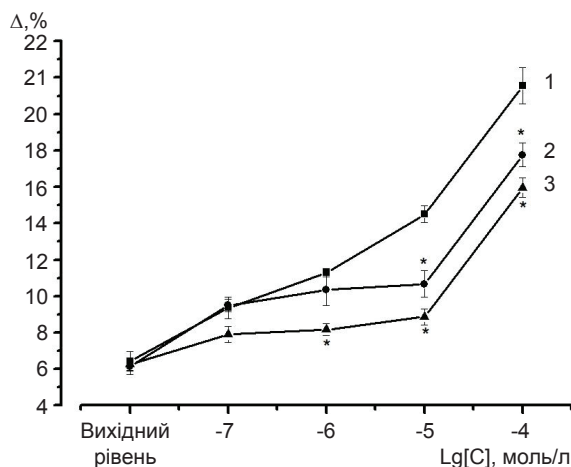


Рис. 6. Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора  $\text{Ca}^{2+}$  у серці щурів за умов введення *in vivo* флокаліну та тіофлокаліну: 1 – контроль 2 – дія флокаліну (2 мг/кг), 3 – дія тіофлокаліну (2 мг/кг). \*  $P < 0,05$  порівняно з контролем

МП  $\text{Ca}^{2+}$ . Полученные результаты позволили определить их роль как кардиопротекторов и регуляторов образования МП в сердце, указывая на антиишемический и антиапоптотический эффекты, что может использоваться для коррекции митохондриальной дисфункции в патологических состояниях сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: флокалин, тиофлокалин,  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналы, митохондриальная пора, сердце, крысы.

**N.A. Strutynska, R.B. Strutynskyi, S.V. Chorna, O.M. Semenykhina, L.A. Mys, O.O. Moibenko, V.F. Sagach**

**NEW FLUORINE-CONTAINING OPENERS OF ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS FLOKALIN AND TIOFLOKALIN INHIBIT CALCIUM-INDUCED MITOCHONDRIAL PORE OPENING IN RAT HEARTS**

In experiments *in vitro* on the mitochondria isolated from the rat's heart we studied the effects of the openers of ATP-sensitive potassium channels ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ -channels), focalin and tiofocalin, on the calcium-induced mitochondrial pore (MPTP) opening. Focalin and tiofocalin caused moderate  $\text{Ca}^{2+}$ -independent mitochondria swelling, which was prevented by a specific inhibitor of 5-hydroxydecanoate. This allowed to identify these compounds as mitochondrial  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -channels openers. We found that concentration-dependent inhibitory effects ( $10^{-7}$  to  $10^{-4}$  M) of focalin (with  $\text{IC}_{50}=50 \mu\text{M}$ ) and tiofocalin (with  $\text{IC}_{50}=2,7 \mu\text{M}$ ) on  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial swelling (MPTP opening) in the heart characterized more powerful cardioprotective action of the latter. It was shown that the administration of these compounds in experiments *in vivo* decreased the sensitivity of the MPTP opening to  $\text{Ca}^{2+}$ . Thus, under physiological conditions the activators  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -channels probably provide the membrane-stabilizing effects, thereby effectively increasing the organelles resistance to  $\text{Ca}^{2+}$ , an inductor of MPTP. The results obtained allowed to characterize the role of the compound studied as *cardioprotectors* and regulators of the MPTP formation in the heart, indicated their anti-ischemic and *anti-apoptotic* effects that can be used in order to correct the mitochondrial dysfunction under pathological conditions of the cardiovascular system.

Keywords: focalin, tiofocalin,  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -channels, mitochondrial pore, heart, rats.

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

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца // К.: Наук. думка, 2008. – 518 с.
2. Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик

- О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів митохондріальної пори в серці шурів // Фізіол. журн. – 2004. – **50**. – №2. – С. 49–63.
3. Струтинська Н.А., Дорофеева Н.О., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф. Підвищена чутливість митохондріальної пори до індуктора  $\text{Ca}^{2+}$  у серці шурів зі спонтанною гіпертензією // Там само. – 2012. – **58**, № 6. – С. 3–8.
4. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Чебанов В.А., Горобець М.Ю. Моделювання промислового процесу виробництва препарату “Флокалін” та визначення його оптимально-ефективної дози для лікування захворювань серця // Наука та інновації. – 2013. – **9**, №1. – С. 55–63.
5. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М., Юзьків М.Я., Квочіна Л.І., Шиш А.М. Дослідження кардіопротекторних ефектів нового фтормісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів // Фізіол. журн. – 2001. – **47**, №2. – С. 16–23.
6. Струтинський Р.Б., Нагібін В.С., Струтинська Н.А., Янчій О.Р., Мойбенко О.О. Вплив флокаліну на розвиток апоптозу та некрозу при аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів // Там само. – 2013. – **59**, №3. – С. 3–9.
7. Auchampach J., Grover G., Gross G. Blockade of ischemic preconditioning in dogs by the novel ATP-dependent potassium channel antagonism sodium 5-hydroxydecanoate // Cardiovascular. Res. – 1992 – **26**, № 11. – P. 1054–1062.
8. Bhatnagar A., Bolli R. Modulation of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels to protect the ischemic myocardium: Clinical implications // Exp. Clin. Cardiol. – 1999. – **4**, №1. – P. 20–22.
9. Cheng Y, Debska-Vielhaber G, Siemen D. Interaction of mitochondrial potassium channels with the permeability transition pore // FEBS Lett. – 2010. – **584**, № 10 – P. 2005–2012.
10. Di Lisa F., Carpi A., Giorgio V., Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection // Biochim. and Biophys. Acta. – 2011. – **1813**, № 7. – P. 1316–1322.
11. Elrod J.W., Molkentin J.D. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore // Ibid. – 2013 – **77**, № 5 – P. 1111–1122.
12. Gross G.J., Auchampach J.A. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs // Ibid. – 1992. – **70**. – P.223–233.
13. Gross G.J., Fryer R.M. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels and myocardial preconditioning // Ibid. – 1999. – **84**, №9. – P. 973–979.
14. Hanley P.J., Daut J. K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2005. – **39**, №1. – P. 17–50.
15. Holmuhamedov E.L., Wang L., Terzic A. ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel openers prevent  $\text{Ca}^{2+}$  overload in rat cardiac mitochondria // J. Physiol. (London). – 1999. – **519**, №2. – P. 347–360.
16. Inoue I., Nagase H., Kishi K., Higuti T. ATP-sensitive  $\text{K}^+$

- channels in the mitochondrial inner membrane // Nature. – 1991. – **352**, №6332. – P. 244–247.
17. Jahandir A., Terzic A.  $K_{ATP}$  channel therapeutics at the bedside // J. Molec. and Cell. Cardiol. – 2005. – **39**. – P. 99–112.
18. Noma A. ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle // Nature. – 1983. – **305**, №5930. – P. 147–148.
19. 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.
20. Wakahara N., Katoh H., Yaguchi Y., Uehara A., Satoh H., Terada H., Fujise Y., Hayashi H., Difference in the cardioprotective mechanisms between Ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts // Circular. J. – 2004. – **68**. – P. 156–162.
21. Webster K.A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species // Future Cardiol. – 2012. – **8**, № 6 – P 863–884.
22. Yagupolskii L.M., Maletina I.I., Petko K.I. New fluorine-containing hypotensive preparations // J. Fluor. Chem.-2001.- **109**. - P.87-94.
23. Yang X.M., Proctor J.B., Cui L., Krieg T., Downey J.M., Cohen M.V. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways // J. Amer. Coll Cardiol. – 2004. – **44**, №5. – P. 1103–1110.

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

*Матеріал надійшов до  
редакції 14.10.2013*

S.V. Goncharov, V.L. Gurianova, D.O. Stroy, T.I. Drevytska, S.P. Kaplinskii, E.A. Nastenکو, M. Litvinenko, R.V. Terletskiy, M.V. Khaitovych, O.O. Moibenکو, V.E. Dosenکو

## Genetic predisposition to essential hypertension in children: analysis of 17 single nucleotide polymorphisms

*Study of 17 single nucleotide polymorphisms has been performed to determine the factors of genetic predisposition to essential hypertension. Polymerase chain reaction (PCR) with subsequent analysis of restriction fragment length, allele specific PCR or real-time PCR was used for genotyping of 17 single nucleotide polymorphisms in 14 genes in 145 children with essential hypertension and 144 healthy persons with following complex multivariate statistical analysis. Two single nucleotide polymorphisms – MMP9 (C<sup>-1562</sup>→T) and NOS3 (Glu<sub>298</sub>→Asp) – rs3918242 and rs1799983 – were shown to represent the main independent effects with the highest predictive potential (77,1% as indicated by binary logistic regression and 74,6% testing accuracy shown by Multifactorial Dimensionality Reduction). MMP9 (C<sup>-1562</sup>→T) and NOS3 (Glu<sub>298</sub>→Asp) potentially may be used to create predictive algorithm for determination of predisposition to arterial hypertension in children.*

*Key words: single nucleotide polymorphism, genetics, hypertension, pediatrics.*

### INTRODUCTION

Genetic predisposition is a strong and necessary background for effects of environmental factors, the worst combinations of which might lead to onset and progression of multigenic diseases, including essential hypertension (EH). The earlier age of disease onset suspects more primary role of genetic factors in its etiology. The cases of EH in childhood are rare but there is no doubt regarding the leading role of genetic factors in their onset [29]. Single nucleotide polymorphism (SNP) is considered to be genetic phenomenon that constitutes diathesis (more common determination is susceptibility) to almost all chronic diseases including EH [2].

There are a lot of studies concerning association of several SNPs and EH in adults but less information is available about EH in children [5, 7, 19, 21, 40]. SNPs in genes encoding factors of blood pressure regulation (such as *NOS3*,

*ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *NPPA*, *NPRI*, *ET1*, etc) are of the main interest for authors investigating this problem and they have found association of some of them with increased blood pressure in early age. Petrovic D. et al. were the first to publish work concerning this aspect in 2002 [39]. They studied frequencies of I/D polymorphism of *ACE* gene, the M<sub>235</sub>→T polymorphism of the angiotensinogen gene (*AGT*), and the angiotensin II type 1 receptor (*AGTR1*) A<sup>1166</sup>→C gene polymorphism in group of 57 children (8-19 years old) with diagnosed EH compared to group of 57 subjects with normal blood pressure, reported that *AGT* M<sub>235</sub>→T polymorphism can be considered as a risk factor for EH in childhood. The same team of investigators in 2004 was failed to find association of ScaI *NPPA* gene polymorphism with the level of blood pressure in the same studied group [58]. Snieder H. et al. in their works (2002, 2004, and 2006) analyzed SNPs in genes encoding beta2-adrenergic

© S.V. Goncharov, V.L. Gurianova, D.O. Stroy, T.I. Drevytska, S.P. Kaplinskii, E.A. Nastenکو, M. Litvinenko, R.V. Terletskiy, M.V. Khaitovych, O.O. Moibenکو, V.E. Dosenکو

receptor *ADRB2* (Arg<sub>16</sub>→Gly and Gln<sub>27</sub>→Glu), endothelin-1 *EDN1* (T<sup>-1370</sup>→G, +138/ex1 del/ins, T-37/in2C, and Lys<sub>198</sub>→Asn), angiotensinogen *AGT* (M<sub>235</sub>→T), and angiotensin II receptor type1 *AGTR1* (C<sup>-521</sup>→T, L<sub>191</sub>→L and A<sup>1166</sup>→C) in Caucasians and Afro-Americans. They have evaluated influence of genotype, sex, race, and socioeconomic state on dynamics of changes of blood pressure and left ventricle mass in 15 years long study [20, 42, 43]. Although EH was not diagnosed in people included into the study, authors concluded that almost all analyzed SNPs as well as sexual and racial factors influence on blood pressure. Single genome-wide association study identifies some SNPs and their relationship with the blood pressure in adolescents – Canadian researchers identified 3 loci in following genes that are associated with high blood pressure: *PAX5*, *MRPS22*, and *FTO* [31].

In the current work we have studied the frequencies of SNPs in groups of genes involved into regulation of vascular tone (*NOS3*, *AGT*, *ACE*, *AGTR1*, *NPPB*) and also of extracellular (*A2M*, *MMP2*, *MMP9*) and intracellular (*LMP2*, *LMP7*, *PSMA6*) proteolysis, of hypoxia response (*HIF1A*), metabolism (*PPARG*), and DNA repair (*XRCC1*) in children with EH and in people with normal blood pressure. We used the integrative analytical approach aimed to evaluate the role of SNPs as genetic basis of predisposition to EH and created predictive model for EH. It includes 2 SNPs: *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T) and *NOS3* 7 exon (Glu<sub>298</sub>→Asp), that represent 2 main independent effects with the highest predictive potential.

## MATERIAL AND METHODS

### Contingent under the Study: Essential Hypertension Group and Control Subjects

Children with diagnosed EH ranged in age from 9 to 17 years (145 subjects) were included into the study. Each participant's parents of the study provided written informed consent, and study protocols were approved by the institutional review boards of Bogomoletz Institute

of Physiology. All members of 24-hour blood pressure monitoring (BPM) was carried out on 5-7 day of in-patient examination using the pressure monitors «ABPM-04/M» («MEDITECH», Hungary) with humeral cuff. Evaluation of BPM data has been realized by commonly accepted approach [44]. The complete clinical examination of patients was carried out according to the recommendations of the European Society of Hypertension, including estimation of renal function (ultrasonic scanning of kidneys, and urine analyses) to exclude the secondary hypertension [27]. While suspecting in patients the renal etiology of hypertension (propensity to increased diastolic blood pressure, night type of hypertension), we carried out the renal dynamic scintigraphy with <sup>99m</sup>Tc-diethylene triamine pentaacetic acid and <sup>99m</sup>Tc-S-benzoyl mercaptoacetyltriglycine in scintillation gamma cameras PHO Gamma LFOV (“Searle”, Holland). Glomerular filtration rate in examined patients for each kidney was ranged from 38 to 98 mL/min, average (X±SD) – 54,3±17,2 mL/min; standardized – 56 – 144 mL/min, average – 105,2±24,9 mL/min.

Clinically healthy children (144 subjects) were included in control group, examination of them by anamnesis taking, electrocardiography and blood pressure measurement was carried out to confirm absence of cardiovascular pathology.

### Genotyping

Blood samples were taken under sterile conditions into 2,7 mL manovettes containing EDTA potassium salt as an anticoagulant (“Sarstedt”, Germany), or buccal epithelium was taken using buccal brushes with the following freezing of samples and their storage at -20°C. DNA for genotyping was extracted from the samples using Isogene kits (Russian Federation) according to manufacturer's protocol. PCR with subsequent analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) was used to determine the SNPs set forth below: *NOS3* promoter (T<sup>-786</sup>→C) by methodic proposed by Ghilardi G. et al. with our modifications

[12], *NOS3* 7 exon (Glu<sub>298</sub>→Asp) [15], *AGT* (Met<sub>235</sub>→Thr) and *AGTR1* (A<sup>1166</sup>→C) [4], *NPPB* promoter (T<sup>381</sup>→C) [30], *A2M* 5' splice site of exon 18 [6], *A2M* (Ile<sub>1000</sub>→Val) [55], *MMP9* (C<sup>1562</sup>→T) [18], *LMP2* (Arg<sub>60</sub>→His) and *LMP7* (Lys<sub>49</sub>→Gln) [50], *HIF1α* exon 12 (C<sup>1744</sup>→T) [38], *PPARG* (Pro<sub>12</sub>→Ala) [2], *XRCC1* (Arg<sub>399</sub>→Gln) [26]. Insertion/deletion polymorphisms of *NOS3* intron 4 and *ACE* intron 16 were determined by Wang X.L. et al. and Evans A.E. et al. correspondingly [11, 51]. To detect *MMP2* C<sup>1306</sup>→T we used the allele-specific PCR [34]. Real-time PCR and Taq-Man Assays was used for allelic discrimination in SNP *PSMA6* (C<sup>-8</sup>→G) TaqMan® SNP Assay C\_11599359\_10 and 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) [48].

### Statistical analysis

Clinical data (table 1) was tested for normally distribution using Shapiro-Wilk test and assumption of equality of variances was analyzed with the help of Levine test using SPSS ver. 17.0. Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies was used to examine Hardy-Weinberg equilibrium. Odds ratios for every single SNP were calculated using SPSS ver. 17.0.

Complex multifactorial statistical analysis was performed in 3 steps to access the independent main and interaction effects of the studied SNPs. In the 1<sup>st</sup> step we used a random forest algorithm [46]. Random forests can accommodate thousands of independent variables and have been demonstrated to be among the most accurate statistical learning machines, and are capable of

generating useful scaling of importance among predictors. Analyses were performed using the Random Forest as given in the R library.

To find out OR (odds ratios) associated with each predictor, to detect main effects of the most important SNPs chosen by random forest and to reveal what genotypes are associated with an increased risk of essential hypertension, we used a binary logistic regression (performed in SPSS ver. 17.0) in the 2<sup>nd</sup> step of statistical analysis.

Finally, in the 3<sup>d</sup> step, we used a non-parametric approach such as Multifactorial Dimensionality Reduction (MDR) software (version 2.0) to detect the interaction effects of the studied SNPs and find out the best model with the highest predicting potential. MDR is a data reduction method that seeks the possibility to identify combinations of multilocus genotypes that are associated with either high risk or low risk of disease. We selected the best MDR model as the one with the maximum testing accuracy. A testing accuracy of 0,5 is expected under the null hypothesis. Statistical significance was determined using 1000-fold permutation tests. The MDR results were considered statistically significant at the  $P < 0,05$  level.

### RESULTS

Hardy-Weinberg and chi-square analysis. Data on frequencies of studied SNPs for the group of controls vs. children with EH are summarized in table 2. Frequency distribution of genotypes of all analyzed SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium.

**Table 1. Basic characteristics of the individuals involved in the study**

Parameter	Control (n=144)	EH (n=145)
Sex, male/female	97/47	103/42
Age, years ± SD	13.7 ± 1.12	14.3 ± 1.62
BMI, kg/m <sup>2</sup> ± SD	19.3 ± 3.44	23.0 ± 4.26
SBP, mm Hg ± SD	107.5 ± 6.86	128.8 ± 7.94 *
DBP, mm Hg ± SD	68.4 ± 6.13	74.8 ± 8.82

BMI – body mass index, SBP – systolic blood pressure, DBP - diastolic blood pressure, SD – standard deviation. \* -  $P < 0.05$

Chi-square test. Distribution of genotypes of studied SNPs in children with EH and healthy people (odds ratios with 95% confidence intervals) is summarized in table 3.

Random forest analysis. Importance index of 14 analyzed SNPs is summarized in figure 1. It can clearly show that *MMP9* is the most important predictor followed by *NOS3* 7 exon (Glu<sub>298</sub>→Asp) SNP and then *NOS3* promoter (T<sup>-786</sup>→C) and *AGTR1* (A<sup>1166</sup>→C). The result of the application of the method suggested by Strobl et al. regarding the reduction of the unimportant predictors is shown in figure 1 (SNPs located to the left of the vertical dashed line). The prediction accuracy for the OOB was 73%.

After selecting the most important predictors we wanted to compare the OOB error rate if only these 4 SNPs are included in the model. Random forest model was built again with 1000 trees and

2 random variables available at each node split. The OOB prediction accuracy did not change at all (73%).

Logistic regression analysis. To detect the main effects of 4 most important SNPs selected by random forest and to reveal the genotypes associated with an increased/decreased risk of EH, we used a binary logistic regression (“block enter” method) but only with the 4 SNPs selected by random forest. The prediction accuracy of logistic regression with 4 predictors was 79.5% and coefficients of logistic regression along with odds ratios, confidence intervals are shown in table 4. The obtained results suggest that only *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T) and *NOS3* 7 exon (Glu<sub>298</sub>→Asp) are significantly associated with EH while *NOS3* promoter (T<sup>-786</sup>→C) and *AGTR1* (A<sup>1166</sup>→C) did not reach statistical significance. Genotype C/T (*MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T))

**Table 2. Percentage distribution of genotypes of studied SNPs in children with essential hypertension and healthy people**

GENES (POLYMORPHISMS), REFERENCE SNP ID	GENOTYPES					
	AA		Aa		aa	
	Control	EAH	Control	EAH	Control	EAH
<i>NOS3</i> (T <sup>-786</sup> →C), rs2070744	40,7	44,4	53,2	40,7	6,1	14,9
<i>NOS3</i> (Glu <sub>298</sub> →Asp), rs1799983	31,1	44,7	64,5	41,3	4,4	14
<i>NOS3</i> (4a/4b)	62,9	68,6	32,8	24,1	4,3	7,3
<i>ACE</i> (I/D)	27,6	18,8	51,7	58	20,7	23,2
<i>AGT</i> (Met <sub>235</sub> →Thr), rs699	19,8	27,4	57,5	49	22,7	23,6
<i>AGTR1</i> (A <sup>1166</sup> →C), rs5186	53,1	52,3	39,9	37,4	7	10,3
<i>NPPB</i> (T <sup>-381</sup> →C), rs198388	48	34,8	33,7	46,7	18,3	18,5
<i>A2M</i> (Ile <sub>1000</sub> →Val), rs669	43,8	35,5	44,5	51	11,7	13,5
<i>A2M</i> (I/D), rs3832852	47	78,8	43,3	19,7	9,7	1,5
<i>MMP2</i> (C <sup>-1306</sup> →T), rs243865	49	50	45	46,1	6	3,9
<i>MMP9</i> (C <sup>-1562</sup> →T), rs3918242	64	73,8	34,9	22,6	1,1	3,6
<i>LMP2</i> (Arg <sub>60</sub> →His), rs17587	63,7	42,2	28,7	45,7	7,6	12,1
<i>LMP7</i> (Lys <sub>49</sub> →Gln), rs2071543	97,5	92,5	2,5	7,5	0	0
<i>PSMA6</i> (C <sup>-8</sup> →G), rs1048990	72	76,5	28	21	0	2,5
<i>HIF1A</i> (C <sup>1744</sup> →T), rs11549465	80	86,3	20	13	0	0,7
<i>PPARG</i> (Pro <sub>12</sub> →Ala), rs3856806	64,9	60	31,1	38,6	4	1,4
<i>XRCC1</i> (Arg <sub>399</sub> →Gln), rs25487	36,2	44	48,3	42,1	15,5	13,9

**Table 3. Distribution of genotypes of studied SNPs in children with essential hypertension and healthy people. Odds ratios with 95% confidence intervals.**

Polymorphism	Genotype	Odds Ratio and 95% CI
<i>NOS3</i> (T <sup>-768</sup> →C)	AA	1(ref)
	Aa	1.464 (0.854 - 2.521)
	aa	0.472 (0.170 - 1.230)
<i>NOS3</i> (Glu <sub>298</sub> →Asp)	AA	1(ref)
	Aa	2.184 (1.215 - 3.927)
	aa	0.457 (0.149 - 1.576)
<i>NOS3</i> (4a/4b)	AA	1(ref)
	Aa	1.494 (0.715 - 3.121)
	aa	0.712 (0.178 - 2.790)
<i>ACE</i> (I/D)	AA	1(ref)
	Aa	0.611 (0.311 - 1.216)
	aa	0.612 (0.265 - 1.433)
<i>AGT</i> (M <sub>235</sub> →T)	AA	1(ref)
	Aa	1.586 (0.745 - 3.151)
	aa	1.490 (0.559 - 3.433)
<i>AGT1</i> (A <sup>1166</sup> →C)	AA	1(ref)
	Aa	1.012 (0.567 - 1.888)
	aa	0.732 (0.244 - 2.180)
<i>NPPB</i> (T <sup>-381</sup> →C)	AA	1(ref)
	Aa	0.519 (0.301 - 0.877)
	aa	0.683 (0.351 - 1.431)
<i>A2M</i> (Ile <sub>1000</sub> →Val)	AA	1(ref)
	Aa	0.699 (0.397 - 1.229)
	aa	0.732 (0.344 - 1.689)
<i>A2M</i> (I/D)	AA	1(ref)
	Aa	3.61 (1.966 - 6.585)
	aa	7.801 (1.703 - 35.91)
<i>MMP2</i> (C <sup>-1306</sup> →T)	AA	1(ref)
	Aa	1.009 (0.565 - 1.890)
	aa	1.452 (0.369 - 5.709)
<i>MMP9</i> (C <sup>-1562</sup> →T)	AA	1(ref)
	Aa	1.793 (1.019 - 3.157)
	aa	0.346 (0.041 - 2.722)
<i>LMP2</i> (Arg <sub>60</sub> →His)	AA	1(ref)
	Aa	0.461 (0.259 - 0.679)
	aa	0.443 (0.138 - 1.008)
<i>LMP7</i> (Lys <sub>49</sub> →Gln)	AA	1(ref)
	Aa	0.343 (0.07 - 1.679)
	aa	NA
<i>PSMA6</i> (C <sup>-8</sup> →G)	AA	1(ref)
	Aa	1.440 (0.874 - 2.373)
	aa	0.199 (0.210 - 1.751)
<i>HIF1A</i> (C <sup>1744</sup> →T)	AA	1(ref)
	Aa	1.540 (0.715 - 3.340)
	aa	NA
<i>PPARG</i> (Pro <sub>12</sub> →Ala)	AA	1(ref)
	Aa	0.749 (0.430 - 1.307)
	aa	2.401 (0.401 - 12.989)
<i>XRCCI</i> (Arg <sub>399</sub> →Gln)	AA	1(ref)
	Aa	1.411 (0.719 - 2.757)
	aa	1.408 (0.601 - 4.015)



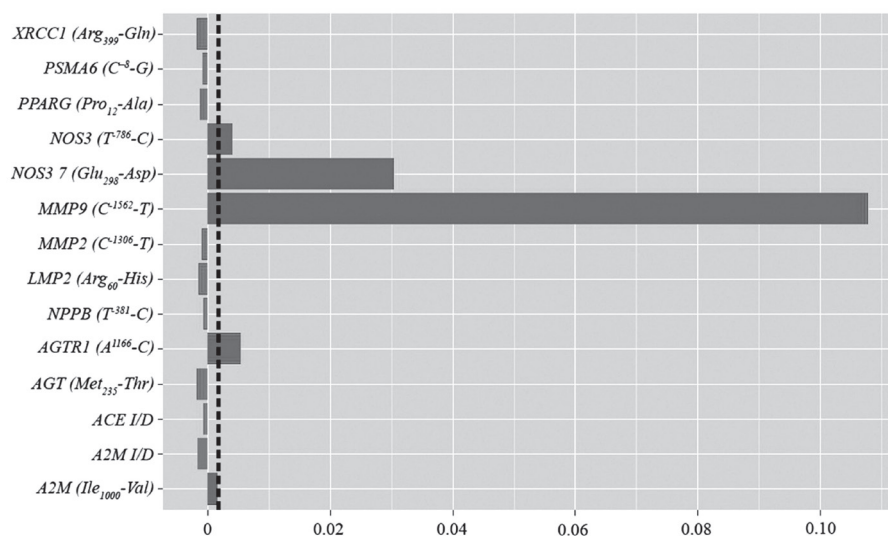


Fig. 1. Variable importance graph of 14 SNPs indicates that 4 SNPs (*MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T), *NOS3* promoter (T<sup>-786</sup>→C), *NOS3* 7 exon (Glu<sub>298</sub>→Asp), *AGTR1* (A<sup>1166</sup>→C)) achieved maximum importance score by crossing the vertical dashed line

is associated with the 7,6-fold increased risk of EH (OR = 7,579; 95% CI – 2,390 – 24,033) while genotype Glu/Asp (*NOS3* 7 exon (Glu<sub>298</sub>→Asp)) is associated with 5.5-fold decreased risk of EH (OR = 0,182; 95% CI – 0,052 – 0,643). So we decided to build another model with only these 2 predictors and compare the results. The prediction accuracy

of logistic regression with 2 predictors was 77,1% and coefficients of logistic regression along with odds ratios, confidence intervals are shown in table 5. By removing 2 insignificant SNPs the prediction accuracy of the model decreased only by 2% so we consider this loss as insignificant and conclude that the most important predictors are (*MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T)

Table 4. Results of logistic regression with 4 SNPs in the mode

SNP	Geno-type	Coefficient of regression	Wald statistics	P -value	OR	95% CI for OR lower	95% CI for OR upper
<i>MMP9</i> (C <sup>-1562</sup> →T)	C/T	2,010	11,536	,001	7,47	2,34	23,82
	T/T	21,668	6,06 x 10 <sup>-7</sup>	,999	2,57 x 10 <sup>9</sup>		
<i>NOS3</i> promoter (T <sup>-786</sup> →C)	T/C	-,3454	,316	,574	,708	,21	2,36
	C/C	1,795	3,324	,068	6,02	,87	41,42
<i>NOS3</i> 7 exon (Glu <sub>298</sub> →Asp)	Glu/Asp	-1,595	6,092	,014	,203	,057	,72
	Asp/Asp	-2,01	1,633	,201	,134	,006	2,92
<i>AGTR1</i> (A <sup>1166</sup> →C)	A/C	,925	2,339	,126	2,52	,77	8,25
	C/C	,506	,179	,673	1,66	,16	17,35
Constant		,125	,037	,848	1,133		

OR – odds ratio, CI – confidential interval

and *NOS3* 7 exon (Glu<sub>298</sub>→Asp) as suggested by logistic regression.

Multifactorial dimensionality reduction approach. To detect the interaction effects of the studied SNPs we used a non-parametric MDR

approach. MDR software has selected the 2 SNPs (*MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T) and *NOS3* 7 exon (Glu<sub>298</sub>→Asp) for the best model with the highest predictive potential (with testing accuracy of 74.6%, cross-validation consistency 9 of 10 and P < 0,05). MDR software

**Table 5. Results of logistic regression with 2 SNPs in the model.**

SNP	Genotype	Coefficient of regression	Wald statistics	P -value	OR	95% CI for OR lower	95% CI for OR upper
<i>MMP9</i> (C <sup>-1562</sup> →T)	C/T	2,109	13,282	,000	8,24	2,65	25,63
	T/T	21,648	6,5x10 <sup>-7</sup>	,999	2,5x10 <sup>9</sup>		
<i>NOS3</i> 7 exon (Glu <sub>298</sub> →Asp)	Glu/Asp	-1,760	7,747	,005	,17	,05	,59
	Asp/Asp	-1,450	1,480	,224	,24	,02	2,42
Constant		,666	1,493	,222	1,95		

OR – odds ratio, CI – confidential interval

indicated that *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T) and *NOS3* 7 exon (Glu<sub>298</sub>→Asp) have very weak interaction effect and

represent 2 main effects as suggested by logistic regression (figure 2).

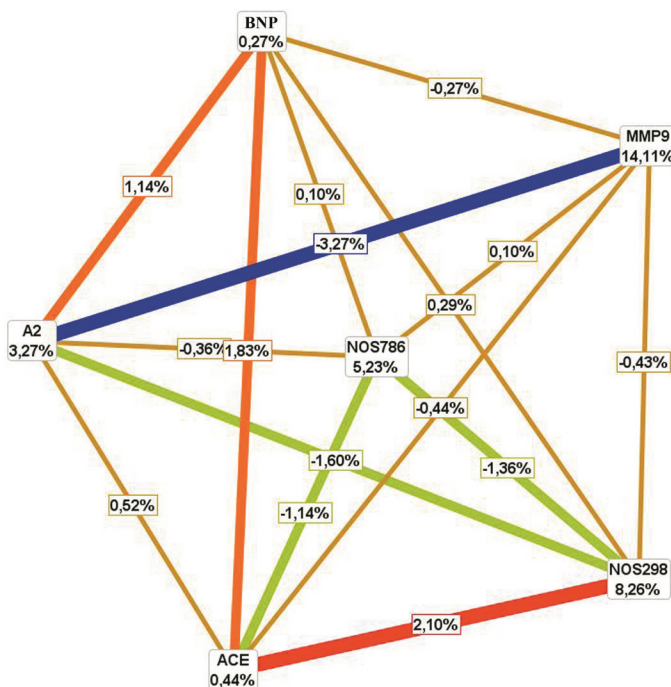


Fig. 2. SNPs interaction graph-model. This interaction model describe the percent of the entropy that is explained by each factor. Each SNP is shown in a box with the percent of entropy below the label. A2 – A2M (Ile<sub>1000</sub>→Val), BNP – NPPB (T<sup>-381</sup>→C), MMP9 – *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T), NOS298 – *NOS3* (Glu<sub>298</sub>→Asp), NOS786 – *NOS3* (T<sup>-786</sup>→C), ACE – *ACE* (I/D). Interactions between SNPs are depicted as lines in different intensity of gray color. Synergy is depicted as a dark gray line between SNPs accompanied by a positive percent of entropy while redundancy is indicated as a light gray line accompanied by a negative percent of entropy

## DISCUSSION

The main goal of the present study was to create the predictive model for evaluation of predisposition to essential arterial hypertension (EH) in children. We have analyzed 14 SNPs in pathophysiologically meaning genes and created the model of two predictors: *NOS3* (Glu<sub>298</sub>→Asp) and *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T).

Interpretation of the role of SNPs in pathogenesis of EH seems to be easy when it concerns genes, directly involved in regulation of blood pressure. For example, we speculate that carriers of rare genotypes by SNPs in gene *NOS3* are more predisposed to EH. Because they are characterized by lower level and/or catalytic activity of eNOS, and correspondingly NO, that leads to impaired vasodilatation [23, 32, 41, 49]. But in our study we have shown that rare allele of *NOS3* (Glu<sub>298</sub>→Asp) is protective against EH – carriers of Glu/Asp genotype has 6.3-fold lower risk of EH comparing with carriers of Glu/Glu genotype. Furthermore, the functional role of this SNP is not clear that additionally tangles the interpretation of obtained results.

The most powerful influence on risk of EH in children we have found for *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T) – C/T genotype carriers are 8.6-fold predisposed to EH than C/C carriers. We did not include C/C genotype by *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T) into our model because of its absence in group of controls, however, its appearance in hypertensives is approximately 4,0 %. It let us to consider the persons with this genotype at higher risk of EH.

Functional studies of *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T) have estimated that each T-allele is associated with enhanced gene transcription, and as a result increased level and activity of *MMP9*. Information concerning the role of SNPs in genes of matrix metalloproteinases, including *MMP9*, was obtained in studies on atherosclerosis and coronary heart disease [1, 54]. Relationship between atherosclerosis and hypertension in adults is not a surprise but in our case we can see significant differences of alleles distribution in hypertensive vs. controls among children, while they do not

have prominent atherosclerotic lesions but only endothelial dysfunction can be observed.

Different studies have shown both increased [47] and decreased [56] level of active *MMP9* in hypertensives' plasma compared to controls. However, the role of this SNP has been shown to be a risk factor of atherosclerosis and coronary heart disease [1, 54], but the data for EH are absent. Recent data show the meaning of MMPs in atherosclerosis as well as in high blood pressure-related vascular remodelling [35, 53]. Furthermore, O. Dumont et al. have shown that NO is necessary for *MMP9*-mediated vascular remodelling that can shed the light on enigma of protective effect of *NOS3* (Glu<sub>298</sub>→Asp) SNP against EH. Hence, it is not possible to make the final conclusion about the mechanism of *MMP9* SNP realization in pathogenesis of EH in children.

The role of SNP in *NPPB* is even harder to explain because the rare allele is characterized by higher level of BNP in blood, while comparing with major allele carriers, by 25% for each minor allele [24]. Taking into account the predominance of opinion about vasodilator and protective role of natriuretic peptides [33], our results about the predominance of minor allele in patients with EH seem to be illogical. However, for the recent time the information about competitive relations between systems of natriuretic peptides and NO-dependent pathway has appeared [28], furthermore, the congenital and permanent increase of BNP level can lead to desensitization of its receptors.

We have obtained absolutely new data on the role of SNPs in genes encoding proteasome subunits in predisposition to EH [14]. Pre-existing insight rated SNPs in *LMP2* only as markers of autoimmune pathology but our data directly denote the association of minor allele with risk of EH. The most prominent differences concern the rate of heterozygous carriers among EH vs. controls. This fact seems to be more interesting if to take into account our previous investigations concerning functional meaning of *LMP2* (Arg<sub>60</sub>→His) [8]. Our results show that the highest proteasomal activity is inherited to

monocytes isolated from blood of heterozygous carriers *LMP2*<sub>60</sub>*Arg/His*, and the lowest – from homozygous carriers of minor allele *LMP2*<sub>60</sub>*His/His*. The functional study of *PSMA6* C<sup>-8</sup>→G demonstrated that the transcription activity of this gene is much higher in carriers of minor allele [36]. It is noticeable that α6-subunit is constitutive and essential component of proteasome and furthermore, for immunoproteasome, which can both generate immunogenic peptides and destroy endogenous proteins [13].

Ubiquitous meaning of proteasomal proteolysis in nearly all intracellular pathways makes the analysis of its role and polymorphisms in genes of its subunits in regulation of vascular tone very intricate. One of the fundamental regulators of vascular tone is endothelial NOS which according to our data is also degraded via proteasomal proteolysis. So, the expected higher activity of proteasome in patients with EH hypothetically can facilitate the degradation of eNOS and lead to reduction of the strongest vasodilator – NO. But the situation is more complex because inhibitors of eNOS has much higher compliance to proteasomal proteolysis than eNOS itself [9]. Furthermore, the low doses of proteasome inhibitors activate *NOS3* transcription and activity of eNOS in cultured endothelial cells [45]. For the recent years it has been shown that proteasome destroy the molecules of stromal interaction that are the fundamental factors of realization of bradykinin-dependent outflux of calcium from endoplasmic reticulum activating eNOS as calcium-dependent enzyme [57]. Physiological antagonist of bradykinin – angiotensin II influence the regulation of calcium ions outflux from endoplasmic reticulum via stimulating the proteasome-dependent degradation of inositol-3-phosphate receptor [3]. Another mechanism of angiotensin II action on vascular wall is concerned with stabilization of hypoxia inducible factor (HIF) that is degraded by proteasome under the normal conditions. It turned out to be that angiotensin II can prevent the degradation of HIF by proteasome [37], and this transcriptional factor is considered to

stimulate the expression of “antihypertensive” genes because its knockdown was shown to cause the experimental hypertension onset [25]. Thus, increased activity of proteasome due to genetic variability may facilitate the high blood pressure.

Analysis of the role of single-SNP-based analysis in EH pathogenesis by our opinion is not informative enough because of multigenic character of this pathology. Only complex evaluation of different variable genes can give the answer about the endogenous predisposition for disease, which in combination with environmental factors.

Analysis of the role of single-SNP-based analysis in EH pathogenesis by our opinion is not informative because of polygenic character of this pathology. For example, the consideration of Wellcome Trust genome-wide association study of essential hypertension of only one SNP as predisposing to EH cannot be conclusive. Furthermore, this SNP (rs1937506) is located in locus predicted as olfactory receptor and the protocadherin 9 isoform 1 precursor genes [10]. Their role in regulation of blood pressure has not physiologically substantiated [22]. At the same time the SNPs in genes involved in pathogenesis of arterial hypertension are not shown as significant in GWAS. Furthermore, only one GWAS is dedicated to the problem of arterial hypertension in adolescent and its results differ from that in adults [32, 16, 17, 52]. In our opinion, these data indicate that genetic risk factors EH in children differ from those in adults. This problem should notice attention due to specificity of early onset of hypertension. Only complex evaluation of different variable genes can give the answer about the endogenous predisposition for disease.

In conclusion, the integral statistical analysis of our results gave us the possibility to create the predictive model including 2 SNPs: *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T) and *NOS3* 7 exon (Glu<sub>298</sub>→Asp) which represent 2 main independent effects with the highest predictive potential (77,1% as indicated by binary logistic regression and 74,6% testing accuracy shown by MDR) which requires further validation and comparison with similar results of other research teams, and additional

clinical data should be included on the next steps of researches aimed to create predictive algorithm for determination of predisposition to arterial hypertension in children.

**С.В. Гончаров, В.Л. Гур'янова, Д.О. Строй, Т.И. Древицька, С.П. Каплінський, Е.А. Настенко, М. Литвиненко, Р.В. Терлецький, М.В. Хайтович, О.О. Мойбенко, В.Є. Досенко**

### ГЕНЕТИЧНА СХИЛЬНІСТЬ ДО ПЕРВИННОЇ АРТЕРІАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ У ДІТЕЙ: АНАЛІЗ 17 ОДНОНУКЛЕОТИДНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ

У 145 дітей з артеріальною гіпертензією та 144 відносно здорових осіб за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом рестрикованих фрагментів було визначено такі поліморфізми: *NOS3* (T<sup>-786</sup>→C) та *NOS3* (Glu<sub>298</sub>→Asp), *AGT* (Met<sub>235</sub>→Thr) та *AGTR1* (A<sup>1166</sup>→C), *NPPB* (T<sup>381</sup>→C), *A2M1/D* у екзоні 18 і *A2M* (Ile<sub>1000</sub>→Val), *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T), *LMP2* (Arg<sub>60</sub>→His) та *LMP7* (Lys<sub>49</sub>→Gln), 12-му екзоні *HIF1α* (C<sup>1744</sup>→T), *PPARG* (Pro<sub>12</sub>→Ala), *XRCCI* (Arg<sub>399</sub>→Gln), за допомогою ПЛР – інсерційно-делеційні поліморфізми 4-го інтрону гена *NOS3* та 16-го інтрону гена *ACE*; алель-специфічної ПЛР – *MMP2* (C<sup>-1306</sup>→T), та ПЛР у реальному часі – *PSMA6* (C<sup>-8</sup>→G). Інтегральний статистичний аналіз отриманих результатів дав змогу створити предиктивну модель, що включає два однонуклеотидні поліморфізми: *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T) та *NOS3* (Glu<sub>298</sub>→Asp), що являють собою 2 головні незалежні ефекти з найбільшою предиктивною силою (77,1% за результатами бінарної логістичної регресії та 74,6% за результатами методу багатofакторного зменшення розмірності).

Ключові слова: однонуклеотидний поліморфізм, генетика, гіпертензія.

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

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

**С.В. Гончаров, В.Л. Гурьянова, Д.А. Строй, Т.И. Древицкая, С.П. Каплинский, Е.А. Настенко, М. Литвиненко, Р.В. Терлецкий, М.В. Хайтович, А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко**

### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ПЕРВИЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У ДЕТЕЙ: АНАЛИЗ 17 ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ

У 145 детей с артериальной гипертензией и 144 относительно здоровых детей с помощью полимеразной

цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом рестрикционных фрагментов были определены следующие однонуклеотидные полиморфизмы: *NOS3* (T<sup>-786</sup>→C) и *NOS3* (Glu<sub>298</sub>→Asp), *AGT* (Met<sub>235</sub>→Thr) и *AGTR1* (A<sup>1166</sup>→C), *NPPB* (T<sup>381</sup>→C), *A2M1/D* в экзоне 18 и *A2M* (Ile<sub>1000</sub>→Val), *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T), *LMP2* (Arg<sub>60</sub>→His) и *LMP7* (Lys<sub>49</sub>→Gln), 12-м экзоне *HIF1*→(C<sup>1744</sup>→T), *PPARG* (Pro<sub>12</sub>→Ala), *XRCCI* (Arg<sub>399</sub>→Gln), с помощью ПЦР – инсерционно-делеционные полиморфизмы в 4-ом интроне гена *NOS3* и 16-м интроне гена *ACE*; аллель-специфической ПЦР – *MMP2* (C<sup>-1306</sup>→T), и ПЦР у реального времени – *PSMA6* (C<sup>-8</sup>→G). Интегральный статистический анализ полученных результатов позволил создать предиктивную модель, включающую 2 однонуклеотидных полиморфизма: *MMP9* (C<sup>-1562</sup>→T) и *NOS3* (Glu<sub>298</sub>→Asp), представляющие 2 главные независимые эффекты с наибольшей предиктивной силой (77,1% по результатам бинарной логистической регрессии и 74,6% по результатам метода многофакторного уменьшения размерности).

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, генетика, гипертензия.

### REFERENCES

1. Abilleira S., Bevan S., Markus H.S. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis // *J. Med. Genet.* – 2006. – **43**. – P.897–901.
2. Al-Shali K.Z., House A.A., Hanley A.J., Khan H.M., Harris S.B., Zinman B., Mamakeesick M., Fenster A., Spence J.D., Hegele R.A. Genetic variation in PPARγ encoding peroxisome proliferator-activated receptor gamma associated with carotid atherosclerosis // *Stroke.* – 2004. – **35**. – P.2036–2040.
3. Bokkala S., Joseph S.K. Angiotensin II-induced down-regulation of inositol trisphosphate receptors in WB rat liver epithelial cells. Evidence for involvement of the proteasome pathway // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**. – P.12454–12461.
4. Buraczyńska M., Grzebalska A., Spasiewicz D., Orłowska G., Ksiazek A. Genetic polymorphisms of renin-angiotensin system and progression of interstitial nephritis // *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska Med.* – 2002. – **57**. – P.330–336.
5. Conen D., Cheng S., Steiner L.L., Buring J.E., Ridker P.M., Zee R.Y. Association of 77 polymorphisms in 52 candidate genes with blood pressure progression and incident hypertension: the Women's Genome Health Study // *J. Hypertens.* – 2009. – **27**. – P.476–483.
6. Dodel R.C., Bales K.R., Farlow M.R., Gasser T., Paul S.M., Du Y. Rapid detection of a pentanucleotide deletion polymorphism in the human alpha2-macroglobulin gene // *Clin. Chem.* – 1999. – **45**. – P.307–317.
7. Doris P.A. Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease: common variant hypothesis // *Hypertension.* – 2002. – **39**. – P.323–331.
8. Dosenko V.E., Mykhal'chuk D.V., Zahorii V.Iu.,

- Khaïtovych M.V., Moïbenko O.O. Allelic polymorphism of genes encoding catalytic immunoproteasome subunits and its functional meaning // *Fiziol. Zh.* – 2005. – **51**. – P.3–10.
9. Dosenko V.E., Zagorii V.Iu., Moïbenko A.A. Effect of proteasomal proteolysis on NO-synthase activity in isolated platelets // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2005. – **77**. – P.39–43.
  10. Ehret G.B., Morrison A.C., O'Connor A.A., Grove M.L., Baird L., Schwander K., Weder A., Cooper R.S., Rao D.C., Hunt S.C., Boerwinkle E., Chakravarti A. Replication of the Wellcome Trust genome-wide association study of essential hypertension: The Family Blood Pressure Program // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2008. – **16**. – P.1507–1511.
  11. Evans A.E., Poirier O., Kee F., Lecerf L., McCrum E., Falconer T., Crane J., O'Rourke D.F., Cambien F. Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease // *Q. J. Med.* – 1994. – **87**. – P.211–214.
  12. Ghilardi G., Biondi M.L., DeMonti M., Bernini M., Turri O., Massaro F., Guagnellini E., Scorza R. Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene // *Clin. Chem.* – 2002. – **48**. – P.989–993.
  13. Goldberg A.L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins // *Nature*. – 2003. – **426**. – P.895–899.
  14. Goncharov S.V., Dosenko V.Ie., Khaïtovych M.V., Moïbenko O.O. Allele polymorphism of genes coding proteasome subunits is associated with an enhanced risk for arterial hypertension in adolescents // *Fiziol. Zh.* – 2009. – **55**. – P.3–10.
  15. Hibi K., Ishigami T., Tamura K., Mizushima S., Nyui N., Fujita T., Ochiai H., Kosuge M., Watanabe Y., Yoshii Y., Kihara M., Kimura K., Ishii M., Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction // *Hypertension*. – 1998. – **32**. – P. 521–526.
  16. Hiura Y., Tabara Y., Kokubo Y., Okamura T., Miki T., Tomoike H., Iwai N. A genome-wide association study of hypertension-related phenotypes in a Japanese population // *Circ. J.* – 2010. – **74**(11). – P.2353–2359.
  17. Johnson T., Gaunt T.R., Newhouse S.J. Blood pressure loci identified with a gene-centric array // *Amer. J. Hum. Genet.* – 2011. – **89**(6). – P.688–700.
  18. Jones G.T., Phillips V.L., Harris E.L., Rossaak J.I., van Rij A.M. Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm // *J. Vasc. Surg.* – 2003. – **38**. – P.1363–1367.
  19. Kato N. Genetic analysis in human hypertension // *Hypertens. Res.* – 2002. – **25**. – P.319–27.
  20. Kupper N., Ge D., Treiber F.A., Snieder H. Emergence of novel genetic effects on blood pressure and hemodynamics in adolescence: the Georgia Cardiovascular Twin Study // *Hypertension*. – 2006. – **47**. – P.948–954.
  21. Kurland L., Liljedahl U., Lind L. Hypertension and SNP genotyping in antihypertensive treatment // *Cardiovasc. Toxicol.* – 2005. – **5**. – P.133–142.
  22. Kurtz T.W. Genome – wide association studies will unlock the genetic basis of hypertension: con side of the argument // *Hypertension*. – 2010. – **56**. – P.1021–1025.
  23. Lacolley P., Gautier S., Poirier O., Pannier B., Cambien F., Benetos A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects // *J. Hypertens.* – 1998. – **16**. – P.31–35.
  24. Lanfear D.E., Stolker J.M., Marsh S., Rich M.W., McLeod H.L. Genetic variation in the B-type natriuretic peptide pathway affects BNP levels // *Drugs. Ther.* – 2007. – **21**. – P.55–62.
  25. Li N., Chen L., Yi F., Xia M., Li P.L. Salt-sensitive hypertension induced by decoy of transcription factor hypoxia-inducible factor-1alpha in the renal medulla // *Circ. Res.* – 2008. – **102**. – P.1101–1108.
  26. Lunn R.M., Langlois R.G., Hsieh L.L., Thompson C.L., Bell D.A. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency // *Cancer. Res.* – 1999. – **59**. – P.2557–2561.
  27. Lurbe E., Cifkova R., Cruickshank J.K., Dillon M.J., Ferreira I., Invitti C., Kuznetsova T., Laurent S., Mancia G., Morales-Olivas F., Rascher W., Redon J., Schaefer F., Seeman T., Stergiou G., Wühl E., Zanchetti A.; European Society of Hypertension. Management of high blood pressure in children and adolescents: recommendations of the European Society of Hypertension // *J. Hypertens.* – 2009. – **27**. – P.1719–1742.
  28. Madhani M., Okorie M., Hobbs A.J., MacAllister R.J. Reciprocal regulation of human soluble and particulate guanylate cyclases in vivo // *Brit. J. Pharmacol.* – 2006. – **149**. – P.797–801.
  29. Maydannik V.G., Moskalenko V.F. Primary arterial hypertension in children and adolescents. – Kiev, 2007 – P. 5–45.
  30. Meirhaeghe A., Sandhu M.S., McCarthy M.I., de Groote P., Cottel D., Arveiler D., Ferrières J., Groves C.J., Hattersley A.T., Hitman G.A., Walker M., Wareham N.J., Amouyel P. Association between the T-381C polymorphism of the brain natriuretic peptide gene and risk of type 2 diabetes in human populations // *Hum. Mol. Genet.* – 2007. – **16**. – P.1343–1350.
  31. Melka M.G., Bernard M., Mahboubi A., Abrahamowicz M., Paterson A.D., Syme C., Lourdasamy A., Schumann G., Leonard G.T., Perron M., Richer L., Veillette S., Gaudet D., Paus T., Pausova Z. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2012. – **97**(1). – P.145–50.
  32. Miyamoto Y., Saito Y., Kajiyama N., Yoshimura M., Shimasaki Y., Nakayama M., Kamitani S., Harada M., Ishikawa M., Kuwahara K., Ogawa E., Hamanaka I., Takahashi N., Kaneshige T., Teraoka H., Akamizu T., Azuma N., Yoshimasa Y., Yoshimasa T., Itoh H., Masuda I., Yasue H., Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension // *Hypertension*. – 1998. – **32**. – P.3–8.

33. Nishikimi T., Maeda N., Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – **69**. – P.318–328.
34. O-charoenrat P., Khantapura P. The role of genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes in head and neck cancer // *Oral Oncol.* – 2006. – **42**. – P.257–267.
35. Dumont O., Loufrani L., Henrion D. Key Role of the NO-Pathway and Matrix Metalloprotease-9 in High Blood Flow-Induced Remodeling of Rat Resistance Arteries // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – **27**. – P.317–324.
36. Ozaki K., Sato H., Iida A. A functional SNP in PSMA6 confers risk of myocardial infarction in the Japanese population // *Nat. Genet.* – 2006. – **38**. – P.921–925.
37. Pagé E.L., Chan D.A., Giaccia A.J., Levine M., Richard D.E. Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – **19**. – P.86–94.
38. Percy M.J., Mooney S.M., McMullin M.F., Flores A., Lappin T.R., Lee F.S. A common polymorphism in the oxygen-dependent degradation (ODD) domain of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) does not impair Pro-564 hydroxylation // *Mol. Cancer* – 2003. – **2**. – P.31.
39. Petrovic D., Bidovec M., Peterlin B. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and essential arterial hypertension in childhood // *Folia Biol.* – 2002. – **50**. – P.53–56.
40. Shastry B.S. SNPs: impact on gene function and phenotype // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – **578**. – P.3–22.
41. Shoji M., Yasujima M. Endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension // *Nippon. Rinsho* – 2000. – **58**. – P.570–573.
42. Snieder H., Dong Y., Barbeau P., Harshfield G.A., Dalageogou C., Zhu H., Carter N.D., Treiber F.A. Beta2-adrenergic receptor gene and resting hemodynamics in European and African American youth // *Amer. J. Hypertens.* – 2002. – **15**. – P.973–979.
43. Snieder H., Harshfield G.A., Treiber F.A. Heritability of blood pressure and hemodynamics in African- and European-American youth // *Hypertension.* – 2003. – **41**. – P.1196–1201.
44. Staessen J.A., Asmar R., De Buyzere M., Imai Y., Parati G., Shimada K., Stergiou G., Redón J., Verdecchia P.; Participants of the 2001 Consensus Conference on Ambulatory Blood Pressure Monitoring. Task Force II: blood pressure measurement and cardiovascular outcome // *Blood Press Monit.* – 2001 – **6** – P. 355–357.
45. Stangl V., Lorenz M., Meiners S., Ludwig A., Bartsch C., Moobed M., Vietzke A., Kinkel H.T., Baumann G., Stangl K. Long-term up-regulation of eNOS and improvement of endothelial function by inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway // *FASEB J.* – 2004. – **18**. – P.272–279.
46. Strobl C., Malley J., Tutz G. An Introduction to recursive partitioning: rationale, application and characteristics of classification and regression trees, bagging and random forests // *Psychol. Methods.* – 2009. – **14**(4). – P.323–348.
47. Su W., Gao F., Lu J., Wu W., Zhou G., Lu S. Levels of Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 mRNAs in Patients with Primary Hypertension or Hypertension-induced Atherosclerosis // *J. Int. Med. Res.* – 2012. – **40**. – P.986–994.
48. Takashima N., Shioji K., Kokubo Y., Okayama A., Goto Y., Nonogi H., Iwai N. Validation of the association between the gene encoding proteasome subunit alpha type 6 and myocardial infarction in a Japanese population // *Circ. J.* – 2007. – **71**. – P.495–498.
49. Tsujita Y., Baba S., Yamauchi R., Mannami T., Kinoshita M., Yamamoto R., Katsuya T., Higaki J., Ogihara T., Ogata J., Iwai N. Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: The Suita Study // *J. Hypertens.* – 2001. – **19**. – P.1941–1948.
50. Vinasco J., Fraile A., Nieto A., Beraun Y., Pareja E., Mataran L., Martín J. Analysis of Lmp and Tap Polymorphisms by Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism in Rheumatoid Arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* – 1998. – **57**. – P.33–37.
51. Wang X.L., Sim A.S., Wang M.X., Murrell G.A., Trudinger B., Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity // *FEBS Lett.* – 2000. – **471**. – P.45–50.
52. Yang H.C., Liang Y.J., Wu Y.L., Chung C.M., Chiang K.M., Ho H.Y., Ting C.T., Lin T.H., Sheu S.H., Tsai W.C., Chen J.H., Leu H.B., Yin W.H., Chiu T.Y., Chen C.I., Fann C.S., Wu J.Y., Lin T.N., Lin S.J., Chen Y.T., Chen J.W., Pan W.H. Genome-wide association study of young-onset hypertension in the Han Chinese population of Taiwan // *PLoS One.* – 2009. – **4**(5). – P.5459.
53. Yasmin, Wallace S., McEniery C.M., Dakham Z., Pusalkar P., Maki-Petaja K., Ashby M.J., Cockcroft J.R., Wilkinson I.B. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and Serum Elastase Activity Are Associated With Systolic Hypertension and Arterial Stiffness // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – **25**. – P.372–378.
54. Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – **69**. – P.636–645.
55. Zappia M., Manna I., Serra P., Cittadella R., Andreoli V., La Russa A., Annesi F., Spadafora P., Romeo N., Nicoletti G., Messina D., Gambardella A., Quattrone A. Increased risk for Alzheimer disease with the interaction of MPO and A2M polymorphisms // *Arch. Neurol.* – 2004. – **61**. – P.341–344.
56. Zervoudaki A., Economou E., Stefanadis C., Pitsavos C., Tsioufis K., Aggeli C., Vasiliadou K., Toutouza M., Toutouzas P. Plasma levels of active extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment // *J. Hum. Hypertens.* – 2003. – **17**. – P.119–124.

57. Zhang W., Meng H., Li Z.H., Shu Z., Ma X., Zhang B.X. Regulation of STIM1, store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx, and nitric oxide generation by retinoic acid in rat mesangial cells // Amer. J. Physiol. Renal Physiol. – 2007. – **292**. – P.1054–1064.
58. Zorc-Plesković R., Bidovec M., Bregar D., Milutinović A., Terzić R., Teran N. The ScaI gene polymorphism of the atrial natriuretic factor and essential arterial hypertension in childhood // Coll. Antropol. – 2004. – **28**. – P.617–621.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kiev;*

*O.O. Bogomoletz National Medical University, Kiev*

*E-mail: sergei\_goncharov@bigmir.net*

*Received 04.05.2013*



Ю.М. Колесник, Є.В. Каджарян, А.В. Абрамов

## Вплив переривчастих гіпоксичних тренувань на функціональний стан кортиколіберин- і $\beta$ -ендорфінсинтезуючих нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів

*В експерименті на щурах показано, що гіпоксичні тренування призводять до посилення імунореактивності до кортиколіберину і  $\beta$ -ендорфіну та збільшення їх вмісту у паравентрикулярному ядрі гіпоталамуса. При цьому показник відношення площі імунореактивного матеріалу до вмісту кортиколіберину і  $\beta$ -ендорфіну, а також коефіцієнт їх вмісту в паравентрикулярному ядрі суттєво не змінювалися у порівнянні з контролем. Таким чином, обраний режим гіпоксичних впливів призводить до адаптації організму, що виражається у збалансованій активності стрес-реалізуючої та стрес-лімітуючої систем гіпоталамуса щурів.*

*Ключові слова: гіпоталамус, переривчаста гіпоксія, нейропептиди.*

### ВСТУП

Добре відомо, що послідовність патогенетичних ланок розвитку стресу лишається незмінною та визначається реактивністю гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи [14, 15]. Ключовим її елементом є гіпоталамічні нейрони, що синтезують кортикотропін-релізінг-гормон (кортиколіберин) [9], значна частка яких локалізована у медіальному дрібноклітинному суб'ядрі паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (ПВЯ) [18]. Саме кортиколіберин активує каскад нейроендокринної відповіді на дію стресового фактора, в результаті чого з надниркових залоз виділяються основні гормони стресу – глюкокортикоїди [7, 9, 17]. Ступінь підвищення їх секреції визначає силу і специфіку дії стресу, а також його наслідки для організму [7, 10]. З іншого боку, нейросекреторні клітини ПВЯ виділяють  $\beta$ -ендорфін, який регулює інтенсивність нейроендокринної відповіді на стрес [12]. Одним з позитивних результатів останнього є розвиток адаптаційних реакцій у

© Ю.М. Колесник, Є.В. Каджарян, А.В. Абрамов

ключових органах і системах, відповідальних за формування резистентності до стресового фактора [5]. Відомо, що універсальною за своєю природою впливу на організм є гіпоксична гіпоксія, яка при багатоденному застосуванні викликає стійке підвищення загальної резистентності організму при диханні газовими сумішами із 14–16%-м вмістом  $O_2$  для людини і 8–11%-м  $O_2$  для лабораторного щура [19].

Метою цього дослідження було вивчити особливості функціонального стану нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ гіпоталамуса щурів при багатоденному впливі гіпоксичної гіпоксії.

### МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 30 самцях щурів лінії Вістар масою 230–250 г. Переривчасті гіпоксичні тренування здійснювали у вентиляваній барокамері 6-годинною експозицією щурів на “висоті” 6000 м ( $pO_2=9,8\%$ ) протягом 15 діб [2]. Мозок інтактних (контрольних) та експериментальних тварин виймали після декапітації, фіксували у рідині Буена

та після стандартної обробки заливали у парапласт ("MkCormic", США). На ротаційному мікромомі Microm-325 ("Microm Corp.", Німеччина) отримували серійні фронтальні зрізи гіпоталамуса завтовшки 7 мкм для гістохімічного забарвлення на РНК і 14 мкм – для імунофлюоресцентного виявлення нейропептидів. Зрізи депарафінували та демаскували у РТ-модулі ("Thermo Scientific", США) у цитратному буферному розчині ("Thermo Scientific", США). Для визначення вмісту нуклеїнових кислот, переважно РНК, гістологічні зрізи забарвлювали галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсом [6] та заливали полімерним середовищем EUKITT ("O.Kindler GmbH", Німеччина). Для визначення вмісту нейропептидів гістологічні зрізи інкубували у вологій камері (+4 °C, 24 год) із поліклональними антитілами до кортикотропін-релізінг-гормону ("Sigma Chemical", США),  $\beta$ -ендорфіну ("Santa Cruz Biotechnology", США) у розведенні 1:200, а потім із вторинними антитілами, кон'югованими із FITC ("Sigma Chemical", США) у розведенні 1:64 у вологій камері (37 °C, 45 хв) і заключали в суміш гліцерин/фосфатного буфера (9:1).

Вивчення зрізів, забарвлених на РНК, проводили у видимому спектрі, а зрізів, забарвлених на нейропептиди – в ультрафіолетовому спектрі збудження за допомогою світлофільтра 38HE з високою емісією ("Carl Zeiss", Німеччина) на мікроскопі AxioImager-M2 ("Carl Zeiss", Німеччина). Отримане зображення за допомогою 16-бітної відеокамери AxioCam-5HRm ("Carl Zeiss", Німеччина) записували у вигляді комп'ютерного файлу для подальшої обробки системою цифрового зображення AxioVision 4.8.2 ("Carl Zeiss", Німеччина).

У кожній серії зрізів, забарвлених на РНК, у інтерактивному режимі визначали не менш ніж 1000 нейронів, що містять ядрце. Далі в автоматичному режимі обчислювали морфометричні параметри нейронів – площа та еквівалентний діаметр клітин, їх ядер, ядерець та цитоплазми, а також денситометричні характеристики – оптична густина ядер,

ядерець і цитоплазми клітин, які зумовлені рівнем накопичення РНК.

У зрізах з імуноним забарвленням на нейропептиди досліджували не менш ніж 200 полів зору у кожній серії. Далі в автоматичному режимі визначали зони із статистично значимою флюоресценцією, задля яких обчислювали абсолютну площу імунореактивного матеріалу, його відносне значення у стандартному полі зору площею приблизно 40 000 мкм<sup>2</sup>, а також денситометричні характеристики – концентрація та питомий вміст нейропептиду, які були зумовлені інтенсивністю флюоресценції.

Вміст кортикостерону у сироватці крові визначали імуноферментним методом за допомогою комерційного набору ("DRG", США).

Отримані результати обробляли пакетом статистичних програм, для оцінки вірогідності відмінностей в групах застосовували критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що у ПВЯ гіпоталамуса виділяють ділянки скупчення великих і дрібних клітин, які формують так звані суб'ядра [4]. Дрібноклітинна частина ПВЯ складається з 5 суб'ядер: переднього, перивентрикулярного, дорсального, латерального та найбільшого – медіального. Однак клітинний вміст останнього також неоднорідний і включає поодинокі великі нейрони [16]. Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що це нейрони з площею перикаріону більш ніж 80 мкм<sup>2</sup> (середня площа 89,8±0,8 мкм<sup>2</sup>) і їхня частка в ПВЯ становить 10–12 % (табл.1). Окрім них у суб'ядрі визначаються дуже дрібні нейрони з площею перикаріону менше як 45 мкм<sup>2</sup> (середня площа 38,2±0,6 мкм<sup>2</sup>). Основна частина клітинної популяції ПВЯ це – нейрони середньої величини із площею перикаріону 59,38±0,24 мкм<sup>2</sup>. Подальший аналіз отриманих результатів буде пов'язаний саме з цією групою клітин.

**Таблиця 1. Відносна кількість (%) нейронів паравентрикулярного ядра різної площі (M±m)**

Серії досліджень	Площа нейронів		
	<45 мкм <sup>2</sup>	45-80 мкм <sup>2</sup>	> 80 мкм <sup>2</sup>
Контроль	7,16±0,80	81,25±1,34	11,60±1,06
Гіпоксичні тренування	6,39±0,45	81,98±1,07	11,63±1,02

Гіпоксичні тренування не впливали на клітинний вміст ПВЯ (див. табл. 1), однак призводили до помірної гіпертрофії нейронів за рахунок збільшення площі їх ядер на 2,4 % та цитоплазми на 5,7 %. У цитоплазмі також зростав вміст РНК на 25,6 % (табл. 2). Подібні ефекти впливу багатодобових гіпоксичних тренувань відзначалися у попередніх наших дослідженнях, причому зміни морфофункціонального стану дрібноклітинних нейронів ПВЯ поєднувались зі збільшенням резистентності організму тварин до дії гострої гіпоксії [1].

Відомо, що дрібноклітинні нейрони ПВЯ синтезують більш ніж 30 різноманітних нейропептидів, основними з яких є кортиколіберин і тіроліберин, а також нейротензин, холецистокінін, вазоактивний інтестинальний пептид, вазопресин, ендорфіни, енкефаліни [3, 19]. Однак невеликий об'єм цитоплазми цих нейронів не дає змоги накопичувати нейропептиди у великій кількості, що ускладнює їх імуногістохімічне виявлення, особливо у інтактних тварин. Тому більшість дослідників для визначення вмісту нейропептидів застосовують прижиттєве введення у шлуночки мозку колхіцину, який руйнує мікротрубочки нейронів і блокує транспорт нейросекрету в аксони. У наших дослідженнях ми не використовували колхіцин і тому при аналізі імунофлюоресцентної реакції не визначались

нейрони з цитоплазмою, що була повністю заповнена імунореактивним матеріалом до кортиколіберину або до β-ендорфіну. Головним чином у ПВЯ імунореактивний матеріал розташовується дифузно у вигляді скупчень різного розміру. При цьому у контрольних тварин матеріал, імунореактивний до кортиколіберину, займав приблизно 1,2 % площі зрізу ПВЯ, що на 48 % перевищувало площу, зайняту матеріалом, імунореактивним до β-ендорфіну (табл. 3). Хоча концентрація останнього в зонах імунореактивності була вища, тим не менш відносний вміст кортиколіберину в ПВЯ на 32 % перебільшував аналогічний показник до β-ендорфіну.

Гіпоксичні тренування призводили до збільшення імунореактивності до кортиколіберину втричі і до β-ендорфіну у 3,1 раза, в результаті чого питомий вміст кортиколіберину у ПВЯ зростав у 8,5 раза, а β-ендорфіну – у 7 разів (див. табл. 3). Отримані результати добре узгоджуються з відомими фактами про збільшення синтезу кортиколіберину у гіпоталамусі у відповідь на дію стресового фактора будь-якої етіології. Надходження кортиколіберину по аксонам дрібноклітинних нейронів до терміналів у серединне підвищення гіпоталамуса з наступним його транспортом по системі портальних судин аденогіпофіза, призводить до активації

**Таблиця 2. Морфометричні характеристики і вміст РНК у нейронах площею 45–80 мкм<sup>2</sup> (M±m)**

Серії досліджень	Площа клітин, мкм <sup>2</sup>	Ядра		Ядерця		Цитоплазма	
		площа, мкм <sup>2</sup>	вміст РНК, ум.од.	площа, мкм <sup>2</sup>	вміст РНК, ум.од.	площа, мкм <sup>2</sup>	вміст РНК, ум.од.
Контроль	59,38±0,24	38,49±0,17	10,42±0,08	2,72±0,06	4,18±0,12	20,89±0,20	5,06±0,06
Гіпоксичні тренування	61,51±0,22*	39,42±0,18*	10,58±0,09	2,83±0,07*	4,39±0,13	22,09±0,20*	6,36±0,05

Примітка. Тут і в табл. 3 \*P<0,001 відносно контролю.

Таблиця 3. Характеристика імунореактивності в паравентрикулярному ядрі (M±m)

Нейропептид	Площа імунореактивного матеріалу, %		Концентрація нейропептиду, ум.од.		Вміст нейропептиду, тис. ум.од./мм <sup>2</sup>	
	контроль	переривчаста гіпоксія	контроль	переривчаста гіпоксія	контроль	переривчаста гіпоксія
Кортиколіберин	1,19±0,21	3,56±0,29*	0,38±0,01	1,1±0,06*	4,627±0,838	39,279±3,306*
β-Ендорфін	0,8±0,12	2,51±0,25	0,43±0,03	0,99±0,05	3,503±0,538	24,921±2,563

секреції адренкортикотропного гормону (АКТГ) [3, 11, 13]. Крім того, у кортикотрофах кортиколіберин стимулює експресію гена проопіомеланокортину – гормону, що є попередником АКТГ та β-ендорфіну [7]. Під впливом АКТГ ендокриноцити кори надниркових залоз секретують глюкокортикоїди, які, з одного боку, регулюють метаболічні процеси, пов'язані з відповіддю організму на стрес, а, з іншого, формують функціональний механізм негативного зворотного зв'язку на рівні аденогіпофіза та гіпоталамуса, гальмуючи секрецію АКТГ і кортиколіберину відповідно [7, 8]. Подібна реакція була показана і вивчена у експерименті та за клінічних умов на прикладі травматичного, емоційного, іммобілізаційного та інших видах стресу, що дає змогу віднести кортиколіберинергічну систему ПВЯ до стрес-реалізуючих систем мозку [11]. Дійсно, у наших дослідженнях гіпоксичні тренування призводили до підвищення концентрації у крові основного глюкокортикоїду щурів – кортикостерону – з 218,0±32,6 до 358,9±17,4 мг/мл, тобто на 64 % (P<0,01).

З іншого боку, гіпоксична гіпоксія, як вже згадувалося, підвищувала активність β-ендорфінергічної системи ПВЯ, яка відноситься до стрес-лімітуючих систем і контролює активність кортиколіберинергічної системи на рівні гіпоталамуса. Слід відмітити той факт, що гіпоксичні тренування не впливали на співвідношення площі імунореактивного матеріалу до кортиколіберину та β-ендорфіну – 1,42±0,12 щодо 1,48±0,27 в контролі (P>0,05), та не змінювали коефіцієнт їх вмісту в ПВЯ – 1,58±0,13 щодо 1,32±0,24 в контролі (P>0,05). На наш погляд, стабіль-

ність цих показників у відповідь на гіпоксичні тренування свідчить про збалансоване підвищення активності стрес-реалізуючої та стрес-лімітуючої систем і відображає особливості нейроендокринної відповіді на гіпоксичні впливи, які в режимі, що був нами застосований, чинять тренувальний ефект і підвищують загальну резистентність організму.

Таким чином, гіпоксичні тренування призводять до збалансованої активації стрес-реалізуючої та стрес-лімітуючої систем гіпоталамуса, викликають помірну гіпертрофію дрібноклітинних нейронів ПВЯ гіпоталамуса та накопичення РНК у цитоплазмі, пропорційно підвищують площу матеріалу, імунореактивного до кортиколіберину та β-ендорфіну у ПВЯ та збільшують вміст нейропептидів.

**Ю.М. Колесник, Е.В. Каджарян, А.В. Абрамов**

#### **ВЛИЯНИЕ ПРЕРЫВИСТЫХ ГИПОКСИЧЕСКИХ ТРЕНИРОВОК НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОРТИКОЛИБЕРИН- И В-ЭНДОРФИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ НЕЙРОНОВ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА КРЫС**

В эксперименте на крысах показано, что гипоксические тренировки приводят к усилению иммунореактивности к кортиколиберину и β-ендорфину и повышению их содержания. При этом показатель отношения площади иммунореактивного материала к кортиколиберину и β-ендорфину, а также коэффициент их содержания в паравентрикулярном ядре гипоталамуса существенно не менялся по сравнению с контролем. Таким образом, выбранный режим гипоксических воздействий приводит к адаптации организма, что выражается в сбалансированной активности стресс-реализующей и стресс-лимитирующей систем гипоталамуса крыс.

Ключевые слова: гипоталамус, прерывистая гипоксия, нейропептиды.

**Yu.M. Kolesnik, E.V. Kadzharyan, A.V. Abramov**

**THE INFLUENCE OF THE INTERMITTENT HYPOXIA TRAININGS ON THE FUNCTIONAL STATUS OF CORTICOLIBERIN- AND BETA-ENDORPHIN-SYNTHESIZING NEURONS OF THE PARAVENTRICULAR NUCLEUS HYPOTHALAMUS IN RATS**

The experiments show that hypoxia training leads to an increase of the immunoreactivity to corticotropin and beta-endorphin and to an increase of the content of these neuropeptides. In this case, the ratio of the area of the immunoreactive material to the corticotropin / beta-endorphin, and the coefficient of their content in the PVN did not change significantly compared with the control. Thus, the selected hypoxia mode leads to adaptation, which is reflected in the balanced activity of stress-realizing and stress-limiting systems of rats' hypothalamus. Key words: hypothalamus, intermittent hypoxia, neuropeptides

*Zaporozhye State Medical University*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

- Абрамов А.В., Колесник Ю.М. Влияние гипоксии на функциональное состояние нейросекреторной системы гипоталамуса крыс // Физиолог. журн. им. И.М. Сеченова. – 1992. – **78**, № 7. – С. 21–27.
- Абрамов А.В., Колесник Ю.М., Иваненко Т.В. Вплив переривчастої гіпоксії на функціональний стан бета-клітин панкреатичних островців при експериментальному цукровому діабеті // Здобутки клініч. і експерим. медицини. – 2011. – № 2(13). – С. 10–13.
- Акмаев И.Г., Гриневич В.В. Нейроиммуноэндокринология гипоталамуса. – М.: Медицина, 2003. – 168 с.
- Гоуфман Е.И. Клеточная организация паравентрикулярных ядер гипоталамуса крысы // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1990. – **98**. – С. 46–51.
- Меерсон Ф. Адаптация, стресс и профилактика. – М.: Наука, 1981. – 279 с.
- Пирс Э. Гистохимия / Пер. с англ. – М.:Изд-во ин. лит-ры., 1962. – 962 с.
- Резников А.Г. Эндокринологические аспекты стресса // Междунар. эндокрин. журн. – 2007. – **4**(10). – С. 20–24.
- Benjamin H., Jeffry L., Tasker G. Synaptic regulation of the hypothalamic – pituitary adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress // Front Cell Neurosci. – 2012. – **6**. – P. 24–28.
- Bonfiglio J.J., Inda C., Refojo D., Holsboer F., Arzt E., Silberstein S. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved // Neuroendocrinology. – 2011. – **94**. – P. 12–20.
- Busnardo C., Tavares R.F., Resstel B.M. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats // Aut. Neurosci.: Basic and clinical. – 2010. – **58**. – P. 51–58.
- Flak J.N., Ostrander M.M., Tasker J.G., Herman J.P. Chronic stress – induced neurotransmitter plasticity in the PVN // J.Comp. Neurol. – 2009. – **517**. – P. 156–165.
- Kovalitskaya Y.A., Novolotskaya E.V. Nonopioid effect of beta-endorphin // Biochemistry (Mosc). – 2011. – **76**. – P. 379–393.
- Seasholtz A.F., Valverde R.A., Denver R.J. Corticotropin-releasing hormone-binding protein: biochemistry and function from fishes to mammals // J. Endocrinol. – 2002. – **75**. – P. 89–97.
- McEwen B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain // Physiol Rev. – 2007. – **87**. – P. 873–904.
- McEwen B.S. The brain is the central organ of stress and adaptation // Neuroimage. – 2009. – **47**. – P. 911–913.
- Silva S.M., Paula-Barbosa M.M., Dulce Madeira M. Prolonged alcohol intake leads to reversible depression of corticotrophin-realising hormone and vasopressin immunoreactivity and mRNA levels in the parvocellular neurons of the paraventricular nucleus // Brain Res. – 2002. – **954**. – P. 82–93.
- Shakh H.I., Kriski K.R., Smith H.J. Corticotropin-realising hormone system polymorphism are associated with children's cortisol reactivity // Neuroscience. – 2013. – **229**. – P. 1–11.
- Swanson L.W., Sawchenko P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei // Ann. Rev. Neurosci. – 1983. – **6**. – P. 269–324.
- Xi L., Serebrovskaya T.V. Intermittent hypoxia: from molecular mechanism to clinical applications. – New York.: Nova Science Publishers, 2009. – 615 p.

*Zaporізьк. мед. ун-т*  
E-mail: [abramov@zsmu.pp.ua](mailto:abramov@zsmu.pp.ua)

*Матеріал надійшов до редакції 12.03.2013*

Т.М. Бойчук, Т.П. Савчук

## Морфофункціональні зміни ендотелію судин проміжного мозку щурів при експериментальній ішемії–реперфузії на тлі цукрового діабету

*Вивчено вплив двобічної каротидної ішемії–реперфузії на показники морфофункціонального стану ендотелію судин лімбако–гіпоталамічного комплексу мозку. Встановлено, що в контрольних щурів зниження щільності розташування ендотеліоцитів у ранньому ішемічно–реперфузійному періоді носить відносний характер, зумовлений набряком клітин, водночас на 12-ту добу зростала абсолютна щільність клітин. В обидва терміни спостереження в ендотеліоцитах капілярів усіх структур збільшений вміст загальної РНК. У тварин із цукровим діабетом рання реакція морфофункціонального стану ендотеліоцитів на ішемію–реперфузію відсутня, за винятком судин венстромедіального ядра гіпоталамуса, а пізня – обмежена зростанням у клітинах вмісту РНК.*

*Ключові слова: цукровий діабет, ішемія–реперфузія головного мозку, ендотеліоцити, РНК, морфологія.*

### ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) є одним з основних факторів ризику виникнення інсульту і асоціюється з гіршим прогнозом щодо відновлення та виживання порівняно з пацієнтами без такого фонового захворювання [9, 13, 14, 24]. Серед причин, що зумовлюють схильність до інсультів, є пов'язані з діабетом судинні ускладнення [16, 23]. У свою чергу найбільш раннім індикатором судинних захворювань, у тому числі й діабетичного походження є ендотеліальна дисфункція [7, 17, 20]. Патогенез останньої у хворих на ЦД активно вивчається упродовж останнього десятиліття і нині налічуються десятки чинників, задіяних у її виникненні, однак тригерним механізмом вважається посилення окисного стресу [10, 11, 19]. Цей механізм є провідним і в ініціації змін у мозку під час його ішемічних ушкоджень [2, 5, 6, 8]. Однак характеристики морфофункціонального стану ендотелію при ускладненні ЦД ішемічно–реперфузійним пошкодженням головного мозку в літературі вкрай обмежені.

© Т.М. Бойчук, Т.П. Савчук

Нами встановлено, що реакція показників, які характеризують стан про- – антиоксидантної та нітровоєргічної систем мозку на експериментальне порушення кровообігу в сонних артеріях у щурів із ЦД суттєво відрізняється від такої у щурів контрольної групи [1]. Це дає змогу очікувати на відповідні модифікації функціонального стану ендотелію.

Мета нашої роботи – дослідити реакцію показників морфофункціонального стану ендотелію судин проміжного мозку щурів із ЦД у різні періоди ішемічно–реперфузійного пошкодження.

### МЕТОДИКА

ЦД моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину («Sigma», США) в дозі 60 мг/кг двомісячним самцям білих лабораторних щурів [2]. Тривалість діабету – 3 міс. Вміст глюкози в плазмі крові визначали глюкозооксидазним методом. В експеримент включали тварин із рівнем глікемії вище ніж 10 ммоль/л. По

досягненні 5 міс щурам контрольної та дослідної груп здійснювали 20-хвилинне припинення кровотоку по обох загальних сонних артеріях їх кліпсуванням [4]. Частину тварин виводили з експерименту декапітацією через годину після завершення ішемічного періоду, частину – на 12-ту добу. Оперативні втручання та забій тварин здійснювали під каліпсовим наркозом (75 мг/кг) із дотриманням основних положень біоетики, задекларованих Директивами ЄЕС № 609 від 24.11.1986 р. і наказом МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Мозок виймали на холоді, користуючись атласом стереотаксичних координат [15] забирали зразки, що містили вентромедіальне ядро гіпоталамуса (ВМГ), преоптичну ділянку (ПОД), комплекс ядер перегородки мозку (ПМ) та мигдалеподібних ядер (МК) і поміщали їх у фіксатор Буена на 24 год. Після стандартної гістологічної проводки заливали в парафінові блоки, з яких готували серійні зрізи товщиною 5–6 мкм. Для виявлення РНК зрізи депарафінували, регідрували в низхідних концентраціях етанолу і фарбували галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсеном [3]. Ендотеліоцити ідентифікували за допомогою флуоресцентного мікроскопа AXIOSKOP. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 («Kontron Elektronik», Німеччина). У площі зрізу судин забраних структур мозку визначали щільність розташування ендотеліоцитів (на 1 мм<sup>2</sup>), концентрацію в них РНК (в одиницях оптичної щільності, O<sub>опц</sub>) і площу клітин (у мікрометрах квадратних).

Для електронно-мікроскопічних досліджень зразки мозку фіксували у 2,5%-му розчині глутаральдегіду (рН 7,3–7,4), через 60 хв переносили в буферний розчин на 20–30 хв і протягом 1 год фіксували 1%-м розчином чотириокису осмію на буфері Міллонга. Після дегідратації в спиртах і ацетоні матеріал заливали в суміш епоксидних смол і аралдиту. За допомогою ультрамікротома УМППТ-7 виготовляли ультратонкі зрізи, забарвлювали їх 1%-м водним розчином уранілацетату,

контрастували цитратом свинцю за методом Рейнольдса [21] та аналізували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К.

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

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати вивчення щільності розташування ендотеліоцитів, їх площі та вмісту в них РНК представлено в таблиці. Слід відмітити, що 20-хвилинна каротидна ішемія з одноденною реперфузією спричиняє зниження щільності розташування клітин у судинах усіх досліджених структур. Характерно, що це відбулося на тлі зростання площі клітин. Імовірно, зниження щільності розташування ендотеліоцитів у цей термін спостереження є наслідком їх набряку, що надалі дістало підтвердження при аналізі електронограм, на характеристиці яких ми зупинимося дещо пізніше.

Наприкінці одноденної реперфузії вміст РНК зріс в ендотеліоцитах усіх досліджених структур, за винятком ВМГ.

Згідно з даними літератури, за умов активації вільнорадикальних процесів чи зниження потужності антиоксидантного захисту однією з найбільш ранніх реакцій клітин є модифікація функціональних властивостей нуклеїнових кислот [18, 22]. Збільшення загального вмісту РНК у нейронах, на думку Ногі і співавт. [12] відображає зростання експресії генів, що беруть участь у реагуванні на ішемію–реперфузію.

На 12-ту добу спостереження в судинах усіх досліджених структур щільність розташування ендотеліоцитів зросла при незмінній, порівняно з контролем, площі. Це узгоджується з даними літератури стосовно підвищення експресії факторів росту судинної стінки і проліферації клітин у відповідь на ішемію–реперфузію [16, 17]. Виняток

**Зміни щільності розташування, площі ендотеліоцитів та вмісту в них РНК у судинах лімбіко–гіпоталамічних структур мозку щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом, ускладненим двобічною каротидною ішемією–реперфузією (M±m)**

Група спостереження	Щільність клітин, у 1 мм <sup>2</sup>	Площа клітини, мкм <sup>2</sup>	Концентрація РНК, O <sub>ощ</sub>
Вентромедіальне ядро гіпоталамуса			
Контроль	226,2±4,5	5,42±0,01	0,96±0,005
Каротидна ішемія–реперфузія 20 хв/ 1 год	181,3±6,1*	5,90±0,10*	0,95±0,005
Каротидна ішемія–реперфузія 12 діб	260,3±10,6*	5,52±0,11	1,19±0,01*
Діабет	173,6±7,3*	5,80±0,12*	1,01±0,004*
Діабет і каротидна ішемія–реперфузія 20 хв/ 1 год	151,3±8,1**	5,70±0,14	0,91±0,006**
Діабет та ішемія–реперфузія 12 діб	189,3±8,8	5,71±0,13	1,10±0,01**
Преоптична ділянка			
Контроль	181,6±5,0	5,63±0,11	0,91±0,006
Каротидна ішемія–реперфузія 20 хв/ 1 год	143,2±7,8*	6,23±0,16*	1,03±0,01*
Каротидна ішемія–реперфузія 12 діб	149,3±7,4*	5,91±0,15	1,02±0,008*
Діабет	139,1±6,5*	6,19±0,16*	0,99±0,009*
Діабет і каротидна ішемія–реперфузія 20 хв/ 1 год	136,3±6,0	5,89±0,19	0,96±0,01
Діабет та ішемія–реперфузія 12 діб	150,3±7,8	6,08±0,17	1,04±0,009**
Перегородка мозку			
Контроль	212,6±7,1	5,62±0,13	0,90±0,004
Каротидна ішемія–реперфузія 20 хв/ 1 год	163,1±5,3*	6,23±0,11*	1,12±0,008*
Каротидна ішемія–реперфузія 12 діб	249,2±8,4*	5,71±0,16	1,08±0,006*
Діабет	161,3±5,8*	5,98±0,11*	0,98±0,009*
Діабет і каротидна ішемія–реперфузія 20 хв/ 1 год	148,6±7,2	5,91±0,16	1,00±0,01
Діабет та ішемія–реперфузія 12 діб	171,9±8,1	6,03±0,12	1,14±0,01**
Мигдалеподібний комплекс			
Контроль	200,3±5,7	5,32±0,12	0,90±0,005
Каротидна ішемія–реперфузія 20 хв/ 1 год	172,4±6,1*	5,89±0,11*	1,03±0,006*
Каротидна ішемія–реперфузія 12 діб	247,4±9,9*	5,49±0,15	1,06±0,005*
Діабет	169,5±9,0*	5,78±0,13*	0,94±0,005*
Діабет і каротидна ішемія–реперфузія 20 хв/ 1 год	159,1±8,2	6,01±0,14	0,93±0,007
Діабет та ішемія–реперфузія 12 діб	162,5±7,9	5,86±0,12	1,03±0,006**

\* – вірогідність порівняно з контролем; \*\* – порівняно зі значеннями у тварин із цукровим діабетом.

становили судини ПОД, в яких щільність розташування ендотеліоцитів в цей термін спостереження залишалася зниженою.

У щурів без ЦД на 12-ту добу вміст РНК в ендотеліоцитах судин усіх досліджених структур був підвищеним, що свідчить про



незавершеність їх реакції на ішемію–реперфузію мозку.

ЦД тривалістю 3 міс знижував щільність розташування ендотеліоцитів у судинах усіх досліджених структур на тлі зростання їх площі. Набряк ендотеліоцитів, зафіксований на електроннограмах, пояснює природу таких змін. У щурів цієї дослідної групи вміст РНК був підвищеним в ендотеліоцитах судин усіх структур, а 20-хвилинна ішемія з одноденною реперфузією не вплинула на жодний із досліджених показників у всіх структурах, за винятком ВМГ, де виявлено зниження щільності розташування клітин та вмісту РНК. Слід гадати, що виснаження функціональних можливостей ендотелію основною патологією унеможливило його реакцію на ішемію–реперфузію або ж зумовлює зміну реагування цих показників.

Слід відмітити відмінності реакції ендотеліоцитів ВМГ на ішемію з одноденною реперфузією як у контрольних, так і дослідних щурів (з ЦД) порівняно з рештою досліджених структур. Ці особливості, ймовірно, можна пов'язати з надзвичайно розвинутою капілярною сіткою цього відділу гіпоталамуса та участю капілярів у процесах нейросекреції [1], що зумовлено наявністю в даній ділянці значної кількості нейросекреторних клітин.

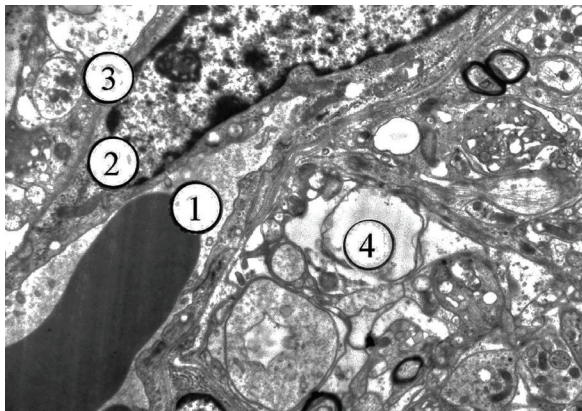


Рис. 1. Ультраструктура гемокапіляра преоптичної ділянки мозку інтактного щура. Просвіт капіляра (1), ендотелій (2), базальна мембрана (3), периваскулярний простір (4). 36. 10 000<sup>x</sup>

Характерно, що на 12-ту добу в ендотелії судин усіх структур збільшується вміст РНК при незмінних інших характеристиках клітин.

На рис. 1 представлена електроннограма кровеносних капілярів ПОД інтактних щурів. Оскільки ультраструктурні зміни в досліджених відділах мозку у відповідних серіях досліджень суттєво не відрізнялися, ми наводимо їх характеристику на прикладі такої структури.

Субмікроскопічні дослідження кровеносних капілярів після 20-хвилинної ішемії/одноденної реперфузії (рис. 2) показали, що вони мають вузькі просвіти внаслідок значного набряку цитоплазми ендотеліоцитів. Вона електронно-прозора, зі зменшеною кількістю деструктивно змінених органел. Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки вакуолеподібні, короткі, рибосом мало, невеликі мітохондрії мають гомогенізований матрикс, в якому кристи не контуруються. Базальна мембрана неширока, світла, на окремих ділянках нечітка. Ядра неправильної форми, з переважанням гетерохроматину в каріоплазмі, інвагінаціями каріолеми, електронно-прозорими ділянками каріоплазми. Ядерна частина цитоплазми містить мало органел.

Для гемокапілярів тварин із ЦД характерні неширокі просвіти, набряк цитоплазми ен-

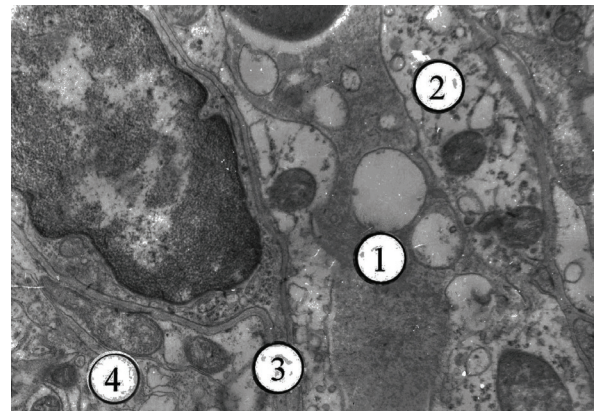


Рис. 2. Субмікроскопічний стан гемокапіляра преоптичної ділянки після ішемії–реперфузії. Неширокий просвіт (1), набряк цитоплазматичних ділянок ендотеліоцита (2), базальна мембрана (3), периваскулярний простір (4). 36. 15.000<sup>x</sup>

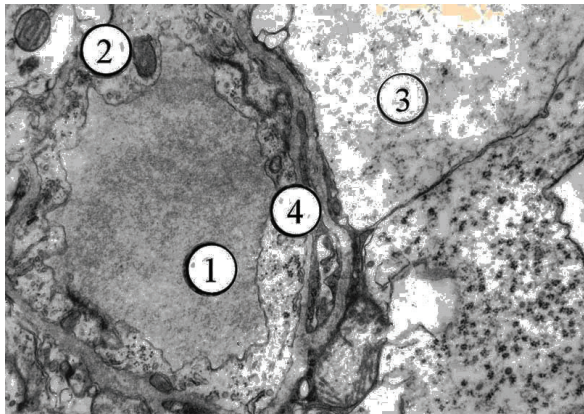


Рис. 3. Субмікроскопічні зміни кровоносного капіляра преоптичної ділянки при експериментальному цукровому діабеті. Просвіт капіляра (1), цитоплазма ендотеліоцита (2), розширений периваскулярний простір (3), базальна мембрана (4). Зб. 15000 $\times$

дотеліоцитів із наявністю в ній пошкоджених органел і зменшеною кількістю піноцитозних пухирців. Базальна мембрана нерівномірна, місцями потовщена, до неї прилягають широкі, світлі астроцитарні ніжки (рис. 3), які створюють збільшені периваскулярні простори.

При ускладненні ЦД каротидною ішемією–реперфузією більшість кровоносних капілярів мають вузькі просвіти й значні периваскулярні простори (рис. 4). Ядра ендотеліоцитів неправильної форми, їх каріолема має численні інвагінації. У цитоплазмі ендотеліальних клітин кількість піноцитозних пухирців та органел зменшена, більшість з останніх деструктивно змінені. Базальні мембрани мікросудин мають потовщені ділянки, місцями – нечіткі контури.

Отже, проведені дослідження свідчать, що в контрольних щурів каротидна ішемія–реперфузія спричиняє як ранні, так і відстрочені зміни морфофункціонального стану ендотелію судин проміжного мозку. Зниження щільності розташування ендотеліоцитів у ранньому ішемічно–реперфузійному періоді носить відносний харак-

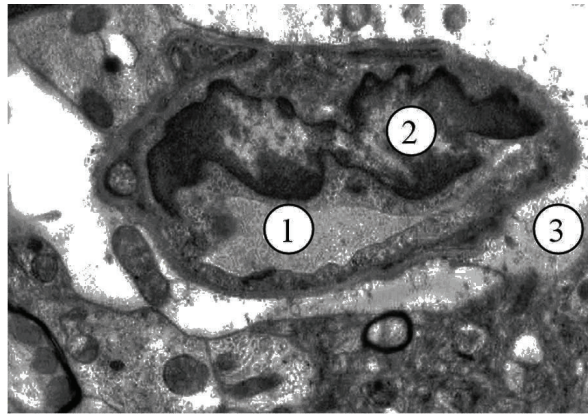


Рис. 4. Ультраструктурна характеристика гемокapіляра преоптичної ділянки при цукровому діабеті та ішемії–реперфузії. Вузький просвіт (1), неправильної форми ядро ендотеліоцита (2), периваскулярні простори (3). Зб. 12000 $\times$

тер, зумовлений набряком клітин, у той час як на 12-ту добу спостерігається зростання абсолютної щільності, ймовірно, пов'язаної з активацією проліферативних процесів. Вміст РНК в ендотеліоцитах збільшується в усі терміни спостереження. У тварин із ЦД рання реакція морфофункціонального стану ендотеліоцитів на ішемію–реперфузію відсутня, за винятком судин ВМГ, а пізня обмежується лише зростанням вмісту в клітинах РНК.

## ВИСНОВКИ

1. У контрольних щурів не виявлено як ранні (після 20-хвилинної ішемії – одногодинної реперфузії), так і відстрочені (12-та доба після 20-хвилинної ішемії) зміни функціонального та морфологічного стану ендотелію судин проміжного мозку.

2. У щурів із тримісячним ЦД рання реакція морфофункціонального стану ендотеліоцитів судин проміжного мозку, притаманна контрольним тваринам, відсутня, а на 12-ту добу спостереження – суттєво обмежена, що може пояснюватися виснаженням функціональних резервів клітин основним захворюванням.

Т.Н. Бойчук, Т.П. Савчук

### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ПРОМЕЖУТОЧНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ НАРУШЕНИИ КРОВООБРАЩЕНИЯ В БАСЕЙНЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Изучено влияние двусторонней каротидной ишемии–реперфузии на показатели морфофункционального состояния эндотелия сосудов лимбико–гипоталамического комплекса мозга. Показано, что у контрольных крыс снижение плотности расположения эндотелиоцитов в раннем ишемически–реперфузионном периоде носит относительный характер, обусловленный отеком клеток, в то время как на 12-е сутки возрастает абсолютная плотность расположения клеток. В оба срока наблюдения в эндотелиоцитах капилляров всех структур увеличено содержание общей РНК. У животных с сахарным диабетом ранняя реакция морфофункционального состояния эндотелиоцитов на ишемию–реперфузию отсутствует, за исключением сосудов вентромедиального ядра гипоталамуса, а поздняя ограничивается только возрастанием содержания в клетках РНК.

Ключевые слова: сахарный диабет, ишемия–реперфузия головного мозга, эндотелиоциты, РНК, морфология.

Т.М. Boichuk, T.P. Savchuk

### FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE VASCULAR ENDOTHELIUM OF DIENCEPHALON OF RATS IN AN EXPERIMENTAL CIRCULATORY DISORDERS IN THE BASIN OF THE CAROTID ARTERIES AGAINST A BACKGROUND OF DIABETES MELLITUS

Abstract. We have studied the influence of bilateral carotid ischemia-reperfusion on the indices of the functional and morphological condition of the vascular endothelium of the brain hypothalamolimbic complex. It has been established that a decrease of the density of endothelial location in an early ischemic-reperfusion period in the control rats has a relative character stipulated by edema of cells whereas on the 12-th day of observation an increase of the absolute density of cells takes place. During both periods of observation there is an increased content of the total RNA in the capillary endotheliocytes of all the structures. An early reaction of the morpho-functional states of endotheliocytes to ischemic-reperfusion is absent in animal with diabetes mellitus, except the vessels of the ventromedial hypothalamus while a late one is restricted by a growth content in RNA cells.

Key words: diabetes mellitus, ischemia-reperfusion of the brain, endotheliocytes, RNA, morphology.

Bucovina State Medical University (Chernivtsi)

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акмаев И.Г. Структурные основы механизмов гипоталамической регуляции эндокринных функций. – М.: Наука, 1979. – 228 с.
2. Бойчук Т.М., Савчук Т.П. Нітросидергічний дисбаланс та вільнорадикальна модифікація білків у структурах проміжного мозку шурів з експериментальним цукровим діабетом за умов гострого порушення кровообігу в басейні сонних артерій // Тавр. медико-біол. вестник. – 2012. – 15, №4. – С. 106–109.
3. Ленков О.М., Ткачук С.С. Вплив двобічної каротидної ішемії–реперфузії на вміст продуктів окиснювальної модифікації білків у корі головного мозку і гіпокампі при експериментальному цукровому діабеті в самців-шурів // Клін. та експерим. патологія. – 2009. – VIII, № 3. – С.37–39.
4. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Изд-во ин. лит., 1962. – 962 с.
5. Скибо Г.Н. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга // Патология. – 2004. – 1, №1. – С. 22–30.
6. Ткачук С.С., Бойчук Т.П. Порівняльний аналіз впливу двобічної каротидної ішемії–реперфузії на стан окиснювальної модифікації білків у структурах мозку дорослих та старих шурів // Клін. та експерим. патологія. – 2010. – IX, № 4. – С. 110–112.
7. Ткачук С.С., Бойчук Т.П. Стан пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в окремих структурах головного мозку старих шурів при неповній глобальній ішемії // Там само. – 2010. – IX, № 3. – С. 109–112.
8. Cheang W.S., Wong W.T., Tian X.Y., Yang Q., Lee H.K., He G.W., Yao X., Huang Y. Endothelial nitric oxide synthase enhancer reduces oxidative stress and restores endothelial function in db/db mice // Cardiovasc. Res. – 2011. – 92, №2. – P. 267–275.
9. Drummond G.R., Selemidis S., Griending K.K., Sobey C.G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets // Nat. Rev. Drug Discovery. – 2011. – 10, №6. – P. 453–471.
10. Eriksson M., Carlberg B., Eliasson M. The disparity in long-term survival after a first stroke in patients with and without diabetes persists: the Northern Sweden MONICA study // Cerebrovasc. Dis. – 2012. – 34, №2. – P.153–160.
11. Fatehi-Hassanabad Z., Chan C.B., Furman B.L. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes // Eur. J. Pharmacol. – 2010. – 636, №1-3. – P. 8–17.
12. Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications // Circ. Res. – 2010. – 107, №9. – P. 1058–1070.
13. Hori M., Nakamachi T., Rakwal R., Shibato J., Nakamura K., Wada Y., Tsuchikawa D., Yoshikawa A., Tamaki K., Shioda S. Unraveling the ischemic brain transcriptome in a permanent middle cerebral artery occlusion mouse model by DNA microarray analysis // Dis. Model Mech.

- 2012. – **5**, №2. – P. 270–283.
14. Inagaki K., Nagao M., Oikawa S. Internal medicine and neurological diseases: progress in diagnosis and treatment. Topics: II neurological diseases related to diabetes mellitus; 2. Cerebral infarction, coma, hypoglycemia // Nihon Naika Gakkai Zasshi. – 2012. – **101**, №8. – P. 2180–2187.
15. Ji R., Schwamm L.H., Pervez M.A., Singhal A.B. Ischemic stroke and transient ischemic attack in young adults: risk factors, diagnostic yield, neuroimaging, and thrombolysis // JAMA Neurol. – 2013. – **70**, №1. – P.51–57.
16. König J.F., Klippel P.A. The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem. – Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1963.– 162 p.
17. Madonna R., De Caterina R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes – part I: pathways of vascular disease in diabetes // Vascul. Pharmacol. – 2011. – **54**, №3-6. – P. 68–74.
18. Nacci C., Tarquinio M., Montagnani M. Molecular and clinical aspects of endothelial dysfunction in diabetes // Intern. Emerg. Med. – 2009. – **4**, №2. – P. 107–116.
19. Pácal L., Varvařovská J., Rušavý Z., Lacigová S., Stětina R., Racek J., Pomahačová R., Tanhäuserová V., Kaňková K. Parameters of oxidative stress, DNA damage and DNA repair in type 1 and type 2 diabetes mellitus // Arch. Physiol. Biochem. – 2011. – **117**, №4. – P. 222–230.
20. Pitocco D., Zaccardi F., Di Stasio E., Romitelli F. Oxidative Stress, Nitric Oxide, and Diabetes // Rev. Diabet. Stud. – 2010. – **7**, №1. – P. 15–25.
21. Potenza M.A., Gagliardi S., Nacci C., Carratu' M.R., Montagnani M. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets // Curr. Med. Chem. – 2009. – **16**, №1. – P. 94–112.
22. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // E.S.Reynolds // J. Cell. Biol. – 1993. – **17**. – P.208–212.
23. Sliwinska A., Blasiak J., Kasznicki J., Drzewoski J. In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) // Chem. Biol. Interact. – 2008. – **173**, №3. – P.159–165.
24. Son S. M. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pathogenesis of Vascular Complications of Diabetes // Diabetes Metab. J. – 2012. – **36**, №3. – P. 190–198.
25. von Sarnowski B., Putaala J., Grittner U., Gaertner B., Schminke U., Curtze S., Huber R., Tanislav C., Lichy C., Demarin V., Basic-Kes V., Ringelstein E.B., Neumann-Haefelin T., Enzinger C., Fazekas F., Rothwell P.M., Dichgans M., Jungehulsing G.J., Heuschmann P.U., Kaps M., Norrving B., Rolfs A., Kessler C., Tatlisumak T. Lifestyle risk factors for ischemic stroke and transient ischemic attack in young adults in the Stroke in Young Fabry Patients study // Stroke. – 2013. – **44**, №1. – P.119–125.

*Буковин. мед. ун-т, Чернівці*  
*E-mail: ajnora14@rambler.ru*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 07.10.2013*

І.П.Пастер, Н.І.Левчук, М.Д.Тронько

## Характеристика мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини при тривалому культивуванні

*Мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігає здатність секретувати 11-гидрокортикостероїди протягом 51 доби культивування, а також адекватно реагувати на стимуляцію адренкортикотропним гормоном та пригнічення хлодитаном, що свідчить про перспективність її застосування для компенсації гіпофункціонального стану адренкортикальної системи в експериментах на тваринах.*

*Ключові слова: кора надниркової залози, мікроінкапсуляція, культивування, 11-оксикортикостероїди, адренкортикотропний гормон, хлодитан.*

### ВСТУП

Одним з альтернативних методів терапії стійких гіпофункціональних станів ендокринних залоз є трансплантація відповідних тканин або клітин. Попередити можливі негативні наслідки пересадки донорського матеріалу, а також виключити необхідність застосування імуносупресивної терапії можна за допомогою методу мікроінкапсуляції тканини або клітин в капсули з напівпроникними мембранами, які створюють імунологічний бар'єр між трансплантатом та організмом реципієнта при можливості необмеженої дифузії гормонів, поживних речовин, кисню, месенджерів і метаболітів [17, 18, 21]. Для виготовлення мікрокапсул найчастіше застосовують біополімер альгінат, який отримують з морських водоростей або вирощують в біореакторі з використанням бактерій [22].

Також метод мікроінкапсуляції тканини або клітин дає змогу вирішити одну з основних проблем трансплантології: відсутність достатньої кількості донорського матеріалу [15, 20]. Багато дослідників намагаються вирішити це питання, вважаючи, що ксенотрансплантація (пересадка органів і

тканин від тварин людині) є цілком реальним виходом з цього становища. Крім основного призначення, альгінатні мікрокапсули слугують також перешкодою можливій передачі патогенних агентів, зокрема ендогенних ретровірусів, при ксенотрансплантації ендокринних тканин або клітин поросят [9]. Не виключена також перспектива трансплантації в мікрокапсулах тканин аденом ендокринних залоз, оскільки зберігається технічна можливість повного їх видалення у разі злякисного переродження.

Нині отримані позитивні результати експериментальних досліджень і клінічних випробувань з використанням мікроінкапсульованих ендокринних тканин і клітин, в тому числі клітин надниркових залоз (НЗ) [13, 14]. Зокрема, запропоновано використання мікроінкапсульованих клітин НЗ для пригнічення неспецифічної реакції відторгнення, яка спостерігається навколо полімерного імплантата [6]. Показано, що на відміну від імплантації порожніх мікрокапсул, при трансплантації мікрокапсул з клітинами НЗ значно зменшується популяція Т-лімфоцитів, знижується відсоток субпопуляцій клітин CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup>, зникає маркер активації макрофагів, а оточу-

© І.П.Пастер, Н.І.Левчук, М.Д.Тронько

юча фіброзна тканина стає менш виразною і не настільки щільною.

Були розпочаті експериментальні дослідження функціональної активності мікроінкапсульованих клітин кори НЗ (КНЗ) поросят [5], однак вони не знайшли подальшого продовження через негативне ставлення до трансплантації донорського матеріалу ксеногенного походження.

На жаль, до теперішнього часу не розроблено метод мікроінкапсуляції тканини або клітин КНЗ людини, який забезпечував би тривале їх функціонування і який можна було б застосовувати як захист трансплантаційного матеріалу замість імуносупресивної терапії при компенсації сталого гіпокортицизму.

Мета нашої роботи – дослідити гістологічну і гормональну характеристику мікроінкапсульованої тканини КНЗ людини при тривалому культивуванні.

## МЕТОДИКА

Для проведення експериментальних досліджень тканину КНЗ людини отримували в хірургічному відділі клініки Інституту ендокринології та обміну речовин після операцій з приводу хвороби Іценка–Кушінга і феохромоцитомі. Адренкортикальну тканину промивали декілька разів стерильним 0,9%-м розчином хлориду натрію з антибіотиками (з розрахунку 100 од. бензилпеніциліну натрієвої солі та 100 мкг стрептоміцину сульфату на 1 мл розчину), очищали від жирової та сполучної тканин, після чого сікли на шматочки розміром до 1 мм<sup>3</sup> та знову промивали декілька разів стерильним 0,9%-м розчином хлориду натрію з антибіотиками.

Шматочки тканини КНЗ людини перенесли в 1%-й розчин альгінату (“Fluka”, Норвегія), який безпосередньо перед застосуванням стерилізували, пропускаючи через фільтр з порами 0,45 мкм (“Filtron”, Німеччина), після чого здійснювали мікроінкапсуляцію тканини за стандартним методом [10]. Для цього через перший канал генератора мікро-

капсул пропускали 1,0%-й розчин альгінату з рівномірно розподіленими шматочками адренкортикальної тканини; через другий канал – повітря зі швидкістю 8–10 л/хв. З вихідного отвору генератора мікрокапсули з тканиною потрапляли в гелеутворювальний розчин хлориду кальцію (“Sigma”, США) з концентрацією 100 ммоль/л для перехресного зв’язування карбоксильних груп мануронової та гулууронової кислот альгінату, в якому їх інкубували протягом 10–15 хв і промивали кілька разів 0,9%-м розчином хлориду натрію.

Нативну та мікроінкапсульовану тканину КНЗ людини культивували у флакончиках з 1 мл середовища RPMI-1640 (“Sigma”, США), яке містило 10 % сироватки новонародженого теляти (“Sigma”, США) і антибіотики, при постійному обертанні з частотою 10–12 год<sup>-1</sup> і 37°C. Частина проб містила також синактен-депо (“Novartis”, Німеччина) в кінцевій концентрації 0,1 Од/мл і хлоридитан, розчинений в спирту, (синтез здійснено керівником лабораторії оргсинтезу та хімреактивів Інституту, доктором хімічних наук Бальном Я.Г.) в кінцевих концентраціях 0,0005, 0,005, 0,05 і 0,5 %. Середовище культивування змінювали через кожну добу.

На етапі мікроінкапсуляції та в динаміці культивування здійснювали макроскопічний контроль стану альгінатних мікрокапсул за допомогою мікроскопа “Біолам” (“ЛОМО”, Росія). Для гістологічного дослідження відбирали мікроінкапсульовану адренкортикальну тканину людини, яку фіксували в рідині Буена протягом 18 год, двічі відмивали у 40° етиловому спирті, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, двічі просвітлювали у ксилолі по 5 хв та заливали у Paraplast X-tra (“Sigma”, США) при 55 °C. Мікротомні зрізи завтовшки 5 мкм забарвлювали гематоксилін-еозинном і проводили стандартні гістологічні дослідження.

У різні строки культивування відбирали аліквоти середовища та заморожували при температурі -20 °C для наступного визначення вмісту 11-гідроксикортикостероїдів (11-

ГОКС) людини флуориметричним методом [1] на спектрофлуориметрі “Hitachi MPF-4” (“Hitachi”, Японія) з використанням як стандарту кристалічного кортизолу (“Reanal”, Угорщина).

До початку дослідження було отримано позитивне рішення Комісії з етики державної установи “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, а також інформована згода від кожного пацієнта.

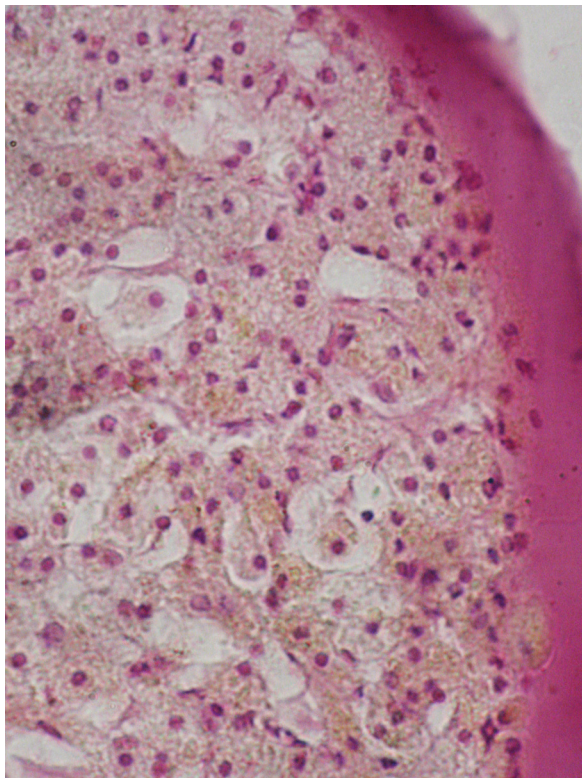
Обробка результатів здійснена стандартними методами варіаційної статистики із застосуванням критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

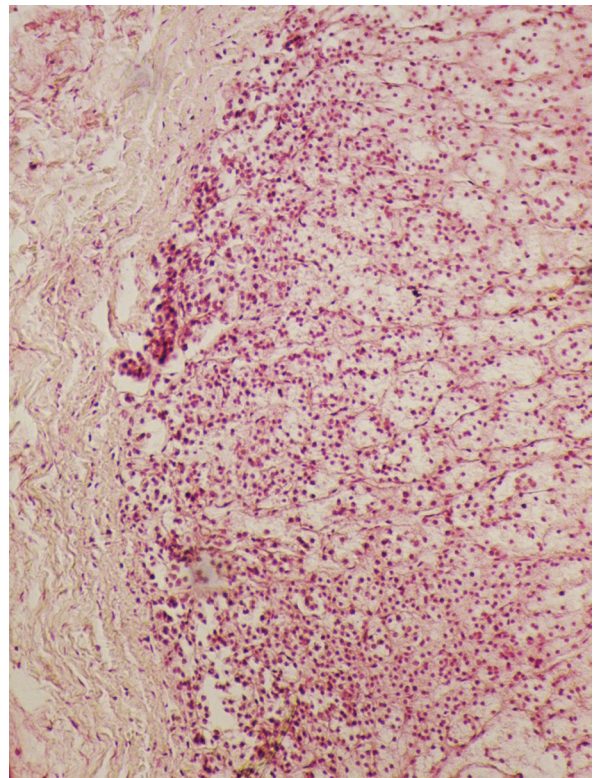
Результати макроскопічного дослідження показали, що виготовлені за стандартним методом альгінатні мікрокапсули [10] мали правильну округлу форму, однорідну структуру, а їх розмір був 1–2 мм у діаметрі. Товщина

стінки мікрокапсул становила 0,1–0,2 мм з усіх сторін від адренкортикальної тканини. Мікрокапсули щільно прилягали до тканини КНЗ і заповнювали заглибини, утворені за рахунок нерівностей її країв (рис. 1,а).

Морфологічна організація переважної більшості адренкортикальних клітин в мікрокапсулах не була порушена. Клітини оточені цільною плазматичною мембраною, їх ядра достатньо активні, цитоплазма помірної щільності, містить дрібні гранули. Лише окремі адренкортикоцити в мікрокапсулах у стані набряку та з ознаками деструктивних змін. Між тим частка таких клітин була незначною порівняно з адренкортикоцитами зі збереженою морфологічною структурою. Шматочки адренкортикальної тканини розміщувалися в мікрокапсулах як по центру, так і дещо ексцентрично, що не впливало на морфологічні ознаки та цілісність ендокринної тканини КНЗ [21].



а



б

Рис. 1. Мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини. Забарвлення гематоксилін-еозином. х600

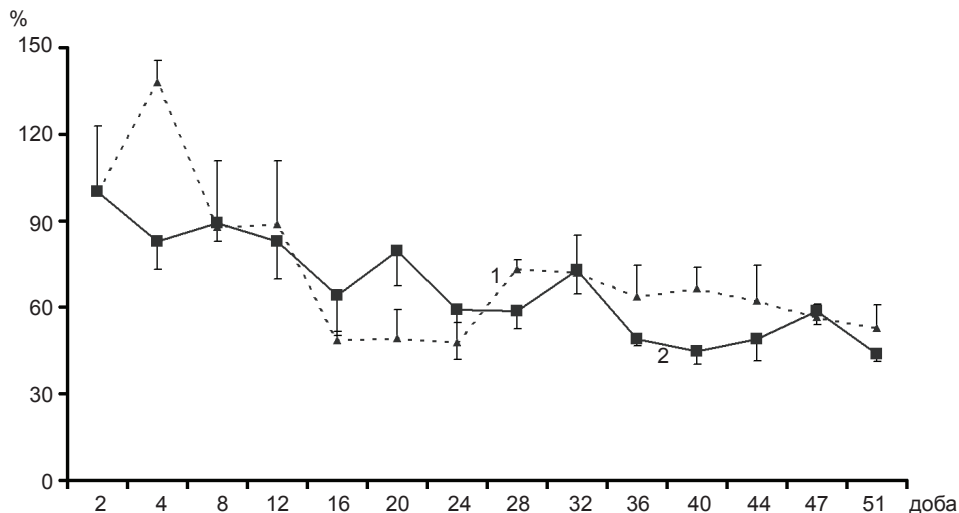


Рис. 2. Вміст 11-гідрокортикостероїдів у середовищі культивування нативної (1) та мікроінкапсульованої (2) тканини кори надниркової залози людини

Адренкортикальна тканина в мікрокапсулах зберігала свою структурну організацію (див. рис. 1,б). Чітко видно всі три зони КНЗ: клубкова, пучкова та сітчаста. При цьому переважна більшість адренкортикоцитів у кожній зоні характеризувалася морфологічними ознаками життєздатності і не мала деструктивних змін.

Гормональні дослідження встановили наявність функціональної активності як нативної, так і мікроінкапсульованої тканини КНЗ людини в динаміці культивування (рис. 2).

Культивування нативної та мікроінкапсульованої адренкортикальної тканини людини з синактен-депо (0,1 Од/мл) збільшувало вміст 11-ГОКС в середовищі на 83,5 і 81,3 % відповідно порівняно з базальними показниками, прийнятими за 100 % (рис. 3).

Дослідження функціональної активності клітин КНЗ поросят, які були попередньо мікроінкапсульовані в тришарові альгінат-полілізін-альгінатні мембрани за допомогою електростатичного генератора мікрокапсул, показали адекватну секрецію кортизолу у відповідь на стимуляцію адренкортикотропним гормоном, яка збігалася з даними специфічної стимуляції вільних адренкортикоцитів [5].

Культивування адренкортикальної тканини людини з хлодитаном дозозалежно знижувало вміст 11-ГОКС в культуральному середовищі: при концентрації препарату 0,0005 % – на 11,1 %, при 0,005 % – на 39,5 %, при 0,05 % – на 54,3 % ( $P < 0,05$ ) і при концентрації 0,5 % – на 69,8 % ( $P < 0,02$ ; рис. 4).

Культивування нативної та мікроінкапсульованої адренкортикальної тканини людини з хлодитаном (0,5 %) знижувало вміст 11-ГОКС в середовищі на 70,1 і 76,4 % відпо-

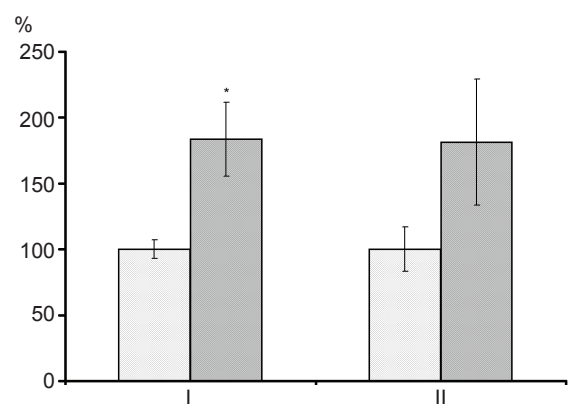


Рис. 3. Вплив синактен-депо на вміст 11-гідрокортикостероїдів у середовищі культивування нативної (I) та мікроінкапсульованої (II) тканини кори надниркової залози людини: 1 – контроль, 2 – синактен-депо. \* $P < 0,05$  порівняно з відповідним контролем



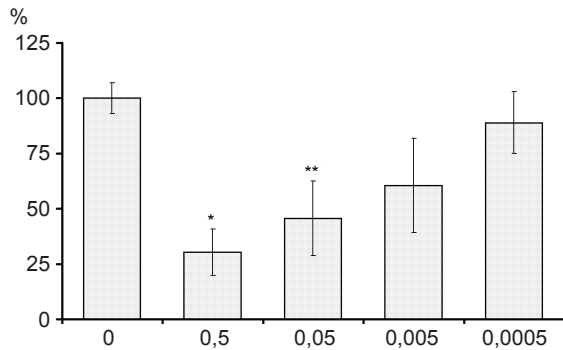


Рис. 4. Вплив хлодитану на вміст 11-гідроксикортикостероїдів в середовищі культивування нативної тканини кори надниркової залози людини залежно від концентрації препарату: 1 – контроль, 2 – хлодитан. \*P < 0,02 і \*\*P < 0,05 порівняно з контролем

відно порівняно з базальними показниками, прийнятими за 100 % (рис. 5).

Хлодитан (2-о-хлорфеніл-2-п-хлорфеніл-1,1-дихлоретан, о,п'-ДДД) як адренолітичний препарат і специфічний інгібітор функції КНЗ затверджений Food and Drug Agency і European Medicine Executive Agency для використання в клінічній практиці при хворобі та синдромі Іценка-Кушінга, а також гормональноактивних пухлинах КНЗ (кортикостеромах) в поєднанні з операцією або самостійно, якщо пухлина чи віддалені метастази не можуть бути видалені хірургічним шляхом, або якщо існує висока ймовірність рецидиву [2, 3, 7, 8, 16].

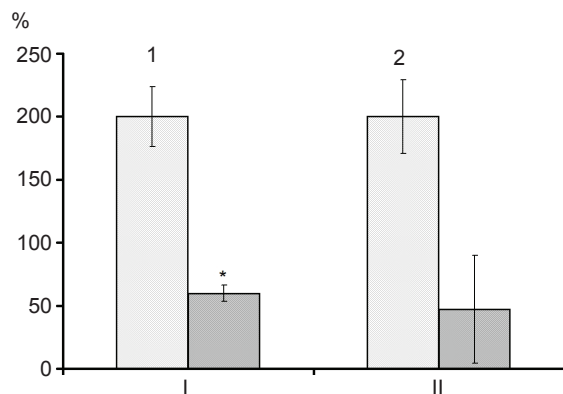


Рис. 5. Вплив хлодитану на вміст 11-гідроксикортикостероїдів в середовищі культивування нативної (I) та мікроінкапсульованої (II) тканини кори надниркової залози людини: 1 – контроль, 2 – хлодитан. \*P < 0,05 порівняно з відповідним контролем

Однак ефективність його застосування дуже варіабельна і залежить від багатьох обставин (зокрема, від біологічного виду надниркової тканини та умов її застосування) [2, 4, 19].

Виразність ефекту хлодитану на утворення кортикостероїдів може бути пов'язаний із індивідуальною чутливістю, здатністю препарату проникати всередину шматочків тканини, а також площею його контакту з поверхнею тканинних елементів КНЗ [4, 11, 12].

Таким чином, мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігає здатність секретувати кортикостероїди в динаміці культивування, а також адекватно реагувати на специфічні чинники, що свідчить про перспективність її застосування для компенсації гіпофункціонального стану адренкортикальної системи у тварин з експериментальним гіпокортицизмом.

*Автори висловлюють щире подяку дослідникам Т.Bohrer, С.Hasse і М.Rothmund з Philipps-University (м. Марбург, Німеччина) за матеріально-технічне та науково-методичне забезпечення впровадження оригінальної методики в Державній установі "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка НАМН України".*

**І.П.Пастер, Н.І.Левчук, Н.Д.Тронько**

**ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОИНКАПСУЛИРОВАННОЙ ТКАНИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

Микроинкапсулированная ткань коры надпочечной железы человека сохраняет способность секретировать 11-оксикортикостероиды на протяжении 51 сут культивирования, а также адекватно реагировать на стимулирование адренкортикотропным гормоном и угнетение хлодитаном, что свидетельствует о перспективности её применения для компенсации гипофункционального состояния адренкортикотропной системы в экспериментах на животных.

Ключевые слова: кора надпочечной железы, микроинкапсуляция, культивирование, 11-оксикортикостероиды, адренкортикотропный гормон, хлодитан.

I.P.Pasteur, N.I.Levchuk, M.D.Tronko

## CHARACTERIZATION OF MICROENCAPSULATED HUMAN ADRENAL CORTEX TISSUE IN LONG-TERM CULTURE

Microencapsulated human adrenal cortex tissue preserves the ability to secrete 11-oxycorticosteroids for 51 days of cultivation, and to react adequately in responses to stimulation with adrenocorticotrophin and inhibition with chloditane, suggesting good prospects of the use of this tissue for compensation of the hypofunctional state of adrenocorticotropin system in experimental animals.

Key words: adrenal cortex, microencapsulation, cultivation, 11-oxycorticosteroids, adrenocorticotrophin, chloditane.

*V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the NAMS of Ukraine”, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балашов Ю.Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – 76, № 2. – P. 280–283.
2. Комиссаренко В.П. Применение ингибиторов для регуляции эндокринных функций и лечения гормонозависимых опухолей // Врач. дело. – 1970. – № 4. – С. 13–18.
3. Комиссаренко И.В. Лечение болезни и синдрома Иценко-Кушинга хлодитаном // Клин. медицина. – 1976. – 54, № 9. – С. 122–127.
4. Кравченко В.И. Влияние о,п'-ДДД на образование кортикостероидов надпочечниковой тканью in vitro // Пробл. эндокринологии. – 1973. – 19, № 5. – С. 76–79.
5. Abobakr A.M. Free and microencapsulated adrenal cortical cells produce similar cortisol responses when stimulated by ACTH: an in vitro study // Int. J. Artif. Organs. – 1994. – 17, № 3. – P. 171–174.
6. Cadic C., Vitiello S., Gin H., Neveu P.J., Dupuy B. Embedded adrenal cells graft reduced local and early nonspecific inflammatory phenomena which follow agarose beads implantation // Cell Transplant. – 1992. – 1, № 5. – P. 349–354.
7. Daffara F., De Francia S., Reimondo G., Zaggia B., Aroasio E., Porpiglia F., Volante M., Termine A., Di Carlo F., Dogliotti L., Angeli A., Berruti A., Terzolo M. Prospective evaluation of mitotane toxicity in adrenocortical cancer patients treated adjuvantly // Endocrine-Related Cancer. – 2008. – 15, № 4. – P. 1043–1053.
8. De Francia S., Ardito A., Daffara F., Zaggia B., Germano A., Berruti A., Di Carlo F. Mitotane treatment for adrenocortical carcinoma: an overview // Minerva Endocrinol. – 2012. – 37, № 1. – P. 9–23.
9. Elliott R. B., Escobar L., Garkavenko O., Croxson M.C., Schroeder B.A., McGregor M., Ferguson G., Beckman N., Ferguson S. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts // Cell Transplant. – 2000. – 9, № 6. – P. 895–901.
10. Figliuzzi M., Plati T., Cornolti R., Adobati F., Fagiani A., Rossi L., Remuzzi G., Remuzzi A. Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets // Acta Biomaterialia. – 2006. – 2, № 2. – P. 221–227.
11. Hahner S., Fassnacht M. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2005. – 6, № 4. – P. 386–394.
12. Hart M.M., Straw J.A. Effect of 1-(o-chlorophenyl)-1-(o-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in various preparations in vitro of dog adrenal cortex // Biochem. Pharmacol. – 1971. – 20, № 7. – P. 1679–1688.
13. Kim Y.M., Kwak K.H., Lim J.O., Baek W.Y. Reduction of allodynia by intrathecal transplantation of microencapsulated porcine chromaffin cells // Artif. Organs. – 2009. – 33, № 3. – P. 240–249.
14. Moustafa T., Girod S., Tortosa F., Li R., Sol J.C., Rodriguez F., Bastide R., Lazorthes Y., Sallerin B. Viability and functionality of bovine chromaffin cells encapsulated into alginate-PLL microcapsules with a liquefied inner core // Cell Transplant. – 2006. – 15, № 2. – P. 121–133.
15. Rowiński W. Future of transplantation medicine // Ann. Transplant. – 2007. – 12, № 1. – P. 5–10.
16. Schteingart D.E., Doherty G.M., Gauger P.G., Giordano T.J., Hammer G.D., Korobkin M., Worden F.P. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference // Endocrine-Related Cancer. – 2005. – 12, № 3. – P. 667–680.
17. Smidsrød O., Skjåk-Bræk G. Alginate as immobilization matrix for cells // Trends Biotechnol. – 1990. – 8, № 3. – P. 71–78.
18. Uludag H., De Vos P., Tresco P.A. Technology of mammalian cell encapsulation // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2000. – 42, № 1-2. – P. 29–64.
19. Veysman I., Nieman L., Fojo T. Management of endocrine manifestations and the use of mitotane as a chemotherapeutic agent for adrenocortical carcinoma // Clin. Oncol. – 2009. – 27, № 27. – P. 4619–4629.
20. Weiss M.J., Ng C.Y., Madsen J.C. Tolerance, xenotransplantation: future therapies // Surg. Clin. North. Am. – 2006. – 86, № 5. – P. 1277–1296.
21. Zimmermann U., Cramer H., Jork A., Thürmer F., Zimmermann H., Fuhr G., Hasse C., Rothmund M. Microencapsulation-based cell therapy / In: H.-J. Rehm and G. Reed (eds.). Biotechnology. – Weinheim, Wiley-VCH, 2001. – P. 547–571.
22. Zimmermann U., Mimietz S., Zimmermann H., Hillgärtner M., Schneider H., Ludwig J., Hasse C., Haase A., Rothmund M., Fuhr G. Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy // BioTechniques. – 2000. – 29, № 3. – P. 564–581.

*ДУ «Ін-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комисаренка НАМН України», Київ  
E-mail: pasteur@bigmir.net*

*Матеріал надійшов до редакції 12.07.2013*

П.І. Янчук, О.О. Виноградова, О.М. Пасічніченко, С.С. Костенко

## Участь ейкозаноїдів у механізмі скоротливих реакцій ворітної вени на дію адреналіну і норадреналіну

*Вивчали вплив індометацину ( $7 \cdot 10^{-8}$  моль/л) на тонічну активність ізольованих сегментів ворітної вени (ВВ) щурів, індуковану адреналіном ( $10^{-5}$  моль/л) і норадреналіном ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л). Індометацин пригнічує норадреналініндуковані тонічні скорочення ВВ з інтактним ендотелієм і не впливає на скорочення деендотелізованої судини, що свідчить про участь у цих реакціях ейкозаноїдів ендотеліального походження. Пригнічення індометацином адреналініндукованих скоротливих реакцій ВВ як з наявним ендотелієм, так і без нього вказує на залучення до реакцій ейкозаноїдів, синтезованих, можливо, гладеньком'язовими клітинами судини.*

*Ключові слова: адреналін, норадреналін, ворітна вена, ендотелій, ейкозаноїди.*

### ВСТУП

Загальний та регіонарний периферичний опір, а також ємність судинної системи регулюються симпатичною нервовою системою, яка впливає на судини головним чином за рахунок вивільнення катехоламінів з симпатичних нервових закінчень і мозкової речовини надниркових залоз. Норадреналін та адреналін є потужними вазоактивними гуморальними факторами, дія яких проявляється через активацію  $\alpha$ - та  $\beta$ -адренорецепторів. Але норадреналін, на відміну від адреналіну, мало впливає на  $\beta_2$ -адренорецептори кровоносних судин і тому його основним ефектом є виражена короточасна гіпертензивна дія, яка пов'язана з активацією  $\alpha$ -адренорецепторів судин і підвищенням периферичного судинного опору [1]. Окрім загальноновизнаної прямої дії норадреналіну безпосередньо на гладеньком'язові клітини (ГМК) судин відомо також про його ендотеліязалежну дію [2]. Зменшення констрикторних відповідей на дію норадреналіну після попередньої перфузії ізольованих препаратів базилярної артерії собак індометацином, автори пов'язують з

виділенням ендотелієм вазоконстрикторних факторів циклооксигеназного шляху утворення [3, 4]. У працях, присвячених дослідженню механізмів регуляції тонуусу ворітної вени (ВВ) катехоламінами, відсутні відомості щодо ролі в них ендотелію та ейкозаноїдів. Метою нашого дослідження було з'ясувати участь ейкозаноїдів у механізмах констрикторних реакцій ВВ, зумовлених дією адреналіну і норадреналіну, та можливі відмінності у цих механізмах, пов'язаних з різною чутливістю адренорецепторів до різних катехоламінів.

### МЕТОДИКА

Експерименти проведені на 40 білих лабораторних щурах масою 200-300 г. У тварин після етаназії за допомогою глибокої наркотизації хлороформом здійснювали лапаротомію. Ретельно відпрепарувували ВВ від сполучних тканин і периваскулярних сплетінь, видаляли її фрагмент з організму і поміщали у розчин Тірде такого складу: NaCl – 8 г/л; KCl – 110 мг/л; CaCl<sub>2</sub> – 250 мг/л; MgSO<sub>4</sub> – 200 мг/л;

© П.І. Янчук, О.О. Виноградова, О.М. Пасічніченко, С.С. Костенко

$\text{NaHCO}_3$  – 1,6 г/л;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 120 мг/л; глюкоза – 2 г/л. Судинний препарат закріплювали у плексигласовій камері з проточним підігрітим розчином Тіроде (2 мл/хв;  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) сталевими гачками, один з яких нерухомо вмонтовано у стінку камери, інший з'єднано зі стрижнем механоелектричного перетворювача. Тут судинні препарати підлягали пасивному розтягненню з силою 5 мН і витримувалися протягом 20–30 хв.

Скорочення ізольованого фрагменту ВВ реєстрували за допомогою тензометричної установки [5]. Датчиком реєстрації був ємнісний механоелектричний перетворювач, сконструйований дослідно-конструкторським відділом Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України. Його сигнал подавали на підсилювач постійного струму, змонтованого на мікросхемі 140 ЧД8. Далі аналоговий сигнал відцифровували з використанням аналого-цифрового перетворювача (АЦП) і виводили на жорсткий диск і паралельно на монітор персонального комп'ютера для реєстрації даних з використанням програми «PowerGraph ver.2.1» виробництва фірми «ДИСофт» (Росія). Застосовували стандартну звукову карту АВЕ64 фірми «Creative» (США) зі стереотрактом, що дає змогу одночасно записувати електричні сигнали з двох незалежних датчиків. Цей комплекс обладнання дає можливість реєструвати сигнали амплітудою від 1 мВ до 2В.

Перевірку і калібрування системи здійснювали прямим прецизійним механічним впливом на датчик важків різної ваги і фіксації результату перетворення в цифровий формат на виході програми «PowerGraph ver.2.1». Зміни тонічного напруження гладеньких м'язів ізольованих сегментів ВВ вимірювали в абсолютних одиницях (міліньютонх).

У роботі були використані: норадреналін та адреналін (ВАТ «Здоров'я», Харків), індометацин («Sopharma», Болгарія), сапонін («Merck», Німеччина). Речовини подавали в камеру по проточній системі з постійною швидкістю 2 мл/хв. З тією ж швидкістю від-

мивали тестові речовини розчином Тіроде. Фармакологічну деендотелізацію препаратів ВВ здійснювали перфузією сапоніну у концентрації 0,5 мг/мл протягом 10 хв [6]. Повноту деендотелізації перевіряли за допомогою цитогістохімічного контролю зрізів перепаратів ВВ, пофарбованих гематоксиліном Брьомера та еозином, з використанням світлової мікроскопії (збільшення у 400 разів).

Статистичну обробку результатів експериментів здійснювали за допомогою аналітичного пакету Statistica 6.0, а перевірку на нормальність – за критерієм Шапіро–Уїлка. Для статистичної обробки параметричних результатів був використаний критерій Левена та критерій t Стьюдента для залежних вибірок, для непараметричних – тест Вілкоксона для залежних вибірок. У роботі амплітуда скорочень представлена у вигляді Me [25 %; 75 %] (медіана [верхня квартиль; нижня квартиль]) для непараметричних результатів, а для параметричних –  $M+SD$  (середні значення  $\pm$  середнє квадратичне відхилення). Зміни вважали статистично значущими при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для з'ясування участі ейкозаноїдів у скоротливих реакціях ВВ на дію норадреналіну застосовували індометацин – блокатор циклооксигеназного шляху перетворення арахідонової кислоти. У контрольних дослідах при перфузії норадреналіну у концентрації  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л ( $n=8$ ) спостерігали тонічні скорочення ВВ з амплітудою 6,25 [2,8; 8,2] мН. Після попередньої перфузії ВВ індометацином ( $7 \cdot 10^{-8}$  моль/л) протягом 10 хв були зареєстровані скоротливі реакції ВВ на дію норадреналіну з амплітудою 2,6 [1,13; 4,75] мН ( $n=8$ ), тобто істотно (на 58 %) менші від контролю ( $P < 0,05$ ; рис.1). Після відмивання впродовж 30–40 хв реакції вени на дію норадреналіну відновлювалися до вихідного рівня. Ці результати свідчать про активну участь ейкозаноїдів у зростанні тонуусу ГМК ВВ.

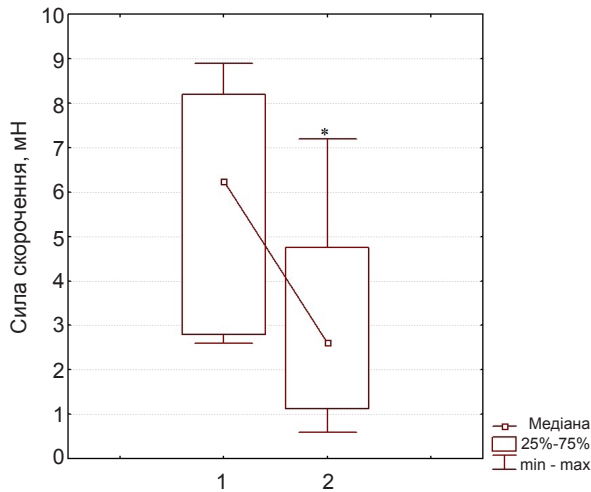


Рис. 1. Амплітуда тонічних скорочень ізольованих препаратів ворітної вени щура під впливом норадреналіну ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л) до (1) та на тлі дії індометацину ( $7 \cdot 10^{-8}$  моль/л; 2). \* $P < 0,05$

Той факт, що індометацин пригнічує скоротливу активність ВВ, викликану дією норадреналіну, не виключає можливу участь ендотелію у опосередковуванні таких реакцій. Тому в наступній серії дослідів ми вирішили з'ясувати участь ейкозаноїдів у ендотелійзалежному скороченні ВВ під дією норадреналіну, порівнюючи скоротливі реакції судин з інтактним (контроль) та видаленим ендотелієм. Так, середня амплітуда тонічних скорочень деендотелізованих препаратів ВВ

( $n=10$ ) була меншою від контролю на 52 % ( $P < 0,01$ ) і становила  $1,3 \pm 0,8$  мН (рис. 2, 3). Це свідчить про часткову участь ендотелію у опосередкуванні впливу норадреналіну на тонус ВВ.

Надалі наші дослідження були спрямовані на визначення ролі ендотелію в утворенні та виділенні ейкозаноїдів, як можливого посередника норадреналініндукованих скорочень ВВ. Деендотелізовані препарати ВВ перфузували розчином індометацину  $7 \cdot 10^{-8}$  моль/л протягом 10 хв, після чого здійснювали аплікацію норадреналіну, який викликав їх скорочення з амплітудою 2,5 [2,3; 3,0] мН, але ці зміни були невірні, порівняно з контролем. Тобто ейкозаноїди, очевидно, не беруть участь у норадреналініндукованих тонічних скороченнях деендотелізованої ВВ.

Дослідження, проведені на ізольованих ГМК судин, свідчать про те, що такі клітини, на відміну від ендотеліальних, не задіяні у вивільненні ПГН<sub>2</sub> (попередника синтезу простагландинів) [7]. Разом з цим існують дані про здатність ендотеліальних клітин інших судин до синтезу простагландинів [8, 9].

Оскільки скоротливі реакції судинних препаратів ВВ, зумовлені дією норадреналіну, пригнічувались як індометацином, так і їх деендотелізацією, можна зробити припу-

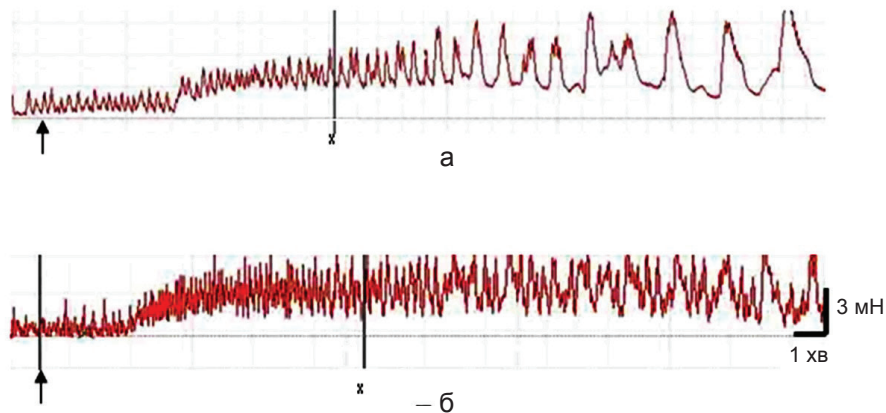


Рис. 2. Скоротлива активність інтактних (а) та деендотелізованих (б) ізольованих препаратів ворітної вени під впливом норадреналіну.

↑ – початок введення норадреналіну у концентрації  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л;  
X – початок відмивання препарату розчином Тірорде

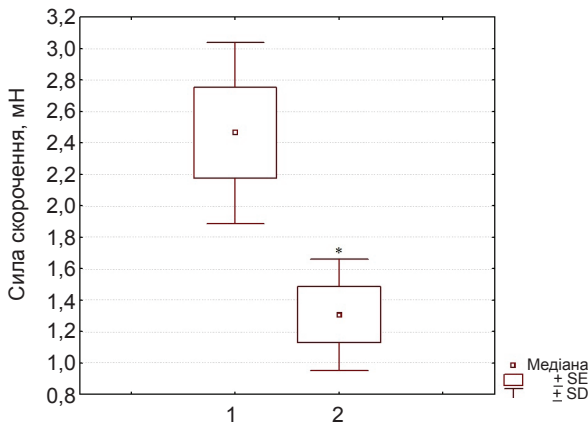


Рис. 3. Зміна амплітуди тонічних скорочень ізолюваних препаратів ворітної вени щура під дією норадреналіну ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л) до (1) та після (2) їх деендотелізації (n=10). \*  $P < 0,05$

шення, що дія норадреналіну на гладенькі м'язи ВВ опосередковується її ендотелієм через виділення ендотеліоцитами продуктів циклооксигеназного шляху перетворення арахідонової кислоти.

У зв'язку з тим, що катехоламіни адреналін і норадреналін мають різну афінність до  $\alpha$ - та  $\beta$ -адренорецепторів ми припустили, що механізми залучення ейкозаноїдів до скоротливих реакцій ВВ можуть відрізнятися. Тому у наступній серії дослідів вивчали участь ейкозаноїдів у адреналініндукованих тонічних реакціях ізолюваних препаратів ВВ.

У контрольних дослідах при перфузії ВВ адреналіном у концентрації  $10^{-5}$  моль/л, спостерігали тонічні скорочення з амплітудою  $4,5 \pm 0,3$  мН (n=8). Після аплікації індометацину у концентрації  $7 \cdot 10^{-8}$  моль/л протягом 10 хв адреналін викликав скорочення ВВ із силою  $3,1 \pm 0,7$  мН, тобто на 24 % меншою ( $P < 0,001$ ) у порівнянні з контролем (рис. 4). Це свідчить про участь продуктів циклооксигеназного шляху перетворення арахідонової кислоти у реакціях ВВ на дію адреналіну.

Виникає питання, чи задіяний ендотелій в опосередкуванні скоротливої реакції ВВ на дію адреналіну. Після деендотелізації амплітуда тонічних скорочень ВВ, індукованих адреналіном ( $10$  мкмоль/л), становила  $3,8 \pm 0,3$

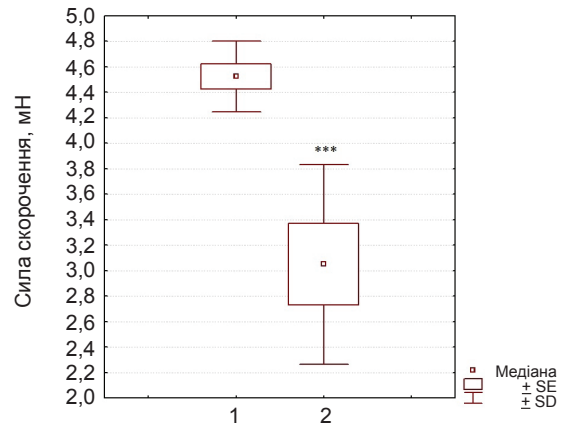


Рис. 4. Амплітуда тонічних скорочень ізолюваних препаратів ворітної вени щура під впливом адреналіну ( $10^{-5}$  моль/л) до (1) та на тлі дії індометацину ( $7 \cdot 10^{-8}$  моль/л; 2). \*\*\* $P < 0,001$

мН, тобто на 12,5 % була меншою ( $P < 0,05$ ) від середньої амплітуди контрольних реакцій, що вказує на часткове опосередкування цих реакцій ендотелієм судин.

Для визначення джерела утворення ейкозаноїдів, які опосередковують вказані скоротливі реакції вени, була застосована аплікація індометацину для адреналінвикликаних тонічних реакцій деендотелізованих препаратів ВВ. Після цього активність препаратів становила  $2,3 \pm 0,63$  мН. Тобто блокада циклооксигенази деендотелізованих препаратів ВВ зменшувала силу скорочень, індукованих адреналіном, на 34,3 % ( $P < 0,001$ ; рис. 5).

Отримані нами результати вказують на участь продуктів циклооксигеназного перетворення у механізмі скорочень ВВ, зумовлених дією адреналіну. Але такі реакції, ймовірно, є лише частково ендотелійзалежними, адже пригнічення індометацином адреналініндукованих скорочень для деендотелізованих судинних препаратів є навіть більш ефективним, ніж для ВВ з інтактним ендотелієм. Такі результати вказують на можливу участь у реакціях ВВ, викликаних дією адреналіну, ейкозаноїдів, що синтезуються ГМК або іншими клітинами судинної стінки. Існують літературні відомості, що підтверджують можливість синтезу та виді-

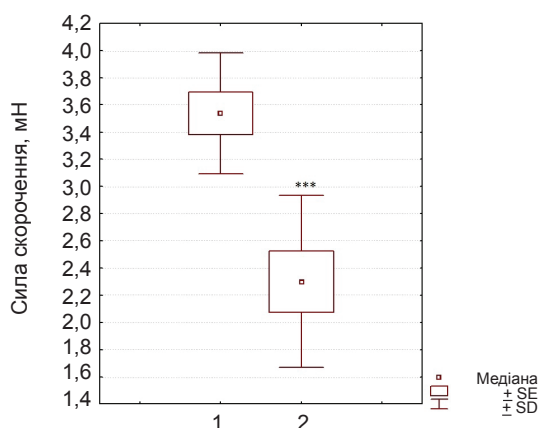


Рис. 5. Амплітуда тонічних скорочень деендотелізованих препаратів ворітної вени щура під впливом адреналіну ( $10^{-5}$  моль/л) до (1) та на тлі дії (2) індометацину ( $7 \cdot 10^{-8}$  моль/л). \*\*\* $P < 0,001$

лення ейкозаноїдів (простагландинів  $F_{2\alpha}$  та  $H$ , тромбоксанів  $A_2$  та  $B_2$ ) ГМК інших судин, наприклад, ниркової артерії кроля, аорти свині та кроля, загальної сонної артерії щурів, базиллярної артерії собак [10–12].

Виходячи з отриманих нами результатів та літературних даних, слід зауважити про тісну взаємодію катехоламінів і ейкозаноїдів у судинному руслі. Ймовірно, простаноїди, як міжклітинні посередники, виконують роль підсилювачів дії катехоламінів. Можливо, таке явище пов'язане з тим, що адреналін і норадреналін посилено синтезуються та вивільняються в кровоносне русло під час стресу, а ейкозаноїди при запальних процесах, травмах, а отже при пов'язаних між собою фізіологічних і патологічних станах організму.

## ВИСНОВКИ

1. Індометацин пригнічує норадреналініндуковані тонічні скорочення ВВ з інтактним ендотелієм і не впливає на скорочення деендотелізованої судини, що свідчить про участь у цих реакціях ейкозаноїдів ендотеліального походження.

2. Пригнічення індометацином адреналініндукованих скоротливих реакцій ВВ

як з інтактним ендотелієм, так і без нього вказує на залучення до реакцій ейкозаноїдів, синтезованих, імовірно, ГМК судини.

**П.І. Янчук, Е.А. Виноградова,  
О.М. Пасичніченко, С.С. Костенко**

## УЧАСТИЕ ЕЙКОЗАНОИДОВ В МЕХАНИЗМЕ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ВОРОТНОЙ ВЕНЫ НА ДЕЙСТВИЕ АДРЕНАЛИНА И НОРАДРЕНАЛИНА

Изучали влияние индометацина ( $7 \cdot 10^{-8}$  моль/л) на тоническую активность изолированных сегментов воротной вены (ВВ) крысы, индуцированную адреналином ( $10^{-5}$  моль/л) и норадреналином ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л). Индометацин угнетает норадреналининдуцированные тонические сокращения ВВ с эндотелием и не влияет на сокращения деэндоотелизированных сосудов, что свидетельствует об участии в этих реакциях ейкозаноидов эндотелиального происхождения. Угнетение индометацином адреналининдуцированных сократительных реакций ВВ как с эндотелием, так и без него указывает на вовлечение в реакции ейкозаноидов, синтезированных, возможно, гладкомышечными клетками сосуда. Ключевые слова: адреналин, норадреналин, воротная вена, эндотелий, ейкозаноиды.

**P.I. Yanchuk, O.O. Vingradova,  
O.M. Pasichnichenko, S.S. Kostenko**

## PARTICIPATION OF EICOSANOIDS IN THE MECHANISMS OF CONTRACTILE REACTIONS OF PORTAL VEIN TO ADRENALINE AND NORADRENALINE

The influence of indometacine ( $7 \cdot 10^{-8} M$ ) on the tonic contractile activity of the isolated rat portal vein (PV) under the action of adrenaline ( $1 \cdot 10^{-5} M$ ) and noradrenaline ( $5 \cdot 10^{-6} M$ ) was studied. Indometacine decreased the amplitude of noradrenaline-induced tonic constriction of PV with intact endothelium and produced no effect on constriction of vessels with denuded endothelial layer. The results suggest that these reactions are mediated by endothelial prostanoids. Inhibition of adrenaline-induced constriction of PV preparations with intact and denuded endothelium suggests that the contractile reactions are mediated by prostanoides derived from both endothelial and smooth muscle cells.

Key words: adrenaline, noradrenaline, portal vein, endothelium, prostanoides.

*Taras Shevchenko National University, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авакян О.М. Фармакологическая регуляция функции адренорецепторов. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.

2. Katusic Z.S., Shepherd J.T., Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid and acetylcholine in canine basilar arteries // *Stroke*. – 1988. – № 19. – P.476–479.
3. Usui H., Kurahasi K., Shirahase H. Endothelium-dependent vasocontraction in response to noradrenaline in the canine cerebral artery // *Jap. J. Pharmacol.* – 1987. – № 44. – P.228–231.
4. Roberts R.E., Kendall D.A., Wilson V.G.  $\alpha$ 2-adrenoceptor and NPY receptor-mediated contractions of porcine isolated blood vessels: evidence for involvement of the vascular endothelium // *Brit. J. Pharmacol.* – 1999. – №128. – P.1705–1712.
5. Блаттнер Р., Классен Х., Денерт Х., Дёринг Х. Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц. – М.: Мир, 1983. – 206 с.
6. Янчук П.І., Пасічніченко О.М., Комаренко В.І., Приходько Т.П., Цибенко В.О. З'ясування механізмів звужувальної дії ацетилхоліну на внутрішньопечінкові ворітні судини // *Фізіол. журн.* – 2006. – **52**, №5. – С.23–28.
7. Marta S., Mercedes C. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E // *Circ. Res.* – 2000. – №87. – P.504–507.
8. Stansby G., Shukla N., Hamilton G. Comparison of prostanoid synthesis in cultured human vascular endothelial cells derived from omentum and umbilical vein // *Eur. J. Vascular Surgery*. – 1991. – **5**, № 5. – P.501–506
9. Furuhashi N., Miyazaki S., Kamura M. Role of endothelium and vasoconstrictor prostanoids in norepinephrine-induced vasoconstriction in isolated rat common carotid arteries // *Clin.Exp.Hypertens.* – 2000. – **22**, №5. – P.543–554.
10. Chaudhari A., Pedram A., Kirschenbaum M.A. Prostanoid biosynthesis in cultured rabbit renal microvascular smooth muscle cells. Effect of arachidonic acid, calcium, and A23187 // *Lab. Invest.* – 1990. – **63**, №1. – P.30–37.
11. Ody C., Duval D. Arachidonate incorporation and prostaglandin production in cultured endothelial and smooth muscle cells from pig aorta // *Prostaglandins Leukot Med.* – 1983.– **11**, №1. – P.63–72.
12. Hassid A., Williams C. Vasoconstrictor-evoked prostaglandin synthesis in cultured vascular smooth muscle // *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1983. – **245**, №3. – P.278–282.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка*  
*E-mail: yanchuk49@ukr.net*

*Матеріал надійшов*  
*до редакції 11.03.2013*



А.А. Басов, М.Г. Барышев, С.С. Джимаков, И.М. Быков, Р.И. Сепиашвили,  
И.И. Павлюченко

## Влияние воды с модифицированным изотопным составом на показатели свободнорадикального окисления *in vivo*

*С помощью ядерного магнитного резонанса изучено влияние воды с модифицированным изотопным составом на содержание дейтерия в крови, проведена оценка состояния прооксидантно-антиоксидантной системы в крови и лиофилизированных тканях (печень, почки) под длительном ее в условиях моделированного окислительного стресса. Рассмотрены возможные механизмы реализации прямого и косвенного антиоксидантного эффекта этой воды и перспективы ее использования для нутриционной коррекции нарушений окислительного метаболизма в организме при особых физиологических состояниях и в клинической практике.*

*Ключевые слова: свободнорадикальное окисление, антиоксиданты, окислительный стресс, дейтерий, электронный парамагнитный резонанс.*

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных пищевых веществ для коррекции антиоксидантного потенциала организма является вода с модифицированным изотопным составом (ВМИС), например, вода с пониженным содержанием дейтерия [1]. Известно, что человек в физиологических условиях потребляет до 2–3 л жидкости в сутки, поэтому изменение структуры питания за счет ВМИС с пониженным содержанием дейтерия может оказывать влияние на показатели антиоксидантной системы (АОС). Во всем мире в последние годы достаточно активно изучаются различные эффекты ВМИС с пониженным содержанием дейтерия – основное ее действие на организм заключается в постепенном снижении содержания дейтерия в биологических жидкостях и тканях за счёт реакций изотопного обмена. В научной литературе чаще описаны биологические эффекты ВМИС, тогда как молекулярные механизмы ее действия на организм еще полностью не исследованы. ВМИС с пониженным содер-

жением дейтерия оказывает влияние на рост опухолевых клеток различных культур [18, 20, 23], обладает иммуномодулирующим свойством [15, 16, 19], влияет на обмен пероксида водорода в печени [7]. Все вышеперечисленные примеры показывают, насколько велика роль изотопного состава воды для молекулярных процессов в организме, а, следовательно, при введении ВМИС с пониженным содержанием дейтерия в рацион питания людей при состояниях, сопровождающихся развитием оксидативного стресса (ОС), возможно повышение потенциала эндогенной АОС и предупреждение осложнений [22]. Таким образом, все более широкое использование такой воды как у людей с различными патологическими состояниями, так и для оздоровления (фитнес), а также в профессиональном спорте, требует детального изучения молекулярных механизмов ее действия, что позволит более рационально использовать эффекты.

Цель нашего исследования – оценить влияние изотопного обмена на показатели

© А.А. Басов, М.Г. Барышев, С.С. Джимаков, И.М. Быков, Р.И. Сепиашвили, И.И. Павлюченко

свободнорадикального окисления тканей и состояние антиоксидантной системы крови у лабораторных животных при использовании в пищевом рационе воды с модифицированным изотопным составом с пониженным содержанием дейтерия в физиологических условиях и при воспалительных процессах.

## МЕТОДИКА

Объектом исследования была кровь и гомогенаты органов (печень, почки) крыс-самцов массой 90–100 г. Животные были разделены на 3 группы: I – крысы, получавшие дистиллированную минерализованную воду ( $158 \text{ млн}^{-1}$ ) в течение 30 сут,  $n=40$ ), II – получавшие дистиллированную минерализованную воду ( $158 \text{ млн}^{-1}$ ) в течение 30 сут, имеющие гнойное воспаление мягких тканей,  $n=40$ ), III – получавшие дистиллированную минерализованную воду с пониженным содержанием дейтерия ( $40 \text{ млн}^{-1}$ ) в течение 30 сут, имеющие гнойное воспаление мягких тканей,  $n=40$ ).

Воду с пониженным содержанием дейтерия получали на установке, разработанной в Кубанском государственном университете [12, 13]. Исходная концентрация дейтерия составляла  $40 \text{ млн}^{-1}$ . Минерализацию полученной воды, производили путем добавления минеральных солей для получения физиологически полноценного минерального состава питьевой воды (минерализация 314–382 мг/л: гидрокарбонаты 144–180 мг, сульфаты менее 1 мг, хлориды 60–76 мг, кальций – 6 мг, магний – 3 мг, натрий 50–58 мг, калий 50–58 мг).

При моделировании гнойной раны у крыс использовали двухэтапную модель окислительного стресса. Первый этап – острую фазу окислительного стресса моделировали путем создания межмышечного абсцесса в мягких тканях длинных мышц спины животного с использованием имплантированного инородного тела. Второй этап – хроническую фазу окислительного стресса моделировали гнойной раной, которая формировалась

естественным образом при дренировании абсцесса и удалении инородного тела.

Основой модели окислительного стресса явилась известная модель раневого процесса, предложенная Л.А. Мамедовым в 1982 году и основанная на хирургическом лечении модели абсцесса. В ходе экспериментальных исследований проведена ее модификация [2].

Для моделирования абсцесса крысе до начала эксперимента срезали и выбривали шерсть на средней и нижней третях спины. Затем под местной анестезией 0,5%-м раствором новокаина (объемом 0,5–1,0 мл) с помощью иглы шприца 10-миллилитрового объема повреждали мягкие ткани (область длинных мышц спины), которые предварительно собирали в складку, и нарушали целостность покровов в каудальной трети спины с помощью иглы, которую вводили под углом  $30\text{--}40^\circ$  в краниальном направлении сформированной складки на глубину до 3 см, с одновременным повреждением мягких тканей шириной до 2 см в предполагаемой зоне формирования абсцесса. В день начала эксперимента под хлоралозо-нембуталовым наркозом разрезали скомпрометированную накануне область длиной 3 см и в мягкие ткани вводили стерильный марлевый шарик диаметром 10 мм, пропитанный 1 мл жидкости с патогенным штаммом *St. aureus*. На рану накладывали первичные швы.

Через сутки у животных появлялось нагноение раны и начинался первый (острый) период моделирования окислительного стресса. Швы снимали через 5 сут с момента инфицирования, что соответствовало переходу во вторую фазу окислительного стресса. В дальнейшем проводили местное лечение гнойной раны под мазовыми повязками до ее полного заживления вторичным натяжением.

Определение концентрации дейтерия в плазме крови были проведены с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на импульсном ЯМР-спектрометре JEOL JNM-ECA 400MHz. Спектры снимали на соответствующей резонансной частоте ядер дейтерия

– 61,4 МГц. Ее параметры: 6,7 с (acquisition time), 20 с (relaxation delay), 5,6 мкс (x-pulse), 0,15 Гц (resolution). Температура съёмки – 25 °С, при этом точность стабилизации 0,2 °С. Измерения проводились с использованием 5 миллиметровой ампулы, внутри которой был строго зафиксирован запаенный капилляр, содержащий откалиброванную в определяемой концентрационной шкале смесь дейтерированного и недейтерированного диметилсульфоксида (DMSO), дающего 2D ЯМР-сигнал в области 3,4 млн<sup>-1</sup> (относительно (CD<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si), в то время как 2D-ЯМР сигнал HDO находится в области 4,7 млн<sup>-1</sup> (относительно (CD<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si), (рис. 1).

Обработка полученных спектров заключалась в определении соотношения интегральных интенсивностей 2D ЯМР-сигнала HDO, содержащейся в исследуемом образце относительно 2D ЯМР-сигнала DMSO-D<sub>1</sub>, интенсивность которого в свою очередь была определена при таких же условиях относительно стандартов – образцов воды с точно определённым содержанием дейтерия (3,7, 51, 150 млн<sup>-1</sup>). Каждый образец измеряли

несколько раз для уменьшения погрешностей эксперимента. При этом точность определения содержания дейтерия в биологических образцах составила ± 2 млн<sup>-1</sup>.

Измерение спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) проводили при комнатной температуре на спектрометре JES Fa 300 («JEOL», Япония) в X-диапазоне. Условия измерения: СВЧ-мощность – 1 мВт, частота микроволнового излучения – 9144 МГц, амплитуда высокочастотной модуляции – 0,1 мТл. Образцы тканей предварительно подвергали лиофилизации (в лиофильной сушилке ЛС-1000), измеряли в кварцевой ампуле (5 мм), масса навески в зоне резонатора составляла 0,0300 г. Концентрацию парамагнитных центров в образцах рассчитывали путем сравнения с сигналом стандартного образца (TEMPO). Интегральную интенсивность сигнала ЭПР в исследуемых образцах определяли путем двойного численного интегрирования по методу прямоугольников [13].

Спектры ЭПР образцов печени лабораторных крыс содержат анизотропный синглет-

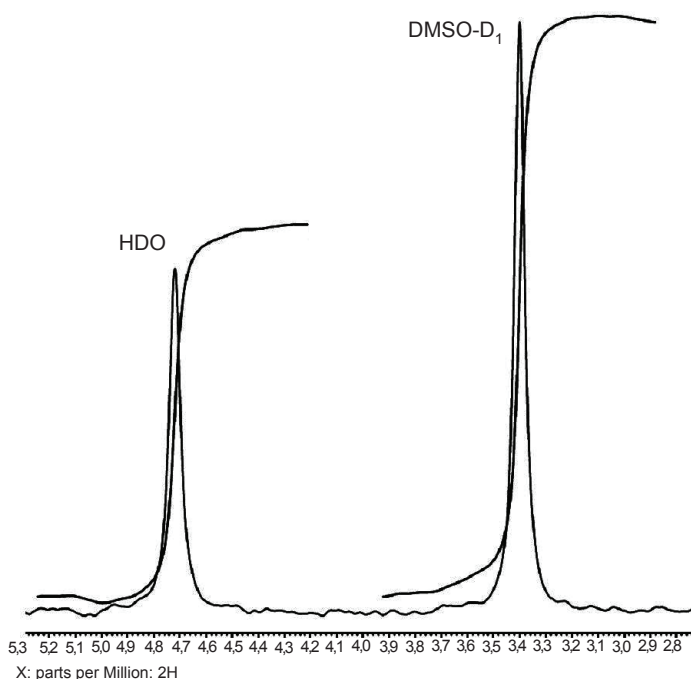


Рис. 1. Соотношения интегральных интенсивностей сигнала 2D ЯМР-HDO, относительно 2D-ЯМР-сигнала DMSO-D<sub>1</sub>

ный сигнал (рис. 2), параметры спин-гамилтониана ( $g_{\perp} = 2,0074$ ,  $g_{\parallel} = 2,003$ ), которого соответствуют стабильным радикалам [1, 5, 14]. Спектры ЭПР образцов почек имеют аналогичный характер.

Учитывая, что метод ЭПР позволяет обнаруживать преимущественно стабильные радикалы [16], для выявления малоустойчивых химически активных радикалов в плазме крови применяли метод люминолзависимой  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции на хемилуминотестере ЛТ-01 производства НПО «Люмин» (Ростов-на-Дону) [3, 10, 11]. Полученные результаты в виде максимума вспышки хемилюминесценции, отражающего ингибирование процессов свободнорадикального окисления (СРО), выражали условных единицах по отношению к вспышке в контрольных пробах без биологического материала.

Дополнительно для оценки состояния эндогенной антиоксидантной системы определяли антиокислительную активность (АОА) плазмы крови амперометрическим способом на анализаторе антиоксидантной активности «Яуза-01-ААА», производства ОАО НПО «Химавтоматика» (Россия) по методу Яшина [17]. Способ основан на измерении электрического тока, возникающего при окислении биологического образца на поверхности

рабочего электрода при определенном потенциале и сравнении полученного сигнала с сигналом стандарта, измеренного в тех же условиях. Статистическую обработку результатов осуществляли методами вариационной статистики с использованием критерия t Стьюдента. Достоверным считали различие при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что наиболее низкое содержание дейтерия в биологических жидкостях и тканях зафиксировано у животных III группы. Оно было меньше на 37,3 и 38,9 % в сравнении с показателями в I и II группах соответственно, что свидетельствует о достоверном ( $P < 0,05$ ) изменении через 30 сут после начала исследования содержания дейтерия в крови (табл. 1). При этом следует отметить, что содержание дейтерия в плазме крови прекращало снижаться после достижения значений в 90–100 млн<sup>-1</sup> и дальнейшего его уменьшения не происходило, несмотря на более низкие показатели содержания дейтерия в потребляемой животными ВМИС (40 млн<sup>-1</sup>). Это позволяет предположить наличие в организме механизмов, способных регулировать в определенном физиологическом интервале

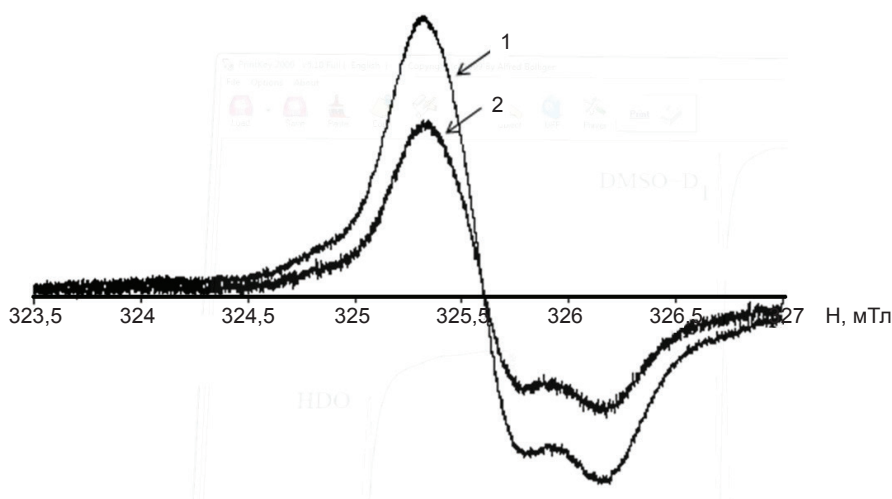


Рис. 2. Спектры электронного парамагнитного резонанса лиофилизированных тканей печени лабораторных крыс II группы (1) и III группы (2)

**Содержание дейтерия, интенсивность свободнорадикального окисления, состояние антиоксидантной системы в крови и тканях у крыс при использовании в пищевом рационе воды с модифицированным изотопным составом**

Группы животных	Содержание дейтерия плазмы, млн <sup>-1</sup>	Антиокислительная активность плазмы, нА·с	Максимум вспышки хемилюминесценции плазмы, усл. ед.	Электронный парамагнитный резонанс, усл. ед./г	
				печени	почки
I	153,3±0,4	1246,4±23,7	1,993±0,024	960,23±56,22	608,61±44,01
II	157,5±0,4	948,2±21,8*	3,058 ± 0,081*	1584,25±112,99*	747,87±55,13*
III	96,1±0,5*,**	1137,1±24,2*,**	2,716±0,126*,**	1316,80±66,69*,**	720,66±57,07*

\* P<0,05 в сравнении с показателями I группы, \*\*P<0,05 в сравнении с показателями II группы.

изотопный состав биологических жидкостей, предупреждая резкие перепады количественного содержания изотопов водорода в разных тканях и органах.

При сравнении интенсивности образования свободных радикалов в лиофилизированных органах было установлено, что в печени и почках крыс с моделированным окислительным стрессом (II и III группы) наблюдалось достоверное повышение концентрации парамагнитных центров (табл. 1), что свидетельствует об устойчивом превалировании на клеточном уровне прооксидантных факторов над компонентами АОС. При этом более существенные изменения наблюдались в гомогенатах печени у животных в II группы, в которых концентрация парамагнитных центров превышала значения контрольной группы I на 64,9 % (P<0,05), что говорит об активном участии печени в обезвреживании токсических субстанций, образующихся при гнойно-воспалительных процессах, следствием чего становится повышение образования в гепатоцитах активных форм кислорода и формирования ОС на тканевом и органном уровнях. Следует отметить, что содержание парамагнитных центров в гомогенатах печени у животных III группы также существенно превышало аналогичные показатели в I группы на 37,1 % (P<0,05), но было достоверно ниже показателей II группы на 16,9 % (P<0,05), что показывает менее выраженную интенсивность СРО в их гепатоцитах и,

видимо, указывает на более активную работу тканевых компонентов эндогенной АОС или меньшую токсическую нагрузку на клетки печени из очага воспаления, что, возможно, обусловлено также активацией других неспецифических защитных систем организма ВМИС с пониженным содержанием дейтерия, например ее иммуномодулирующим эффектом, ускоряющим локализацию возбудителя с помощью механизмов клеточного иммунитета.

При изучении состояния процессов СРО в гомогенатах почек были получены менее выраженные изменения у крыс с моделированным ОС, хотя они и достоверно были повышены во II (на 22,9 %, P<0,05) и в III группе (на 18,4 %, P<0,05) в сравнении с контрольными значениями. При этом достоверных отличий в обеих опытных группах зафиксировано не было, что может быть связано с меньшим специфическим влиянием ВМИС с пониженным содержанием дейтерия на эндогенную АОС почек, или меньшей способностью низко- и среднемолекулярных гидрофильных токсических субстанций активировать свободнорадикальные процессы в ткани почек. Известно, что некоторые из них (например, мочевины, олигопептиды, мочевины) могут проявлять и антиоксидантный эффект, участвуя в перехвате свободных радикалов, что снижает их содержание в органах выделительной системы [9].

Изменения в крови были более значимы, что связано с интегрирующей ее функцией

как биологической жидкости, отражающей весь спектр изменений, происходящих в организме. При исследовании плазмы крови отмечено значительное снижение ее АОА у крыс в II группы (на 23,9 %,  $P < 0,05$ ), в то время как в III группе было отмечено гораздо меньшее снижение АОА и ее показатели достоверно превышали аналогичные значения в III группе (на 19,9 %,  $P < 0,05$ ). Подобные изменения характеризуют снижение потенциала эндогенной АОС, прежде всего ее низкомолекулярного звена, во всем организме, что может приводить к развитию различных повторных патологических процессов и осложнений. В свою очередь уровень СРО в крови крыс II и III групп был достоверно ( $P < 0,05$ ) повышен в сравнении с контролем на 53,7 и 36,7 % соответственно, что указывает на выраженную активацию прооксидантного звена, которое приводит к истощению низкомолекулярных антиоксидантных факторов и развитию ОС. Менее выраженные изменения прооксидантных показателей наблюдались у животных III группы, что можно объяснить меньшей токсической нагрузкой на их системы неспецифической защиты, вследствие более быстрого обезвреживания в печени эндогенных токсических субстанций и иммуномодулирующего действия ВМИС с пониженным содержанием дейтерия, уменьшающего воспалительные изменения у животных.

Все перечисленные выше многообразные эффекты, связанные с воздействием на организм крыс ВМИС с пониженным содержанием дейтерия можно объяснить с помощью ряда механизмов, реализуемых *in vivo* на молекулярном и клеточном уровнях. Так, при потреблении ВМИС с пониженным содержанием дейтерия в клетках происходят реакции обмена  $H_2O$  на  $D_2O$  и  $HDO$ , а также быстрый  $H \pm D$  обмен в гидроксильных, сульфгидрильных и аминогруппах всех органических соединений, включая белки, нуклеиновые кислоты, липиды, сахара, что может оказывать влияние на состояние низкомолекулярного звена АОС, одними из основ-

ных факторов которого являются тиоловые (-SH) и гидроксильные (-OH) группы. Кроме того, присутствие дейтерия в биологических системах приводит к изменениям структуры и свойствам нуклеиновых кислот и белков при образовании наиболее важных для структуры макромолекулы динамических короткоживущих водородных (дейтериевых) связей, что может снижать активность ферментов антирадикальной защиты (каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы), уменьшая тем самым антиоксидантный потенциал организма. В свою очередь ВМИС с пониженным содержанием дейтерия, снижая содержание дейтерия в тканях, восстанавливает работу ферментного звена АОС – как за счет непосредственного взаимодействия с -OH или -SH-группами в активных центрах, так и путем активации процессов транскрипции за счет изменения колебательных моментов в цепях молекул нуклеиновых кислот и энергетического облегчения их взаимодействия с ферментами, обеспечивающими считывание генетического кода. Также при высоком содержании дейтерия нарушается транспорт ионов в клеточной мембране и увеличивается сопротивление биомембраны, которое особенно негативно сказывается на процессах ее возбудимости [8]. Поэтому использование ВМИС с пониженным содержанием дейтерия нивелирует эти отрицательные факторы и позволяет снизить вязкость мембран, повысить проницаемость для ионов, улучшить передачу сигналов первичных и вторичных мессенджеров, что восстанавливает адекватный энергообмен в тканях и снижает прооксидантную нагрузку на клеточные структуры. В данном случае эффекты ВМИС будут подобны другим (например, гормонам) косвенным антиоксидантам нашего организма.

Таким образом, следует отметить, что в естественных условиях наблюдается отсутствие изменений изотопного состава плазмы крови при моделировании *in vivo* окислительного стресса. В тоже время при использова-

нии ВМИС с пониженным содержанием дейтерия в плазме крови происходит достоверное снижение концентрации дейтерия, которое продолжается до значений в 90–100 млн<sup>-1</sup>, в дальнейшем практически не изменяющихся. При этом ВМИС с пониженным содержанием дейтерия оказывает влияние на прооксидантно-антиоксидантную систему организма, снижая интенсивность СРО и восстанавливая потенциал эндогенной АОС. Наибольший прямой и косвенный антиоксидантный эффект ВМИС наблюдается в плазме крови и в гепатоцитах, тогда как интенсивность свободнорадикальных процессов выделительной системы изменяется менее существенно при введении такой воды в пищевой рацион. Все это позволяет рассматривать ВМИС как перспективное вещество для нутриционной коррекции дисбаланса прооксидантно-антиоксидантной системы в организме.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (11-04-96523-р\_юг\_ц), государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации, проект № 4.1755.2011.*

**A.A. Basov, M.G. Baryshev, S.S. Jimak, I.M. Bykov, R.I. Sepiashvili, I.I. Pavlyuchenko**

#### **THE EFFECT OF CONSUMPTION OF WATER WITH MODIFIED ISOTOPE CONTENT ON THE PARAMETERS OF FREE RADICAL OXIDATION IN VIVO.**

With the use of nuclear magnetic resonance we investigated the effect of consumption of water with the modified isotope content on the composition of deuterium in the blood, assessed the state of pro-oxidant-antioxidant system in the blood and lyophilized tissues (liver, kidneys) under prolonged oxidative stress. Possible mechanisms of direct and indirect antioxidant effects of the water with modified isotope content and the perspectives of its use for nutritional correction of abnormalities of oxidative metabolism during special physiological conditions and in clinical practice are discussed.

*Kuban Medical University, Krasnodar, Russia*

*Kuban National University, Krasnodar, Russia*

*South Scientific Center RAS, the laboratory of "Problems of natural and new materials" Rostov-on-Don, Russia*

*Institute of Immunophysiology, Moscow, Russia.*

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Ажипа Я.И. Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса. – М.: Наука, 1983. – 528 с.
2. Басов А.А., Быков И.М., Федосов С.Р., Малышко В.В. «Способ хирургического моделирования окислительного стресса у лабораторных животных». Положительное решение о выдаче патента на изобретение по заявке № 2011100352/14 (000483) от 11.01.2011.
3. Басов А.А., Павлюченко И.И., Плаксин А.М., Федосов С.Р. Использование аналогово-цифрового преобразователя в составе системы сбора и обработки информации с хемилюминестером LT-1 //Вестн. новых мед. технологий. – 2003. – 10, № 4. – С. 67–68.
4. Бахвалов Н.С., Жидков Н.П., Кобельков Г.М. Численные методы. – М.: Физматлит, 2001. – 630 с.
5. Боровик Е.С, Еременко В.В., Мильнер А.С. Лекции по магнетизму. – М.: Физматлит, 2005. – 512 с.
6. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В., Измайлов Д.Ю. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов //Биофизика. – 2011. – 56, вып. 6. – С.1081–1090.
7. Колесова О.Е., Помыткин И.А. Влияние естественной концентрации тяжелых изотопов воды на скорость генерации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> митохондриями // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2006. – №11. – С.514–516.
8. Лобышев В.Н., Калинин Л.П. Изотопные эффекты D<sub>2</sub>O в биологических системах. – М.: Наука, 1978. – 215 с.
9. Мирхайдаров А.Р. Исследование хемилюминесценции крови и мочи у больных в критических состояниях // Материалы нац. научн.-практ. конф. с международ. участием «Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека». – Смоленск, 2001. – С.212–214.
10. Павлюченко И.И., Басов А.А., Федосов С.Р. Система лабораторной диагностики окислительного стресса. Пат. на полезную модель № 54787. – Заявл. 19.01.2006; опубл. 27.07.2006. – Б.21.
11. Павлюченко И.И., Федосов С.Р., Басов А.А. Программа регистрации сигналов хемилюминестера LT-1. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2006611562. – Заявл. № 2006610783 от 16.03.2006.
12. Пат. 2438765 Российская Федерация, МПК В01Д 59/40 (2006.01). Способ получения биологически активной питьевой воды с пониженным содержанием дейтерия [Текст] / Фролов В.Ю., Барышев М.Г., Болотин С.Н., Джимаков С.С.; заявители и патентообладатели государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный университет» (RU) – № 2010121324/05; заявл. 25.05.2010; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 7 с.
13. Пат. 2438766 Российская Федерация, МПК В01Д 59/40 (2006.01). Способ получения биологически активной питьевой воды с пониженным содержанием дейтерия [Текст] / Фролов В.Ю., Барышев М.Г., Ломакина Л.В.,

- Джимак С.С.; заявители и патентообладатели Учреждение Российской академии наук Южный научный центр РАН (RU), государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный университет» (RU) – 2010121326/05; заявл. 25.05.2010; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 7 с.
14. Пулатова М.К., Рихирева Г.Т., Куроптева З.В. Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии. – М.: Энергоатомиздат, 1989. – 232 с.
  15. Раков Д.В. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия и кислорода  $^{18}\text{O}$  на развитие лучевых повреждений после гамма-облучения //Авиакосм. и экол. медицина. – 2007. – **41**, № 3. – С.36–39.
  16. Раков Д.В., Ерофеева Л.М., Григоренко Д.Е. Влияние воды с пониженным содержанием тяжелого стабильного изотопа водорода дейтерия и кислорода  $^{18}\text{O}$  на развитие лучевых повреждений при гамма - облучении в низкой дозе //Радиац. биология. Радиоэкология. –2006. – **46**, №4. – С.475–479.
  17. Яшин А.Я. Инъекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках // Рос. хим. журн. – 2008. – Т. LII, № 2. – С.130–135.
  18. Bild W., Năstăsă V., Haulică I. In vivo and in vitro research on the biological effects of deuterium-depleted water: Influence of deuterium-depleted water on cultured cell growth //Rom. J. Physiol. – 2004. – № 41(1–2). – P.53–67.
  19. Bild W., Stefanescu I., Haulica I. Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium-depleted water // Rom. J. Physiol. – 1999. – № **36** (3–4). – P.205–218.
  20. Feng-song Cong, Ya-ru Zhang, Hong-cai Sheng, Zong-huaAo, Su-yi Zhang, Ju-yong Wang Deuterium-depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis //Exp. and Therap. med. – 2010. – №1. – P.277–283.
  21. Olariu L., Petcu M., Tulcan C., Chis-Buiga I., Pup M., Florin M., Brudiu I. Deuterium depleted water- antioxidant or prooxidant? //Luc. Stiinfif. Med. Veterin. – 2007. – Timisoara. – Vol. XL. – P.265–269.
  22. Olariu L., Petcu M., Cuna S. The role of deuterium depleted water (ddw) administration in blood deuterium concentration in Cr (VI) intoxicated rats // Luc. Ştiinţif. Med. Veterin. – (2), 2010. – Timișoara. Vol. XLIII. – P.193–196.
  23. Somlyai G. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells //FEBS Let. – 1993. – **317**, № 1,2. – P.1–4.

*ГБОУ ВПО «Кубан. гос. мед. ун-т» Минздравсоцразвития  
России, Краснодар;  
ФГБОУ ВПО Кубан. гос. ун-т, Краснодар, Россия;  
Южный науч. центр РАН, лаборатория «Проблем природных  
и новых материалов», Ростов-на-Дону, Россия;  
Ин-т иммунофизиологии, Москва, Россия  
E-mail: [IlyaMB@ksma.ru](mailto:IlyaMB@ksma.ru)*

*Материал поступил в  
редакцию 13.11.2012*



Г.І. Ходоровський, Р.Р. Дмитренко, О.В. Ясінська

## Роль ретино-гіпоталамо-епіфізарної системи в про- й антиоксидантних процесах у тканинах ясен статевозрілих самців білих щурів

*У досліджах на статевозрілих самцях білих щурів досліджували вплив функціонального стану ретино-гіпоталамо-епіфізарної системи на продукти пероксидного окиснення ліпідів: (дієнові кон'югати – ДК і малоновий діальдегід – МДА) й антиоксидантну систему (супероксиддисмутаза – СОД і каталаза – КТ) у тканинах ясен і крові за умов зміни активності пінеальної залози утриманням тварин при трьох режимах освітлення впродовж 14 днів: природного освітлення, постійного цілодобового освітлення («фізіологічна» епіфізектомія), постійної цілодобової темряви (підвищена функція епіфіза). Показниками стану тканин ясен були: ДК, МДА, СОД, КТ і інтегральні показники – СОД/КТ, (СОД+КТ)/(ДК+МДА). Установлено, що тканини ясен статевозрілих самців щурів активно реагують на зміну тривалості фотоперіоду перебігом ліпідної пероксидації та інтенсивністю активності антиоксидантних ферментів. Анти-–прооксидантний індекс за умов постійної темряви, менший, ніж за умов постійного освітлення. Різна тривалість фотоперіоду змінює інтенсивність вільнорадикального окиснення та активність антиоксидантного захисту на організменному (плазма крові) та ще більш виразно на органному (тканини ясен) рівнях. Вважаємо, що в тканинах ясен існує потужна система антиоксидантного захисту активність якої залежить від функціонального стану ретино-гіпоталамо-епіфізарної системи.*

*Ключові слова: продукти пероксидного окиснення, антиоксидантні ферменти, тканини ясен, фотоперіод.*

### ВСТУП

За останні роки інтерес до структур стінок ротової порожнини та їх функцій продовжує зростати. Це спричинено тим, що серед усіх захворювань пародонта гінгівіт і пародонтит становить 90–95 %. Ясна (гінгіва) є складовою пародонта. Епітеліальний шар розмежує внутрішнє середовище пародонта від зовнішнього, яким є ротова порожнина і є першою лінією захисту гомеостазу пародонта [5, 13]. Саме з цих міркувань ясна заслуговують на першочергову увагу і вивчення. Потрібні нові підходи до розуміння фізіології і патології як ясен, так і пародонта в цілому.

Провідні стоматологічні журнали США, Європи та Індії за 2011–2012 рр. містять дані наукових досліджень експериментального та

клінічного спрямування щодо зв'язків між тканинами ясен і ендокринною системою. Наведемо лише декілька з них. У клінічних умовах на добровольцях і в досліджах *in vitro* на тканинах ясен продемонстрована здатність епітелію і фібробластів власної пластинки ясен продукувати грелін, який на думку авторів має відношення до реагування вродженої імунної системи на патогенні збудники [11]. Виявлена нова не наднирковозалозна глюкокортикоїдна система, що існує в яснах: кератиноцити і фібробласти мають здатність до експресії рецепторів адренкортикотропного гормону (АКТГ), активувати кортизон в активний кортизол і синтезувати кортизол під дією АКТГ. Автори вважають, що ця нова глюкокортикоїдна система може відігравати

© Г.І. Ходоровський, Р.Р. Дмитренко, О.В. Ясінська

важливу роль у захисті пародонта та у виникненні його захворювань [14].

Широко обговорюється взаємозв'язок стану пародонта і жіночої статеві системи. В епітелії нормальних слинних залоз людини виявлені естрогенові рецептори  $\alpha$  і  $\beta$ , які відіграють опосередковано імуномодулювальну функцію. Ротова рідина (зовнішнє середовище ясен) містить естрогени [12]. Зі свого боку функціональний стан тканин ясен є важливим фактором підтримки нормальної активності статевої системи жінки. Встановлено, що структура та розповсюдженість захворювань тканин пародонта в жінок залежить не тільки від віку, а й від вмісту естрогенів у ротовій рідині [1]. Крім того, локальні зміни в тканинах пародонта, ортодонтичні маніпуляції, що викликають рух зубів, впливають на виділення релаксину в яєчниках, і на перебіг вагітності. Епідеміологічні дослідження, підтверджують наявність зв'язку між захворюваннями пародонта і патологією вагітності [15].

Разом із тим практично відсутні дослідження особливостей взаємовідносин тканин ясен і епіфіза. Водночас відомо, що мелатонінергічна система, основною ланкою якої є епіфіз, слугує не тільки для пристосування до дії фотоперіодичнозалежних несприятливих впливів зовнішнього середовища, але до неперіодичних небезпечних чинників, здійснюючи антистресовий та антиоксидантний захист організму [4].

Метою нашого дослідження було вивчення впливу функціонального стану епіфіза на прооксидантні процеси і антиоксидантну систему тканин ясен у статевозрілих самців білих щурів.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 22 білих лабораторних безпорідних щурах-самцях репродуктивного віку середньою масою 0,186 кг. Зміну активності пінеальної залози моделювали впродовж 14 днів утриманням тварин за умов трьох режимів освітлення: природного освітлення - інтактні щурі (група 1) постійного

цілодобового освітлення інтенсивністю 500 лк (стан «фізіологічної» пінеалектомії; група 2), постійної цілодобової повної темряви (стан підвищеної функціональної активності пінеальної залози; група 3).

Тканини ясен одразу після декапітації щурів забирали на холоді та гомогенізували наважки в 1,2 мл охолодженого тріс-буфера. Гомогенат використовували в біохімічному аналізі: визначення показників переоксидного окиснення ліпідів – ПОЛ (малонового діальдегіду – МДА та дієнових кон'югатів – ДК) [2, 8] та активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази – СОД та каталази – КТ) [6, 9]. Стан антиоксидантної системи у тканинах ясен оцінювали за активністю СОД та КТ. Вивчали співвідношення активностей СОД та КТ (СОД/КТ), зміни якого можуть свідчити про внутрішній дисбаланс ферментативної антиоксидантної системи та зниження загального антиоксидантного потенціалу органа чи організму в цілому [3]. За інтегральним показником співвідношення сумарної антиоксидантної активності ферментів СОД та КТ до сумарного вмісту продуктів ПОЛ: оцінювали про-антиоксидантний гомеостаз ясен (СОД+КТ)/(ДК+МДА), де СОД – абсолютні значення активності СОД у Од/хв · мг білка; КТ – абсолютні значення активності КТ у мкмоль/хв · мг білка; ДК – абсолютні значення вмісту ДК у нмоль/мг білка; МДА – абсолютні значення вмісту МДА у нмоль/мг білка.

Статистичну обробку результатів здійснювали за методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента.

Експерименти проведені з дотриманням Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень наведено в табл. 1.

За умов звичайного освітлення процеси ПОЛ (вміст ДК і МДА) і активність фермен-

Таблиця 1. Показники перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи у тканині ясен статевозрілих самців щурів за зміненого фотоперіоду (M±m)

Показник	Природне освітлення, група 1(n=8)	Постійне освітлення, група 2 (n=6)	Постійна темрява, група 3 (n=8)
Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка			
плазма	0,935±0,037	0,822±0,043*	1,606±0,105*,**
ясна	0,535±0,0343	0,782±0,0198*	0,369±0,0131*,**
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка			
плазма	0,397±0,055	0,302±0,018	0,652±0,027*,**
ясна	0,311±0,0183	0,488±0,006*	0,213±0,0045*,**
Супероксиддисмутаза, од/хв · мг білка			
плазма	7,022±0,344	7,400±0,940*	6,720±0,212
ясна	15,20±0,939	21,07±0,652*	13,38±0,981**
Каталаза, мкмоль/хв . мг білка			
плазма	4,331±0,640	1,998±0,219*	7,536±0,248*,**
ясна	6,117±0,324	19,34±0,583*	3,311±0,284*,**

Примітка. Тут і в табл. 2: \* вірогідно стосовно групи 1 (P<0,05); \*\* вірогідно стосовно групи 2 (P<0,05).

тів, які захищають клітини від великих концентрацій перексиду водню та індукуються великими концентраціями вільних радикалів – СОД і КТ були різними на системному (у плазмі крові), органному рівнях (у тканинах ясен). Сумарний вміст продуктів ПОЛ у плазмі крові виявився на 37 % вищим, ніж у тканинах ясен. Таким чином, вільнорадикальні перекисні процеси у плазмі крові більш виражені у порівнянні з тканинами ясен. Імовірно, це зумовлено потужнішим в яснах антиоксидантним захистом. Підтвердженням є той факт, що сумарна активність СОД і КТ у тканинах ясен (21,31) була майже в 2 рази вищою, ніж у плазмі крові (11,35). Анти-прооксидантний індекс (АПІ) у плазмі крові становить 8,594±0,622, у тканинах ясен – 25,22±0,121. Стоматологи вважають, що цей показник більш адекватно відображає стан ПОЛ й антиоксидантного захисту в організмі, ніж визначення вмісту МДА і КТ [7]. У нашому випадку АПІ в тканинах ясен майже

втричі вищий, ніж у плазмі крові (табл. 2).

Отже, у дорослих тварин за звичайних умов світлового дня антиоксидантна система у тканинах ясен утримує вільнорадикальний гомеостаз краще ніж, на системному рівні. Досліди з утриманням тварин за різної тривалості фотоперіоду показали, що його зміни досить помітно вплинули на показники про- й антиоксидантної системи як у плазмі крові, так і в тканинах ясен.

За умов постійного освітлення впродовж 2 тиж показники прооксидантних процесів (ДК, МА) у тканинах ясен зазнали змін і були вищими, ніж у тварин за умов природного освітлення. Одночасно на системному рівні сумарний вміст ДК і МА в плазмі крові тварин зменшився на 18,50 %.

Постійне освітлення суттєво вплинуло на стан антиоксидантної системи як у плазмі крові, так і в тканинах ясен тварин. Разом із тим характер змін цієї системи був різним на системному і органному рівнях. Так, у тка-

Таблиця 2. Інтегральні показники перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної систем організму статевозрілих самців щурів за зміненого фотоперіоду (M±m)

Показник	Природне освітлення, група 1 (n=8)	Постійне освітлення, група 2 (n=6)	Постійна темрява, група 3 (n=8)
Супероксиддисмутаза/каталаза			
плазма	1,744±0,239	4,083±0,644	0,900±0,060**
ясна	2,483±0,059	1,094±0,044*	4,266±0,729*,**
Супероксиддисмутаза і каталаза / дієнові кон'югати і малоновий діальдегід			
плазма	8,591±0,622	8,334±0,476	6,355±0,273
ясна	25,22±0,121	31,86±0,880*	28,65±1,223*,**

нинах ясен активність СОД була на 38,61 % більшою, КТ більше ніж у 3 рази щодо контрольних значень. Водночас активність цих ферментів на системному рівні була дещо іншою. Зокрема, у плазмі крові активність СОД помірно зростала (на 5,4%), а КТ знизилася більше ніж у 2 рази.

Зіставлення показників про- й антиоксидантних (АПІ) процесів у плазмі крові та тканинах ясен за умов постійного освітлення вказують на те, що під впливом тривалого світлового подразника (стресора) в тканинах ясен активність ендogenous антиоксидантів (АПІ – 31,86±0,880) значно переважала над процесом вільнорадикального окиснення макромолекул, у той час як у плазмі крові АПІ становить лише 8,334±0,476. Наведене є ще одним доказом різного ступеня реагування про- і антиоксидантних процесів на організменному (кров) і органному (ясна) рівнях.

Тварини третьої групи утримувалися в умовах 14-добової постійної темряви, тобто були в стані підвищеної функціональної активності епіфіза. За таких умов показники ПОЛ (ДК і МД) у плазмі крові були майже в 4 рази більшими, ніж у тканинах ясен. При цьому вміст МДА і ДК в яснах були значно меншими від значень у тварин як за умов природного, так і постійного освітлення. Активність антиоксидантної системи тканини ясен була високою, але дещо меншою, ніж за умов постійного освітлення. Вірогідно

мелатонінергічна система, активована темнотою, знижувала інтенсифікацію ліпідної пероксидації в тканинах ясен і адекватно стану ПОЛ утримувала рівень активності антиоксидантних ферментів. Підтвердженням цьому є і значення АПІ в тканинах ясен: 28,65±1,223 за умов темряви і 31,86±0,880 за умов постійного освітлення.

Отримані результати певною мірою узгоджуються із даними інших дослідників, щодо реагування ПОЛ і антиоксидантних ферментів переднього мозку щурів [4] та надниркових залоз [10] на фотоперіоди різної тривалості.

Таким чином, ретино-гіпоталамо-епіфізарна система синхронізує перебіг ліпідної пероксидації і активність антиоксидантних ферментів у тканинах ясен зі змінами тривалості фотоперіоду в зовнішньому середовищі. При цьому, найбільш вірогідно, мелатонін відіграє роль синхронізатора. У зв'язку із цим виникає питання щодо механізму його дії. Це може бути безпосередня дія на тканини ясен, в яких, в такому разі повинні бути мелатонінчутливі рецептори. Можливий інший механізм: опосередкована дія. У цьому разі мелатонін модулює активність нейромедіаторних систем головного мозку та всієї нейроендокринної системи, що забезпечує пристосування тканин ясен і всього організму до дії зовнішніх чинників, у тому числі змін тривалості фотоперіоду.

Вияснення зазначених механізмів потребує подальших досліджень.

## ВИСНОВКИ

1. Тканини ясен статевозрілих самців шурів активно реагують на зміну тривалості фотоперіоду перебігом ліпідної пероксидації та інтенсивністю активності антиоксидантних ферментів. Анти- – прооксидантний індекс за умов постійної темряви (підвищеної функції епіфіза) менший, ніж за умов постійного освітлення («фізіологічної» пінеалектомії).

2. Ретино-гіпоталамо-епіфізарна система змінює інтенсивність вільнорадикального окиснення та активність антиоксидантного захисту на організменному (плазма крові) та ще більш виразно на органному (тканини ясен) рівнях, що вказує на існування в тканинах ясен потужної антиоксидантної системи захисту.

**Г.И. Ходоровский, Р.Р. Дмитренко,  
Е.В. Ясинская**

## РОЛЬ РЕТИНО-ГИПОТАЛАМО-ЭПИФИЗАРНОЙ СИСТЕМЫ В ПРО-И АНТИОКСИДАТНЫХ ПРОЦЕССАХ В ТКАНЯХ ДЕСЕН ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМЦОВ БЕЛЫХ КРЫС

В опытах на половозрелых самцах белых крыс исследовали влияние функционального состояния ретино-гипоталамо-эпифизарной системы на продукты перекисного окисления липидов: (диеновые конъюгаты – ДК и малоновый диальдегид – МДА) и антиоксидантную систему (супероксиддисмутазы – СОД и каталазы – КТ) в условиях изменения активности пинеальной железы путем содержания животных при трех режимах освещения в течение 14 сут: естественного освещения (группа 1), постоянного круглосуточного освещения (группа 2), постоянной круглосуточной темноты (группа 3). Показателями состояния тканей десен были: ДК, МДА, СОД, КТ и интегральные показатели – СОД / КТ, (СОД+КТ)/(ДК+МДА). Установлено, что ткани десен половозрелых самцов крыс реагируют на изменение продолжительности фотопериода путем липидной пероксидации и интенсивностью активности антиоксидантных ферментов. Анти- – прооксидантний індекс в условиях постоянной темноты меньше, чем в условиях постоянного освещения. Ретино-гипоталамо-эпифизарная система изменяет интенсивность свободнорадикального окисления и активность антиоксидантной защиты на организменном (плазма крови) и еще более выражено на органном (ткани десен) уровнях, что свидетельствует о

существовании в тканях десен мощной антиоксидантной системы защиты.

Ключевые слова: продукты перекисного окисления липидов, антиоксидантные ферменты, ткани десен, фотопериод.

**G.I. Khodorovskiy, R.R. Dmitrenko, O.V. Yasinska**

## THE ROLE OF RETINAL-HYPOTALAMIC-PINEAL SYSTEM IN PRO- AND ANTIOXYDANT PROCESSES IN GINGIVAL TISSUES OF ADULT MALE ALBINO RATS

The aim of this study is to evaluate the effects of pineal gland functional state on the prooxydant processes and antioxidant system in the gingival tissues. Male rats were assigned into one of the following groups in accordance with the duration of photoperiod: 1) control – natural daylight; 2) permanent darkness for 14 days; 3) permanent light for 14 days. The following parameters were measured in gingival tissues and the blood serum: 1) prooxidant factors (dieneconjugates – DC and malonic dialdehyde – MD); 2) antioxidant enzymes (superoxide dismutase – SOD and catalase). The present findings indicate that the gingival tissue of rats reacts to the changes in the duration of photoperiod by peroxidation and activity of antioxidant enzymes. The antioxidant-prooxidant index under dark conditions (high function of the pineal gland) was lower than under condition of permanent light (“physiological” pinealectomy). Different durations of photoperiod change the intensity of free radical oxidation and the activity of antioxidant enzymes at the systemic level (blood serum) and much more at the organ level (tissues of gingiva). Our data suggest that the gingival tissues possess rather powerful protective antioxidant system, which depends on the functional state of the pineal gland.

Key words: prooxidant processes, antioxidant enzymes, gingival tissues, photoperiod.

*Bukovinian State Medical University, Chernivtsi.*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белоклицкая Г.Ф. Современный взгляд на классификации болезней пародонта // Совр. стоматология. – 2007. – № 3. – С.59–64.
2. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – №3. – С.33–36.
3. Гончар О.О., Гавенаускас Б.Л., Маньковська І.М. Вплив різних режимів інтервального гіпоксичного тренування на про- – антиоксидантний статус м'язової тканини шурів при адаптації до гіпоксії навантаження // Експерим. та клін. біохімія. – 2005. – 29, №1. – С.7–15.
4. Заморский И.И. Участие мелатонинэргической системы организма в механизмах немедленной адаптации к острой гипоксии // Клін. та експерим. патологія. – 2012. – XI, №3 (41), Ч.1. – С.74–76.

5. Ковач И.В., Воскресенский О.Н. Физиологическая резистентность тканей полости рта // Вісник стоматології. – № 5. – 2007. – С.2–6.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С.16–18.
7. Левицкий А.П., Макаренко О.А., Зеленіна Ю.В. Антиоксидантна і протизапальна дія інгібітора еластази при експериментальному пародонтиті // Одеськ. мед. журн. – 2007. – № 4 (102). – С.26–29.
8. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. – В кн.: Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
9. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – №11. – С.678–681.
10. Ясінська О.В. Особливості фотоперіодичних змін проксидантних процесів, антиоксидантної системи та надниркових залоз за умов екзогенної гіпоксії: Автореф. дис. ... канд.мед.наук. – Вінниця, 2006. – 21 с.
11. Ohtal K., Laborde N.J., Kajjiya M., Shin J., Zhu T., Thondukulam A.K., Min C., Kamata N., Karimbux N.Y., Stashnko P., Kawai T. Expression and possible immunoregulatory function of ghrelin in oral epithelium // J. Dents. Res. – 2011, **90**. – P.1286–1292.
12. Tsinti M., Kassi E., Korkolopoulou P. Functional estrogen receptors alpha and beta are expressed in normal human salivary gland epithelium and apparently mediate immunomodulatory effects // Eur. J. Oral. Sci. – 2009. – **117**, I. – 5. – P. 498–505.
13. Marinho Del Santo Periodontium and orthodontic implications: Biological basics // Int. J. Stomat. Res. – 2012. – **1** (2). – P. 6–16.
14. Cirillo N., Hassonal Y., Pignatelli M., Gasparoto T.H., Morgan D.J., Prime S.S. Characterization of a novel oral glucocorticoid system and its possible role in disease // J. Dent. Res. – 2012. – **91**. – P. 97–103.
15. Yang S.Y., Ko N.M., Kang J.H., Moon Y.H., Yoo H.I., Jung N.R., Kim M. S., Cho J.H., Oh W.M., Kim S.H. Relaxin is up-regulated in the rat ovary by orthodontic tooth movement // Eur J. Oral. Sci. – 2011. – **119**. – P.115–120.

*Буковин. держ. мед. ун-т, Чернівці*  
*E-mail: physidogy@bsmu.edu.ua*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 01.08.2013*

С.Б. Дроздовська, О.М. Лисенко, В.Є. Досенко, В.М. Ільїн, О.О.Мойбенко

## T<sup>-786</sup>→C-поліморфізм промотора гена ендотеліальної NO-синтази та фізична працездатність у спорті

*Враховуючи значний вплив T<sup>-786</sup>→C-поліморфізму гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS) на процеси адаптації до фізичних навантажень, досліджено вплив цього поліморфізму на фізичну працездатність у спорті та встановлена можливість його використання як маркера схильності до занять спортом. Проаналізовано ДНК 516 осіб, з них 195 кваліфікованих спортсменів та 321 осіб, які не мають регулярного стажу занять спортом. Досліджено частоту генотипів та алелей за T<sup>-786</sup>→C поліморфізмом гена eNOS у групах спортсменів різних видів спорту, вивчено особливості розподілу генотипів та алелей серед спортсменів та осіб, які не займаються спортом. Встановлено, що частота T-алеля в групі спортсменів на 6,4% ( $P_{\chi^2}=0,03$ ) вища, ніж у контрольній групі. Виявлено асоціацію T-алеля T<sup>-786</sup>→C-поліморфізму гена eNOS зі схильністю до занять видами спорту, в яких результативність виступів вимагає розвитку швидкості та сили. В групі спортсменів швидкісно-силових видів спорту частота T-алеля на 12 % ( $P_{\chi^2}=0,002$ ) вища, ніж у контрольній групі і на 10 % ( $P_{\chi^2}=0,004$ ), ніж у групі видів спорту з переважним розвитком витривалості. Встановлено, що T<sup>-786</sup>→C-поліморфізм гена eNOS впливає на потужність та економічність функціонування кардіореспіраторної системи спортсменів під час фізичних навантажень.*

*Ключові слова: ендотеліальна NO-синтаза, алельний поліморфізм, м'язова діяльність, фізичні навантаження, спадкова схильність.*

### ВСТУП

Наявність різних генетичних варіантів гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS) на сучасному етапі пов'язують із індивідуальними особливостями функціонування NO-синтазної системи в цілому та успішності адаптації організму як до гіпоксії, так і до фізичних навантажень [8, 9, 13, 26]. Ген eNOS кодує її синтез, що сприяє утворенню одного з найбільш важливих газотрансмітерів, який бере участь у багатьох фізіологічних і патофізіологічних процесах NO (оксиду азоту). Активація синтезу цього медіатора є одним з перших механізмів адаптації серцево-судинної системи до різних типів гіпоксії, що дає змогу зберігати оптимальне забезпечення організму киснем [6, 8] та відіграє важливу роль у забезпеченні довгострокової його адаптації до фізичних навантажень значного обсягу й інтенсивності [2, 9, 26]. Зростає кількість

© С.Б. Дроздовська, О.М. Лисенко, В.Є. Досенко, В.М. Ільїн, О.О.Мойбенко

доказів, які підтверджують модулювальний ефект NO у споживанні вуглеводів [10, 24, 28] та кисню [1], його вплив на базальний мітохондріальний біогенез у скелетній м'язовій тканині [24, 30, 31]. Індукція синтезу NO клітинами за допомогою фізичних навантажень вважається інсуліннезалежним додатковим способом доставки глюкози у клітину [5]. Особливості метаболізму вуглеводів, мітохондріального біогенезу, кисневих режимів, адаптація до гіпоксичних станів, звісно, є важливими факторами, що впливають на фізичну працездатність у спорті.

Більше досліджена роль NO у формуванні відповіді організму на гіпоксію. Як гостра, так і хронічна гіпоксія викликають збільшення стабільних метаболітів NO у крові людей. Активацію синтезу монооксиду азоту у високогір'ї вважають одним з перших механізмів адаптації серцево-судинної системи до гіпоксії, що дає змогу задовольняти кисневий

запит при зниженні парціального тиску кисню у вдихуваному повітрі [3, 7].

З трьох ізоформ ферменту NOS, що каталізує синтез NO, тільки нейрональна nNOS та eNOS індукуються м'язовою діяльністю. Активність NOS під час фізичних вправ збільшується у скелетних м'язах [26]. Як eNOS, так і nNOS, експресуються в волокнах скелетної м'язової тканини, з переважанням eNOS в оксидативних волокнах, тоді як nNOS більше у гліколітичних волокнах [16, 20–22].

Ген eNOS розміщений на хромосомі 7q35-36 і складається з 26 екзонів і 25 інтронів. Індивідуальні особливості функціонування системи NOS на сучасному етапі пов'язують із наявністю різних генетичних варіантів, тобто алельного поліморфізму цього гена. Генетичні його варіанти пов'язують з розвитком артеріальної гіпертензії, атеросклерозу, цукрового діабету та інших «хвороб цивілізації» [11, 15].

Серед 713 алельних варіантів цього гена (за даними бази NCBI), 517 (за даними бази Genecards) як маркери схильності до високої фізичної працездатності вивчалися: трансверсія T<sup>-786</sup>→C у промоторі гена eNOS, трансверсія G<sup>894</sup>→T в 7-му екзоні, що призводить до заміни глутаміну на аспарагін у 298-му положенні білка eNOS та тандемні повтори варіабельної кількості 4-го інтрону (4b/4a) [29]. Одне з найважливіших значень у механізмах адаптації до фізичних навантажень серед усіх поліморфізмів гена eNOS має алельний поліморфізм промотору цього гена. У експерименті було показано, що наявність алеля C у положенні (-786) промотору гена eNOS призводить до зниження його активності, а недостатня кількість eNOS, яка при цьому виникає, є причиною зменшення синтезу та вивільнення оксиду азоту та дисфункції ендотелію [4, 12].

T<sup>-786</sup>→C-поліморфізм може коригувати ефект тренування на ендотеліальну дисфункцію [13, 14]. Адаптація до фізичних навантажень посилює вазодилатацію у відповідь на фізичні вправи у осіб з генотипом T/T [25].

У жінок з цим генотипом у постменопаузному періоді значно зменшувався вміст холестеролу у плазмі у відповідь на 8-тижневе тренування [14].

Враховуючи вплив цього поліморфізму на адаптацію до фізичних навантажень, логічно припустити, що T<sup>-786</sup>→C-поліморфізму гена eNOS може зумовлювати спадкову схильність до занять спортом, тому мета дослідження – виявити вплив T<sup>-786</sup>→C-поліморфізму гена eNOS на фізичну працездатність у спорті та встановити можливість його використання як маркера схильності до занять спортом.

## МЕТОДИКА

Обстежено 516 осіб, з них 195 членів збірних команд України та 321 нетренована особа (контрольна група). Всі обстежені спортсмени залежно від характеру енергозабезпечення м'язової діяльності в обраному виді спорту були поділені на 3 групи: 1-ша – спортсмени, які спеціалізуються у дисциплінах спорту, що вимагають витривалості (n=82); 2-га – швидко-силових можливостей (n=90); 3-тя – витривалості та сили (n=23).

Реакції кардіореспіраторної системи (КРС) на фізичні навантаження переважно аеробного характеру енергозабезпечення досліджували в стандартизованих лабораторних умовах з використання методів ергометрії, спірометрії, газоаналізу та пульсометрії. Реакцію КРС за умов фізичних навантажень різного характеру вивчали за допомогою ергоспірометричного комплексу «MetaMax3B» (Німеччина). У реальному масштабі часу («breath by breath») визначали основні характеристики реакції дихальної системи: легенево-вентиляцію ( $V_E$ ), частоту дихання (Ft), дихальний об'єм ( $V_T$ ), концентрацію CO<sub>2</sub> та O<sub>2</sub> у видихуваному (FEO<sub>2</sub>, FECO<sub>2</sub>) повітрі, споживання O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>), виділення CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>), газобмінне відношення ( $VCO_2 \cdot VO_2^{-1}$ ), вентиляційні еквіваленти для O<sub>2</sub> ( $E_{QO_2} = V_E \cdot VO_2^{-1}$ ) і для CO<sub>2</sub> ( $E_{QCO_2} = V_E \cdot VCO_2^{-1}$ ), кисневий пульс («O<sub>2</sub>-пульс»= $VO_2 \cdot ЧСС^{-1}$ ) тощо. Враховуючи,



що вимірювання проводили у відкритій системі, показники зовнішнього дихання приведені до умов ВTPS, а газообміну – до умов STPD. Частоту серцевих скорочень (ЧСС, хв<sup>-1</sup>) реєстрували за допомогою приладу «Sport Tester Polar» (Фінляндія).

Потужність аеробних механізмів енергозабезпечення фізичної роботи характеризувалася досягнутим  $VO_{2max}$  і потужністю «критичної» роботи ( $W_{кр.}$ ) при виконанні роботи ступінчасто зростаючої потужності до моменту «відмови від роботи», а також потужністю роботи на рівні анаеробного порогу ( $W_{ПАНО}$ ). Тестові фізичні навантаження виконувалися на весловому ергометрі «Concept II» (США) та на тредмілі «Laufband» (Німеччина).

ДНК виділяли із букального епітелію за допомогою набору реактивів Diatom<sup>TM</sup> DNA Prep («Biocom», Росія). T<sup>-786</sup>→C-поліморфізму промотору гена eNOS визначали методом Real-time PCR. Реакційна суміш складалася з TaqMan® Fast Universal Master Mix (2x) (Applied Biosystem, США) 10мкл; Assay SNP NOS3 – 0,32 мкл; dH<sub>2</sub>O – 13, 98 мкл та 50–100 ng ДНК. Assay SNP NOS3 містила прямий (CCA CCA GGG CAT CAA GCT) та зворотний (GCA GGT CAG CAG AGA GAC TAG) праймери; зонди для мінорного VIC (TTC CCT GGC TGG CTG A) та мажорного FAM (CCT GGC CGG CTG A) алелей. ПЛР (real-time PCR) виконували з використанням приладу Applied Biosystems 2700, PerkinElmer, США.

Тестування проводили після дня відпочинку при стандартизованому режимі харчування та питного режиму. Спортсмени були обізнані про зміст тестів і дали згоду на їх проведення.

Статистичний аналіз результатів проведено за допомогою програмного пакета SPSS ver.17.0. Для оцінки зв'язку між поліморфізмом гена та особливостями реакцій КРС на фізичні навантаження був виконаний метод множинного регресійного аналізу, в результаті якого отримана лінійна відносно незалежних параметрів моделі поліноміаль-

ного вигляду. Вірогідність відмінностей у розподілі вибірок визначали за критерієм  $\chi^2$ . Значення  $P < 0,05$  вважали вірогідним.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Частота генотипів за цим поліморфізмом у контрольній групі за нашими результатами становить: 43,3 % Т/Т-генотип, 45,8 % Т/С-генотип, 10,9 % С/С-генотип (табл. 1). Розподіл алейних варіантів поліморфізму такого гена відповідає рівновазі Харді–Вайнберга ( $P_{\chi^2} = 0,9$ ). Найбільш поширеним є гетерозиготний Т/С-генотип. Порівняльний аналіз наших результатів з даними літератури свідчить, що хоча частота гомозиготного С/С-генотипу в українській популяції значно нижча порівняно з іспанською та англійською популяціями [19, 27], за частотою алеля С українське населення не відрізняється від інших вибірок [17, 19].

Загальна вибірка спортсменів вірогідно відрізняється за розподілом від контрольної групи: частота Т/Т-генотипу на 11,6 % вища, а Т/С-генотипу на 10,4 % нижче, ніж у контролі ( $P_{\chi^2} = 0,035$ ). Частота Т-алеля на 6,4 % вища в вибірці спортсменів ( $P_{\chi^2} = 0,03$ ).

За розподілом алейних варіантів T<sup>-786</sup>→C-поліморфізму промотору гена eNOS група спортсменів, які спеціалізуються в видах спорту з переважним розвитком витривалості, вірогідно не відрізняється від контролю.

Спортсмени швидкісно-силових видів спорту та видів спорту, що потребують поєданого розвитку сили та витривалості, за розподілом генотипів вірогідно відрізняються від контролю ( $P_{\chi^2} = 0,003$  та  $P_{\chi^2} = 0,011$  відповідно). У спортсменів швидкісно-силових видів спорту частота Т-алеля на 12 % ( $P_{\chi^2} = 0,002$ ) вища, ніж у контролі і на 10 % ( $P_{\chi^2} = 0,004$ ), ніж в групі видів спорту на витривалість. Частота генотипу Т/Т у спортсменів швидкісно-силових видів вища на 20 %, а у спортсменів змішаних видів – на 13,2 %, тоді як частота С/С-генотипу у спортсменів швидкісно-силових видів значно менша, ніж у контрольній групі, що дає змогу зробити

Таблиця 1. Частота алельних варіантів T<sup>-786</sup>→C-поліморфізму промотору гена eNOS серед спортсменів різних видів спорту (n=516)

Генотип	Спортсмени, які спеціалізуються в видах спорту						Всі спортсмени (n=195)		Контрольна група (n=321)	
	на витривалість (n=82)		швидкісно-силових (n=90)		що вимагають поєднання витривалості та сили (n=23)					
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
T/T	37	45,1	57	63,3	13	56,5	107	54,9	139	43,3
T/C	38	46,3	27	30,0	4	17,4	69	35,4	147	45,8
C/C	7	8,5	6	6,7	6	26,1	19	9,7	35	10,9
Частота T-алеля	0,68		0,78		0,65		0,73		0,66	
Частота C-алеля	0,32		0,22		0,35		0,27		0,34	
P <sub>1</sub>	0,82		0,003*		0,011*		0,035*		1	
P <sub>2</sub>	0,61		0,002*		0,89		0,03*		-	
P <sub>3</sub>			0,05		-		-		-	

P<sub>1</sub> – статистична вірогідність у розподілі генотипів у порівнянні з контрольною групою, P<0,05; P<sub>2</sub> – алелей у порівнянні з контрольною групою, P<0,05; P<sub>3</sub> – генотипів у порівнянні з видами спорту на витривалість, \*P<0,05 вірогідні відмінності за  $\chi^2$ -критерієм.

припущення про лімітуючу роль цього генотипу для розвитку високої фізичної працездатності спортсменів цих видів спорту.

Отже, результати дають можливість стверджувати, що T-алель цього поліморфізму кількісно переважає у спортсменів швидкісно-силових видів спорту й асоційована з успішністю у цих видах. Тому T-алель гена може вважатися маркером схильності до розвитку швидкісно-силових можливостей.

Враховуючи модулювальний вплив NO на процеси споживання кисню під час фізичних навантажень [24], його потужний вазодилатційний ефект і вплив T<sup>-786</sup>→C-поліморфізму промотору гена eNOS на його рівень можна припустити, що T-алель, зумовлюючи високий вміст NO в організмі, підвищує його адаптаційну здатність до фізичної роботи швидкісно-силового характеру.

Основні тенденції впливу T<sup>-786</sup>→C-поліморфізму промотору гена eNOS на спортивну працездатність описані Gómez-Gallego та співавт. [18], де доводиться, що T-алель

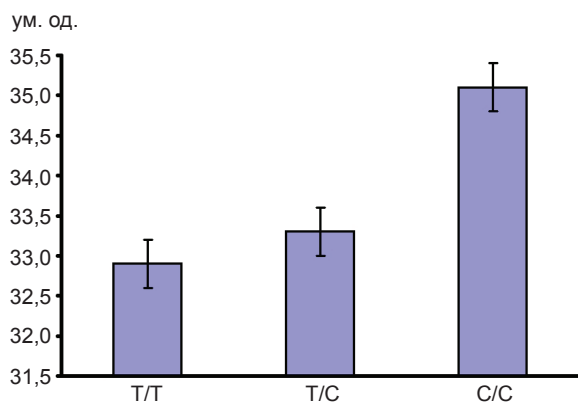
цього поліморфізму кількісно переважає у спортсменів швидкісно-силових видів спорту і асоційований з успішністю у цих видах спортивних спеціалізацій, що підтверджується результатами нашої роботи. Крім того, в наших дослідженнях, так само, як і у вищезгаданих, немає вірогідної різниці між вибірками спортсменів, які спеціалізуються в видах спорту на витривалість та в контрольній групі. Це підтверджує, що T-алель гена може вважатися маркером схильності до розвитку швидкості та сили.

Для перевірки вірогідності нашої гіпотези та доведення фізіологічної релевантності розглянутого поліморфізму ми дослідили його вплив на аеробну продуктивність та характер реакцій КРС під час фізичних навантажень. При моделюванні залежності VO<sub>2max</sub> від комплексу поліморфізмів генів було встановлено, що наявність T/T-генотипу за T<sup>-786</sup>→C поліморфізмом гена eNOS у спортсменів високої кваліфікації сприяє досягненню високих значень VO<sub>2max</sub>. Поєднання цих двох

факторів пояснює 9,7 % фенотипної дисперсії максимального споживання  $O_2$ .

Для того, щоб уникнути впливу факторів статі, виду спорту, спортивної кваліфікації на характеристики реакції КРС за умов фізичних навантажень була створена однорідна вибірка, що складалася зі спортсменів однієї статі (жіноча) та одного виду спорту (академічне веслування), а також одного віку і однакової спортивної кваліфікації майстрів спорту. Ці спортсменки багаторазово брали участь у дослідженнях (від 6 до 14 разів кожна) протягом 3 років. За результатами обстежень була побудована регресійна модель, що відображає взаємозв'язок поліморфізмів генів і  $VO_{2max}$ . Встановлено, що поодиноким фактором  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізму промотору гена eNOS спричиняє вірогідний вплив на максимальне споживання кисню і пояснює 35 % розсіювання  $VO_{2max}$  відносно маси тіла у цій вибірці.

Побудова множинних регресійних моделей для інших показників аеробних можливостей спортсменів, які займаються видами спорту з переважним розвитком витривалості, дали змогу виявити, що поліморфізм гена eNOS впливає на вентиляційний еквівалент за киснем (ум.од.;  $P=0,046$ ), що характеризує ефективність легеневої вентиляції (рисунок).



Вентиляційний еквівалент для  $O_2$  у спортсменів з різними генотипами за  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізмом гена eNOS. \* $P < 0,05$  порівняно зі спортсменами з генотипом T/T

Отримані результати дають змогу стверджувати, що наявність C-алеля  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізму гена eNOS у гомозиготному стані погіршує ефективність легеневої вентиляції при підвищенні інтенсивності фізичних навантажень. Результати, отримані нами добре пояснюються тим фактом, що C-алель сприяє зниженню активності гена eNOS, а недостатність кількості ендотеліальної NO-синтази, що при цьому виникає, є причиною зменшення синтезу і вивільнення оксиду азоту, а також і дисфункції ендотелію судин [3].

Порівняння реакцій КРС за умов фізичних навантажень у спортсменок з генотипом T/T та спортсменок-носіїв алеля C (генотипи T/C та C/C; табл.2) свідчить, що наявність алеля C призводить до більш низької аеробної продуктивності, меншої економічності функціонування КРС під час фізичної роботи, що виявляється у більш низькій потужності виконаної роботи (на 7,85 % менше, ніж у спортсменок з T/T-генотипом), при більш високих  $V_{E max}$  та  $VO_{2 max}$  (вищих на 7,14 та 6,31 % відповідно). При виконанні навантаження на рівні порогу анаеробного обміну (ПАНО) у цих спортсменок відзначався вищий рівень  $V_E$  на 16,9,  $VO_2$  на 6,3, ЧСС на 8,8 % ( $P=0,05$ ). При цьому спостерігався більш високий поріг анаеробного обміну ( $VO_2$  на рівні ПАНО у відсотках від  $VO_{2 max}$  на 4,97 %).

У спортсменів – носіїв C-алеля спостерігали незначні відмінності, що виявлялися у вищому рівні аеробної потужності (на 1,24 % є вищою потужність виконаної роботи, на 5 % –  $V_{E max}$ ), при зниженні економічності функціонування КРС. У осіб з T/C та C/C-генотипом  $EQO_2$  перевищує на 5 %,  $V_{E PAHO}$  на 6,07 %. У осіб з T/T-генотипом  $VO_{2 PAHO}$  було вищим на 4,2 %. Як бачимо, гендерні відмінності є незначними і вказують на вплив поліморфізму цього гена, хоча більш виражено він виявляється у жінок. Таким чином, зазначені факти підтверджують вплив наявності C-алеля на реакції КРС у спортсменів під час фізичних навантажень.

**Таблиця 2. Характеристики реакції кардіореспіраторної системи спортсменів різної статі, які спеціалізуються у видах спорту з переважним проявом витривалості, під час фізичного навантаження ступінчастозростаючої потужності до моменту вимушеної відмови від роботи (M±SE), (n=59)**

Показники	Спортсменки з T/T-генотипом (n=12)	Спортсменки з генотипами T/C і C/C (n=14)	Спортсмени з T/T-генотипом (n=14)	Спортсмени з генотипами T/C і C/C (n=19)
Максимальне споживання O <sub>2</sub>				
Максимальний рівень				
потужності роботи				
загальний, Вт	294,94±10,08	302,78±13,47	383,54±30,65	388,35±40,02
на 1 кг маси тіла, Вт·кг <sup>-1</sup>	4,37±0,20	4,08±0,17	4,39±0,47	4,43±0,54
легеневої вентиляції				
загальний, л·хв <sup>-1</sup>	113,34±6,31	121,43±4,04	164,68±27,64	173,29±38,31
на 1 кг маси тіла, л	1,66±0,05	1,70±0,05	1,87±0,24	1,95±0,30
споживання O <sub>2</sub> ,				
загальний, л·хв <sup>-1</sup>	3,39±0,12	3,61±0,11	5,05±0,58	5,06±0,54
на 1 кг маси тіла, мл·хв <sup>-1</sup> ·кг <sup>-1</sup>	50,38±2,17	51,16±1,92	57,40±7,20	57,64±6,22
виділення CO <sub>2</sub> ,				
загальний, л·хв <sup>-1</sup>	3,96±0,18	3,96±0,11	5,64±0,61	5,53±0,87
на 1 кг маси тіла, мл·хв <sup>-1</sup> ·кг <sup>-1</sup>	58,56±2,45	56,04±2,15	64,99±7,16	63,90±9,09
Частота серцевих скорочень, хв <sup>-1</sup>	185,51±5,28	189,08±1,80	190,44±6,86	189,44±6,13
Кисневий ефект серцевого скорочення, "O <sub>2</sub> -пульс", мл <sup>-1</sup>	18,18±0,64	19,26±0,66	26,46±3,31	26,90±3,30
Вентиляційний еквівалент для O <sub>2</sub>	32,78±1,01	33,13±0,88	32,42±3,67	33,99±5,01
Газообмінне відношення, VCO <sub>2</sub> /VO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1,16±0,03	1,11±0,05	1,12±0,08	1,09±0,14
Поріг анаеробного обміну (ПАНО)				
Потужність роботи				
загальний, Вт	219,23±10,35	231,99±7,03	302,94±39,17	305,81±56,00
на 1 кг маси тіла, Вт·кг <sup>-1</sup>	3,26±0,18	3,28±0,13	3,49±0,67	3,49±0,73
Рівень легеневої вентиляції				
загальний, л·хв <sup>-1</sup>	77,42±6,60	90,46±5,96*	121,87±27,12	129,75±39,97
на 1 кг маси тіла, л·хв <sup>-1</sup> ·кг <sup>-1</sup>	1,12±0,07	1,26±0,07	1,39±0,28	1,46±0,40
Рівень споживання O <sub>2</sub> ,				
загальний, л·хв <sup>-1</sup>	2,85±0,16	3,03±0,11	4,36±0,73	4,23±0,73
на 1 кг маси тіла, мл·хв <sup>-1</sup> ·кг <sup>-1</sup>	42,22±2,46	42,72±1,83	50,06±8,88	48,04±6,69
Частота серцевих скорочень, хв <sup>-1</sup>	162,42±7,28	176,82±2,49*	172,54±17,18	174,47±12,65
Рівень порогу анаеробного обміну як VO <sub>2</sub> ПАНО в % від VO <sub>2</sub> max, %	80,22±3,94	84,21±30,94	86,36±9,45	84,62±9,87

\*P&lt;0,05 вірогідно порівняно з T/T-генотипом.

## ВИСНОВКИ

1. Розподіл частот генотипів та алелей за  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізмом гена eNOS в групі кваліфікованих спортсменів відрізняється від розподілу серед осіб, які не займаються спортом. Частота T-алеля на 6,4 % вища в вбірці спортсменів ( $P_{\chi^2}=0,03$ ).

2. Групи спортсменів швидкісно-силових видів спорту та видів спорту, що потребують поєданого розвитку сили та витривалості, вірогідно відрізняються від контрольної групи вищою частотою генотипу T/T ( $P_{\chi^2}=0,003$  та  $P_{\chi^2}=0,011$  відповідно). Встановлено асоціацію T-алеля  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізму гена eNOS зі схильністю до занять видами спорту, в яких результативність виступів залежить від розвитку швидкості та сили.

3.  $T^{-786} \rightarrow C$  поліморфізм гена eNOS здійснює вплив як на показники аеробної потужності, так і економічності функціонування кардіореспіраторної системи спортсменів під час фізичних навантажень. Присутність C-алеля  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізму гена eNOS погіршує ефективність легеневої вентиляції при збільшенні інтенсивності фізичних навантажень.

4. Отримані результати дають змогу рекомендувати включення визначення  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізму гена eNOS до комплексної системи оцінки спадкової схильності до занять різними видами спорту.

**С.Б. Дроздовская, Е.Н. Лысенко, В.Е. Досенко, В.Н. Ильин, А.А. Мойбенко**

### **$T^{-786} \rightarrow C$ -ПОЛИМОРФИЗМ ПРОМОТОРА ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ И ФИЗИЧЕСКАЯ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ В СПОРТЕ**

Учитывая значительное влияние  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізма гена eNOS на процессы адаптации к физическим нагрузкам, исследовано влияние этого полиморфизма на физическую работоспособность в спорте и установлено возможность его использования в качестве маркера предрасположенности к занятиям спортом. Проанализировано ДНК 516 человек, из них 195 квалифицированных спортсменов и 321 человека, которые не имеют регулярного стажа занятий спортом. В работе исследована ча-

стота генотипов и аллелей  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізма гена eNOS у спортсменов различных видов спорта, изучены особенности распределения генотипов и аллелей среди спортсменов и лиц, не занимающихся спортом. Частота T-аллеля в группе спортсменов на 6,4% ( $p_{\chi^2}=0,03$ ) выше, чем в контрольной группе. Выявлена ассоциация T-аллеля  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізма гена eNOS со склонностью к занятиям видами спорта, в которых результативность выступлений зависит от развития скорости и силы. У спортсменов скоростно-силовых видов спорта частота T-аллеля на 12% ( $P_{\chi^2}=0,002$ ) выше, чем в контрольной группе и на 10% ( $P_{\chi^2}=0,004$ ), чем у спортсменов, которые занимаются видами спорта с преимущественным развитием выносливости. Установлено, что  $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізм гена eNOS оказывает влияние на мощность и экономичность функционирования кардиореспираторной системы спортсменов во время физических нагрузок.

Ключевые слова: эндотелиальная NO-синтаза, аллельный полиморфизм, мышечная деятельность, физические нагрузки, наследственная предрасположенность.

**S.B. Drozdovska, O.M. Lysenko, V.E. Dosenko, V.M. Ilyin, O.O.Moybenko**

### **$T^{-786} \rightarrow C$ -PROMOTER POLYMORPHISM OF THE ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE (ENOS) AND EXERCISE PERFORMANCE**

Given the significant impact of the  $T^{-786} \rightarrow C$ -polymorphism of the eNOS gene in the process of adaptation to physical stress, we aimed to investigate the effect of this polymorphism on physical performance in sportsmen and establish the possibility of its use as a marker of predisposition to the sport. DNA of 516 people, of which 195 qualified athletes and 321 people who had no experience of regular exercise was investigated. The frequency of genotypes and alleles of the  $T^{-786} \rightarrow C$ -polymorphism of the eNOS gene in groups of athletes of different sports, the distribution of genotypes and alleles among athletes and those who are not involved in sports were studied. T allele frequency in a group of athletes on 6.4% ( $r\chi^2 = 0.03$ ) than in control group. The association of the T allele of the  $T^{-786} \rightarrow C$ -polymorphism of the eNOS gene with a predisposition for speed and power was established. In the group of athletes in speed and power sports, the T-allele frequency was higher than that in the control group by 12% ( $r\chi^2 = 0.002$ ) and than in group endurance sports by 10% ( $r\chi^2 = 0.004$ ). We found that the  $T^{-786} \rightarrow C$ -polymorphism of the eNOS gene influence the power and efficiency of the functioning of the cardiorespiratory system of athletes during exercise.

Key words: endothelial NO-synthase, gene polymorphism, muscle activity, physical exercise, inherited predisposition

*National University of Physical Education and Sport of Ukraine, Kyiv;*

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Артюхов В.Г., Калаева Е.А., Путинцева О.В. Динамика оксигенации нативного и УФ-модифицированного гемоглобина человека в присутствии оксида азота // Физиология человека – 2004. – 30, № 2 – С. 110–116.
2. Богдановська Н.В., Свядох Г.М., Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Маліков М.В. Синтез оксиду азоту у період довгострокової адаптації до інтенсивної м'язової роботи у спортсменок // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №3. – С. 94–99.
3. Доломан Л.Б., Коцюруба А.В., Хромов А.С., Сагач В.Ф. Влияние высокогорной гипоксии на содержание стабильных метаболитов монооксида азота в крови человека // Нурохіа Med. J. – 2004. –12. №3-4.– С.56–59.
4. Досенко В.Є. Роль алельного поліморфізму генів ендотеліальної NO-синтази та протеасоми в патогенезі серцево-судинних захворювань: молекулярно-генетичні аспекти: Автореф. дис. ...д-ра мед. наук. – К., 2006. – 43 с.
5. Кравченко Н.А., Ярмыш Н.В. Регуляция экспрессии эндотелиальной NO-синтазы и дисфункция сосудистого эндотелия при сердечно-сосудистой патологии // Цитология и генетика. – 2008. – №4. – С.69–79.
6. Кургалюк Н.М. Оксид азота как фактор адаптационной защиты при гипоксии // Успехи физиол. наук. – 2002. – 33, № 4. – С. 65–79.
7. Максимович Н.Е. Переносимость гипоксической гипоксии при ишемии головного мозга у крыс на фоне использования модуляторов NO-синтаз // Нурохіа Med. J. – 2004. – 12, № 1-2. – С. 19–22.
8. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка. – 2008. – 520 с.
9. Bailey S.J., Vanhatalo A., Winyard P.G., Jones A.M. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: Its role in human exercise physiology // Europ. J. Sport Sci. – 2012. – 12, №4. – P.309–320.
10. Bradley S.J., Kingwell B.A., McConell G.K. Nitric oxide synthase inhibition reduces leg glucose uptake but not blood flow during dynamic exercise in humans //Diabetes.– 1999. – 48. – P.1815–1821.
11. Cruz-González I., Corral E., Sánchez-Ledesma M., Sánchez-Rodríguez, Martín-Luengo C., González-Sarmiento R. Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study // BMC Cardiovascular. Disorders. – 2009. – 9, №35 doi:10.1186/1471-2261-9-35
12. Doshi A.A., Ziolo M.T., Wang H., Burke E., Lesinski A., Binkley P. A promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with reduced mRNA and protein expression in failing human myocardium //Card. Fail. – 2010. – 16, №4. – P.314–319.
13. Erbs S., Baither Y., Linke A., Adams V., Shu Y., Lenk K., Gielen S., Dilz R., Schuler G., Hambrecht R. Promoter but not exon polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction // Arterioscler. Thromb. Vascular. Biol. – 2003. – 23. – P.1814–1819.
14. Esposti R.D., Sponton C.H.G., Malagrino P.A., Carvalho F.C., Peres E., Puga G.M., Novais I.P., Albuquerque D.M., Rodovalho C., Bacci M., Zanesco A. Influence of eNOS gene polymorphism on cardiometabolic parameters in response to physical training in postmenopausal women // Brazilian Journal of Medical. and Biol. Res. – 2011 – 44. – P.855–863.
15. Franks P. W., Luan J., Barroso I., Brage S., Gonzalez Sanchez J. L., Ekelund U., Serrano Rı'os M., Schafer A. J., O'Rahilly S., Wareham N. J. Variation in the eNOS Gene Modifies the Association Between Total Energy Expenditure and Glucose Intolerance // Diabetes. – 2005. – 54. – P. 2795–2801.
16. Hussain S.N., El-Dwairi Q., Abdul-Hussain M.N., Sakhal D. Expression of nitric oxide synthase isoforms in normal ventilatory and limb muscles //J. Appl. Physiol. – 1997.– 83. – P. 348–353.
17. Ghilardi G., Biondi M.L., DeMonti M., Bernini M., Turri O., Massaro F., Guagnellini E., Scorza R Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene // Clin. Chem. – 2002. – 48, № 7. – P.989–993.
18. Gómez-Gallego F., Ruiz J.R., Buxens A., Artieda M., Arteta D. The гена -786 T/C polymorphism of the NOS3 gene is associated with elite performance in power sports //Europ. J. Appl. Physiol. – 2009. – 107, № 5. – P. 565–569.
19. Jeerooburkhan N., Jones L.C., Bujac S., Cooper J.A., Miller G.J., Vallance P., Humphries S.E., Hingorani A.D. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease// Hypertension. – 2001. – 38. – P.1054–1061.
20. Kobzik L., Stringer B., Balligand J.L., Reid M.B., Stamler J.S. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships // Biochem. Biophys. Res. Com. – 1995. – 211. – P. 375–381.
21. Kapur S., Bedard S., Marcotte B., Cote C.H., Marette A. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action //Diabetes.– 1997. – 46. – P.1691–1700.
22. Lau K.S., Grange R.W., Isotani E., Sarelus I.H., Kamm K.E., Huang P.L., Stull J.T. nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle //Physiol. Genomics – 2000. – 2. – P. 21–27.
23. Le Gouill E., Jimenez M., Binnert C., Jayet P.Y., Thalmann S., Nicod P., Scherrer U., Vollenweider P. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knockout mice have defective mitochondrial b-oxidation //Diabetes. – 2007. – 56. – P. 2690–2696.

24. McConell G.K., Wadley G.D. Potential role nitric oxide in contraction-stimulated glucose uptake and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle // Proc. Austral. Physiol. Soc. – 2008. – 39. – P.69–74.
25. Negrao M.V., Alves C.R., Alves G.B., Pereira A.C., Dias R.G., Laterza M.C., Mota G.F., Oliveira E.M., Bassaneze V., Krieger J.E., Negrao C.E., Rondon M.U. Exercise training improves muscle vasodilatation in individuals with T786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene // Physiol Genomics.–2010. – 42A. – P. 71–77.
26. Roberts C.K., Barnard R.J., Jasman A., Balon T.W. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277. – P. E390–394.
27. Ruiz J.R., Arteta D., Buxens A., Artieda M., Gómez-Gallego F., Santiago C., Yvert T., Morán M., Lucia A. Can we identify a power-oriented polygenic profile // J. Appl. Physiol. – 2010. –108(3). – P. 561-566.
28. Wilkerson D.P., Campbell I.T., Jones A.M. Influence of nitric oxide synthase inhibition on pulmonary O2 uptake kinetics during supra-maximal exercise in humans // J. Physiol.– 2004. – 561, № 2. – P.623–635.
29. Wolfarth B., Rankinen T., Mühlbauer S., Ducke M., Rauramaa R., Boulay M.R., Pérusse L., Bouchard C. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and elite endurance athlete status: the Genathlete study // Scand. J. Med. Sci. Sports. – 2008.–18. – P.485–490.
30. Wadley G.D., McConell G.K. Effect of nitric oxide synthase inhibition on mitochondrial biogenesis in rat skeletal muscle // J. Appl. Physiol. – 2007. – 102. – P. 314–320.
31. Wadley G.D., Choate J., McConell G.K. NOS isoform-specific regulation of basal but not exercise-induced mitochondrial biogenesis in mouse skeletal muscle // J. Physiol. – 2007. – 585. – P. 253–262.

*Нац. ун-т фіз. виховання і спорту України, Київ;  
Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ  
E-mail: sdrozdovska@gmail.com*

*Матеріал надійшов до  
редакції 13.07.2013*

С.Ю. Ціпоренко

## Вплив імунокорекції на запальний процес уrogenітального тракту у чоловіків з безпліддям

*Досліджували концентрації металопротеїназ, про- та протизапальних цитокінів, маркерів активації лімфоцитів у сім'яній плазмі чоловіків з малосимптомними формами хронічного запалення уrogenітального тракту, ускладненого безпліддям. Встановлено зрушення цитокінового профілю, зниження концентрації металопротеїнази-2 ( $576,4 \pm 89,3$  нг/мл,  $P < 0,001$ ), хемокінів – фракталкіну ( $16,3 \pm 1,3$  нг/мл,  $P < 0,001$ ) і хемокінів, регульованих активацією, експресією і секрецією нормальних Т-клітин (РАНТЕС;  $12,7 \pm 1,0$  нг/мл,  $P < 0,001$ ), істотне збільшення вмісту інтерлейкіну (ІЛ)-8 ( $215,5 \pm 7,8$  нг/мл,  $P < 0,01$ ) та моноцитарного хемотаксичного фактора 1 ( $926,4 \pm 30,2$  нг/мл,  $P < 0,001$ ), збільшення індексу  $CD25^+/CD95^+$ , що вказує на порушення процесів апоптозу патологічних форм генеративних клітин і накопичення їх у спермі. Тривалий запальний процес у статевих органах супроводжується виснаженням локальної імунної системи, наслідком чого є розвиток інфертильності. Встановлено різноспрямовані зсуви співвідношення ІЛ-10/ІЛ-12: його збільшення відмічалось у групі осіб із підвищеним рівнем гіперголівчатих сперматозоїдів, а зменшення при мікросоматичному морфотипі сперматозоїдів. Отримані результати підкреслюють важливість мікрооточення у процесі дозрівання гамет. Показано, що включення алфагіну і гепатомаксу в комплекс імунореабілітації чоловіків з малосимптомними формами уrogenітальних інфекцій призводить до поліпшення субпопуляційного складу лейкоцитів сперми, до нормалізації концентрацій про-та протизапальних цитокінів, і, отже, до збільшення запліднюючого потенціалу.*

*Ключові слова:* чоловіче безпліддя, сперматозоїди, сім'яна плазма, металопротеїнази, цитокіновий профіль, маркери активації лімфоцитів.

### ВСТУП

Серед важливих напрямів сучасних наукових досліджень є вивчення системи протеолізу як особливої форми біологічної регуляції функцій організму. Остання активується в живих організмах під впливом мікробів, наслідком чого є утворення різноманітних біологічно активних речовин – ензимів, гормонів, пептидів, амінокислот тощо. Протеолітичні ензими, яким властива висока біологічна активність, беруть участь у функціонуванні різних органів і систем організму та в регуляції біологічних процесів. Останні не тільки здійснюють неспецифічний розпад білкових молекул, але й контролюють функції та системи організму, що реалізується в реакціях загального й обмеженого протеолізу. За сучасними уявленнями, саме ензими протеолізу

© С.Ю. Ціпоренко

підтримують рівновагу між загибеллю та деградацією клітин і їхнім відновленням [2]. У цих процесах беруть участь 4 класи протеолітичних ферментів – матриксні металопротеїнази, цистеїнові та серинові протеїнази, а також аспартатпротеїназа катепсин D [7]. Матричні металопротеїнази (ММП) – родина позаклітинних цинквмісних протеїназ. Сьогодні відомо близько 30 ММП, їхня роль у процесах морфогенезу, апоптозу, ремоделювання та резорбції тканин продовжує вивчатись [10, 17]. Існує п'ять типів ММП: колагенази (ММП-1, -8 та -13), желатинази (ММП-2 та -9), стромелізини (ММП-3, -10, -11), еластази (ММП-7, -12) та мембранний тип (МТ-ММП, ММП-14, -15, -16 та -17).

ММП секретуються як запальними, так і стромальними клітинами у відповідь на екзогенні стимули та прозапальні цитокіни:



фактор некрозу пухлин (ФНП)- $\alpha$ , інтерлейкін (ІЛ)-1 $\beta$ . Понижують секрецію ММП інтерферон (ІФН)- $\gamma$ , ІЛ-4 і ІЛ-10 [6].

Субстратом для желатиназ ММП-2 та ММП-9 є колаген I, IV, V, VII та X типів, еластин, фібронектин, ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-2, ІЛ-8, ІЛ-15, трансформуючий фактор росту (ТФР)- $\beta$ , хемокіни, ІФН- $\beta$ , розчинні форми рецепторів для низки інтерлейкінів тощо. Встановлено вплив ММП-3, ММП-8, ММП-13, ММП-14, ММП-28 на вміст хемокінів: фракталкіну, ІЛ-8, хемокіну регульованого активацією, експресією і секрецією нормальних Т-клітин (РАНТЕС) [8,15], що свідчить про їх участь у розвитку запального процесу. Активність ММП регулюється тканинними інгібіторами металопротеїназ (ТІМП) [5]. Досліджено роль ММП у функціонуванні чоловічої репродуктивної системи та у запліднюючій здатності сперми [11]. Продемонстровано підвищений вміст ММП-2 та ММП-9 у секреті передміхурової залози та сім'яників у чоловіків із гіперплазією простати [12]. Концентрації ММП-2 і ММП-9 та їх інгібіторів ТІМП-1 і ТІМП-2 вивчались у чоловічій спермі при різних формах патоспермії [4]. Вважається що ТІМП-1 є специфічним для ММП-9, а ТІМП-2 для ММП-2 [8]. Цілковим зрозуміло, що під час запального процесу в урогенітальному тракті чоловіків вміст цитокінів і біологічних активних речовин, що регулюють їх функціональну активність зазнають певних змін. У чоловіків з наявністю хронічної урогенітальної інфекції було зареєстровано суттєве зростання концентрації низки цитокінів – ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-13, ІЛ-15, ІЛ-17, ІЛ-23, ІФН- $\alpha$ , моноцитарного хемотаксичного фактора (МХФ) та меншою мірою – ІЛ-2, ІЛ-10, ІЛ-12, ІЛ-18, ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$  [14]. Підвищений вміст цих медіаторів запалення вказує на залучення імунних факторів для захисту чоловічого генітального тракту. Ці зміни більш вагомі при розвитку ускладнень, зокрема, інфертильності. Вивчення особливостей взаємодії цитокінів і металопротеїназ під час запалення в чолові-

чих геніталіях, очевидно, матиме не тільки діагностичне та терапевтичне значення але й, можливо, вирішуватиме питання збільшення запліднюючого потенціалу [10].

Комплексна медикаментозна протизапальна терапія при малосимптомних урогенітальних запальних процесах не завжди забезпечує стійкий терапевтичний ефект, оскільки її результати залежать від біологічних властивостей збудників, стану системи імунітету та природної резистентності пацієнта. Виходячи з цього, в сучасних умовах велика увага приділяється вивченню ефективності імуноактивних препаратів у лікуванні хворих з хронічною урогенітальною патологією.

Слід підкреслити, що ефективні методи імунокорекції чоловіків з хронічною урогенітальною інфекцією не розроблено. Тому нашу увагу привернули сучасні імуноактивні препарати алфагін (виробник «Гербіон», Пакистан) і гепатомакс (виробник «Будьте здорові», Україна) при імунокорекції пацієнтів з безсимптомними формами хронічної урогенітальної інфекції.

Метою роботи було дослідження в сім'яній плазмі чоловіків з хронічним запаленням урогенітального тракту (ХЗУТ) цитокінів про- та протизапальної дії, маркерів активації лімфоцитів CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>HLA-DR4<sup>+</sup> та CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, металопротеїназ ММП-2, ММП-9 та їх інгібіторів ТІМП-1, ТІМП-2 й патогенетичне обґрунтування використання імуноактивних препаратів алфагін та гепатомакс.

## МЕТОДИКА

Інфертильні чоловіки (58 осіб), які брали участь у дослідженні, отримували курс імунокорекції. При цьому 28 пацієнтам було призначено комбінований імуноактивний препарат алфагін по одній капсулі двічі на день упродовж місяця та гепатомакс по одній капсулі тричі на день, також упродовж одного місяця, а решта 30 пацієнтів прийма-

ли загальноприйняте лікування. Протокол дослідження було схвалено біоетичним комітетом Луганського державного медичного університету. Усі пацієнти дали письмову інформовану добровільну згоду на участь у дослідженні.

Критерієм відбору пацієнтів у дослідження була відсутність запальної лейкоцитарної реакції та патологічної мікрофлори в сечовидільному каналі, секреті передміхурової залози та сім'яників, а також у спермі. Тривалість безпліддя становила 3–6 років. Вік обстежених від 24 до 40 років. На початок обстеження пройшло більше ніж рік після завершення попереднього лікування.

В анамнезі всі пацієнти перенесли інфекції, що передаються статевим шляхом (хламідії, уреоплазми, мікоплазми, герпесвірусна інфекція I/II типу) від 1 до 6 років назад, результати клініко-лабораторного вивчення були підтверджені бактеріоскопічним, бактеріологічним, культуральним і ПЛР-методами.

Аналіз сперми проводили через півгодини після еякуляції та згідно з інструкцією ВООЗ [16]. Враховували концентрацію сперматозоїдів, рН сім'яної рідини, вміст лейкоцитів та їх популяцій (гранулоцити, макрофаги, лімфоцити). Пацієнтів із лейкоспермією не включали у дослідження. Для визначення морфології використовували фарбування за Папаніколау [13].

У сироватці крові та в сім'яній плазмі імунотерапевтичним методом на лабораторному оснащенні Sanofi diagnostic Pasteur (Франція) за допомогою сертифікованих в Україні тест-систем виробництва ProCon («Протеиновый контур», РФ) вивчали вміст таких цитокінів: ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ФНП- $\alpha$ . Концентрацію ІФН- $\gamma$  визначали, використовуючи сертифіковані в Україні тест-системи виробництва НПО «Диагностические системы» (РФ). Вміст цитокінів ІЛ-8 та МХФ-1 досліджували у сироватці крові та в плазмі сперми імунотерапевтичним методом за допомогою тест-системи «ИФА-БЕСТ» фірми ООО «Вектор-Бест», (РФ), вміст РАН-

ТЕС та фракталкіну – тест-системи фірми «RayBiotech, Inc.» (США). Концентрації цитокінів ІЛ-12 та ІЛ-18 у сироватці крові та в сім'яній плазмі визначали імунотерапевтичним методом за допомогою аналізатора «STAT-FAX-303 PLUS» (США) при довжині хвилі 492 нм. Для визначення вмісту лімфоцитів, які на своїй поверхні експресують рецептори функціональної активації клітин CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>HLA-DR4<sup>+</sup> (TRAIL-рецептор 1), використовували еритроцитарний діагностичний з моноклональними антитілами виробництва НВЦ «МедБио-Спектр» (РФ). Обчислювали співвідношення імунотерапевтичних індексів – ІЛ-2/ІЛ-4, ІЛ-10/ІЛ-12 та CD25<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup>. Вміст ММП-2, ММП-9, ТІМП-1 та ТІМП-2 визначали у плазмі сперми імунотерапевтичним методом за допомогою тест-системи Biotrak («Amersham int.», Великобританія).

Контрольні значення концентрацій усіх вищезазначених цитокінів отримано під час дослідження 24 фертильних чоловіків без клінічних ознак хвороби.

Статистичний аналіз проводили на персональному комп'ютері за допомогою пакета програми «MedStat» [1]. При цьому для перевірки показників на нормальний розподіл використовували критерій  $\chi^2$ . Обчислювали медіану, 25%-й квантиль, 75%-й квантиль, довірчі інтервали. Для порівняння показників використовували критерій  $\chi^2$ , двобічну критичну ділянку. Для аналізу наявності та сили зв'язку розраховували коефіцієнт парної кореляції Кендала –  $\tau$ . Проводили кількісну оцінку ефекту імунотерапії – обчислювали зниження абсолютного та відносного ризиків, а також кількість хворих, яких потрібно пролікувати.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що у плазмі сперми чоловіків із ХЗУТ концентрація ММП-2 достовірно знижувалася, кратність різниці була 2,9, вміст ММП-9, ТІМП-1 та ТІМП-2 не відрізнявся від контрольних значень (табл. 1).

**Таблиця 1. Вміст металопротеїназ (ММП-2, ММП-9) і тканинних інгібіторів металопротеїназ (ТІМП-1, ТІМП-2) у сім'яній плазмі чоловіків із хронічним запаленням уrogenітального тракту (ХЗУТ) (Me±m [95%-й довірчий інтервал])**

Показники, нг/мл	Норма	Чоловіки з ХЗУТ
ММП-2	1646,4±124,8 [1351,2;1967,4]	576,4±89,3* [351,3;767,6]
ММП-9	47,4±9,7 [21,2;77,4]	44,9±8,5 [29,1;67,7]
ТІМП-1	23478,3±675,4 [21751,2;24867,4]	27547,6±704,7 [25424,5;28667,6]
ТІМП-2	4538,2±358,5 [3851,2;5367,4]	4794,5±289,9 [4021,6;5167,8]

\*P < 0,001.

Результати дослідження цитокінового профілю свідчать (табл. 2), що в обстежуваних пацієнтів з безпліддям спостерігається достовірне збільшення в сім'яній плазмі концентрації ІЛ-8 (215,5±7,8 пг/мл, P<0,01), та МХФ (926,4±30,2 пг/мл, P<0,001).

Водночас у інфертильних чоловіків значно знижувалася в сім'яній плазмі концентрація ІЛ-1β, ІЛ-12, ІЛ-18. Концентрації ФНП-α, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ІФН-γ не перевищували відповідні середні значення здорових чоловіків. Причому концентрації усіх вищевказаних цитокінів у периферичній крові пацієнтів із ХЗУТ коливалися в межах контролю. Досить цікавим виявилось вивчення співвідношення ІЛ-10/ІЛ-12. У літературі зазначається, що його зменшення є ключовим моментом у пригніченні ефективності локального імунного захисту в нижніх відділах сечостатевого тракту, інгібіції клітинно-опосередкованої імунної відповіді та розвитку імуносупресії [18]. У нашому дослідженні спостерігалися різноспрямовані зсуви цього співвідношення у інфертильних чоловіків. Достовірне збільшення співвідношення ІЛ-10/ІЛ-12 відмічалось у групі осіб із підвищеним рівнем гіперголівчатих сперматозоїдів, а зменшення – при мікросоматичному морфотипі сперматозоїдів. Отримані результати підкреслюють важливість мікрооточення у процесі дозрівання гамет. У групі інфертильних чоловіків

концентрація РАНТЕС була меншою за норму (12,7±1,0 пг/мл, P<0,05), кратність різниці в середньому становила 3,2 раза, а у частини хворих (13 осіб) – 6,3 раза (середнє значення 6,4±0,8 пг/мл, P<0,001). Морфометрія сперми у цієї групи пацієнтів показала гіперголівчатий морфотип сперматозоїдів (τ=-0,86, P=0,4). Вміст фракталкіну у плазмі сперми безплідних пацієнтів достовірно зменшувався (16,3±1,3 пг/мл, P<0,001) щодо контролю (29,4±1,5 пг/мл).

У хворих на ХЗУТ, яке ускладнене безпліддям, спостерігався достовірно підвищений вміст CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> у спермі як у відносних, так і в абсолютних значеннях, що свідчить про посилену активність протиінфекційного захисту. Вміст лімфоцитів у спермі інфертильних чоловіків з експресією CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> був підвищений у порівнянні з контрольною групою як у відносних, так і в абсолютних значеннях. Кратність різниці становила 1,5 раза. Водночас у 12 хворих (20,7 %) цей показник, навпаки, зменшувався відносно контролю, й середнє значення його було 9,0±1,1%, (P<0,01), що було менше в 1,3 раза від прийнятої норми. Знижений вміст імунокомпетентних клітин, готових до вступу в процес апоптозу, може призводити до дисбалансу в імунній системі. Про активацію протиінфекційного захисту свідчить тенденція до збільшення абсолютного числа

**Таблиця 2. Імунологічні показники плазми сперми чоловіків із хронічним запаленням уrogenітального тракту (ХЗУТ) (Me±m [95%-й довірчий інтервал])**

Показники	Норма	Чоловіки з ХЗУТ
Інтерлейкін (ІЛ)-1 $\beta$ , пг/мл	54,6±0,8 [51,2;67,4]	5,4±0,5 *** [5,1;6,3]
ІЛ-2, пг/мл	86,5±1,7 [63,4;89,5]	14,2±1,3*** [12,5;16,5]
ІЛ-4, пг/мл	24,1±1,2 [23,5;32,7]	24,1±0,5 [23,1;25,6]
ІЛ-6, пг/мл	34,1±1,2 [32,1;36,7]	32,2±1,4 [30,2;35,7]
ІЛ-8, пг/мл	36,1±1,5 [35,4;40,3]	215,5±7,8 *** [197,0;237,7]
ІЛ-10, пг/мл	36,3±1,3 [32,2;39,4]	35,1±1,3 [32,5;41,5]
ІЛ-12, пг/мл	13,6±1,4 [11,8;15,8]	9,6±0,3* [8,3;10,2]
ІЛ-18, пг/мл	28,1±0,8 [25,6;30,4]	21,0±0,6*** [16,8;22,5]
ІЛ-2/ ІЛ-4	3,5±0,3 [2,9;5,1]	0,6±0,2*** [0,4;1,7]
ІЛ-10/ ІЛ-12	2,7±0,2 [2,2;5,4]	3,7±0,32** [2,0;6,7]
Моноцитарний хемотаксичний фактор (МХФ), пг/мл	82,4±1,4 [78,8;80,3]	926,4±30,2*** [845,1;969,6]
Фактор некрозу пухлин $\alpha$ , пг/мл	12,9±0,5 [11,2;15,9]	12,1±0,9 [11,5;15,2]
Хемокин, регульований активацією, експресією і секрецією нормальних Т-клітин (РАНТЕС), пг/мл	40,5±2,2 [37,6;43,5]	12,7±1,0 *** [9,8;14,6]
Фракталкін, пг/мл	29,4±1,5 [26,1;32,0]	16,3±1,3*** [12,9;18,4]
Інтерферон (ІФН)- $\gamma$ , пг/мл	5,3±0,2 [5,0;5,7]	5,1±1,2 [4,3;7,1]
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , %	10,7±1,5 [9,3;14,4]	16,3±1,4** [12,5;19,6]
CD4 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> , %	11,8±1,2 [8,1;14,0]	17,9±1,3 ** [10,3;21,1]
CD4 <sup>+</sup> HLA-DR4 <sup>+</sup> , %	1,2±0,2 [0,9;1,4]	1,8±0,2* [1,4;1,9]
CD25 <sup>+</sup> /CD95 <sup>+</sup>	0,90±0,14 [0,80;1,12]	0,97±0,12* [0,96;1,22]

\* P &lt; 0,05, \*\*P &lt; 0,01, \*\*\*P &lt; 0,001.

клітин з експресією CD4<sup>+</sup>HLA-DR4<sup>+</sup> у цій групі хворих. Відповідно до літературних даних [3] ми обчислювали відношення CD25<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup>. Слід відмітити, що існує позитивний кореляційний зв'язок між підвищеним його значенням та наявністю гіперголівчатих сперматозоїдів. Водночас збільшення цього індексу спостерігалось у групі інфертильних чоловіків. Достовірне зменшення співвідношення CD25<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup> спостерігалось у групі інфертильних чоловіків, спермометрія в яких встановила переважання нормосоматичних форм сперматозоїдів. Отримані результати свідчать, на наш погляд, про токсичну дію активованих лімфоцитів у спермі на тлі пригнічення процесів апоптозу.

Як показали результати нашого дослідження, розвиток такого ускладнення у чоловіків, як інфертильність на тлі хронічного запалення уrogenітального тракту, супроводжується не тільки зрушенням мікрооточення, але й патоморфологічними змінами генеративних клітин. У літературі зазначається [9], що ММП-2 інактивує низку хемокінів – фракталкін, РАНТЕС і прозапальні цитокіни – ІЛ-1β, ФНП-β. Протеоліз ІЛ-8 під впливом ММП-9, навпаки, підвищує активність цього цитокіну [15]. ММП-9, інактивуючи ІФН-γ, може призводити до тривалого перебігу запального процесу [10]. Інфламация характеризується зазвичай підвищеними концентраціями металопротеїназ [6], проте обстеження чоловіків із ХЗУТ вказує, навпаки, на зменшення вмісту ММП-2 та норму ММП-9 у сироватці сперми поряд із зниженими концентраціями прозапальних цитокінів ІЛ-1β, ІЛ-2, ІЛ-12, ІЛ-18. Це може свідчити про виснаження локальної відповіді імунної системи, незважаючи на нормальні імунологічні показники в системному кровообігу. Змінені параметри цитокінового профілю в уrogenітальному тракті, очевидно, негативно впливають на процеси матурації, наслідком чого є переважання патологічних форм сперматозоїдів у групі інфертильних чоловіків. Таким чином, визначення зни-

ження концентрації ММП-2 у плазмі сперми може слугувати негативною прогностичною ознакою розвитку інфертильності.

У наступній серії досліджень проводили імунорекцію 58 інфертильним чоловікам, в яких було встановлено дисбаланс субпопуляцій лейкоцитів у спермі. При цьому вивчалась ефективність і перспективність використання у чоловіків (28 осіб – 48,3 %) з малосимптомними формами уrogenітальної інфекції препаратів рослинного походження алфагін і гепатомакс (дослідна група). Група контролю (30 осіб – 51,7 %) отримувала загальноприйнятні засоби. Зміни субпопуляційного складу лейкоцитів в обох групах були однотиповими. Повторне дослідження сперми після проведення курсу імунореабілітації встановило тенденцію до покращення дисбалансу субпопуляцій лейкоцитів у більшості пацієнтів першої групи. Так, у 24 осіб (85,7 %) кількість гранулоцитів, моноцитів та лімфоцитів нормалізувалася. У решти (4 особи – 14,3 %) число лімфоцитів залишалось дещо вищим від норми, виявлено мікросоматичний морфотип сперматозоїдів.

Дослідження концентрації ММП-2 у спермі показало достовірне її збільшення у групі, яка приймала алфагін із гепатомаксом та не відрізнялася від норми (P>0,01). У групі контролю вміст ММП-2 у спермі залишався нижчим від норми, хоча й мав тенденцію до підвищення (P<0,05).

Після проведеного курсу імунореабілітації достовірно зменшився вміст ІЛ-8 і МХФ та підвищився вміст ІЛ-1β, ІЛ-2, ІЛ-12, ІЛ-18 у дослідній групі (табл. 3).

Водночас у групі контролю лише відмічалася тенденція до нормалізації їх концентрацій та відбувалася позитивна динаміка покращення субпопуляційного складу лейкоцитів у спермі, але суттєво менша, ніж у пацієнтів дослідної групи. Поряд з цим застосування алфагіну в комбінації з гепатомаксом сприяло поліпшенню самопочуття хворих, підвищенню працездатності, забезпечило відновлення апетиту, покращення емоційного стану, нор-

Таблиця 3. Вплив алфагіну та гепатомаксу на вміст імунологічних показників плазми сперми безплідних чоловіків (Me±m [95%-й довірчий інтервал])

Показники	Норма	До лікування	Після лікування	
			Алфагін і гепатомакс	Загальноприйняті засоби (контроль)
Інтерлейкін (ІЛ)-1β, пг/мл	54,6±0,8 [51,2;67,4]	5,4±0,5 *** [5,1;6,3]	53,1±0,45 [50,5;64,3]	38,4±0,7** [33,3;41,3]
ІЛ-2, пг/мл	86,5±1,7 [63,4;89,5]	14,2±1,3*** [12,5;16,5]	84,6±1,4 [64,5;88,4]	65,2±1,5** [50,5;71,4]
ІЛ-4, пг/мл	24,1±1,2 [23,5;32,7]	24,1±0,5 [23,1;25,6]	24,5±1,4 [23,4;30,2]	25,0±1,4 [24,1;26,2]
ІЛ-6, пг/мл	34,1±1,2 [32,1;36,7]	32,2±1,4 [30,2;35,7]	35,3±1,2 [31,9;37,4]	32,8±1,4 [29,2;37,1]
ІЛ-8, пг/мл	36,1±1,5 [35,4;40,3]	215,5±7,8 *** [197,0;237,7]	37,5±1,5 [36,1;41,4]	85,5±7,4** [39,5;104,6]
ІЛ-10, пг/мл	36,3±1,3 [32,2;39,4]	35,1±1,3 [32,5;41,5]	35,6±1,4 [33,0;38,5]	34,5±1,4 [32,2;41,3]
ІЛ-12, пг/мл	13,6±1,4 [11,8;15,8]	9,6±0,3* [8,3;10,2]	12,4±1,3 [11,3;14,6]	9,4±2,0* [7,4;11,5]
ІЛ-18, пг/мл	28,1±0,8 [25,6;30,4]	21,0±0,6*** [16,8;22,5]	27,3±0,5 [25,3;31,4]	22,6±1,4** [18,4;24,2]
ІЛ-2/ ІЛ-4	3,5±0,3 [2,9;5,1]	0,6±0,2*** [0,4;1,7]	3,4±0,5 [2,4;5,6]	2,4±0,* [1,3;2,8]
ІЛ-10/ ІЛ-12	2,7±0,2 [2,2;5,4]	3,7±0,32** [2,0;6,7]	2,8±0,5 [2,2;5,2]	3,6±0,4** [2,9;4,6]
Моноцитарний хемотаксичний фактор, пг/мл	82,4±1,4 [78,8;80,3]	926,4±30,2*** [845,1;969,6]	83,4±1,3 [77,7;80,]	454,2±34,5*** [39735;543,5]
Фактор некрозу пухлин α, пг/мл	12,9±0,5 [11,2;15,9]	12,1±0,9 [11,5;15,2]	11,9±0,73 [11,4;14,49]	12,7±1,1 [10,7;15,8]
Хемокін, регульований активацією, експресією і секрецією нормальних Т-клітин (РАНТЕС), пг/мл	40,5±2,2 [37,6;43,5]	12,7±1,0 *** [9,8;14,6]	40,2±4,2 [30,5;46,5]	31,4±1,4** [29,4;34,5]
Фракталкін, пг/мл	29,4±1,5 [26,1;32,0]	16,3±1,3*** [12,9;18,4]	27,4±1,6 [25,3;32,5]	17,5±1,2*** [15,4;19,7]
Інтерферон-γ, пг/мл	5,3±0,2 [5,0;5,7]	5,1±1,2 [4,3;7,1]	5,5±0,5 [5,0;5,9]	5,3±1,3 [4,5;6,7]
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , %	10,7±1,5 [9,3;14,4]	16,3±1,4** [12,5;19,6]	10,5±145 [9,8814,4]	15,5±1,0** [13,9;17,5]
CD4 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> , %	11,8±1,2 [8,1;14,0]	17,9±1,3 ** [10,3;21,1]	12,1±1,2 [8,5;13,4]	16,7±1,4** [15,3;17,9]
CD4 <sup>+</sup> HLA-DR4 <sup>+</sup> , %	1,2±0,2 [0,9;1,4]	1,8±0,2* [1,4;1,9]	1,4±0,4 [0,9;1,49]	1,5±0,2* [1,2;1,8]
CD25 <sup>+</sup> /CD95 <sup>+</sup>	0,90±0,07 [0,80;1,12]	0,97±0,12* [0,96;1,22]	0,91±0,05 [0,87;1,21]	0,94±0,07* [0,89;1,21]

\*P &lt; 0,05, \*\*P &lt; 0,01, \*\*\*P &lt; 0,001.

малізацію сну, зменшення дратівливості та проявів емоційної лабільності.

Проводячи кількісну оцінку ефекту імунореабілітації алфагіном в комбінації з гепатомаксом у хворих на малосимптомні форми урогенітальної інфекції встановлено, що запропонований метод знижує неефективність лікування на 54,6 % (інтервальна оцінка: 26,0–72,1%,  $P=0,05$ ) у порівнянні з загальноприйнятими методами. Запропонований методичний підхід знижує ризик його неефективності в 5,6 раза (інтервальна оцінка: 2,95–11,31 раза,  $P=0,05$ ) в порівнянні з контрольним методом лікування. Причому кількість хворих, яких необхідно пролікувати становить 2,1 пацієнта (інтервальна оцінка: 1,2–5,2 пацієнта,  $P=0,05$ ), тобто слід пролікувати 2–3 чоловіків у порівнянні зі стандартним методом терапії, щоб отримати додаткововилікуваного хворого.

## ВИСНОВКИ

1. При хронічному запаленні в урогенітальному тракті чоловіків зрушується вміст про- та протизапальних цитокінів, знижується концентрація ММП-2, хемокінів – фракталкіну та РАНТЕС, різко збільшується вміст ІЛ-8, МХФ-1 та збільшується співвідношення  $CD25^+/CD95^+$ . Це вказує на порушення процесів апоптозу патологічних форм генеративних клітин, що призводить до їх накопичення у спермі.

2. Тривалий запальний процес у статевих органах супроводжується виснаженням локальної імунної відповіді, наслідком чого є розвиток інфертильності.

3. Включення алфагіну та гепатомаксу в імунокорекцію чоловіків з малосимптомними формами урогенітальних інфекцій покращує субпопуляційний склад лейкоцитів сперми, усуває морфофункціональні зміни сперматозоїдів та нормалізує концентрації про- та протизапальних цитокінів, що проявляється збільшенням їх запліднюючого потенціалу.

## С. Ю. Ципоренко

### ВЛИЯНИЕ ИММУНОКОРЕКЦИИ НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС В УРОГЕНИТАЛЬНОМ ТРАКТЕ У МУЖЧИН С БЕСПЛОДИЕМ

Изучали концентрации металлопротеиназ, про- и противовоспалительных цитокинов, маркеров активации лимфоцитов в семенной плазме мужчин с малосимптомными формами хронического воспаления уrogenитального тракта, осложненного бесплодием. Установлено сдвиги цитокинового профиля, снижение концентрации металлопротеиназы-2 ( $576,4 \pm 89,3$  нг/мл,  $P < 0,001$ ), хемокинов – фракталкина ( $16,3 \pm 1,3$  пг/мл,  $P < 0,001$ ) и хемокина, регулируемого активацией, экспрессией и секрецией нормальных Т-клеток (РАНТЕС) ( $12,7 \pm 1,0$  пг/мл,  $P < 0,001$ ), резкое увеличение содержания интерлейкина (ИЛ)-8 ( $215,5 \pm 7,8$  пг/мл,  $P < 0,01$ ), моноцитарного хемотаксического фактора 1 ( $926,4 \pm 30,2$  пг/мл,  $P < 0,001$ ) и увеличение индекса  $CD25^+/CD95^+$ . Это указывает на нарушение процессов апоптоза патологических форм генеративных клеток и накопление их в сперме. Длительный воспалительный процесс в половых органах сопровождается истощением локального иммунного ответа, следствием чего является развитие инфертильности. Установлено разнонаправленные сдвиги соотношения ИЛ-10/ИЛ-12: его увеличение отмечалось в группе лиц с повышенным уровнем гиперголовчатых сперматозоидов, а уменьшение при микросоматическом морфотипе сперматозоидов. Полученные результаты подчеркивают важность микроокружения в процессе созревания гамет. Показано, что включение алфагина и гепатомакса в иммунореабилитацию мужчин с малосимптомными формами уrogenитальных инфекций приводит к улучшению субпопуляционного состава лейкоцитов спермы, к нормализации концентраций про- и противовоспалительных цитокинов, и, следовательно, к увеличению оплодотворяющего потенциала.

Ключевые слова: мужское бесплодие, сперматозоиды, семенная плазма, металлопротеиназы, цитокиновый профиль, иммунореабилитация, алфагин, гепатомакс.

## S. Yu. Tsiporenko

### INFLUENCE OF IMMUNOCORRECTION ON THE INFLAMMATORY PROCESS IN THE UROGENITAL TRACT IN MEN WITH INFERTILITY

We studied the concentration of metalloproteinases, pro- and anti-inflammatory cytokines, lymphocyte activation markers in seminal plasma of men with oligosymptomatic forms of chronic inflammation of the urogenital tract complicated with infertility. It was shown that chronic inflammation of the urogenital tract shifts the levels of cytokine profile, reduces the concentration of metalloproteinase-2 ( $576,4 \pm 89,3$  ng/ml,  $P < 0,001$ ), chemokines – fractalkine ( $16,3 \pm 1,3$  pg/ml,

$P < 0,001$ ) and chemokine regulated by activation, expression and secretion of normal T-cells (RANTES ( $12,7 \pm 1,0$  pg/ml,  $P < 0,001$ ). Additionally, we observed a sharp increase in IL-8 ( $215,5 \pm 7,8$  pg/ml,  $P < 0,01$ ), MCP-1 ( $926,4 \pm 30,2$  pg/ml,  $P < 0,001$ ) and elevation of the CD25 + / CD95 + ratio. These observations point for alterations in apoptotic mechanisms in pathological forms of the generative cells and their accumulation in the sperm. Prolonged inflammation of the genital area is accompanied by depletion of the local immune system resulting in the development of infertility. The multidirectional shifts in IL-10/IL-12 index have been established: an increase in the group of patients with elevated level of hypercapitated spermatozoa and its reduction in microsomatic morphotype of spermatozoa. These data emphasize the importance of the microenvironment in maturation of gametes. It was shown that an inclusion of alfagin and hepatomax in immunorehabilitation of men with oligosymptomatic forms of urogenital infections improves leukocyte subpopulation content of sperm and concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines, and therefore, results in an increase in fertilizing potential. Key words: male infertility, sperm, seminal plasma, metalloproteinases, cytokine profile, immunorehabilitation, alfagin, hepatomax.

Lugansk State Medical University

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Лях Ю.Є., Гурьянов В.Г. Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом. – Донецк: MedStat, 2004. – 212 с.
- Орлова Л., Петров С. Активність металопротеїнази матриксу (MMP-2) і катепсिनоподібної протеїнази D у різних видів змій // Вісник Львів. ун-ту. – 2011. – №55. – С. 34–38.
- Порядин Г.В., Салмаси Ж. М., Казмирский А. Н. Активационные маркеры лимфоцитов как показатели дисрегуляции иммунной системы при воспалении // Патология и терапия. – 2006. – №2. – С. 2–7.
- Baumgart E., Lenk S.V., Loening S.A., Jung K. Quantitative differences in matrix metalloproteinase (MMP)-2, but not in MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 or TIMP-2, in seminal plasma of normozoospermic and azoospermic patients // Hum. Reprod. – 2002. – №17. – P. 2919–2923.
- Benjamin M.M., Khalil R.A. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease // EXS. – 2012. – 103. – P. 209–279.
- Elkington, P.T., O’Kane, C.M., Friedland, J.S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease // Clin. Exp. Immunol. – 2005. – 142. – P. 12–20.
- Jedinak A., Maliar T. Inhibitors of proteases as anticancer drugs // Neoplasma. – 2005. – 52. – P. 185–192.
- Jennifer R., Fang Li, Xiaobei Zhang. ELR-CXC chemokine receptor antagonism targets inflammatory responses at multiple levels // J. Immun. – 2009. – 182. – P. 3213–3222.
- Loetscher, P., Clark-Lewis, I. Agonistic and antagonistic activities of chemokines // J. Leukoc. Biol. – 2001. – 69. – P. 881–884.
- Marquez-Curtis L.A., Shirvaikar N., Robert Turner A., Mirza I. Membrane type-1 matrix metalloproteinase expression in acute myeloid leukemia and its upregulation by tumor necrosis factor- $\alpha$  // Cancers. – 2012. – 4. – P. 743–762.
- McCauley T.C., Zhang H.M., Bellin M.E., Ax R.L. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. Mol // Reprod. Dev. – 2001. – 58. – P. 336–341.
- Pal S., Ganguly K.K., Chatterjee A. Extracellular matrix protein fibronectin induces matrix metalloproteinases in human prostate adenocarcinoma cells PC-3 // Cell Commun. Adhes. – 2013. – 20(5). – P. 105–114.
- Papanicolaou G.N. New cancer diagnosis. Proceedings of the Third Race Betterment Conference, January 1928. Race Betterment Foundation, Battle Creek, Michigan. – 1928. – P. 528–534.
- Seshadri S., Bates M., Vince G., Lewis Jones D. I. Cytokine expression in the seminal plasma and its effects on fertilisation rates in an IVF cycle // Andrologia. – 2011. – 43. – P. 378–386.
- Van den Steen P.E., Proost P., Wuyts A., Van Damme J., Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- $\alpha$  and leaves RANTES and MCP-2 intact // Blood. – 2001. – 96. – P. 2673–2681.
- WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semem-cervical mucus interaction. – WHO, 4-th edn.: Cambridge universiti press, 1999. – P. 128.
- Zakošek Pipan M., Kosec M., Mrkun J., Zrimšek P. Gelatinases in boar seminal plasma and their relation to semen indicators // Acta Vet. – 2010. – 79. – P. 491–496.
- Zhang X., Ibrahim E., de Rivero Vaccari J.P., Lotocki G., Aballa T.C. Involvement of the inflammasome in abnormal semen quality of men with spinal cord injury // Fertil. Steril. – 2013. – 99. – P. 118–124.

ДЗ «Луган. мед. ун-т»  
E-mail: tsiporenko@ukr.net

Матеріал надійшов до  
редакції 01.08.2013



Н.В. Козьявкіна, Л.Г. Баріляк, О.Р. Янчій, О.Л. Фучко

## Тиреотропні ефекти води Нафтуса, їх вегетативний прояв і можливість прогнозування

*В клініко-фізіологічному спостереженні за 32 чоловіками віком від 25 до 60 років, хворих на хронічний безкам'яний холецистит в фазі ремісії, виявлено, що через 75–85 хв після вживання біоактивної води Нафтуса (3 мл/кг,  $t^0$  18–20 °C) рівень в плазмі загального трийодтироніну ( $T_3$ ) у 14 осіб суттєво не змінюється, у 9 – знижується на  $0,26 \pm 0,10$  нмоль/л або 11 %, а у інших 9 – підвищується на  $0,29 \pm 0,04$  нмоль/л або 17 %. Зміни вмісту  $T_3$  корелюють негативно зі змінами абсолютної ( $r=-0,55$ ) і відносної ( $r=-0,47$ ) спектральної потужності (СП) ультранизькочастотної компоненти варіабельності серцевого ритму (ВСР) та позитивно ( $r=0,46$ ) – зі змінами відносної СП низькочастотної компоненти ВСР. Із врахуванням слабкої кореляції з параметром ВСР  $pNN_{50}$  ( $r=-0,21$ ) коефіцієнт канонічної кореляції ( $R$ ) між змінами вмісту  $T_3$  і показників ВСР сягає  $0,68$  ( $P=0,002$ ). З іншого боку, зміни вмісту  $T_3$  корелюють з його початковим рівнем ( $r=-0,46$ ), а також з початковими рівнями моди ( $r=-0,40$ ), її амплітуди ( $r=0,30$ ) та абсолютної СП низькочастотної компоненти ВСР ( $r=-0,33$ ), тобто тиротропні ефекти Нафтусі кондиціонуються цими показниками на 30 % ( $R=0,55$ ;  $P=0,038$ ). Методом дискримінантного аналізу виявлено 14 початкових показників-предикторів, за сукупністю яких характер тиротропного ефекту Нафтусі прогнозується з точністю 100 %. Ключові слова: біоактивна вода Нафтуса, трийодтиронін, варіабельність серцевого ритму, прогнозування.*

### ВСТУП

В попередніх експериментальних і клініко-фізіологічних дослідженнях трускавецької наукової школи бальнеології показано, що курсове вживання біоактивної води Нафтуса (БАВН) – головного лікувального засобу курорту Трускавець – чинить поліваріантний тиреотропний вплив [5, 11, 12, 19]. З'ясовано, що характер курсового тиреотропного ефекту (ТЕ) зумовлений низкою початкових нейрогормональних, метаболічних, імунних, гемодинамічних і клінічних показників і піддається надійному прогнозуванню за їх сукупністю [5, 12, 18]. Разом з тим залишається нез'ясованим ранньопочатковий ТЕ БАВН, тобто зміни тиреоїдної функції незабаром після вживання лікувальної води, що й стало метою нашого дослідження.

© Н.В. Козьявкіна, Л.Г. Баріляк, О.Р. Янчій, О.Л. Фучко

### МЕТОДИКА

Проведено клініко-фізіологічне спостереження за 32 чоловіками віком від 25 до 60 років, які проходили відновне лікування хронічного безкам'яного холециститу в фазі ремісії на курорті Трускавець. При роботі дотримувалися всіх етичних принципів обстеження людей. Одержано дозвіл від Комітету з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

У підготовчому періоді проводили анкетування для оцінки рівня особистої тривожності за шкалою Спілбергера-Ханіна [6], реєстрували з допомогою апаратно-програмного комплексу „КардиоЛаб+ВСР” („ХАИ-МЕДИКА”, Харків) електрокардіограму у II ст. відведенні для оцінки показників варіабельності серцевого ритму (ВСР) [1, 2], забирали з ліктьової вени пробу крові для визначення вмісту в її плазмі загального трийодтироніну

(методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням аналізатора „Tescan”, Oesterreich і набору реагентів ЗАО „Алкор Био”, СПб., РФ [10]). Після цього пацієнт вживав БАВН (3 мл/кг, 18–20 °С), а ще через 75–85 хв (коли пацієнти курорту зазвичай приймають їжу) проводили повторне тестування. Тиреотропний ефект, а також супутні зміни показників ВСП оцінено методом прямих різниць. Застосовано статистичні методи варіаційного, кореляційного, множинно-регресивного, канонічного і дискримінантного аналізів з використанням пакета програм Statistica 5.5.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Базальний вміст загального трийодтироніну ( $T_3$ ) у 30 осіб знаходився в межах  $1,49 \pm 3,01$  нмоль/л, який вкладається у діапазон норми: 1,1–3,1 нмоль/л [10], і лише у 2 виявлено незначне перевищення верхньої межі (до  $3,21$  і  $3,64$  нмоль/л). Через 75–85 хв після вживання БАВН у 9 осіб вміст  $T_3$  знижувався пересічно на  $0,26 \pm 0,10$  нмоль/л або 11 % ( $P=0,02$ ), від  $2,36 \pm 0,18$  нмоль/л до  $2,10 \pm 0,18$  нмоль/л. Натомість у інших 9 пацієнтів, навпаки,

виявлено приріст індивідуальних рівнів  $T_3$  пересічно на  $0,29 \pm 0,04$  нмоль/л або 17 % ( $P<0,001$ ), від  $1,69 \pm 0,05$  до  $1,98 \pm 0,04$  нмоль/л. Разом з тим у більшості випадків вміст  $T_3$  залишався стабільним: середні значення  $2,21 \pm 0,15$  і  $2,21 \pm 0,15$  нмоль/л до та після вживання БАВН, середня різниця  $0,00 \pm 0,02$  нмоль/л. Отже, БАВН чинить у 28 % обстежених гальмівний, а у 28 % – стимулювальний терміновий ТЕ, не впливаючи суттєво (квазінульовий ефект) на тиреоїдну функцію щитоподібною залози у 44 % пацієнтів.

З огляду на підлеглість тиреоїдної функції щитоподібною залози нервовим регуляторним впливам нами проаналізовано супутні зміни показників ВСП, які відображують активність симпатичних і парасимпатичних регуляторних структур різних рівнів. Виявлено (табл. 1), що з-поміж показників Баєвського (первісних або класичних) гальмівний ТЕ супроводжується підвищенням на 17 % амплітуди моди (АМо) – корелята симпатичного тонусу в поєднанні з тенденцією до зниження на 12 % варіаційного розмаху – корелята вагального тонусу. За таких умов індекс вегетативного балансу зростає на 29%, відображуючи його симпатотонічний зсув.

Таблиця 1. Супутні зміни показників Баєвського за різних термінових тиреотропних ефектів біоактивної води Нафтуса

Показник	Тиреотропний ефект								
	Гальмівний (9)			Квазінульовий (14)			Стимулювальний (9)		
	до	після	ефект	до	після	ефект	до	після	ефект
Мода (Мо), мс	933 $\pm 42$	906 $\pm 46$	-28 $\pm 28$	800 $\pm 39$	829 $\pm 44$	+29 $\pm 19$	739 $\pm 52$	683 $\pm 47$	-56 $\pm 35$
Амплітуда моди (АМо), %	43,9 $\pm 4,1$	51,2 $\pm 4,1$	+7,3 $\pm 2,3^*$	56,5 $\pm 5,6$	49,1 $\pm 4,2$	-7,4 $\pm 3,1^*$	53,9 $\pm 5,8$	57,9 $\pm 5,3$	+4,0 $\pm 2,7$
Варіаційний розмах ( $\Delta X$ ), мс	216 $\pm 20$	190 $\pm 19$	-25 $\pm 14$	170 $\pm 23$	182 $\pm 22$	+12 $\pm 18$	177 $\pm 23$	156 $\pm 21$	-21 $\pm 16$
Індекс вегетативного балансу (АМо/ $\Delta X$ )	232 $\pm 38$	298 $\pm 40$	+67 $\pm 32^*$	493 $\pm 102$	429 $\pm 117$	-65 $\pm 86$	388 $\pm 85$	456 $\pm 85$	+68 $\pm 66$
Показник адекватності про- цесів регуляції (АМо/Мо)	49 $\pm 6$	59 $\pm 7$	+10 $\pm 4^*$	74 $\pm 9$	62 $\pm 6$	-12 $\pm 5^*$	79 $\pm 13$	89 $\pm 12$	+10 $\pm 8$

Примітка. Тут і надалі приведені середні значення та їх стандартні похибки до і після вживання БАВН та її ефекти (прямі різниці), \* $P<0,05$ .

При цьому збільшується на 20 % і показник адекватності процесів регуляції (ПАПР). При стимулювальному ТЕ зміни мають аналогічну скерованість, але невірні. Натомість квазінульовий ТЕ супроводжується протилежними змінами згаданих показників, проте значущими є зниження лише АМо (-13 %) і ПАПР (-16 %).

З-поміж часових показників ВСР значущі супутні зміни виявлено стосовно лише SDNN (Standart Deviation of all NN intervals) – індикатора симпато-парасимпатичної модуляції, який знижується як за гальмівного ТЕ (на  $8 \pm 4$  мс: від  $47 \pm 6$  до  $39 \pm 5$  мс), так і за стимулювального (на  $8 \pm 3$  мс: від  $40 \pm 7$  до  $32 \pm 5$  мс) ТЕ, не змінюючись за квазінульового ТЕ ( $37 \pm 5$  і  $40 \pm 5$  мс).

Як загальна потужність (TP, Total Power) спектру ВСР, так і потужність її дуже низькочастотної (VLF, very low frequency) компоненти теж змінюються односкеровано за альтернативних ТЕ (табл. 2), проте ці зміни значущі лише за стимулюючого ТЕ. Натомість потужність ультранизькочастотної (ULF, ultra low frequency) компоненти ВСР проявляє різноскеровані тенденції до змін за різноскерованих ТЕ: ріст за гальмівного і зниження – за стимулюючого ТЕ.

На думку різних авторів, потужність VLF-компоненти ВСР відображує стан гуморальної регуляції (ренін–ангіотензин–альдостеронова система, вміст циркулюючих катехоламінів, системи терморегуляції [14,17]), церебральні ерготропні впливи на підлегли рівні, стан нейрогуморального та метаболічного рівнів регуляції та може використовуватися як надійний маркер ступеня зв'язку автономних рівнів регуляції кровообігу з надсегментарними, гіпофізарно-гіпоталамічним і кірковим [1, 2], а інші [13, 15] пов'язують цей параметр з симпатичною активністю ВНС.

Менш неоднозначною є інтерпретація низькочастотної (LF) компоненти ВСР: вважається, що вона характеризує стан симпатичного відділу ВНС, зокрема системи регуляції судинного тону [1, 2], і/або симпато-парасимпатичну модуляцію барорефлекторної природи [13–16]. Інтерпретація високочастотної (HF) компоненти ВСР визначена як маркер парасимпатичної активності [1, 2, 13–16, 20]. Натомість інтерпретація ULF-компоненти в літературі досі відсутня.

Скринінг кореляційних зв'язків між змінами  $T_3$  – з одного боку, та показників ВСР – з іншого, виявив вірогідні (для вибірки із 32 осіб критична величина  $|r| > 0,35$  при  $P < 0,05$  і  $> 0,46$  при  $P < 0,01$ ) зв'язки динаміки

**Таблиця 2.** Супутні зміни спектральних показників варіабельності ритму серця за різних термінових тиреотропних ефектів біоактивної води Нафтуса

Показник	Тиреотропний ефект								
	Гальмівний (9)			Квазінульовий (14)			Стимулювальний (9)		
	до	після	ефект	до	після	ефект	до	після	ефект
Загальна потужність спектра (ПС) ВСР (TP), мс <sup>2</sup>	2484	1733	-751	1670	1967	+297	1923	1148	-775
	$\pm 671$	$\pm 515$	$\pm 447$	$\pm 466$	$\pm 545$	$\pm 232$	$\pm 637$	$\pm 373$	$\pm 363^*$
ПС ультранизькочастотної компоненти ВСР (ULF), мс <sup>2</sup>	164	194	+30	65	58	-7	105	67	-38
	$\pm 97$	$\pm 129$	$\pm 114$	$\pm 18$	$\pm 19$	$\pm 21$	$\pm 29$	$\pm 40$	$\pm 50$
ПС дуже низькочастотної компоненти ВСР (VLF), мс <sup>2</sup>	1296	716	-580	483	499	+16	813	485	-328
	$\pm 464$	$\pm 184$	$\pm 417$	$\pm 101$	$\pm 101$	$\pm 112$	$\pm 200$	$\pm 138$	$\pm 157^*$
ПС низькочастотної компоненти ВСР (LF), мс <sup>2</sup>	683	491	-192	570	675	+106	524	390	-134
	$\pm 177$	$\pm 126$	$\pm 127$	$\pm 140$	$\pm 154$	$\pm 134$	$\pm 208$	$\pm 107$	$\pm 144$
ПС високочастотної компоненти ВСР (HF), мс <sup>2</sup>	341	333	-8	553	735	+182	481	207	-274
	$\pm 104$	$\pm 105$	$\pm 56$	$\pm 257$	$\pm 408$	$\pm 166$	$\pm 284$	$\pm 107$	$\pm 184$

$T_3$  з динамікою саме ULF:  $r=-0,55$  стосовно абсолютної потужності (в  $ms^2$ ) і  $r=-0,47$  стосовно відносної потужності (у відсотках від TP). Протилежна за характером кореляція виявлена стосовно динаміки відносної потужності LF-компоненти ВСП ( $r=0,46$ ). З урахуванням слабого зв'язку ( $r=-0,21$ ) з параметром  $pNN_{50}$  (від англ. percent of interval differences of successive NN intervals greater than 50 ms) канонічна (загальна) кореляція між динамікою загального трийодтироніну та показників ВСП виявляється вельми сильною (рисунок).

Залежність описується наступним рівнянням:

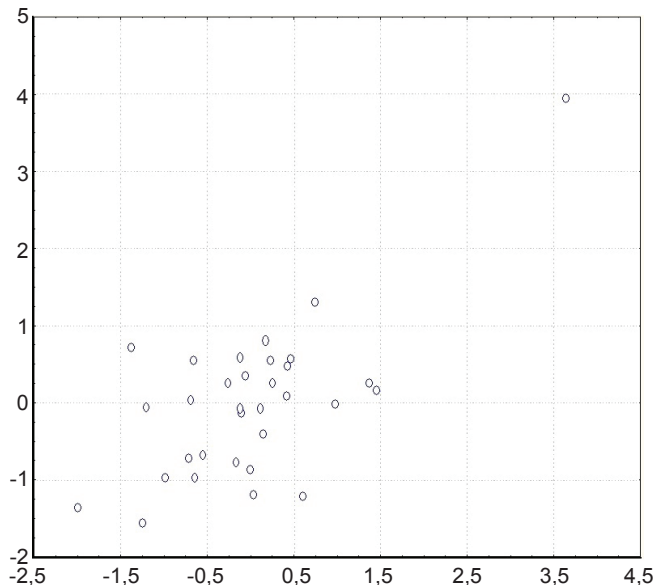
$$\Delta T_3 = -0,020 - 0,0006 \cdot \Delta ULF (ms^2) - 0,0048 \cdot \Delta ULF (\%) + 0,0035 \cdot \Delta LF (\%) - 0,01 \cdot \Delta pNN_{50} (\%)$$

$$R=0,68; R^2=0,46; F_{(4,3)}=5,83; \chi^2_{(4)}=17,4; P=0,002$$

Застосування дискримінантного (розпізнавального) аналізу уможливило виявлення показників (дискримінантних змінних), за сукупністю змін яких всі три ТЕ БАВН вірогідно відрізняються. Методом forward stepwise [21] виділено сім розпізнавальних (класифікуючих) показників. Це, окрім  $T_3$  (за визначенням) та вже зга-

даних абсолютної і відносної потужностей ULF, індикатори: активності симпатичної ланки регуляції (АМо), поточного рівня функціонування серцево-судинної системи як наслідку регуляторних впливів (ЧСС, HR), сумарного рівня активності регуляторних систем (TP) та загальної ВРС (триангулярний індекс, HRV TI). Дискримінантна інформація, що міститься у перелічених 7 показниках (точніше, їх змінах), конденсується у двох канонічних радикалах (дискримінантних функціях): 81 % у першому і 19 % у другому.

Скринінг кореляційних зв'язків між змінною вміст  $T_3$  – з одного боку, та зареєстрованими початковими показниками осіб – з іншого, виявив помірну інверсну кореляцію, насамперед із початковим вмістом самого  $T_3$  ( $r=-0,46$ ), що узгоджується із “законом початкового рівня”. Разом з тим динаміка  $T_3$  корелює з  $Mo$  ( $r=-0,40$ ),  $LF$  ( $r=-0,33$ ) і  $АМо$  ( $r=0,30$ ). Перелічені початкові показники сукупно зумовлюють як характер, так і вираженість тиреотропної реакції ( $\Delta T_3$ ) організму на БАВН на 30 %, що описується рівнянням множинної регресії:



Канонічний кореляційний зв'язок між змінами під впливом біоактивної вод Нафтуса показників варіабельності серцевого ритму (вісь X) і загального трийодтироніну (вісь Y)

$$\Delta T_3 = 0,705 - 0,178 \cdot T_3 - 0,00029 \cdot Mo - 0,00025 \cdot A Mo - 0,00012 \cdot LF$$

$$R = 0,55; R^2 = 0,30; F_{(4,3)} = 2,94; \chi^2_{(4)} = 10,1; p = 0,038.$$

Дискримінантний аналіз виявив 14 початкових показників як провісників (предикторів) того чи іншого ТЕ. Прогностична інформація сконденсована у двох радикалах: у першому – 88 %, у другому – 12 %. Видно, що гальмівному ТЕ передують, як правило, максимальні значення  $T_3$ , віку, абсолютної потужності низькочастотної компоненти спектра ВСР і мінімальні показники адекватності процесів регуляції, інформація про які локалізована у позитивній зоні шкали першого радикалу. Особи, підлеглі позитивному ТЕ БАВН, посідають протилежну – негативну зону, а квазінульовому ТЕ відповідає квазінульова зона шкали. З іншого боку, квазінульовому ТЕ передують максимальні значення показника активності процесів регуляції, стрес-індексу, вегетативного показника ритму, відносної потужності низькочастотної компоненти спектра ВСР у поєднанні з мінімальними значеннями потужностей ультранизькочастотної компонент, індексу централізації, коефіцієнту варіації і особистої тривожності. Особи ж, підлеглі альтернативним ТЕ, в цьому відношенні не розрізняються між собою, посідаючи негативну зону шкали другого радикалу. В цілому на площині обох радикалів всі три групи-кластери дуже чітко розмежовані, наслідком чого є можливість безпомилкового прогнозу характеру ТЕ БАВН за допомогою обчислення класифікаційних функцій на основі індивідуальних величин показників-предикторів і коефіцієнтів класифікуючих функцій і їх констант.

Прогнозована поліваріантність як курсових, так і термінових ефектів БАВН констатована також стосовно вегетативної регуляції [7, 8, 22], нейро-гормонального індексу стресу [17], атерогенності, гемодинаміки, фізичної працездатності [3], шлункової та панкреатичної секреції, холекінетики [9], резистентності до гіпоксії [4], тобто має універсальний характер.

## ВИСНОВКИ

1. Виявлено поліваріантний характер раннь-опочаткового ефекту вживання біоактивної води Нафтуса на вміст в плазмі крові загального трийодтироніну.

2. Показано, що кожен тип тиреотропного ефекту супроводжується характерними змінами показників варіабельності серцевого ритму.

3. Продемонстровано можливість вірогідного прогнозу типу термінового тиреотропного ефекту за сукупністю низки початкових показників-провісників.

**Н.В. Козьяккіна, Л.Г. Бариліак, О.І. Янчій, О.Л. Фучко**

## ТИРЕОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВОДЫ НАФТУСЯ, ИХ ВЕГЕТАТИВНОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ И ВОЗМОЖНОСТЬ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ

В клинко-физиологическом наблюдении за 32 мужчинами возрастом от 25 до 60 лет, больных хроническим бескаменным холециститом в фазе ремиссии, выявлено, что через 75–85 мин после употребления биоактивной воды Нафтуса (3 мл/кг,  $t^0$  18–20°C) содержания в плазме общего трийодтиронина ( $T_3$ ) у 14 лиц существенно не изменяется, у 9 – снижается на  $0,26 \pm 0,10$  нмоль/л или 11 %, а у других 9 – повышается на  $0,29 \pm 0,04$  нмоль/л или 17 %. Изменения содержания  $T_3$  коррелируют отрицательно с изменениями абсолютной ( $r = -0,55$ ) и относительной ( $r = -0,47$ ) спектральной мощности (СМ) ультранизкочастотной компоненты вариабельности сердечного ритма (ВСР) и положительно ( $r = 0,46$ ) – с изменениями относительной СМ низкочастотной компоненты ВСР. С учетом слабой корреляции с параметром ВСР  $pNN_{50}$  ( $r = -0,21$ ) коэффициент канонической корреляции (R) между изменениями  $T_3$  и показателей ВСР достигает 0,68 ( $P = 0,002$ ). С другой стороны, изменения содержания  $T_3$  коррелируют с его начальным уровнем ( $r = -0,46$ ), а также с начальными уровнями моды ( $r = -0,40$ ), ее амплитуды ( $r = 0,30$ ) и абсолютной СМ низкочастотной компоненты ВСР ( $r = -0,33$ ), т.е. тиреотропные эффекты Нафтуса кондиционируются этими показателями на 30 % ( $R = 0,55$ ;  $P = 0,038$ ). Методом дискриминантного анализа выявлено 14 начальных показателей-предикторов, по совокупности которых характер тиреотропного эффекта Нафтуса прогнозируется с точностью 100 %. Ключевые слова: биоактивная вода Нафтуса, трийодтиронин, вариабельность сердечного ритма, прогнозирование.

N.V. Kozyavkina, L.G. Barylyak, O.R. Yanchiy,  
O.L. Fuchko

### IMMEDIATE THYROTROPIC EFFECTS OF BIOACTIVE WATER NAFTUSSYA, THEIR VEGETATIVE RELEVANCE AND POSSIBILITY TO FORECAST

Clinical physiological monitoring of 32 men aged 25-60 years with chronic stoneless cholecystitis in the phase of remission found that in 14 patients 75-85 minutes after drinking the bioactive water Naftussya (3 ml/kg,  $t^0$  18-20°C) the plasma level of total triiodothyronine ( $T_3$ ) was not significantly changed, while in 9 patients it was reduced to  $0,26 \pm 0,10$  nM/l (by 11%). In the other 9 patients the level increased to  $0,29 \pm 0,04$  nM/l (by 17%). The changes in  $T_3$  level correlated negatively with the changes in absolute ( $r = -0,55$ ) and relative ( $r = -0,47$ ) power spectral density (PSD) of ultra very low-frequency components of heart rate variability (HRV). These changes correlated positively ( $r = 0,46$ ) with the changes in relative PSD of low-frequency components of HRV. Subject to a weak correlation with HRV parameter  $pNN_{50}$  ( $r = -0,21$ ) canonical correlation coefficient (R) between changes in HRV parameters and  $T_3$  reaches 0,68 ( $p = 0,002$ ). On the other hand, the changes in  $T_3$  correlated with its initial level ( $r = -0,46$ ), as well as initial levels of moda ( $r = -0,40$ ), its amplitude ( $r = 0,30$ ) and absolute PSD of low-frequency components HRV ( $r = -0,33$ ), i.e. thyrotropic effects conditioned these parameters by 30% ( $R = 0,55$ ;  $p = 0,038$ ). The method of discriminant analysis has identified 14 primary parameters that allowed predicting the thyrotropic effect of Naftussya water with 100% accuracy.

Key words: bioactive water Naftussya, triiodothyronine, heart rate variability, forecast.

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

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баевский Р.М., Иванов Г.Г. Вариабельность сердечного ритма: теоретические аспекты и возможности клинического применения // Ультразвук. и функционал. диагностика. – 2001. – №3. – С. 106–127.
2. Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем (методические рекомендации) // Вестн. аритмологии. – 2001. – №24. – С. 65–87.
3. Бальнеокардиология / За ред. І.Л. Поповича, С.В. Ружилю, С.В. Івасівки, Б.І. Аксентійчука. – К.: Комп'ютерпрес, 2005. – 229 с.
4. Бариліак Л.Г., Бабиліук Р.В., Попович І.Л., Королишин Т.А., Нестерова Л.Ф. Вплив бальнеотерапії на курорті Трускавець на стійкість до гіпоксії у дітей з дисфункцією нейроендокринно-імунного комплексу // Мед. гідрологія та реабілітація. – 2011. – 9, №4. – С. 4–38.
5. Бульба А.Я. Типи тиротропних ефектів бальнеотерапії

- на курорті Трускавець, їх нейро-ендокринні і клінічні супутники та предиктори у жінок з гіперплазією щитовидної залози // Там само. – 2007. – 5, №2. – С. 30–45.
6. Вадзюк С.Н., Шуган Т.Б. Розумова працездатність: методики дослідження, зміни та корекція. – Тернопіль: Богдан, 2000. – 170 с.
7. Вісьтак Г.І. Прогнозування ефектів біоактивної води Нафтуса на вегетативний гомеостаз у жінок з гінекологічно-ендокринною патологією // Здобутки клініч. і експерим. медицини. – 2009. – №2(11). – С. 86–90.
8. Вісьтак Г.І., Попович І.Л. Вегетотропні ефекти біоактивної води Нафтуса та їх ендокринний і імунний супроводи у щурів-самок // Мед. гідрологія та реабілітація. – 2011. – 9, №2. – С. 39–57.
9. Гумега М.Д., Левицький А.Б., Попович І.Л. Бальнеогастроентерологія. – К.: ЮНЕСКО-СОЦЮ, 2011. – 243 с.
10. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения триодтиронина в крови человека. – СПб.: ЗАО «Алкор Био», 2000.
11. Козьявкіна Н.В. Варіанти тиротропних ефектів біоактивної води Нафтуса та їх ліпідний супровід // Мед. гідрологія та реабілітація. – 2008. – 6, №3. – С. 115–122.
12. Козьявкіна Н.В. Поліваріантність тиротропних ефектів біоактивної води Нафтуса у жінок з хронічною ендокринно-гінекологічною патологією, їх нейро-ендокринно-імунний і клінічний супровід та можливості прогнозування // Там само. – 2011. – 9, №2. – С. 4–22.
13. Коркушко О.В., Писарук А.В., Шатило В.Б. Значение анализа вариабельности ритма сердца в кардиологии: возрастные аспекты // Кровообіг та гемостаз. – 2009. – №1–2. – С. 127–139.
14. Котельников С.А., Ноздрачов А.Д., Одинак М.М., Шустов Е.Б., Коваленко І.Ю., Давиденко В.Ю. Вариабельность ритма сердца: представления о механизмах // Физиология человека. – 2002. – 28, №1. – С. 130–143.
15. Методи аналізу і віражні норми вариабельности ритма сердца. (Метод. рекомендації) / Коркушко О.В., Шатило В.Б., Писарук А.В., Чеботарев Н.Д., Лишневская В.Ю., Коркушко А.О., Чеботарева Ю.Н. – УкрНИИ геронтологии АМН Украины. – К., 2005. – 35 с.
16. Михайлов В.М. Вариабельность ритма сердца. Опыт практического применения метода. – Иваново, 2000. – 200 с.
17. Попович І.Л. Стреслімітуючий адаптогенний механізм біологічної та лікувальної активності води Нафтуса. – К.: Комп'ютерпрес, 2011. – 300 с.
18. Фучко О.Л. Супутні зміни імунного статусу у жінок, хворих на хронічний холецистит, за різних тиротропних ефектів біоактивної води Нафтуса та можливість їх прогнозування // Мед. гідрологія та реабілітація. – 2010. – 8, №3. – С. 69–78.
19. Фучко О.Л., Бульба А.Я. Типи тиротропних ефектів бальнеотерапії на курорті Трускавець у жінок з гіперплазією щитовидної залози та супутні зміни параметрів ліпідного і електролітного обміну // Там

- само. – 2008. – 6, №3. – С. 51–59.
20. Heart Rate Variability. Standarts of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use // Circulation. – 1996. – 93, №5. – P. 1043–1065.
21. Klecka W.R. Discriminant Analysis (Seventh Printing, 1986) // Факторный, дискриминантный и кластерный анализ: Пер. с англ./ Под ред. И.С. Енюкова. – М.: Финансы и статистика, 1989. – С. 78–138.
22. Kozyavkina O.V., Barylyak L.G. Ambivalent vegetotropic effects of bioactive water Naftussya and opportunity of their forecasting in rats // Медична гідрологія та реабілітація. – 2008. – 6, №3. – С. 123–127.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,  
Трускавець  
E-mail: kutniyroman@meta.ua*

*Матеріал надійшов до  
редакції 18.03.2013*

Е.А. Рыбникова, К.А. Баранова, Т.С. Глущенко, О.В. Ветровой, М.В. Сидорова, В.И. Портниченко

## Участие транскрипционного фактора, индуцированного гипоксией, в нейрональных механизмах адаптации к психоэмоциональному и гипоксическому стрессу

*Методом количественной иммуногистохимии исследована экспрессия  $\alpha$ -субъединицы транскрипционного фактора HIF-1 в гиппокампе и неокортексе крыс в ответ на патогенный психоэмоциональный (модель посттравматического стрессового расстройства – ПТСР) и гипоксический (тяжелая гипобарическая гипоксия, 180 мм рт. ст., 3 ч) стресс, а также при применении нейропротективных способов гипоксического пре- и посткондиционирования. Обнаружена пролонгированная гиперэкспрессия HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе и неокортексе крыс в ответ на психоэмоциональный стресс в модели ПТСР, но не на гипоксический стресс. Гипоксическое пре- и посткондиционирование с использованием сеансов умеренной гипобарической гипоксии (360 мм рт. ст., 2 ч, трижды с интервалом 24 ч), способствующее адаптации к психоэмоциональному стрессу, нивелировало пролонгированную гиперэкспрессию HIF-1 $\alpha$ . Наряду с этим гипоксическое посткондиционирование, улучшающее структурно-функциональную реабилитацию после тяжелого гипоксического стресса, стимулировало экспрессию HIF-1 $\alpha$  в нейронах мозга крыс, переживших тяжелую гипоксию. Результаты свидетельствуют о том, что транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$  активно вовлекается в процессы адаптации/деадаптации к действию повреждающих факторов, однако его роль специфична по отношению к природе стрессора.*

*Ключевые слова: фактор HIF-1 $\alpha$ , мозг, психоэмоциональный стресс, гипоксический стресс, адаптация, гипоксическое преко́ндиционирование, гипоксическое посткондиционирование*

### ВВЕДЕНИЕ

Повреждающее действие тяжелых форм гипоксии на нейроны мозга хорошо известно. Индуцируемые гипоксией структурно-функциональные нарушения, а также гибель нейронов уязвимых образований мозга (гиппокампа, неокортекса) считаются одной из наиболее частых причин неврологических и нейродегенеративных расстройств [19]. Однако как в собственных исследованиях, так и в литературе накоплены сведения о том, что умеренная гипоксия может оказывать не повреждающее, а благоприятное действие на мозг, способствуя мобилизации эндогенных нейропротективных процессов и

механизмов [7, 8, 17]. В частности, трехкратное воздействие умеренной гипобарической гипоксии (УГГ, 380 мм рт. ст. в течение 2 ч) повышало резистентность нейронов мозга к повреждающим воздействиям, то есть приводило к формированию гипоксической/ишемической толерантности мозга, этот процесс происходил с вовлечением специфического транскрипционного фактора, индуцированного гипоксией, HIF-1 (от англ. hypoxia-inducible factor 1) [7]. Вместе с тем умеренная гипоксия также оказывает значительное анксиолитическое и антидепрессивное действие на поведение, предотвращая развитие тревожно-депрессивных состояний, вызываемых интенсивными психоэмоцио-



нальными стрессами у крыс [3–5]. Сходный анксиолитический эффект недавно описан при применении умеренной нормобарической гипоксии (8 % O<sub>2</sub>, 2 ч, трехкратно) у мышей [14], при этом в мозгу наблюдалась стимуляторная регуляция экспрессии мРНК сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и адреномедуллина, являющихся генами-мишенями фактора HIF-1. На этом основании можно полагать, что HIF-1, вероятно, играет важную роль в формировании толерантности мозга не только к гипоксии–ишемии, но и психоэмоциональным стрессам, однако этот вопрос практически не исследован.

Фактор HIF-1 представляет собой ключевой компонент в организации клеточных и системных гомеостатических реакций на гипоксию [2, 9, 26].  $\alpha$ -Субъединица этого гетеродимера (HIF-1 $\alpha$ ) является кислородчувствительной – стабилизируется при гипоксии и выполняет специфическую функцию в регуляции экспрессии генома, тогда как  $\beta$ -субъединица (HIF-1 $\beta$ ) экспрессируется конститутивно [11]. HIF-1 $\alpha$  активируется в физиологически важных местах регуляции путей метаболизма кислорода, обеспечивая быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс путем воздействия на гены-мишени, регулирующие процесс ангиогенеза, вазомоторный контроль, энергетический метаболизм, эритропоэз и апоптоз [10, 13, 18, 22, 23, 26, 27, 31]. Наряду с этим HIF-1 вовлекается в процессы гибели/выживания клеток, метаболизм глюкозы, миграцию и инвазию клеток, ремоделирование клеточного микроокружения, канцерогенез, метастазирование и многие другие, представляя собой таким образом перспективную терапевтическую мишень при многих заболеваниях.

Недавно нами впервые показана индукция HIF-1 $\alpha$  в ответ на тяжелый психоэмоциональный стресс, причем профиль активации HIF-1 довольно сложен [1]. Тяжелый психоэмоциональный стресс, приводящий к развитию постстрессорной депрессии в экспериментальной модели на крысах, ин-

дуцировал отсроченную экспрессию HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе и гипоталамусе, что, вероятно, вовлечено в механизмы патогенеза депрессивного состояния. Это подтверждалось и в экспериментах с применением УГГ в режиме прекондиционирования, когда предварительное воздействие трехкратной УГГ по определенной схеме предотвращало развитие постстрессорной депрессии и значительно модифицировало профиль экспрессии HIF-1 $\alpha$  в образованиях мозга в ответ на стресс, усиливая активацию экспрессии данного фактора в ранний период (24 ч после стресса) и нивелируя его отсроченную сверхэкспрессию (5–10 сут после стресса). Таким образом, очевидно, что HIF-1 вовлекается как в повышение устойчивости мозга (и организма в целом) к психоэмоциональным стрессам, так и в формирование постстрессорных дезадаптивных состояний, однако его роль в механизмах адаптации/патологии довольно сложна и требует более детального изучения. Дальнейшему анализу этого вопроса посвящено настоящее исследование, проведенное на экспериментальной модели тревожной постстрессорной патологии (посттравматического стрессового расстройства, ПТСР), развивающейся как отдаленная реакция на стресс и характеризующейся специфической отсроченной динамикой [16]. Ранее нами обнаружено, что предъявление УГГ в режимах пре- и посткондиционирования (то есть до или после патогенного стресса) оказывает значительный протективный эффект, полностью корректируя развитие ПТСР в данной экспериментальной модели [4, 5].

Цель нашей работы – изучение возможной роли HIF-1 в развитии тревожной ПТСР-патологии, в стресс-протективном и анксиолитическом действии гипоксического пре- и посткондиционирования, а также сравнительный анализ особенностей экспрессии HIF-1 $\alpha$  в неокортексе и гиппокампе крыс в отдаленный период после психоэмоционального и тяжелого гипоксического стресса и при нейропротективных воздействиях УГГ.

## МЕТОДИКА

Опыты проведены на самцах крыс линии Вистар массой 200–250 г. С соблюдением требований, сформулированных в Директивах Совета Европейского Сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Для индукции экспериментального аналога ПТСР у крыс использовали модель «стресс-рестресс» [16], которая в настоящее время считается наиболее адекватной моделью ПТСР. Крыс подвергали тяжелому комбинированному стрессу, состоящему из 2-часовой иммобилизации, 20-минутного вынужденного плавания и, после 15-минутного перерыва, эфирного стресса до полной обездвиженности. Этот сверхинтенсивный психоэмоциональный (травматический) стресс вызывает у особей формирование тревожной психопатологии, в основе которой лежит нарушение стрессореактивности в условиях, ассоциирующихся с воспоминаниями о травматическом стрессе. В парадигме «стресс-рестресс» такую «напоминающую» роль (роль триггерного стимула, к которому особь с развившейся после травматического стресса специфической ПТСР-патологией адаптироваться не может и, соответственно, впадает в тревожно-депрессивное состояние) выполняет рестресс, заключающийся в 30-минутной иммобилизации, которой крысы подвергались через 7 сут после травматического стресса. В дни экспозиции экспериментальных групп психоэмоциональному стрессу и рестрессу контрольных животных также изымали из домашних клеток и переносили на 5 мин в новую обстановку, чтобы нивелировать возможные эффекты неспецифических воздействий, в частности хэндлинга и стресса новизны.

Протективное умеренное гипоксическое воздействие с предъявлением трехкратной экспозиции животных гипобарической гипок-

сии в барокамере проточного типа (360 мм рт. ст., 2 ч, эквивалентно подъему на высоту 5 км) проводили в режимах пре- и посткондиционирования. Воздействие тремя сеансами УГГ с интервалами 24 ч осуществляли за сутки до психоэмоционального (патогенного) стресса в модели ПТСР (гипоксическое прекодиционирование, ГП) или на 4, 5, 6-е сутки после психоэмоционального стресса (гипоксическое посткондиционирование, ГПост). Забор ткани мозга для иммуногистохимического анализа производили спустя 1, 5 и 10 сут после рестресса.

Животных другой группы подвергали стрессированию в модели тяжелой гипоксии в барокамере (ТГ, 180 мм рт. ст., 3 ч). Крысам, пережившим ТГ, проводили экспозицию УГГ (360 мм рт. ст., 2 ч, с интервалом 24 ч) на 1–3-и сутки после гипоксического стресса. Ткани мозга в этой экспериментальной серии забирали через 24 ч после последнего сеанса УГГ (96 ч после ТГ соответственно). Ранее показано, что применяемое воздействие ТГ индуцирует структурно-функциональные повреждения чувствительных образований мозга [6], а гипоксическое посткондиционирование эффективно корректирует повреждающее влияние ТГ на нейроны мозга и оказывает анксиолитическое действие на поведение животных [24].

После декапитации крыс мозг быстро извлекали, выделяли области гиппокампа с прилежащим фронтопариетальным неокортексом. Образцы фиксировали молекулярным фиксатором FineFix («Milestone», Италия) 24 ч при +4<sup>0</sup>С. Далее препараты промывали в проточной воде в течение 2 ч и обезвоживали, проводя через растворы этилового спирта возрастающей концентрации (50, 70, 80, 96, 96 % по 1 ч) и бутанола (1 ч и ночь). Затем материал проводили через 4 порции ксилола (по 15 мин), 3 порции парафина (по 45 мин) и заливали в парафиновые блоки. Далее с помощью микротомы изготавливали серии чередующихся срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне –2,80

мм от брегмы. Они использовались для количественной иммуноцитохимической оценки содержания белка – продукта раннего гена HIF-1 $\alpha$  в неокортексе и гиппокампе. После стандартных процедур депарафинизации, регидратации и демаскировки антигена срезы в течение ночи при +4°C инкубировали с первичными поликлональными кроличьими антителами к HIF-1 $\alpha$  («Santa Cruz Biotechnology, Inc», США, разв. 1:100), а далее использовали авидин-биотиновую систему детекции («Vector Laboratories, Inc», UK). Для визуализации реакции использовали диаминобензидин. После обезвоживания и заключения срезов в желатин проводили количественный анализ иммунореактивности нейронов с использованием системы, состоящей из светового микроскопа Jenaval («Carl Zeiss», Германия), цифровой камеры Baumer CX05c («Baumer Optronik», Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением Videotest Master Morphology. На основании оценки оптической плотности иммунопозитивные клетки разделяли на 2 класса: слабо- и интенсивноиммунореактивные, анализировали общее число иммунореактивных клеток (N) и число интенсивно иммунопозитивных клеток (Ni), отражающее изменения интенсивности экспрессии данного белка. Результаты статистически обрабатывали с помощью пакетов анализа данных Statistica 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2002, использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (P<0,05). Все результаты представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  SEM (от англ. standard error of the mean). Результаты и SEM выражены в процентах от контроля, контроль принят за 100 %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При развитии патологического состояния в модели ПТСР обнаруживалась значительная и длительная индукция HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе и неокортексе крыс, несмотря на то, что об-

щее число иммунопозитивных нейронов при этом изменялось незначительно. По общему числу HIF-1 $\alpha$  экспрессирующих нейронов устойчивое (1–10 сут) повышение обнаружено в гиппокампе и V слое неокортекса (рис. 1, 2). По этому показателю максимальная амплитуда изменений (до 270 %) выявлена в V слое неокортекса (см. рис. 2). В отличие от общего числа иммунопозитивных клеток, интенсивность экспрессии HIF-1 $\alpha$  возрастала значительно и устойчиво, максимально – во II слое неокортекса (свыше 6000 %; см. рис. 1, 2). Эти результаты подтверждают полученные нами ранее сведения о том, что формирование дезадаптивного состояния у крыс в ответ на психоэмоциональный стресс сопровождается сверхэкспрессией HIF-1 $\alpha$  в образованиях мозга в отдаленный постстрессорный период [1]. В предыдущих исследованиях была использована модель «выученной беспомощности» у крыс, где депрессивноподобная патология формировалась сразу после стрессорного воздействия и устойчиво сохранялась по крайней мере до 10 сут. Стойкая стимуляция HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе и гипоталамусе обнаруживалась к 5–10-м суткам после стресса, в то время как индукция HIF-1 $\alpha$  в ранний постстрессорный период была выражена слабо. При этом ГП, предотвращающее нарушение адаптации к стрессу «выученной беспомощности», усиливало индукцию HIF-1 $\alpha$  в ранний период (1 сут), нивелируя при этом его отсроченную сверхэкспрессию. Для трактовки результатов настоящей работы необходимо учитывать специфику ПТСР, в особенности тот факт, что ПТСР-патология продолжительный период времени (до рестресса) развивается скрыто, поэтому все исследуемые сроки (1–10 сут после рестресса) характеризуют отдаленный период после патогенного воздействия (травматического стресса). В связи с этим стойкая стимуляция экспрессии HIF-1 $\alpha$ , обнаруживаемая в мозгу экспериментальных животных на всех сроках, также свидетельствует о том, что устойчивая активация данного транскрипционного фактора в отдаленный

период после психоэмоционального стресса, очевидно, имеет важное значение в патогенезе стрессиндуцированных дезадаптивных состояний. Полагают также, что чрезмерная и длительная активация HIF-1 формирует патогенетический базис болезни Альцгеймера [28, 33].

Косвенным подтверждением патогенетической роли сверхиндукции HIF-1 служат результаты экспериментов с использованием УГГ в нейропротективных режимах ГП и ГПост. Оказалось, что ГП, повышающее устойчивость к психоэмоциональному стрессу в модели ПТСР, в значительной степени предотвращало стрессиндуцированную сверхэкспрессию в неокортексе и нормализовывало уровни HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе. Общее число нейронов гиппокампа как дорсального (CA1), так и вентрального (зубчатая извилина), содержащих HIF-1 $\alpha$ , оставалось в диапа-

зоне контрольных значений в течение всего периода регистрации (до 10 сут; см. рис. 1). Аналогичная картина обнаруживалась для показателя интенсивности экспрессии – количество интенсивно HIF-1-иммунопозитивных клеток в гиппокампе не отличалось от контрольных значений на всех сроках, то есть ГП полностью предотвращало стойкую сверхэкспрессию HIF-1 $\alpha$  в этой структуре мозга, что согласуется с данными, полученными ранее в модели психоэмоционального стресса «выученной беспомощности» [1]. В неокортексе после ГП в модели ПТСР также наблюдалась значительная редукция числа иммунореактивных нейронов, интенсивно экспрессирующих HIF-1 $\alpha$ , относительно непрекондиционированной группы, но тем не менее сохранялась умеренная индукция этого фактора, в несколько раз превосходившая базальный уровень (см. рис. 2).

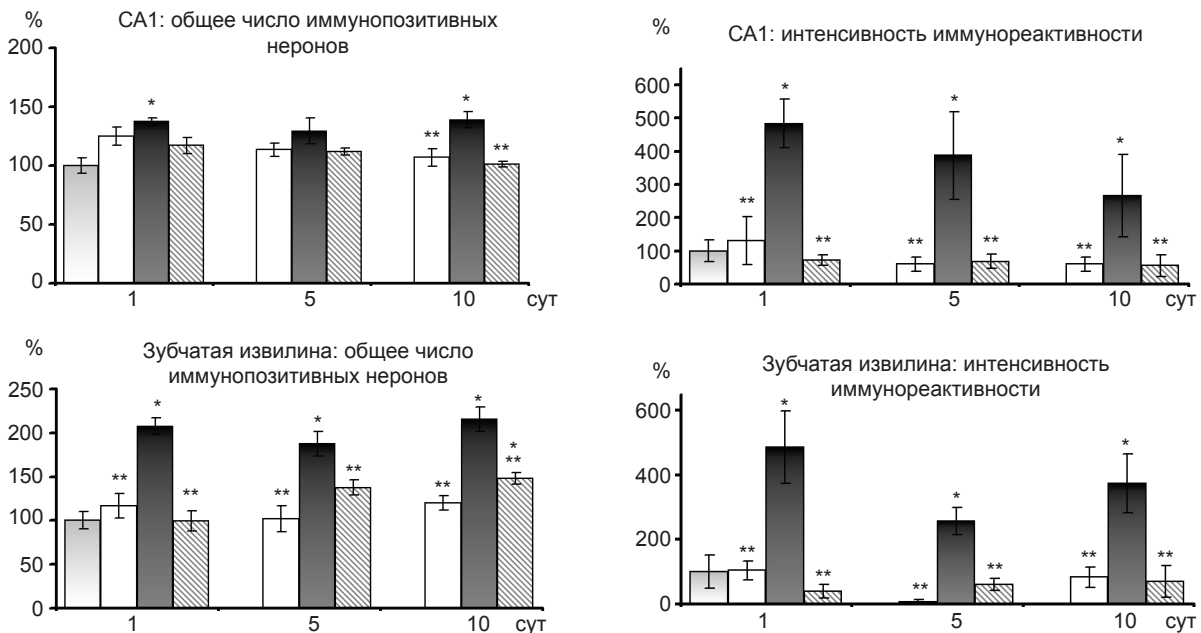


Рис 1. Экспрессия индуцированного гипоксией специфического транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  в дорсальном (поле CA1) и вентральном (зубчатая извилина) гиппокампе крыс после действия психоэмоционального стресса/рестресса в модели посттравматического стрессового расстройства, а также гипоксического пре- и посткондиционирования. Результаты представлены в процентах относительно контроля (серый столбик, 100 %). Черный столбик – животные, формирующие постстрессорную патологию; белый столбик – прекодиционированные крысы, у которых в ответ на стресс патология не развивается; затрихованные столбики – крысы, после стресса подвергавшиеся гипоксическому посткондиционированию и также не формирующие патологию. По оси абсцисс – сутки после рестресса. \* $P \leq 0,05$  по сравнению с контролем, \*\* $P \leq 0,5$  по сравнению с группой крыс со стрессиндуцированной патологией

ГПост, полностью нивелирующее патологические последствия психоэмоционального стресса в модели ПТСР, также подавляло стойкую сверхэкспрессию HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе и неокортексе (см. рис.1, 2). Эффект проявлялся и в отношении общего числа иммунореактивных клеток, и, особенно, в отношении интенсивности экспрессии HIF-1 $\alpha$ . В гиппокампе и верхних слоях неокортекса (II слой) показатели иммунореактивности у посткондиционированных животных значительно не отличались от базальных, тогда как в зоне проекционных нейронов неокортекса (V слой) сохраняется умеренная экспрессия HIF-1 $\alpha$  в течение всего срока регистрации (1–10-е сутки после рестресса, что соответствует 8–18-м суткам после патогенного психоэмоционального стресса; см. рис. 2). Таким образом, развитие тревожной патологии в модели ПТСР у крыс сопровождалось значительной и пролонгированной ап-регуляцией HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе и неокортексе. Стресс-протективный и анксиолитический эффект ГП и ГПост сопровождался полным либо

частичным подавлением сверхэкспрессии HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе и неокортексе. Известно тесное функциональное взаимодействие HIF-1 с глюкокортикоидными рецепторами, играющими ключевую роль в стрессорных реакциях и адаптации к повреждающим воздействиям как на уровне белок-белковых взаимодействий, так и на уровне регуляции активности генома [12, 15, 29]. Формирование ПТСР патологии, возникающей в результате действия сверхинтенсивного психоэмоционального стресса, сопровождается нарушением активности гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы и редукцией содержания глюкокортикоидных гормонов в плазме крови [32]. Последние в свою очередь оказывают супрессивное действие на транскрипционную активность HIF-1, редуцируя уровни его  $\alpha$ -субъединицы [29]. Таким образом, стойкая сверхиндукция HIF-1 $\alpha$ , наблюдаемая нами в гиппокампе и неокортексе (образованиях мозга, имеющих высокие уровни кортикостероидных рецепторов), вполне вероятно может являться ре-

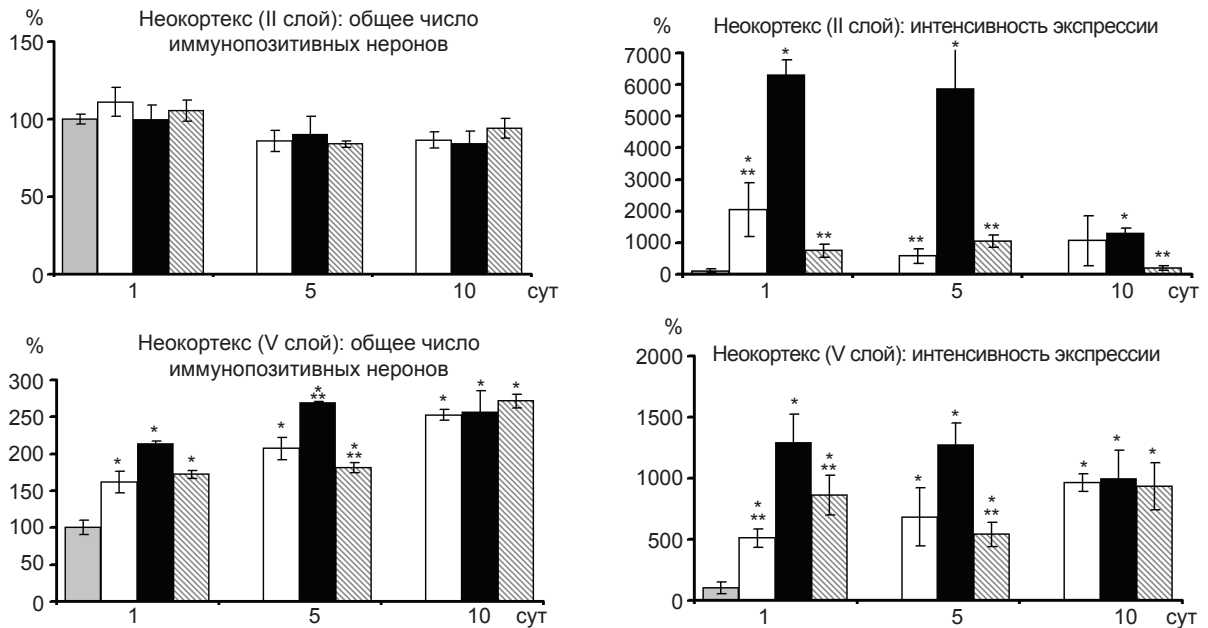


Рис 2. Экспрессия индуцированного гипоксией специфического транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс после действия психоэмоционального стресса/рестресса в модели посттравматического стрессового расстройства, а также гипоксического пре- и посткондиционирования. По оси абсцисс – сутки после рестресса. \*P $\leq$ 0,05 по сравнению с контролем, \*\*P $\leq$ 0,5 по сравнению с группой крыс со стрессиндуцированной патологией

зультатом сниженного глюкокортикоидного тонуса, характерного для данной патологии.

В модели гипоксического стресса изменения экспрессии HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе и неокортексе крыс при патологии и ее коррекции трехкратной УГГ значительно отличались от таковых в модели психоэмоционального стресса. В отдаленный период после ТГ (96 ч) значительных изменений содержания HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе и неокортексе крыс не обнаруживалось (рис. 3). ГПост тремя сеансами УГГ оказывало мощное стимулирующее влияние на экспрессию HIF-1 $\alpha$ , причем увеличилось и число экспрессирующих его нейронов и, особенно, интенсивность экспрессии (свыше

500 % – в CA1, свыше 1500 % – в неокортексе). Таким образом, гипоксический стресс, в отличие от психоэмоционального, не вызывал отдаленной сверхэкспрессии этого фактора в гиппокампе и неокортексе, а нейропротективный эффект УГГ у животных, перенесших ТГ, сопровождался его активацией в уязвимых образованиях мозга крыс. Результаты подтверждают представление о том, что HIF-1 необходим для защиты нейронов мозга от повреждающего действия гипоксического фактора и вовлекается в нейрональные протективные процессы, очевидно, путем срочной мобилизации базисных механизмов адаптации к гипоксии и компенсации ее ней-

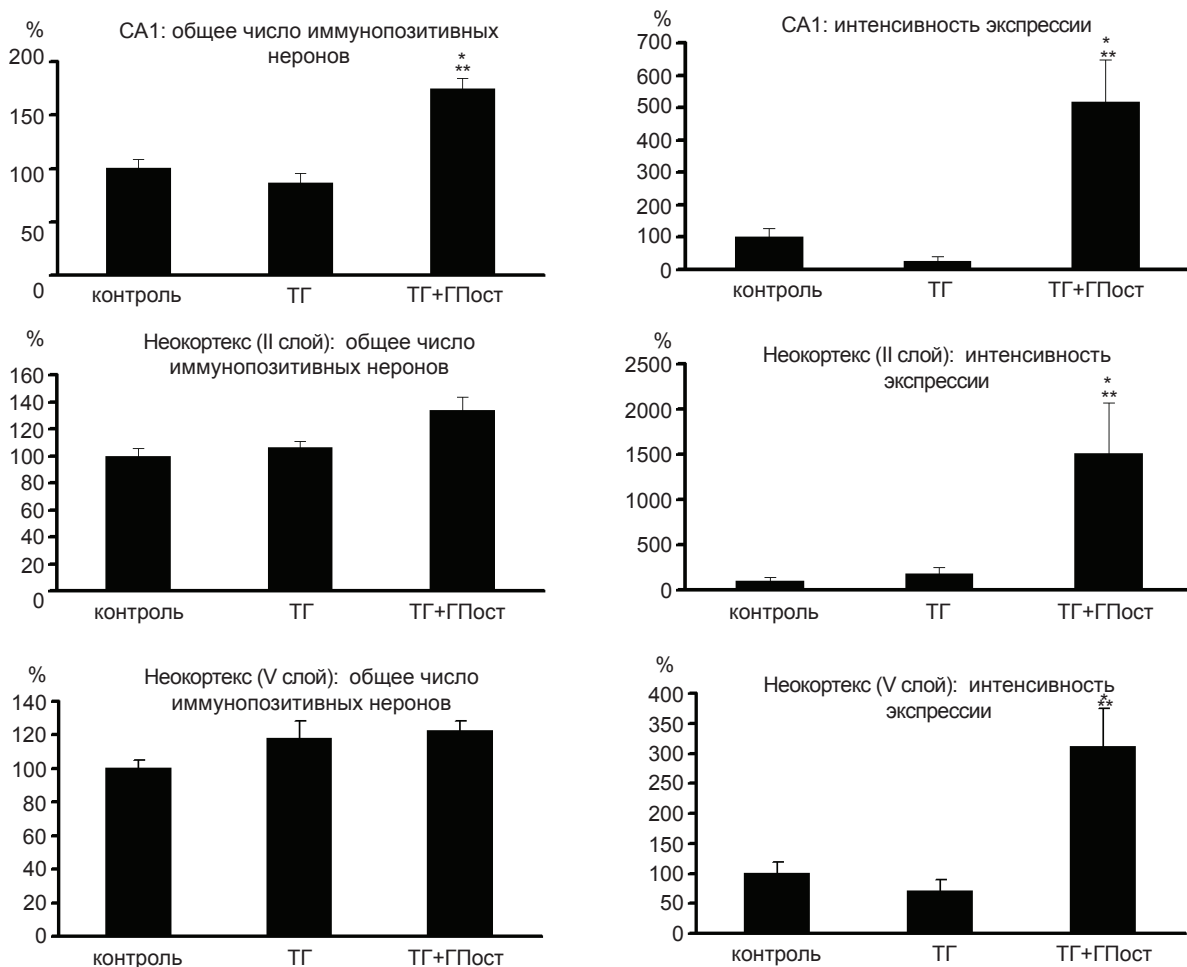


Рис.3. Эффект тяжелой гипобарической гипоксии (ТГ) и посткондиционированной тяжелой гипоксии (ТГ+ГПост) на экспрессию HIF-1 $\alpha$  в гиппокампе и неокортексе крыс (4 сут после ТГ). Результаты представлены в процентах от контроля. \* $P \leq 0,05$  по сравнению с контролем, \*\* $P \leq 0,05$  – по сравнению с ТГ

ротоксического действия.

На основании проведенных исследований и данных литературы очевидно, что HIF-1 в мозгу может играть роль как патогенетического фактора, стойкая сверхиндукция которого связана с расстройством механизмов адаптации к стрессу, так и нейропротектора, вызывающего мобилизацию базисных проадаптивных процессов. При этом роль HIF-1 стресс-специфична и зависит от природы стрессора. Адаптация к гипоксическому стрессу имела важное значение для жизнедеятельности одноклеточных и многоклеточных организмов уже на ранних стадиях эволюции, поэтому механизмы адаптации к гипоксии являются древними и довольно консервативными в филогенезе, и центральное место во внутриклеточном гипоксическом сигналинге занимает HIF-1, обеспечивающий поддержание кислородного гомеостаза и адаптации/выживания клеток в условиях гипоксии [22, 30]. В последние годы появляется все больше работ о нейропротективной роли HIF-1 в мозгу, где нервными и глиальными клетками продуцируется не только сам этот белок, но и его транскрипционная мишень – цитокин эритропоэтин, оказывающий широкий спектр протективных эффектов, не связанных с гемопоезом [20].

В отличие от гипоксического, психоэмоциональный стресс – это повреждающий фактор, возникший на поздних этапах эволюции и, соответственно, механизмы адаптации к нему сформировались в эволюционном аспекте сравнительно недавно. Среди них ключевая роль принадлежит гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системе [25], функция которой также в значительной мере регулируется HIF-1. Недавно в модели регенерирующей скелетной мышцы *in vitro* было установлено, что HIF-1-опосредуемый ответ на гипоксию независим от глюкокортикоидного стрессорного ответа [21], на основании чего сделано предположение о том, что каскад реакций адаптации к гипоксическому стрессу, ключевым звеном которых является индукция HIF-1, и система неспецифического ответа

организма на стресс представляют собой два различных проадаптивных механизма, функционально не взаимодействующих. Однако наши результаты об участии HIF-1 в процессах адаптации к психоэмоциональному стрессу и имеющиеся в литературе сведения о взаимодействии HIF-1 с глюкокортикоидными рецепторами свидетельствуют об ошибочности этого предположения и о важной, стресс-специфической роли данного фактора в нейрональных и системных механизмах адаптации не только к гипоксическому, но и психоэмоциональному стрессу.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что локализованный в нейронах мозга фактор HIF-1 широко вовлекается в процессы адаптации мозга и организма в целом к стрессам различной природы и компенсации постстрессорных нарушений, однако его роль специфична по отношению к природе стрессора. Впервые наши исследования на крысах продемонстрировали участие HIF-1 в патогенезе тревожно-депрессивных состояний, возникающих при действии тяжелого психоэмоционального, но не гипоксического, стресса. Стресс-протективные и проадаптивные эффекты УГГ в режимах пре- и посткондиционирования сопровождаются усилением срочной активации HIF-1 и нивелированием его пролонгированной сверхиндукции в нейронах мозга.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 13-04-00532 и 12-04-31039, грантом ГФФИ Украины Ф53/200-2013.*

**О.О. Рыбникова, К.О. Баранова, Т.С. Глущенко, О.В. Ветровой, М.В. Сидорова, В.И. Портниченко**

#### **УЧАСТЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА, ИНДУКОВАННОГО ГИПОКСИЕЙ, У НЕЙРОНАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМАХ АДАПТАЦІЇ ДО ПСИХОЕМОЦІЙНОГО ТА ГИПОКСИЧНОГО СТРЕСУ**

Методом кількісної імуногістохімії досліджена експресія  $\alpha$ -субодиниці транскрипційного фактора HIF-1 в гіпокампі і неокортексі шурів у відповідь на патогенний психоемоційний (модель посттравматичного стрессового розладу, ПТСР) і гіпоксичний (важка гіпобарична гіпоксія, 180 мм

рт.ст., 3 год) стрес, а також при застосуванні нейропротективних способів гіпоксичного пре-і посткондиціонування. Виявлено пролонговану оверекспресію HIF-1 $\alpha$  в гіпокампі і неокортексі шурів у відповідь на психоемоційний стрес у моделі ПТСР, але не на гіпоксичний стрес. Гіпоксичне пре-і посткондиціонування з використанням сеансів помірної гіпобаричної гіпоксії (360 мм рт.ст., 2 год, тричі з інтервалом 24 год), що сприяє адаптації до психоемоційного стресу, нівелювало пролонговану оверекспресію HIF-1 $\alpha$ . Поряд з цим гіпоксичне посткондиціонування, що покращує структурно-функціональну реабілітацію після важкого гіпоксичного стресу, стимулювало експресію HIF-1 $\alpha$  в нейронах мозку шурів, які пережили важку гіпоксію. Результати свідчать про те, що транскрипційний фактор HIF-1 $\alpha$  активно залучений до процесів адаптації / дезадаптації до дії пошкоджувальних факторів, проте його роль специфічна по відношенню до природи стресора.

Ключові слова: фактор, індукований гіпоксією, HIF-1 $\alpha$ , мозок, психоемоційний стрес, гіпоксичний стрес, адаптація, гіпоксичне прекоондиціонування, гіпоксичне посткондиціонування.

**E.A. Rybnikova, K.A. Baranova, T.S. Gluschenko,  
O. Vetrov, M. Sidorova, I. Portnichenko**

#### **INVOLVEMENT OF TRANSCRIPTIONAL FACTOR HIF-1 $\alpha$ IN THE NEURONAL MECHANISMS OF ADAPTATION TO PSYCHOEMOTIONAL AND HYPOXIC STRESS IN RATS**

Using quantitative immunohistochemistry, neuronal expression of  $\alpha$ -subunit of the transcriptional factor HIF-1 in hippocampus and neocortex of rats in response to pathogenic psychoemotional (model of posttraumatic stress disorder, PTSD) and hypoxic (severe hypobaric hypoxia, 180 Torr, 3 h), as well as to neuroprotective exposures to hypoxic pre- and postconditioning has been studied. Elongated overexpression of HIF-1 $\alpha$  in hippocampus and neocortex of rats in response to the psychoemotional stress in PTSD paradigm, but not hypoxic stress, has been observed. Hypoxic pre- and postconditioning with mild hypobaric hypoxia (360 Torr, 2 h, 3 trials spaced at 24 h), those induced adaptation to the psychoemotional stress, abolished the elongated HIF-1 $\alpha$  overexpression. Hypoxic postconditioning which improved structure and functional rehabilitation following severe hypoxic stress up-regulated HIF-1 $\alpha$  expression in the brain neurons of rats survived severe hypoxia. The findings indicate that transcription factor HIF-1 is particularly involved in the processes of adaptation/maladaptation to the action of injurious stresses, but its role depends upon the nature of stressor.

Key words: hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ , brain, psychoemotional stress, hypoxic stress, adaptation, hypoxic preconditioning, hypoxic postconditioning.

*Pavlov Institute of Physiology, RAS, St. Petersburg, Russia;  
International Centre for Astronomical, Medical and  
Ecological Research, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Баранова К.А., Миронова В.И., Рыбникова Е.А., Самойлов М.О. Особенности экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  в мозге крыс при формировании депрессивноподобного состояния и антидепрессивных эффектов гипоксического прекоондиционирования // *Нейрохимия*. – 2010. – 27, № 1. – С. 40–46.
2. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // *Биол. мембраны*. – 2012. – 29, №4. – С. 238–252.
3. Рыбникова Е.А., Самойлов М.О., Миронова В.И., Тюлькова Е.И., Пивина С.Г., Ватаева Л.А., Ордян Н.Э., Абриталин Е.Ю., Колчев А.И. Возможности использования гипоксического прекоондиционирования для профилактики постстрессовых депрессивных эпизодов // *Журн. невропатол. психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2007. – № 3-4. – С. 43–48.
4. Рыбникова Е.А., Миронова В.И., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Анксиолитический эффект гипоксического прекоондиционирования у крыс в модели посттравматического стрессового расстройства // *Журн. Внд*. – 2008. – 58, № 4. – С. 475–482.
5. Рыбникова Е.А., Воробьев М.Г., Самойлов М.О. Гипоксическое посткондиционирование корректирует нарушения поведения крыс в модели посттравматического стрессового расстройства // *Там же*. – 2012. – 62, № 3. – С. 364–371.
6. Рыбникова Е.А., Хожай Л.И., Тюлькова Е.И., Глуценко Т.С., Ситник Н.А., Пелто-Хьюкко М., Отеллин В.А., Самойлов М.О. Влияние гипобарической гипоксии на экспрессию белков ранних генов и структурные изменения нейронов мозга: корректирующий эффект прекоондиционирования // *Морфология*. – 2004. – 125, №2. – С. 10–15.
7. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В. Сигнальные молекулярные и гормональные механизмы протективных эффектов гипоксического прекоондиционирования // *Патол. физиология и эксперим. терапия*. – 2012. – №3. – С. 3–10.
8. Самойлов М.О., Семенов Д.Г., Тюлькова Е.И., Рыбникова Е.А., Ватаева Л.А., Глуценко Т.С., Строев С.А., Миллер О.Л. Молекулярные механизмы кратко- и долговременных эффектов гипоксического прекоондиционирования. – В кн.: *Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты* / Отв. ред. Л.Д. Лукьянова, И.Б. Ушаков. – М.: Истоки, 2003. – С. 96–111.
9. Серебровская Т.В. Гипоксия-индуцибельный фактор: роль в патофизиологии дыхания // *Укр. пульмонол. журн*. – 2005. – № 3. – С. 77–81.
10. Ausserer W.A., Bourrat-Floek B., Green C.J., Laderoute K.R., Sutherland R.M. Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress // *Mol. Cell Biol*. – 1994. – 14(8). – P. 032–5042.
11. Gu Y.Z., Hogenesch J.B., Bradfield C.A. The PAS su-



- perfamily: sensors of environmental and developmental signals // *Annu. Re Pharmacol. Toxicol.* – 2000. – **40**. – P. 519–561.
12. Kodama T., Shimizu N., Yoshikawa N., Makino Y., Ouchida R., Okamoto K., Hisada T., Nakamura H., Morimoto C., Tanaka H. Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**(35). – P. 33384–33391.
  13. Lando D., Gorman J.J., Whitelaw M.L., Peet D.J. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – **270**(5). – P. 781–790.
  14. Leconte C., Léger M., Boulouard M., Tixier E., Fréret T., Bernaudin M., Schumann-Bard P. Repeated mild hypoxic exposures decrease anxiety-like behavior in the adult mouse together with an increased brain adrenomedullin gene expression // *Behav. Brain Res.* – 2012. – **230**(1). – P. 78–84.
  15. Leonard M.O., Godson C., Brady H.R., Taylor C.T. Potentiation of glucocorticoid activity in hypoxia through induction of the glucocorticoid receptor // *J. Immunol.* – 2005. – **174**, №4. – P. 2250–2257.
  16. Liberzon I., Krstov M., Young E.A. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback // *Psychoneuroendocrinology.* – 1997. – **22**, №6. – P. 443–453.
  17. Lin A.M., Chen C.F., Ho L.T. Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron-induced oxidative injury in rat brain // *Exp. Neurol.* – 2002. – **176**, № 2. – P. 328–335.
  18. Murphy B.J., Andrews G.K., Bittel D., Discher D.J., McCue J., Green C.J., Yanovsky M., Giaccia A., Sutherland R.M., Laderoute K.R., Webster K.A. Activation of metallothionein gene expression by hypoxia involves metal response elements and metal transcription factor-1 // *Cancer Res.* – 1999. – **59**(6). – P. 1315–1322.
  19. Ogunshola O.O., Antoniou X. Contribution of hypoxia to Alzheimer's disease: is HIF-1alpha a mediator of neurodegeneration? // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2009. – **66**, № 22. – P. 3555–3563.
  20. Paschos N., Lykissas M.G., Beris A.E. The role of erythropoietin as an inhibitor of tissue ischemia // *Int. J. Biol. Sci.* – 2008. – **10**, № 4(3). – P. 161–168.
  21. Pirkmajer S., Filipovic D., Mars T., Mis K., Grubic Z. HIF-1alpha response to hypoxia is functionally separated from the glucocorticoid stress response in the in vitro regenerating human skeletal muscle // *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2010. – **299**, №6. – P. 1693–700.
  22. Portnychenko A.G., Dosenko E., Portnichenko I., Moybenko O.O. Expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  differentially changed in rat heart ventricles after hypoxic preconditioning // *Proc. of XXVIII Eur. Sect. Meeting of the ISHR, Athens, Greece, May 28-31, 2008.* – Medimond Intern. Proc., 2008. – P. 61–64.
  23. Risau W. Mechanisms of angiogenesis // *Nature.* – 1997. – **386**. – P.671–674.
  24. Rybnikova E., Vorobyev M., Pivina S., Samoilov M. Post-conditioning by mild hypoxic exposures reduces rat brain injury caused by severe hypoxia // *Neurosci Lett.* – 2012. – **513**(1). – P. 100–105.
  25. Selye H. Stress and the general adaptation syndrome // *Brit. Med. J.* – 1950. – **1**(4667). – P. 1383–1392.
  26. Semenza G.L. O<sub>2</sub>-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1 // *J. Appl. Physiol.* – 2004. – **96**(3). – P. 1173–1177.
  27. Semenza G.L. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease // *Respir. Res.* – 2000. – **1**(3). – P. 159–162.
  28. Shi J., Yang S.H., Stubbley L., Day A.L., Simpkins J.W. Hypoperfusion induces overexpression of beta-amyloid precursor protein mRNA in a focal ischemic rodent model // *Brain Res.* – 2000. – **853**. – P. 1–4.
  29. Wagner A.E., Huck G., Stiehl D.P., Jelkmann W., Hellwig-Bürgel T. Dexamethasone impairs hypoxia-inducible factor-1 function // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2008. – **372**, № 2. – P. 336–340.
  30. Weidemann A., Johnson R.S. Biology of HIF-1alpha // *Cell Death Differ.* – 2008. – **15**, № 4. – P. 621–627.
  31. Wenger R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression // *FASEB J.* – 2002. – **16**. – P. 1151–1162.
  32. Yehuda R. Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – **1179**. – P. 56–69.
  33. Zhang X., Zhou K., Wang R., Cui J., Lipton S. A., Liao F.F., Xu H., Zhang Y.W. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and beta-amyloid generation // *J. Biol. Chem.* – 2007. – **282**. – P. 10873–10880.

ФГБУН Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН,  
 Санкт-Петербург, Россия;  
 Междунар. центр астроном. и мед.-экол. исследований  
 НАН Украины, Киев  
 E-mail: rybnikova1@rambler.ru

Материал поступил в  
 редакцию 31.04.2013

Ю.И. Кирова, Э.Л. Германова, Л.Д. Лукьянова

## Фенотипические особенности экспрессии фактора, индуцированного гипоксией, и редокс-статус клеток неокортекса крыс на разных стадиях адаптации к гипоксии

*Гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования вызывают в коре головного мозга неустойчивых к гипоксии крыс фазное увеличение экспрессии фактора, индуцированного гипоксией (HIF-1 $\alpha$ ). Показано, что после каждого гипоксического воздействия наблюдается кратковременная фаза срочной экспрессии HIF-1 $\alpha$ , которая быстро нивелируется в нормоксических условиях. Вторичное увеличение экспрессии развивается через сутки после очередного гипоксического воздействия. Фазность срочной и долгосрочной экспрессии HIF-1 $\alpha$  коррелирует с динамикой формирования у неустойчивых к гипоксии крыс срочной и отсроченной резистентности, что позволяет предполагать вовлеченность HIF-1 в механизмы не только долговременной, но и срочной адаптации к гипоксии. Показано, что воздействия гипоксии в режиме прекондиционирования мобилизуют антиоксидантную систему (индуцируют активацию Cu,Zn-супероксиддисмутазы), не влияя на интенсивность процессов ПОЛ в неокортексе (интервальная нормобарическая гипоксия, 10 % O<sub>2</sub>) или снижают в раннем постгипоксическом периоде содержание продуктов липопероксидации и окисленного глутатиона в клетках неокортекса (гипобарическая гипоксия – ГБГ-5000, 10,6 % O<sub>2</sub>). В условиях отсутствия активизации процессов свободнорадикального и перекисного окисления прекондиционирующие режимы гипоксии увеличивают экспрессию HIF-1 $\alpha$  в неокортексе неустойчивых к гипоксии крыс, индуцируют формирование срочной и долговременной адаптации к гипоксии. Таким образом, активные формы кислорода не имеют определяющего значения в индукции экспрессии HIF-1 $\alpha$  и формировании срочной и долговременной адаптации к гипоксии. У высокоустойчивых животных гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования не влияют на экспрессию HIF-1 $\alpha$  и формирование адаптации. Воздействия тяжелой гипоксии (ГБГ-7000, 8 % O<sub>2</sub>) вызывают активизацию процессов ПОЛ в неокортексе неустойчивых к гипоксии крыс. В условиях доминирования прооксидантных систем над антиоксидантными наблюдается снижение экспрессии HIF-1 $\alpha$  в неокортексе, нарушение формирования срочной и долговременной адаптации к гипоксии. Ключевые слова: HIF-1 $\alpha$ , неокортекс, гипоксическое прекондиционирование, тяжелая гипоксия, высокоустойчивые и неустойчивые к гипоксии крысы, срочная и долговременная адаптация к гипоксии, перекисное окисление липидов, гидроперекиси липидов, конъюгированные диены, окисленный глутатион, продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой.*

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, особая роль в формировании адаптации к гипоксии принадлежит специфическому гипоксическому транскрипционному фактору HIF-1 (от англ. Hypoxia Inducible Factor), координирующему генно-опосредованные ме-

ханизмы этого процесса как на клеточном, так и на системном уровнях. HIF-1 экспрессируется в самых разных типах клеток, функционирует как транскрипционный активатор и ключевой регулятор кислородного гомеостаза у всех ядерных метазоа и является эволюционным продуктом адаптации к изменению содержания кислорода в окружающей среде [12, 27, 32].

© Ю.И. Кирова, Э.Л. Германова, Л.Д. Лукьянова

HIF-1 – это гетеродимерный редоксчувствительный белок, который состоит из конститутивно экспрессируемой субъединицы HIF-1 $\beta$  и O<sub>2</sub>-регулируемой субъединицы HIF-1 $\alpha$  [42]. Синтез HIF-1 $\alpha$  индуцируют разные группы сигнальных молекул, включая сукцинат, факторы роста, цитокины, гормоны, вазоактивные пептиды, с помощью активации PI3K- или MAPK-опосредованных сигнальных путей [31]. Этот процесс кислороднезависим. Протеасомная деградация HIF-1 $\alpha$  инициируется пролилгидроксилазами (от англ. Prolyl Hydroxylase-Domaine containing protein – PHD; HIF-1 Prolyl Hydroxylase - PHH), которые используют O<sub>2</sub> и  $\alpha$ -кетоглутарат в качестве субстратов, необходимых для катализа диоксигеназной реакции. При этом один атом O<sub>2</sub> включается в остаток пролина, а второй – в  $\alpha$ -кетоглутарат с образованием сукцината и CO<sub>2</sub> [22]. В условиях гипоксии активность PHDs снижается, HIF-1 $\alpha$  аккумулируется в клетке, реализуется его транскрипционная функция, связанная с экспрессией генов адаптации.

В настоящее время обширная литература посвящена регуляции активности HIF-1, в том числе его взаимодействию с другими сигнальными путями, на разных стадиях адаптации к гипоксии. Так, например, широко обсуждается гипотеза триггерной роли активных форм кислорода (АФК) преимущественно митохондриального происхождения в стабилизации, активации и экспрессии HIF-1 при гипоксическом сигналинге. Эта гипотеза сформировалась на основе многочисленных фактов, подтверждающих гипоксическую гиперпродукцию АФК в митохондриях [8, 10, 37], потенцирующее их действие на PI3K- и MAPK-сигнальные пути [17, 36], ингибирование кислородными метаболитами HIF-специфичных пролилгидроксилаз, что приводит к стабилизации и аккумуляции последнего [10].

При обсуждении сигнальной роли АФК в гипоксических условиях следует учитывать, что способность HIF-1 связывать транс-

крипционные ко-активаторы и HRE (от англ. hypoxia-responsible element) генов-мишеней, является редоксчувствительной и регулируется соотношением GSSG/GSH [18]. Высокий уровень GSSG – маркера окислительного стресса – препятствует стабилизации HIF-1 $\alpha$  в условиях гипоксии, его транслокации в ядро, ДНК-связыванию и взаимодействию с ко-активаторами транскрипции [19, 20]. При активации свободнорадикальных процессов, которая наблюдается при тяжелой гипоксии, возможна также окислительная модификация HIF-1 $\alpha$  АФК по остаткам цистеина [41] и последующая деградация окисленного HIF-1 $\alpha$  в убиквитиннезависимом 20S протеасомном пути [34].

В последние годы появились работы, в которых доказывается, что снижение содержания молекулярного кислорода в окружающей среде приводит к уменьшению продукции в клетках АФК [5]. Так, например, показано, что в изолированном перфузируемом легком во время гипоксии уменьшается продукция супероксидного радикала (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) [30]. В культурах клеток, инкубируемых в условиях гипоксии (0,01 – 4 % O<sub>2</sub>), было обнаружено значимое снижение активности пентозофосфатного цикла, что указывает на уменьшение митохондриальной и цитозольной продукции АФК. Обратный эффект наблюдался при гипероксии, которая вызывала увеличение активности пентозофосфатного цикла [38]. Таким образом, метаболическая продукция АФК является, по-видимому, прямой функцией pO<sub>2</sub>, как было предсказано Boveris и Chance [11].

Существует и альтернативная свободнорадикальной гипотезе точка зрения, согласно которой аккумуляция HIF-1 $\alpha$  при гипоксии связана с репрограммированием работы дыхательной цепи и увеличением образования эндогенного сукцината – ингибитора реакций протеасомной деградации HIF-1 $\alpha$  и активатора его кислороднезависимого синтеза, контролируемого сигнальными системами MAPK и PI3K [2, 6]. Содержание сукцината

– метаболита цикла трикарбоновых кислот – многократно увеличивается в тканях и крови при гипоксии, что позволяет считать его молекулярным маркером гипоксических/ишемических состояний, сигнальная функция которого опосредуется высокоспецифичным рецептором GPR91 [4, 24–26, 40]. Сукцинат ингибирует PHDs, способствуя тем самым аккумуляции HIF-1 $\alpha$  в клетке [33]. В настоящее время сукцинат рассматривается как сигнальная молекула, благодаря которой осуществляется сигнальная функция митохондрий, контролирующая формирование молекулярных механизмов адаптации к гипоксии [2, 6].

Резюмируя все сказанное выше, очевидно, что регуляция активности HIF-1 $\alpha$  при гипоксии – процесс многофакторный и очень сложный. На сегодняшний день остаются нерешенными следующие принципиальные вопросы: 1) участвует ли HIF-1 $\alpha$  в индукции срочных механизмов адаптации при разных режимах гипоксического воздействия; 2) влияют ли фено- и генотипические особенности организма на участие HIF-1 $\alpha$  в формировании срочной и долгосрочной адаптации; 3) существует ли корреляция между экспрессией HIF-1 $\alpha$  в тканях, активностью АФК и формированием резистентности организма к гипоксии. Именно этим вопросам посвящена данная работа.

## МЕТОДИКА

Работа проведена на двух фенотипах животных: с низкой (НУ) и высокой устойчивостью (ВУ) к гипоксии белых беспородных крысах-самцах, содержащихся в виварии в стандартных условиях [7].

В течение 15 сут животных подвергали воздействию: а) интервальной нормобарической гипоксии (ИНГ) в режиме прекондиционирования (ежедневные часовые циклы, состоящие из чередования кратковременных 5-минутных периодов дыхания при постоянном нормальном давлении гипоксической

газовой смесью, содержащей 10 % O<sub>2</sub>, сменяющихся дыханием в течение 3 мин атмосферным воздухом); суммарная длительность гипоксического воздействия в этом случае составляла 35 мин; б) гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования – ГБГ-5000 (подъем в барокамере на высоту 5000 м, 10,5 % O<sub>2</sub> и пребывание в этих условиях в течение часа); в) тяжелой гипобарической гипоксии – ГБГ-7000 (подъем в барокамере на высоту 7000 м, 8 % O<sub>2</sub> и пребывание в этих условиях в течение часа).

Содержание HIF-1 $\alpha$  определяли в наиболее чувствительной к гипоксии ткани – коре головного мозга. Забор ткани проводили сразу (1 мин) и через 24 ч после 1-, 3-, 8- и 15-го применения гипоксических воздействий в выбранном режиме. В эти же периоды оценивали степень адаптированности крыс по изменению их общей резистентности к гипоксии (время жизни в условиях острой гипобарической гипоксии на критической высоте).

Для определения содержания HIF-1 $\alpha$  [13] получали ядерный экстракт коры головного мозга. Белки разделяли в 8%-м полиакриламидном геле. Перенос белков с последнего на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроэлюцией в течение 60 мин. Преинкубацию мембраны проводили 60 мин в PBS, содержащем 0,1% Tween-20 и 5%-е обезжиренное молоко. Затем мембрану инкубировали 14 ч при 4<sup>0</sup>С в растворе первых поликлональных антител («Santa Cruz Biotechnology», CA, США) против HIF-1 $\alpha$  в разведении 1:1000. После отмывки мембрану инкубировали 60 мин в растворе вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена («Santa Cruz Biotechnology», CA, США) в разведении 1:5000. Детектирование HIF-1 $\alpha$  осуществляли в реакции с ECL-реагентами на пленку фирмы «Kodak» с последующей денситометрией (Adobe Photoshop CS5 Extended software version 12.0.3; Adobe Systems, San Jose, CA, США).

Для оценки редокс-статуса клеток неокортекса определяли содержание компонентов

пула глутатиона (G, GSH, GSSG) [16], продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): гидроперекисей липидов [21], диеновых конъюгатов полиненасыщенных жирных кислот [15], а также метаболитов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-ПП) [28]. В клетках неокортекса определяли активность ключевых антиоксидантных ферментов цитоплазмы: глутатионпероксидазы [29], глутатионредуктазы [14], и Cu,Zn-содержащей супероксиддисмутазы [39]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия между группами при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Особенности действия разных режимов гипоксических воздействий на содержание HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс с ВУ и НУ и резистентность организма.*

Период полураспада HIF-1 $\alpha$  при обычном содержании кислорода во вдыхаемом воздухе (21 %) составляет несколько минут и, благодаря постоянно протекающему в цитозоле процессу его протеасомной деградации, внутриклеточное содержание HIF-1 $\alpha$  в нормоксических условиях достаточно низкое. Тем не менее, HIF-1 $\alpha$  постоянно синтезируется в нормоксических условиях, что видимо, необходимо для перманентной базовой индукции генов, связанных с поддержанием функциональной активности клетки и, прежде всего, с синтезом энергии. Оказалось, однако, что в нормоксических условиях базовое содержание HIF-1 $\alpha$  в коре головного мозга крыс с разной устойчивостью к гипоксии значительно различается. В неокортексе крыс с НУ содержание HIF-1 $\alpha$  было в 1,7 раза выше, чем у ВУ

(табл. 1). Таким образом, между содержанием HIF-1 $\alpha$  в неокортексе и резистентностью к гипоксии существует обратная зависимость. Одной из причин наблюдаемых различий может быть неодинаковая интенсивность кислородзависимой протеасомной деградации HIF-1 $\alpha$  в неокортексе животных с ВУ и НУ в условиях нормоксии, обусловленная более высоким уровнем оксигенации коры головного мозга у первых. Это, в свою очередь, может определять и большую эффективность у них процесса деградации гипоксического фактора. Таким образом, существуют не только тканеспецифические [1, 35], но и выраженные фенотипические различия в базовом содержании HIF-1 $\alpha$  в тканях, зависящие от исходной резистентности животных к гипоксии.

*Влияние однократного гипоксического preconditionирования на содержание HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс и резистентность организма.* Одноразовое применение ИНГ (10 % O<sub>2</sub>) и ГБГ-5000 м (10,5 % O<sub>2</sub>) индуцировало в неокортексе крыс с НУ двухфазное увеличение содержания HIF-1 $\alpha$  (рис. 1,а). Первичное увеличение (120–140 %) наблюдалось сразу после гипоксического воздействия. Оно было кратковременным и в условиях постгипоксической реоксигенации быстро (в течение часа) нормализовалось. Второй более продолжительный период увеличения экспрессии HIF-1 $\alpha$  (120–130 %) развивался через 24 ч после гипоксического воздействия в условиях нормальной оксигенации, т.е. был кислороднезависим. Это позволяет предполагать, что он вызван активацией кислороднезависимого синтеза HIF-1 $\alpha$  и/или шаперонопомощью его стабилизацией [23].

Двухфазное увеличение экспрессии HIF-1 $\alpha$  коррелировало с динамикой формирования у крыс с НУ срочной и отсроченной

**Таблица 1. Базовое нормоксическое содержание HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс с индивидуальными различиями в устойчивости к острой гипоксии (в % к содержанию HIF-1 $\alpha$  у наиболее резистентных животных)**

Время жизни (11500 м), мин, сек	0'40''	1'20''	2'20''	4'20''	8'40''
HIF-1 $\alpha$ , %	173*	174*	158*	116	100

\*  $P < 0,05$ .

резистентности к гипоксии. Ранее нами было показано, что однократное гипоксическое воздействие в режиме прекондиционирования вызывает у крыс с НУ краткосрочное многократное увеличение толерантности к острой гипоксии (в 3–9 раз; см. рис. 1,б). Вторичное, отсроченное увеличение толерантности было существенно меньше (в 1,5–2 раза) и развивалось после периода ее относительной нормализации [3, 7].

У крыс с ВУ, в отличие от животных с НУ, однократное часовое воздействие гипоксии в режиме прекондиционирования не приводило ни к срочной экспрессии HIF-1 $\alpha$  в коре головного мозга в первые сутки постгипоксического периода, ни к увеличению его отсроченного синтеза (см. рис. 1,а). У

этого фенотипа животных была также снижена способность к формированию срочной резистентности (в 2–3 раза), а отсроченная не развивалась (см. рис. 1,б) [3, 7].

Таким образом, при гипоксических воздействиях в режиме прекондиционирования срочная экспрессия HIF-1 $\alpha$ , связанная как с кислородзависимым процессом его стабилизации за счет ингибирования пролилгидроксилазных реакций, так и с кислороднезависимым синтезом, реализуется только у крыс с НУ и отсутствует у животных с ВУ. Это говорит о фенотипических различиях путей образования HIF-1 $\alpha$ , влияющих на его участие в механизмах срочной адаптации и на формирование резистентности.

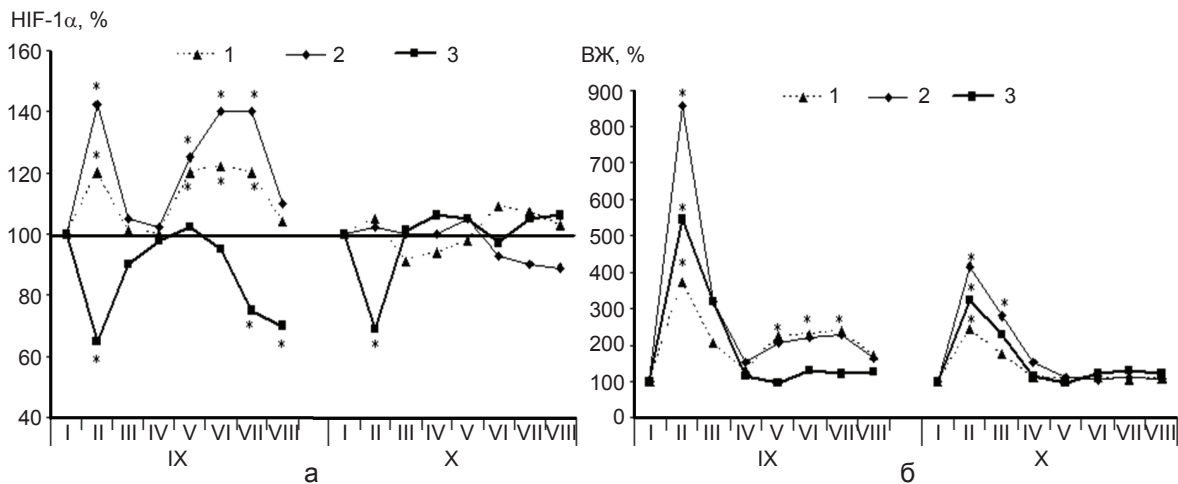


Рис. 1. Фенотипические различия в экспрессии HIF-1 $\alpha$  (неокортексе) и резистентности крыс к гипоксии на разных этапах формирования адаптации

1 – интервальная нормобарическая гипоксия в режиме прекондиционирования; 2 – гипобарическая гипоксия в режиме прекондиционирования; 3 – тяжелая гипобарическая гипоксия; I – контроль; II – 1 мин; III – 30 мин; IV – 2 ч; V – 24 ч; VI – 3+24 ч; VII – 8+24 ч; VIII – 15+24 ч

1 мин, 30 мин, 2 ч, 24 ч – продолжительность реоксигенации (минуты, часы)

1, 3, 8, 15 – количество гипоксических воздействий

24 ч – время после гипоксических воздействий

IX – неустойчивые к острой гипобарической гипоксии крысы; сохраняют жизнеспособность в этих условиях не более 2 мин;

X – высокоустойчивые к острой гипобарической гипоксии крысы; сохраняют жизнеспособность в этих условиях более 6 мин;

\* $P < 0,05$  достоверное различие с контрольной группой

ВЖ – «время жизни»; продолжительность пребывания животного на критической высоте (11,5 тыс. м) до появления патологических типов дыхания

Влияние однократного воздействия тяжелой гипоксии на содержание HIF-1 $\alpha$  и резистентность организма. Одноразовое применение ГБГ-7000 (8 % O<sub>2</sub>) приводило у обоих фенотипов животных не к увеличению, а первичному достоверному снижению содержания HIF-1 $\alpha$  в коре головного мозга в ранний постгипоксический период (первые 30 мин), которое могло достигать 30–40 % (см. рис. 1,а). В последующие часы происходила его постепенная нормализация вплоть до полного восстановления исходного уровня через сутки. Снижение экспрессии HIF-1 $\alpha$  в условиях тяжелой гипоксии наблюдали и другие исследователи [35]. Объяснение этому явлению в настоящее время отсутствует, хотя имеются предположения, что оно может быть связано с нарастающим в этих условиях энергодиффицитом и подавлением синтеза HIF-1 $\alpha$  на этапе трансляции [9]. Полученные факты указывают так же на то, что регуляторная функция HIF-1 $\alpha$  в условиях *in vivo* реализуется лишь в определенном диапазоне концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе и не проявляется при снижении до значений менее 10 %.

Несмотря на то, что у обоих фенотипов крыс после однократного применения тяжелой гипоксии наблюдалось подавление срочной экспрессии HIF-1 $\alpha$ , способность формировать срочную резистентность к острой гипоксии у них сохранялась, хотя степень ее выраженности уменьшалась сравнительно с гипоксическим прекодиционированием (ГБГ-5000; см. рис. 1,б). В отличие от этого формирование отсроченной резистентности к острой гипоксии в этих условиях вообще не происходило [3, 7].

Все это говорит о том, что формирование отсроченных механизмов адаптации полностью зависит от способности организма к экспрессии HIF-1 $\alpha$ , в то время как на стадии индукции адаптации HIF-1 $\alpha$  не является единственным сигнальным механизмом этого процесса.

*Действие многократного (курсового) применения гипоксии на динамику содержания*

*HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс и резистентность организма.* При курсовом ежедневном применении ИНГ (10 % O<sub>2</sub>) и ГБГ-5000 (10,5 % O<sub>2</sub>) в режиме прекодиционирования в неокортексе крыс с НУ происходило увеличение базового содержания HIF-1 $\alpha$ , которое могло отражать активацию его синтеза и достигало максимальных значений в период 3–8-го гипоксических воздействий (120 %<sub>ИНГ</sub>; 140 %<sub>ГБГ-5000</sub>; см. рис. 1,а). После 15-го гипоксического воздействия содержание HIF-1 $\alpha$ , снижалось до исходных значений, что отражало, по-видимому, завершение формирования адаптации.

Динамика содержания HIF-1 $\alpha$  в КГМ животных с НУ коррелировала с динамикой формирования отсроченной резистентности (см. рис. 1). При увеличении числа гипоксических воздействий до 8 резистентность постепенно нарастала и превышала исходную в 2–2,5 раза. Однако после 15-го воздействия она снижалась, хотя и была выше контрольного уровня в 1,5–2,0 раза (см. рис. 1,б).

В отличие от курсового прекодиционирования, многократное применение тяжелой гипоксии (ГБГ-7000, 8 % O<sub>2</sub>) вызывало у крыс с НУ снижение базового содержания HIF-1 $\alpha$  в неокортексе, которое нарастало по мере увеличения числа гипоксических воздействий (до 30 % после 15-го воздействия; см. рис. 1,а). Устойчивое снижение экспрессии HIF-1 $\alpha$  в этих условиях можно рассматривать как формирование дезадаптивных процессов.

У крыс с ВУ, в отличие от животных с НУ, ни курсовое гипоксическое воздействие в режиме прекодиционирования, ни многократное применение тяжелой гипоксии не влияли на содержание HIF-1 $\alpha$  и не индуцировали формирование отсроченной резистентности к острой гипоксии (см. рис. 1).

Таким образом, только у фенотипа крыс с НУ в условиях гипоксического прекодиционирования была установлена положительная динамика экспрессии HIF-1 $\alpha$ , которая коррелировала с увеличением резистентности к острой гипоксии. Тяжелая гипоксия

индуцировала у них отрицательную динамику экспрессии HIF-1 $\alpha$ , снижение срочной резистентности и нарушение формирования долговременной адаптации к гипоксии.

*Влияние разных режимов гипоксических воздействий на редокс-статус и экспрессию HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс с НУ.*

Однократное воздействие разных режимов гипоксии (ИНГ-10 % O<sub>2</sub>, ГБГ-5000 – 10,5 % O<sub>2</sub>, ГБГ-7000 – 8 % O<sub>2</sub>) вызывало разнонаправленные срочные изменения параметров редокс-статуса клеток неокортекса у крыс с НУ. Воздействие ИНГ не влияло на содержание продуктов липидной перекисидации и компонентов системы глутатиона, но индуцировало кратковременное увеличение активности Cu,Zn-СОД (рис. 2). Таким образом, ИНГ не влияла на редокс-статус клеток и оказывала лишь срочное кратковременное потенцирующее действие на антиоксидантную систему.

В отличие от ИНГ, часовое воздействие ГБГ-5000 вызывало в раннем постгипоксическом периоде снижение содержания гидроперекисных метаболитов и GSSG в клетках неокортекса, а также кратковременную активацию Cu,Zn-СОД, более выраженную сравнительно с ИНГ (см. рис. 2). Вторичное увеличение активности СОД происходило через 24 ч реоксигенации. Следовательно, в отличие от ИНГ, воздействие ГБГ-5000 сопровождалось снижением интенсивности процессов свободнорадикального и перекисного окисления в неокортексе, и этот процесс являлся суммарным итогом снижения скорости АФК-генерации и активизации антиоксидантной системы.

Таким образом, при однократных гипоксических воздействиях в режиме прекондиционирования увеличение срочной экспрессии HIF-1 $\alpha$  происходит при отсутствии изменений редокс-статуса клеток неокортекса (ИНГ)

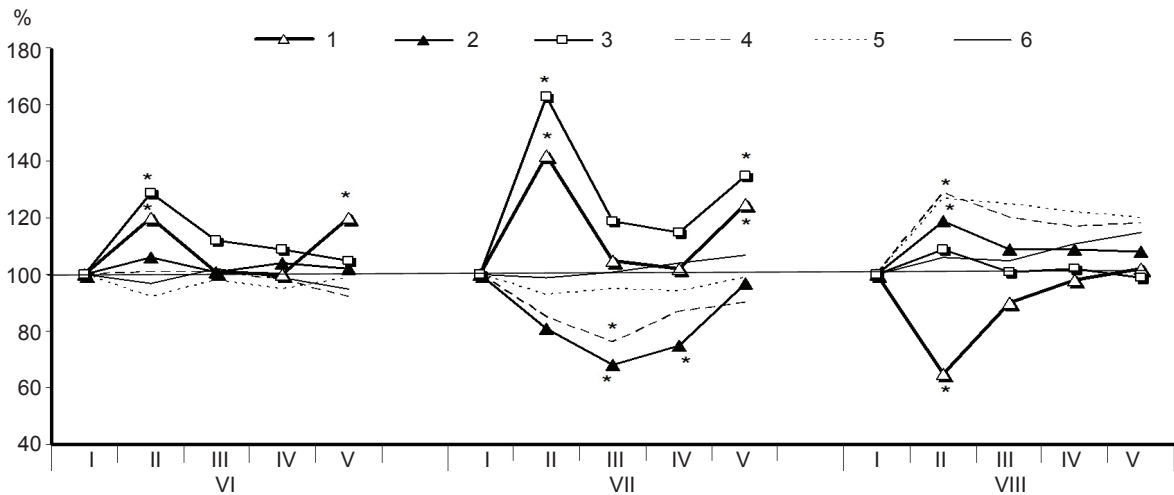


Рис. 2. Влияние однократного воздействия разных режимов гипоксии на содержание продуктов липидной перекисидации, окисленного глутатиона, активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы и экспрессию HIF 1 $\alpha$  в неокортексе крыс, неустойчивых к гипоксии

1 – HIF-1 $\alpha$ , 2 – окисленный глутатион, 3 – Cu,Zn-супероксиддисмутазы, 4 – гидроперекиси липидов, 5 – диеновые конъюгаты, 6 – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой;

I – контроль; II – 1 мин; III – 30 мин; IV – 2 ч; V – 24 ч

1 мин, 30 мин, 2 ч, 24 ч – продолжительность реоксигенации (минуты, часы)

VI – интервальная нормобарическая гипоксия в режиме прекондиционирования; VII – гипобарическая гипоксия в режиме прекондиционирования; VIII – тяжелая гипобарическая гипоксия.

\*P<0,05 достоверное различие с контрольной группой



или даже на фоне снижения интенсивности процессов свободнорадикального окисления (ГБГ-5000). Полученные результаты позволяют предполагать, что АФК не участвуют в регуляции срочной экспрессии HIF-1 $\alpha$ .

При однократном воздействии тяжелой формы гипоксии (ГБГ-7000) в клетках неокортекса происходило кратковременное снижение экспрессии HIF-1 $\alpha$  на фоне увеличения содержания гидроперекисных метаболитов, диеновых конъюгатов и GSSG в ранний постгипоксический период с последующей быстрой (через 2 ч) его нормализацией (см. рис. 2). Восстановление базового уровня экспрессии HIF-1 $\alpha$  в постгипоксическом периоде может свидетельствовать о транзитном характере нарушений синтеза HIF-1 $\alpha$ , индуцированных тяжелой гипоксией [9]. Тем не менее, активность Cu,Zn-СОД и глутатионзависимых антиоксидантных ферментов после воздействия ГБГ-7000 значительно не менялась, что говорит

о снижении способности к мобилизации антиоксидантной защиты.

Курсовое воздействие гипоксии в режиме прекодиционирования (ИНГ, ГБГ-5000) не влияло в неокортексе крыс с НУ на долгосрочную динамику содержания продуктов липидной пероксидации и компонентов пула глутатиона (рис. 3). Однако при курсовом воздействии ГБГ-5000, в отличие от курсового применения ИНГ, в неокортексе крыс с НУ наблюдалась устойчивая активация Cu,Zn-СОД (см. рис. 3). Таким образом, защитные антиоксидантные эффекты курсового применения ГБГ-5000 значительно превосходили соответствующие эффекты курсового воздействия ИНГ.

Несмотря на отсутствие при курсовом гипоксическом прекодиционировании изменений интенсивности свободнорадикальных процессов, в неокортексе крыс с НУ происходило постепенно нарастающее в процессе тренировок увеличение базового содержания

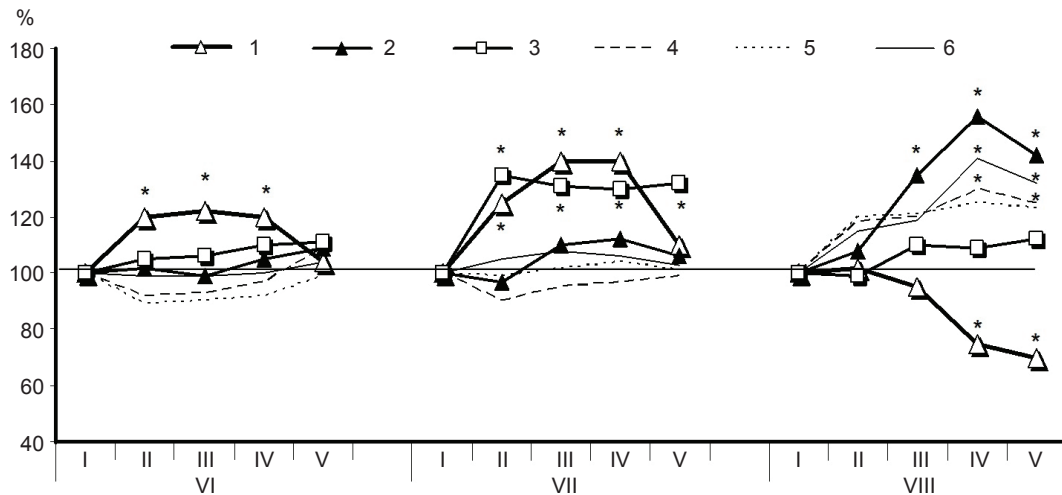


Рис. 3 Влияние курсового воздействия разных режимов гипоксии на содержание продуктов липидной пероксидации, окисленного глутатиона, активность Cu,Zn- супероксиддисмутазы и экспрессию HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс, неустойчивых к гипоксии

1 – HIF-1 $\alpha$ , 2 – окисленный глутатион, 3 – Cu,Zn-супероксиддисмутаза, 4 – гидроперекиси липидов, 5 – диеновые конъюгаты, 6 – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой;

I – контроль; II – 1+24 ч; III – 3+24 ч; IV – 8+24 ч; V – 15+24 ч

1, 3, 8, 15 – количество гипоксических воздействий, 24 ч – время после гипоксических воздействий, VI – интервальная нормобарическая гипоксия в режиме прекодиционирования; VII – гипобарическая гипоксия в режиме прекодиционирования; VIII – тяжелая гипобарическая гипоксия. \* P<0,05 достоверное различие с контрольной группой

HIF-1 $\alpha$ , достигающее максимальных значений после 8-го гипоксического воздействия (см. рис. 3). При курсовом, также как и при однократном применении гипоксических воздействий в режиме прекондиционирования, формирование HIF-1-зависимых механизмов адаптации протекало на фоне отсутствия признаков активации свободнорадикальных процессов, что ставит под сомнение необходимость их участия в механизмах отсроченной экспрессии HIF-1 $\alpha$ .

Противоположные эффекты были получены при курсовом применении тяжелых гипоксических воздействий (ГБГ-7000). В этом случае в неокортексе крыс с НУ наблюдалось устойчивое увеличение содержания гидроперекисных соединений, диеновых конъюгатов полиненасыщенных жирных кислот, ТБК-ПП, GSSG, которое достигало максимальных значений после 8-го воздействия (см. рис. 3). В этот же период, на пике активации свободнорадикальных процессов, развивалось устойчивое снижение (на 25–30 %) содержания HIF-1 $\alpha$  в КГМ, что может быть связано с активизацией убиквитиннезависимого пути деградации окислительно-модифицированного HIF-1 $\alpha$  [34] (см. рис. 3). При этом активность антиоксидантных ферментов неокортекса (глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, СОД) не отличалась от контрольной, но устойчивая активация процессов ПОЛ указывает на несостоятельность механизмов антиоксидантной системы неокортекса в этих условиях.

Полученные результаты позволяют предполагать, что при курсовом применении тяжелых гипоксических воздействий, сопутствующая активация свободнорадикальных процессов может быть одной из причин подавления отсроченной аккумуляции HIF-1 $\alpha$  и отрицательно влиять на формирование долгосрочной адаптации к гипоксии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что базовое содержание HIF-1 $\alpha$  в нор-

моксической ткани и интенсивность его экспрессии в гипоксических условиях зависят от фенотипа животных, т.е. генетически детерминированы. При этом в нормоксических условиях между содержанием HIF-1 $\alpha$  в ядерной фракции и исходной резистентностью животных к гипоксии существует обратная зависимость, свидетельствующая о фенотипических различиях путей образования и аккумуляции HIF-1 $\alpha$  (в системах пролилгидроксилазных реакций и сигнальных путях PI3K и MAPK-зависимого синтеза), влияющих на его участие в механизмах срочной адаптации и на формирование резистентности.

Гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования (содержание O<sub>2</sub> во вдыхаемом воздухе не менее 10 %) способствуют индукции срочной экспрессии HIF-1 $\alpha$  (при однократном применении гипоксии) и отсроченному увеличению базового содержания HIF-1 $\alpha$  (при курсовом применении гипоксии) только у фенотипа крыс с НУ и отсутствует у животных с ВУ. Этот фазный процесс коррелирует с динамикой формирования у животных с НУ срочной и отсроченной резистентности к гипоксии и протекает без признаков окислительного стресса (при отсутствии активации свободнорадикальных процессов и изменения редокс-статуса ткани). Все это свидетельствует о: а) фенотипически опосредованной вовлеченности HIF-1 не только в механизмы отсроченной, но и срочной адаптации к гипоксии и б) возможности реализации сигнальной функции HIF-1 без участия АФК.

Специфическая транскрипционная функция HIF-1 $\alpha$  в условиях *in vivo* реализуется лишь в определенном диапазоне концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе и не проявляется при ее снижении до значений менее 10 %. При 8 % O<sub>2</sub> у обоих фенотипов животных наблюдается не увеличение, а достоверное снижение содержания HIF-1 $\alpha$  в коре головного мозга в ранний постгипоксический период, которое нарастает у животных с НУ при многократном гипоксическом

воздействию. При этом, однако, у них сохраняется способность формировать срочную резистентность к острой гипоксии, хотя степень ее выраженности снижена сравнительно с гипоксическим прекондиционированием. В то же время при данном режиме оксигенации и у животных с НУ, и с ВУ отсутствует способность формировать отсроченную резистентность к острой гипоксии. Следовательно, формирование долгосрочных механизмов адаптации зависит от способности организма синтезировать и накапливать в этот период HIF-1 $\alpha$ , который является, видимо, главным регуляторным фактором, ответственным за этот процесс. Однако частичное сохранение способности организма к формированию срочной резистентности свидетельствует о том, что на стадии индукции адаптации HIF-1 $\alpha$  не является единственным сигнальным механизмом этого процесса.

Отсутствие активации свободнорадикальных процессов при однократном и курсовом применении гипоксических воздействий в режиме прекондиционирования ставит под сомнение необходимость их участия в механизмах срочной и отсроченной экспрессии HIF-1 $\alpha$  и формировании резистентности организма в этих условиях. Однако активация свободнорадикальных процессов в условиях тяжелой гипоксии (8 % O<sub>2</sub>) может быть причиной подавления срочной экспрессии и отсроченной аккумуляции HIF-1 $\alpha$ .

## ВЫВОДЫ

1. HIF-1 $\alpha$  выполняет сигнальную функцию при формировании не только долгосрочных механизмов адаптации, но и (частично) на стадии ее индукции лишь в определенном диапазоне концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе (не менее 10% O<sub>2</sub>) и преимущественно у животных с НУ, что указывает на фенотипическую опосредованность процесса, т.е. его генетическую детерминированность.

2. Сигнальная функция HIF-1 $\alpha$  при формировании срочной и долгосрочной адаптации

и резистентности организма не реализуется при концентрации кислорода менее 10%, что связано с подавлением срочной экспрессии и синтеза HIF-1 $\alpha$  в этих условиях.

3. Сигнальная функция HIF-1 $\alpha$  при гипоксических воздействиях в режиме прекондиционирования не требует участия АФК и реализуется при отсутствии признаков окислительного стресса. Однако активация свободнорадикальных процессов при тяжелых формах гипоксии (8 % O<sub>2</sub>) может способствовать подавлению срочной экспрессии и синтеза HIF-1 $\alpha$  и формирования долгосрочной адаптации к гипоксии.

Ю.І. Кірова, Е.Л. Германова, Л.Д. Лук'янова

## ФЕНОТИПОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ФАКТОРА, ІНДУКОВАНОГО ГІПОКСІЄЮ, І РЕДОКС-СТАТУС КЛІТИН НЕОКОРТЕКСУ ЩУРІВ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ АДАПТАЦІЇ ДО ГІПОКСІЇ

Гіпоксичні впливи в режимі прекондиціонування викликають в корі головного мозку нестійких до гіпоксії щурів фазове збільшення експресії фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1 $\alpha$ ). Показано, що після кожного гіпоксичного впливу спостерігається короткочасна фаза негайної експресії HIF-1 $\alpha$ , яка швидко нівелюється в нормоксичних умовах. Вторинне збільшення експресії розвивається через добу після чергового гіпоксичного впливу. Фазовий характер негайної та довгострокової експресії HIF-1 $\alpha$  корелює з динамікою формування у нестійких до гіпоксії щурів негайної та відстроченої резистентності, що дає змогу припускати залученість HIF-1 у механізми не тільки довготривалої, але й негайної адаптації до гіпоксії. Показано, що впливи гіпоксії в режимі прекондиціонування мобілізують антиоксидантну систему (індукують активацію Cu, Zn-SOD), не впливають на інтенсивність процесів ПОЛ в неокортексі (інтервальна нормобарична гіпоксія, 10 % O<sub>2</sub>) або знижують в ранньому постгіпоксичному періоді вміст продуктів ліпопероксидації та окисненого глутатіону в клітинах неокортексу (гіпобарична гіпоксія – ГБГ-5000, 10,6 % O<sub>2</sub>). За відсутності активізації процесів вільнорадикального і перекисного окиснення гіпоксичне прекондиціонування збільшує експресію HIF-1 $\alpha$  в неокортексі нестійких до гіпоксії щурів, індукує формування негайної та довготривалої адаптації до гіпоксії. Таким чином, активні форми кисню не мають визначального значення в індукції експресії HIF-1 $\alpha$  і формуванні адаптації до гіпоксії. У «високоостійких» тварин гіпоксичні впливи в режимі прекондиціонування не впливають на експресію HIF-1 $\alpha$  і формування адаптації. Впливи важкої гіпоксії (ГБГ-7000, 8 % O<sub>2</sub>) викликають

активізацію процесів ПОЛ в неокортексі нестійких до гіпоксії шурів. В умовах домінування прооксидантних систем над антиоксидантними спостерігається зниження експресії HIF-1 $\alpha$  в неокортексі, порушення формування термінової та довготривалої адаптації до гіпоксії.

Ключові слова: HIF-1 $\alpha$ , неокортекс, гіпоксичне прекодиціювання, важка гіпоксія, високостійкі і нестійкі до гіпоксії шури, негайна і довготривала адаптація до гіпоксії, перекисне окиснення ліпідів, гідроперекиси ліпідів, кон'юговані дієни, окиснений глутатіон, продукти, що реагують з тіобарбітуровою кислотою.

**Yu.I. Kirova, E.L. Germanova, L.D. Lukyanova**

### PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF HIF-1 ALPHA EXPRESSION AND REDOX STATUS IN RAT NEOCORTICAL CELLS AT DIFFERENT STAGES OF ADAPTATION TO HYPOXIA

Hypoxic preconditioning induces two-phase increase of HIF-1 $\alpha$  expression in the neocortex of low-resistance rats. The first, brief phase appears after each hypoxic episode and rapidly disappears in normoxic conditions. The second increase in of HIF-1 $\alpha$  expression occurs in 24 hours after the hypoxic episode. The phase-nature of HIF-1 $\alpha$  expression corresponds to the dynamics of urgent and long-term resistance in low-resistance rats, which suggests the HIF-1 $\alpha$  involvement in mechanisms of urgent and long-term adaptation. It was found that in the mode of preconditioning, hypoxic treatments mobilized the anti-oxidant system (activated Cu, Zn-SOD) and had no effect on the intensity of lipid peroxidation processes in neocortex (INH, 10% O<sub>2</sub>) or even decreased the content of lipid peroxidation products and oxidized glutathione in neocortical cells in the early post-hypoxic period (HBH-5000, 10.5% O<sub>2</sub>). Thus, ROS do not play a key role in the induction of HIF-1 $\alpha$  expression and fast-response/long-term adaptation to O<sub>2</sub> deficiency in hypoxia-sensitive animals. In high-resistance rats, hypoxia preconditioning does not influence the HIF-1 $\alpha$  protein expression and the adaptation. Severe hypoxic modes (HBH-7000, 8% O<sub>2</sub>) caused activation of lipid peroxidation processes in neocortex of hypoxia-sensitive rats. With the pro-oxidant systems dominating over the anti-oxidant ones, the neocortical expression of HIF-1 $\alpha$  was found to decrease, which was accompanied by the impairment of the mechanisms of fast-response/long-term adaptation to hypoxia.

Key words: HIF-1 $\alpha$ , neocortex, preconditioning hypoxia, severe hypoxia, high-resistance rats, low-resistance rats, urgent and long-term adaptation to hypoxia, lipid peroxidation, lipid hydroperoxides, conjugated dienes, thiobarbituric acid reactive substances, oxidized glutathione.

*Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Russian Academia Medical Sciences*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Феноти-

пические особенности динамики содержания HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2012. – **154**, №12. – С. 681–686.

2. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2011. – №1. – С. 3–19.
3. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекодиционирования: роль гипоксического периода и реоксигенации // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – **147**, №4. – С. 380–384.
4. Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М. Триггерная роль энергетического обмена в каскаде функционально-метаболических нарушений при гипоксии. – В кн.: Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты / Под ред. Лукьяновой Л.Д., Ушакова И.Б. – М.: Истоки, 2004. – С. 51–84.
5. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. Влияние гипоксического прекодиционирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2011. – **151**, №3. – С. 292–296.
6. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // Биол. мембраны. – 2012. – **29**, №4. – С. 238–252.
7. Чернобаева Г.Н., Лукьянова Л.Д. Роль индивидуальной резистентности к гипоксическому фактору при поиске антигипоксантов и оценке эффективности их действия // В кн.: Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. – М., 1989. – С. 160–164.
8. Abramov A.Y., Scorziello A., Duchon M.R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation // J. Neurosci. – 2007. – **27**, №5. – С. 1129–1138.
9. Althausen S., Mengesdorf T., Mies G. Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2 $\alpha$ , elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice // J. Neurochem. – 2001. – №78. – С. 779–787.
10. Bell E.L., Klimova T.A., Eisenbart J., Moraes C.T., Murphy M.P., Budinger G.R., Chandel N.S. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production // J. Cell Biol. – 2007. – №177. – P. 1029–1036.
11. Boveris A., Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen // Biochem. J. – 1973. – №134. – P. 707–716.
12. Bruick R.K. O<sub>2</sub> sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor // Genes & Development. – 2003. – №17. – P. 2614–2623.
13. Calvert J.W., Cahill J., Yamaguchi-Okada M., Zhang JH. Oxygen treatment after experimental hypoxia-ischemia in neonatal rats alters the expression of HIF-1 $\alpha$  and its

- downstream target genes // *J. Appl. Physiol.* – 2006. – №101. – P. 853–865.
14. Dringen R., Gutterer J.M. Glutathione reductase from bovine brain // *Methods Enzymol.* – 2002. – №348. – P. 281–288.
  15. Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein // *Free Radic. Res. Commun.* – 1989. – №6. – P. 67–75.
  16. Eyer P., Podhradsky D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent // *Anal. Biochem.* – 1986. – №153. – P. 57–66.
  17. Griendling K.K., Sorescu D., Lassegue B., Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and Pathophysiology // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – №20. – P. 2175–2183.
  18. Haddad J.J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors // *Cell Signal.* – 2002. – №14. – P. 879–897.
  19. Haddad J.J., Land S.C. O<sub>2</sub>-evoked regulation of HIF-1 and NF- $\kappa$ B in perinatal lung epithelium requires glutathione biosynthesis // *Amer. J. Physiol. Lung. Cell Mol Physiol.* – 2000. – №278. – P. L492–L503.
  20. Haddad J.J., Olver R.E., Land S.C. Antioxidant/prooxidant equilibrium regulates HIF-1 alpha and NF-kappa B redox sensitivity evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells // *J. Biol. Chem.* – 2000. – №275. – P. 21130–21139.
  21. Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation // *Free Radical Biology & Medicine.* – 1995. – 19, №3. – P. 271–280.
  22. Kaelin W.G., Ratcliffe P.J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway // *Mol. Cell.* – 2008. – №30. – P.393–402.
  23. Katschinski D.M., Le L., Schindler S.G., Thomas T., Voss A.K., Wenger R.H. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 alpha stabilization // *Cell Physiol. Biochem.* – 2004. – №14. – P. 351–360.
  24. Lukyanova L.D., Dudchenko A.M., Tsybina T.A., Germanova E.L., Tkatchuk E.N. Mitochondrial signaling in Adaptation to Hypoxia. – In: *Adaptation Biology and Medicine / Eds Lukyanova L.D., Takeda N., Singal P.K.* – Publishing House New Dehli, India, 2008. – 5. – P. 245–260.
  25. Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kirova Yu.I. The Signal Function of Succinate and Free Radicals in Mechanisms of Preconditioning and Long-term Adaptation to Hypoxia. – In: *Adaptation Biology and Medicine / Eds Wang P., Kuo C.-H., Takeda N., Singal P.K.* – Publishing House New Dehli, India, 2011. – 6. – P. 251–277.
  26. Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kirova J.I., Lysko A.I. The signal function of succinate and free radicals in mechanisms of preconditioning and long-term adaptation to hypoxia. – In: *Adaptation Biology and Medicine / Eds Wang P., Kuo C.-H., Takeda N., Singal P.K.* – Publishing House New Dehli, India, 2009. – 1. – P. 45–48.
  27. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., Ratcliffe P.J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia inducible factors for oxygen-dependent proteolysis // *Nature.* – 1999. – №399. – P. 271–275.
  28. Okawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* – 1979. – №95. – P. 351–358.
  29. Ozdemir G., Ozden M., Maral H., Kuskay S., Cetinalp P., Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria // *Ann. Clin. Biochem.* – 2005. – №42. – P. 99–104.
  30. Paky A., Michael J.R., Burke-Wolin T.M., Wolin M.S., Gurtner G.H. Endogenous production of superoxide by rabbit lungs: effects of hypoxia or metabolic inhibitors // *J. Appl. Physiol.* – 1993. – №74. – P. 2868–2874.
  31. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy // *Cancer.* – 2003. – №3. – P. 721–732.
  32. Semenza G.L. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis // *Blood.* – 2009. – 114, №10. – P. 2015–2019.
  33. Selak M.A., Armour S.M., MacKenzie E.D., Boulahbel H., Watson D.G., Mansfeld K.D., Pan Y., Simon M.C., Thompson C.B., Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase // *Cancer Cell.* – 2005. – №7. – P. 77–85.
  34. Shringarpure R., Grune T., Mehlhase J., Davies K.J. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome // *J. Biol. Chem.* – 2003. – №1. – P. 311–318.
  35. Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia // *FASEB J.* – 2001. – №15. – P. 2445–2453.
  36. Torres M., Forman H.J. Redox signaling and the MAPK-kinase pathways // *Biofactors.* – 2003. – №17. – P. 287–296.
  37. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species // *J. Physiol.* – 2003. – №15. – P. 335–344.
  38. Tuttle S.W., Maity A., Oprysko P.R., Kachur A.V., Ayene I.S., Biaglow J.E., Koch C.J. Detection of reactive oxygen species via endogenous oxidative pentose phosphate cycle activity in response to oxygen concentration // *J. Biol. Chem.* – 2007. – 282, №51. – P. 36790–36796.
  39. Ukedo H., Maeda S., Ishii T., Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1-((phenylamino)-carbonyl--3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase // *Anal. Biochem.* – 1997. – №251. – P. 206–209.
  40. Vargas S.L., Toma I., Kang J.J., Meer E.J., Peti-Peterdi J. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release // *J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2009. – №20. – P. 1002–1011.

41. Wang G.L., Jiang B.H., Semenza G.L. Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1995. – №2. – P. 550–556.
42. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – №92. – P. 5510–5514.

*ФГБУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии»  
РАМН, Москва  
E-mail: [bioenerg@mail.ru](mailto:bioenerg@mail.ru)*

*Материал поступил в  
редакцию 31.04.2013*

М.В. Сидорова, Е.А. Рыбникова, А.В. Чурилова, В.И. Портниченко, М.О. Самойлов

## Влияние различных режимов умеренной гипобарической гипоксии на экспрессию фактора, индуцированного гипоксией, в неокортексе крыс

*Иммуногистохимическим методом исследованы изменения экспрессии фактора, индуцированного гипоксией, (HIF-1 $\alpha$ ) в неокортексе крыс после воздействий умеренной гипобарической гипоксией (УГГ) в нескольких режимах (одно-, трех- и шестикратные сеансы), отличающихся по эффективности нейропротективного действия. Установлено, что трехкратная экспозиция УГГ, представляющая собой наиболее эффективный протективный режим при применении в качестве гипоксического пре-кондиционирования, оказывает наиболее выраженный эффект на активность HIF-1, существенно повышая экспрессию его регуляторной  $\alpha$ -субъединицы в пирамидальных нейронах неокортекса крыс. Результаты свидетельствуют о важной роли HIF-1 $\alpha$  в механизмах формирования гипоксической толерантности мозга, индуцируемых прекондиционированием трехкратной УГГ.*

*Ключевые слова: умеренная гипобарическая гипоксия, нейропротективный эффект, фактор, индуцированный гипоксией.*

### ВВЕДЕНИЕ

Нервные клетки гиппокампа и неокортекса чрезвычайно чувствительны к гипоксии. Даже непродолжительная депривация кислорода вызывает значительные нарушения нейрональных функций, а более длительные гипоксические эпизоды (десятки минут) приводят к структурным нарушениям нейронов и, в конечном итоге, их гибели [4, 14]. С последствиями повреждающего действия гипоксии в настоящее время связывают этиологию и патогенез многих неврологических и нервно-психических заболеваний, в том числе инсульта, деменции, болезни Паркинсона и Альцгеймера [10]. Поэтому проблема повышения резистентности мозга к тяжелым формам гипоксии актуальна. В этом отношении актуальны исследования, активно развивающиеся в последние годы и связанные с разработкой немедикаментозных способов, индуцирующих гипоксическую/ишемическую толерантность мозга. Одним из наиболее эффективных и перспективных

таких способов является гипоксическое прекондиционирование (ГП), основанное на применении повторяющихся сеансов умеренной гипоксии, в частности гипобарической [2, 5, 6, 13]. Установлено, что ГП оказывает выраженное нейропротективное действие, предотвращая структурно-функциональные повреждения нейронов мозга в условиях тяжелой гипоксии [5, 8, 11, 12]. Вызываемое ГП формирование гипоксической/ишемической толерантности нейронов мозга обусловлено индукцией эндогенных геномзависимых процессов адаптации и нейропротекции, затрагивающих все уровни внутриклеточных регуляторных механизмов от активности сигнальных каскадов до экспрессии генома и синтеза проадаптивных белков [6, 9]. Однако до сих пор остается неясным, какой нейрохимический фактор выполняет роль первичного медиатора эффектов ГП, вызывая индукцию проадаптивных процессов. Наиболее вероятным кандидатом на эту роль в настоящее время считается фактор, индуцированный

© М.В. Сидорова, Е.А. Рыбникова, А.В. Чурилова, В.И. Портниченко, М.О. Самойлов

гипоксией, HIF-1, контролирующей клеточные реакции на гипоксию на молекулярном уровне [16].

HIF-1 – это  $\alpha\beta$ -гетеродимерный белковый комплекс, связывающийся со специфической последовательностью ДНК (HRE), и регулирующий экспрессию большого числа генов-мишеней. Являясь ключевым звеном внутриклеточного гипоксического сигналинга, HIF-1 осуществляет транскрипционную регуляцию генов, вовлекающихся в базисные молекулярно-клеточные механизмы адаптации, роста, пролиферации и дифференциации клеток [17]. Перечень мишеней HIF-1 включает большое число генов, продуктами которых являются эритропоетин и ферменты, регулирующие механизмы переключения с аэробного метаболизма на гликолиз. Активность HIF-1 зависит от наличия  $\alpha$ -субъединицы (HIF-1 $\alpha$ ), которая при нормоксии быстро разрушается в кислородзависимых реакциях пролилгидроксилирования и убиквитинации, но стабилизируется с последующей транслокацией в ядро в условиях гипоксии, когда деградирующие ее ферменты инактивируются [1].

HIF-1 считается фактором периферической адаптации, реализующим свое про-адаптивное влияние за счет стимуляции эритропоэза, ангиогенеза, утилизации глюкозы, перестройки процессов транспорта кислорода, тканевого дыхания и термогенеза и др. [3, 7]. Вместе с тем в последнее время уделяется большое внимание возможной нейропротективному значению HIF-1 в мозгу. Обнаружено что у «нокаутных» мышей с дефицитом HIF-1 в мозгу гипоксическая толерантность после ГП не формируется [15], что также согласуется с гипотезой о ключевой роли HIF-1 в реализации нейропротективного действия ГП. Однако необходимы детальные исследования этого вопроса. Целью настоящей работы явился анализ изменений экспрессии HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс после воздействий умеренной гипобарической гипоксией в нескольких режимах (одно-, трех- и шестикратные сеансы), отличающихся по эффективности нейропротективного действия.

## МЕТОДИКА

Опыты проведены на самцах крыс линии Вистар массой 200–250 г. Экспозицию умеренной гипобарической гипоксии проводили в барокамере проточного типа, куда животные помещались на 2 ч, при этом давление в барокамере ступенчато снижали до 360 мм рт.ст. В случае однократного гипоксического воздействия (1УГГ) крыс декапитировали спустя 3 и 24 ч. При применении многократных воздействий соответствующее количество гипоксических сеансов (три и шести) осуществляли с интервалом 24 ч, а декапитацию животных производили через 3 и 24 ч после последнего сеанса гипоксии.

После декапитации крыс мозг быстро извлекали и выделяли коронарные сегменты, содержащие париетальный неокортекс. Образцы фиксировали молекулярным фиксатором FineFix («Milestone», Италия) 24 ч при +4°C. Далее препараты промывали в проточной воде в течение 2 ч и обезвоживали, проводя через этиловые спирты возрастающей концентрации (50, 70, 80, 96 % по 1 ч) и через бутанола (1 ч и ночь). Затем материал проводили через 4 порции ксилола (по 15 мин), 3 порции парафина (по 45 мин) и заливали в парафиновые блоки. Далее при помощи микротомы изготавливали серии чередующихся срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне -2,80 мм от брегмы. Они использовались для количественной иммуноцитохимической оценки содержания белка HIF-1 $\alpha$  в неокортексе (V слой). После стандартных процедур депарафинизации, регидратации и демаскировки антигена, срезы в течение ночи при +4°C инкубировали с первичными поликлональными кроличьими антителами к HIF-1 $\alpha$  («Santa Cruz Biotechnology», Inc, США, разведение 1:100), а далее использовали авидин-биотиновую систему детекции («Vector Laboratories», Inc, Великобритания). Для визуализации реакции использовали диаминобензидин. После обезвоживания и заключения срезов в



желатин проводили количественный анализ иммунореактивности нейронов с использованием системы, состоящей из светового микроскопа Jenaval («Carl Zeiss», Германия), цифровой камеры Baumer CX05c («Baumer Optronic», Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением Videotest Master Morphology. На основании оценки оптической плотности клетки разделяли на 2 класса: интенсивно- (класс 1) и слабо- (класс 2) HIF-1 $\alpha$ -иммунопозитивные, анализировали общее число иммунореактивных клеток, и число клеток каждого класса. Результаты статистически обрабатывали с помощью пакетов анализа данных Statistica 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2002, использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA ( $P < 0,05$ ). Все результаты представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  SEM (standard error of the mean) и выражены в процентах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание HIF-1 $\alpha$  оценивали в V слое неокортекса, в котором локализуются крупные пирамиды, являющиеся основными проекционными нейронами неокортекса. Существенных изменений общего числа HIF-1 $\alpha$ -иммунопозитивных нейронов как после однократного, так и многократных (три и шести) воздействий умеренной гипобарической гипоксией не наблюдалось (рис. 1). Однако следует отметить некоторое увеличение числа нейронов, экспрессирующих HIF-1 $\alpha$ , у животных, которым предьявляли трехкратные УГГ, но не другие воздействия.

У контрольных животных в этой области преобладали HIF-1 $\alpha$ -слабопозитивные пирамидальные нейроны (рис. 2). Одно- и шестикратные сеансы УГГ незначительно повышали интенсивность экспрессии HIF-1 $\alpha$ , о чем свидетельствует достоверно возросшее по сравнению с контролем число клеток 1-го класса. Причем шестикратные сеансы УГГ в отличие от однократных индуцировали к 3 ч достоверное (на 400 %) увеличение количест-

ва клеток 1 класса (интенсивнопозитивных). Вместе с тем трехкратное воздействие УГГ оказывало выраженный стимулирующий эффект на экспрессию HIF-1 $\alpha$ . Число клеток 1-го класса возрастало до 1200–1400 % от контрольного уровня (см. рис. 2). Этот эффект развивался уже к 3 часам после последнего сеанса трехкратной УГГ и сохранялся и на 24-часовом сроке.

Ранее в наших исследованиях проводился анализ эффективности использования одно-, трех- и шестикратной УГГ в качестве ГП. Согласно этим данным, однократное прекодирующее воздействие, в отличие от трехкратного, не предотвращает структурно-функциональные повреждения, вызываемые тяжелой гипоксией, а шестикратное ГП оказывает частичный корректирующий эффект [5]. Таким образом, трехкратные сеансы УГГ представляют собой оптимальный режим ГП, а индуцируемые им механизмы по всей видимости отражают эндогенные нейропротективные процессы, обуславливающие формирование гипоксической толерантности мозга. Показано, что выраженная гиперэкспрессия pCREB и NF- $\kappa$ B65 в неокортексе выявляется после трех-, но не одно- и шестикратных сеансов прекодионирования. В данной работе установлено, что трехкратная экспозиция УГГ оказывает наиболее выраженный эффект на активность

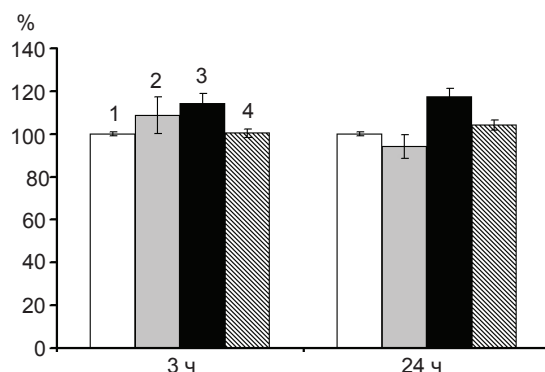


Рис. 1. Влияние сеансов умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) различной кратности (одно-, трех-, шести) на количество нейронов неокортекса, экспрессирующих HIF-1 $\alpha$ : 1 – контроль, 2, 3, 4 – одно-, трех-, шестикратная УГГ соответственно

HIF-1, существенно повышая экспрессию его регуляторной  $\alpha$ -субъединицы в нейронах неокортекса крыс. Сопоставляя эти результаты с эффективностью режимов ГП, можно сделать заключение, что формирование гипоксической толерантности мозга, индуцируемое трехкратной УГГ, сопровождается оверэкспрессией HIF-1 $\alpha$ .

*Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-00677, совместным грантом РФФИ № 13-04-90433 и ГФФИ Украины № Ф53.4/038.*

**М.В.Сидорова, О.О. Рибникова, Г.В. Чурилова, В.І.Портніченко, М.О. Самойлов**

**ВПЛИВ РІЗНИХ РЕЖИМІВ ПОМІРНОЇ ГІПОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ФАКТОРА, ІНДУКОВАНОГО ГІПОКСІЄЮ, У НЕОКОРТЕКСІ ЩУРІВ**

Імуногістохімічним методом досліджено зміни експресії гіпоксіїндукційного фактора 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) у неокортексі щурів після впливів помірної гіпобаричної гіпоксії (ПГГ) в декількох режимах (одно-, трьох-і шестикратні сеанси), що відрізняються за ефективністю нейропротективної дії. Встановлено, що триразова експозиція ПГГ, що являє

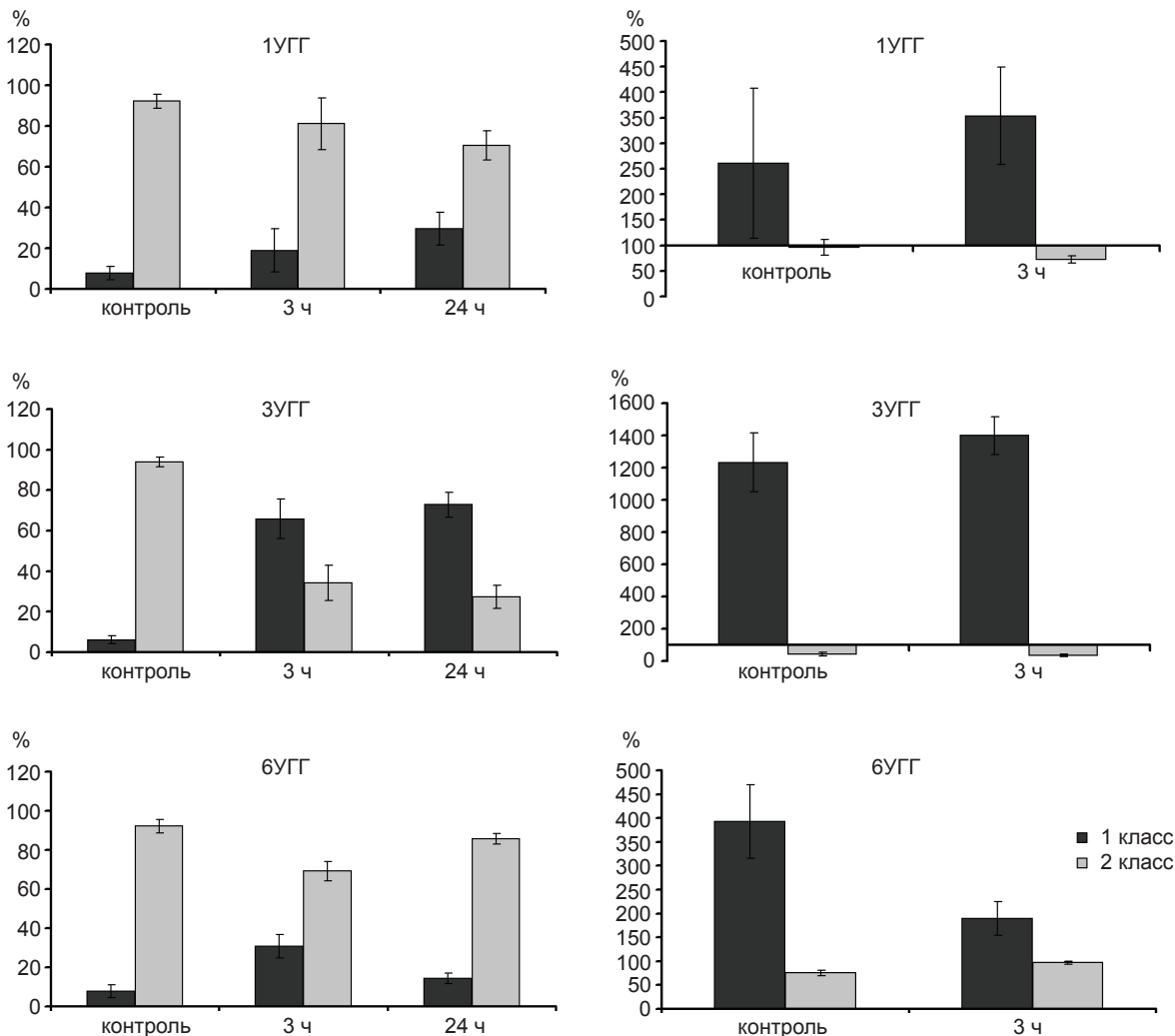


Рис. 2. Эффекты одно- (1УГГ), трех- (3УГГ), шестикратной (6УГГ) на интенсивность экспрессии HIF-1 $\alpha$ , распределение HIF-1 $\alpha$  иммунопозитивных клеток по классам интенсивности. 1-й класс – интенсивно-иммунопозитивные клетки, 2-й класс – слабоиммунопозитивные клетки. Результаты представлены в процентах от общего количества клеток (левая колонка), либо от контрольных значений (правая колонка), в виде среднего  $\pm$  ошибка среднего

собой найбільш ефективний протективний режим при застосуванні як гіпоксичне preconditionування, спричинює найбільш виражений ефект на активність HIF-1, істотно підвищуючи експресію його регуляторної  $\alpha$ -субодиниці в пірамідальних нейронах неокортексу щурів. Результати свідчать про важливу роль HIF-1 $\alpha$  у механізмах формування гіпоксичної толерантності мозку, індукованих preconditionуванням триразовою ПГГ.

Ключові слова: помірна гіпобарична гіпоксія, нейропротективний ефект, фактор HIF-1 $\alpha$ .

**M.V. Sidorova, E.A. Rybnikova, A.V. Churilova,  
V.I. Portnichenko, M.O. Samoilov**

### THE IMPACT OF MILD HYPOBARIC HYPOXIA IN DIFFERENT MODES ON EXPRESSION OF HIF-1 $\alpha$ IN RAT NEOCORTEX

Using quantitative immunohistochemistry, modifications of HIF-1 $\alpha$  expression in neocortex of rats exposed to various modes of mild hypobaric hypoxia (MHH) (1, 3 and 6 episodes) differed in their neuroprotective efficacy have been studied. It has been shown that three-trial MHH being the most effective neuroprotective mode when used as a preconditioning produces most considerable changes in HIF-1 by substantial up-regulation of its regulatory  $\alpha$ -subunit expression in the rat neocortex. Present findings support the hypothesis on important roles of HIF-1 in the mechanisms of brain hypoxic tolerance induced by the hypoxic preconditioning with three-trial MHH.

Key words: mild hypobaric hypoxia, neuroprotective effect, hypoxia-inducible factor HIF-1.

*Pavlov Institute of Physiology, RAS, St.Petersburg, Russia;  
International Centre for Astronomical, Medical and Ecological Research, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции. Обзор // Биол. мембраны. – 2012. – 29, №4. – С.238–253.
2. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Емельянова Т.В., Прут Д.А., Колар Ф.З., Портниченко А.Г., Подкоксенов Ю.К., Халиулин И.Г., Ванг Х., Пей Ж.-М. Гипоксическое preconditionирование, как новый подход к профилактике ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и сердца // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – 17, №3. – С.27–36.
3. Портниченко В.И., Носарь В.И., Портниченко А.Г., Древицкая Т.И., Сидоренко А.М., Маньковская И.Н. Фазовые изменения энергетического метаболизма при гипоксии // Физиол. журн. – 2012. – 58, №4. – С.3–12.

*ФГБВН Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия;  
Международ. центр астроном. и медико-экол. исследований НАН Украины, Киев  
E-mail: [samoilov@pavlov.infran.ru](mailto:samoilov@pavlov.infran.ru)*

4. Самойлов М.О. Реакции нейронов мозга на гипоксию. – Л : Наука. – 1985. – 190 с.
5. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды (обзор) // Рос. физиол. журн. им.И.М.Сеченова. – 2012. – 98(1). – С.108–126.
6. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В. Сигнальные молекулярные и гормональные механизмы протективных эффектов гипоксического preconditionирования // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2012. – №3. – С. 3–10.
7. Серебровская Т.В. Гипоксия-индуцибельный фактор: роль в патофизиологии дыхания. Обзор // Укр. пульмон. журн. – 2005. – № 3. – С. 77–81.
8. Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Изменения нейронов гиппокампа и неокортекса крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии // Морфология. – 2012. –141 (1). – С.7–11.
9. Obrenovitch T.P. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia // Physiol. Rev. – 2008. – 88. – P. 211–247.
10. Ogunshola O.O., Antoniou X. Contribution of hypoxia to Alzheimer's disease: is HIF-1 $\alpha$  a mediator of neurodegeneration? // Cell. Mol. Life. Sci. – 2009. – 66, № 22. – P. 3555–563.
11. Rybnikova E, Sitnik N, Gluschenko T, Tjulko E and Samoilov M The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats // Brain Res. – 2006. – 1089, № 1. – P.195–202.
12. Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E., Gluschenko T., Otelin V., Pelto-Huikko M., and Samoilov M. Preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia // Beh. Brain. Res. – 2005. – 160, № 1. – P.107–114.
13. Sharp F.R., Ran R., Lu A., Tang Y., Strauss K.I., Glass T., Ardizzone T., Bernaudin M. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury // NeuroRx. – 2004. – 1, № 1. – P. 26–35.
14. Siesjo B.K., Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1989. – 9, №2. – P.244–252.
15. Taie S., Ono J., Iwanaga Y., Tomita S., Asaga T., Chujo K., Ueki M. Hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  has a key role in hypoxic preconditioning // J. Clin. Neurosci. – 2009. – 16, №8. – P.1056–1060.
16. Webb J.D., Coleman M.L., Pugh C.W. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing // Cell. Mol. Life Sci. – 2009. – 66(22). – P.3539–3554.
17. Weidemann A., Johnson R.S. Biology of HIF-1 $\alpha$  // Cell Death Differ. – 2008. – 15, № 4. – P.621–627.

*Матеріал посту́пів в редакцію 31.04.2013*

Е.И. Тюлькова, Л.А. Ватаева, Т.С. Глущенко, С.Г. Пивина

## Влияние пренатальной гипоксии на функцию гипофизарно-адренокортикальной системы и рабочую память у крыс

*В проведенном исследовании с использованием количественного иммуноцитохимического метода впервые проведен сравнительный анализ влияния тяжелой гипобарической гипоксии в различные периоды пренатального развития на характер экспрессии глюкокортикоидных рецепторов GR в дорсальном (CA1) и вентральном (зубчатая извилина) гиппокампе и неокортексе крыс, их стресс-реактивность и рабочую память. Согласно полученным данным, тяжелая гипоксия в пренатальном периоде индуцирует выраженные нарушения экспрессии GR в нейронах неокортекса взрослых самцов, но не самок, что коррелирует с дефицитом рабочей памяти у самцов, перенесших воздействие гипоксии на 14–16-е сутки пренатального онтогенеза. Увеличение стрессового содержания кортикостерона было выявлено лишь у самок, подвергшихся воздействию гипоксии в пренатальном периоде на 17–19-е сутки. Гипоксия у самок и самцов приводит к неодинаковым изменениям функции гиппокампа, а также других структур, причастных к обучению.*

*Ключевые слова:* пренатальная гипоксия, гиппокамп, неокортекс, глюкокортикоидные рецепторы, гипофизарно-адренокортикальная система, рабочая память.

### ВВЕДЕНИЕ

Пренатальный период – наиболее важный в развитии организма. Именно в этот период он чрезвычайно уязвим: любые неблагоприятные изменения, происходящие в организме беременной женщины, вследствие болезней или действия вредных факторов извне, могут привести к множественным порокам развития, а также к недоразвитию или функциональной незрелости органов плода. По наблюдениям клиницистов, особое место среди факторов риска нарушений развития плода занимает гипоксия. Гипоксия плода возникает в результате нарушения маточно-плацентарного кровотока, заболеваний плода, стресса и наличия у матери устойчивой зависимости от вредных привычек. Многие последствия внутриутробной гипоксии необратимы и могут проследиваться в течение длительного времени или со значительной задержкой после воздействия. Внутриутроб-

ная гипоксия часто сочетается с поражениями нервной системы и неврологическими расстройствами у детей раннего возраста, а также может повышать риск возникновения психических и нейродегенеративных заболеваний в более зрелом возрасте [11, 16]. Последствия действия гипоксии в раннем онтогенезе требуют особого внимания и являются предметом изучения в специально проводимых экспериментах на животных.

Эффекты пренатальной гипоксии не всегда соответствуют степени ее тяжести. Для развития организма первостепенное значение имеют сроки онтогенеза, в которые произошла экспозиция гипоксии. В течение пренатального и раннего постнатального онтогенеза выделяют несколько критических периодов, когда организм становится особенно восприимчив к неблагоприятным внешним воздействиям [9, 21]. Нарушения, обусловленные действием повреждающих факторов во время раннего онтогенеза, могут

© Е.И. Тюлькова, Л.А. Ватаева, Т.С. Глущенко, С.Г. Пивина

приводить к возникновению не только грубых дефектов развития (врожденные аномалии – уродства), но и различных функциональных расстройств в деятельности клеток, органов и систем всего организма. При действии повреждающих факторов в ранние сроки, в период активного органогенеза, может происходить рассасывание плодов или их гибель, увеличение частоты хромосомных aberrаций в клетках тканей организма, а также появление таких пороков развития, как анэнцефалия, ацефалия, анофтальмия, заячья губа, фокомелия, амелия, атрезия ротового отверстия и др. [7, 26, 30]. Появление функциональных нарушений связывают с более поздними сроками пренатального онтогенеза [1, 6, 13, 15] – третья неделя беременности у крыс, соответствующая периоду позднего органогенеза.

При изучении последствий влияния пренатальной гипоксии на развитие мозга особый интерес представляет гиппокамп и новая кора. Кортикальные структуры головного мозга играют важную роль в обеспечении адаптивных реакций при стрессе, при этом их роль не ограничивается только интеграцией процессов обучения или восприятием сложных взаимосвязей отрицательных раздражителей и выработки соответствующих поведенческих навыков. Как гиппокамп, так и различные области новой коры способны регулировать активность паравентрикулярных ядер гипоталамуса и, следовательно, активность гипоталамо-гипофизарной системы [19, 23] через корково-гипоталамические пути, [22], а также через проекционные проводящие пути к ядру терминальной полоски [18]. Таким образом, кора головного мозга осуществляет интеграцию отдельных компонентов нервной и эндокринной систем, участвующих в восприятии отрицательного стимула и формировании адаптивного ответа всего организма на данное воздействие. Важным обстоятельством является то, что гиппокамп и новая кора относятся к числу структур головного мозга, наиболее чувствительных к действию гипоксии.

вительных к действию гипоксии.

В настоящей работе изучали влияние пренатальной гипоксии на рабочую память, стресс-реактивность и содержание глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и коре головного мозга у взрослых самцов и самок крыс. Период экспозиции гипоксии был относительно коротким и составлял 3 сут – это были 14–16-е или 17–19-е сутки беременности – начало и конец третьей недели пренатального онтогенеза. Таким образом, были прослежены последствия действия гипоксии во второй половине основного органогенеза, а также в период раннего гистогенеза.

## МЕТОДИКА

Эксперименты проведены с использованием потомков крыс линии Вистар, полученных из вивария Института физиологии им. И. П. Павлова РАН. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского Сообщества (89/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов утверждены комиссией по гуманному обращению с животными ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Гипоксию создавали, помещая беременных самок в течение 3 сут (на 14–16-е или 17–19-е сутки гестации) в барокамеру проточного типа, в которой в течение 3 ч поддерживали давление 160–180 мм рт. ст., соответствующее «подъему» на высоту 11000 м.

День рождения крысенка обозначали как первые сутки жизни. На вторые сутки после рождения число крысят в пометах уравнивали, доводя его до 8. Каждая самка с детенышами находилась в отдельной клетке размером 54x34x19 см в комнате лабораторного вивария, в котором поддерживалась постоянная температура (20–22°C) и режим свет/темнота по 12 ч. Пищевой рацион состоял из полусинтетических кормов.

У крыс вырабатывалась пространственная дифференцировка в водном лабиринте

Морриса диаметром 2,0 м и глубиной 0,7 м. В воде, заполнявшей лабиринт, разводили мел, в результате чего она теряла прозрачность. В настоящем исследовании использовали протокол (схема опыта), позволяющий выявлять трудности в обучении, связанные с нарушениями механизмов рабочей памяти. При проведении опытов животных обучали искать скрытую под водой платформу (диаметр 12 см). Их помещали в один из четырех секторов лабиринта. Если крыса в течение 60 с не находила платформу, ее принудительно помещали на нее. Время пребывания на платформе составляло 20 с. Через 15 с после извлечения из лабиринта животное повторно тестировали, при этом местоположение скрытой под водой платформы не меняли. При переходе к тестированию животного в следующей пробе ставили задачу найти и запомнить новое положение платформы. Интервал между пробами с измененным положением платформы составлял 4 мин, всего в течение опыта проводили 5 таких проб. Регистрировали время, в течение которого крыса обнаруживала платформу (латентный период). Поведение животных во время тестирования в лабиринте Морриса регистрировали с помощью веб-камеры. Для получения мягкого рассеянного освещения в комнате, где проводили эксперименты, свет мощной лампы (500 Вт) направлялся в потолок, который при этом является вторичным излучателем с большой поверхностью излучения. При проведении опытов экспериментатор наблюдал за поведением животных на экране компьютера. Экспериментатор и оборудование, использовавшееся для регистрации поведения, были изолированы от экспериментальной зоны с помощью перегородки.

Для определения стресс-реактивности гипофизарно-адренкортикальной системы (ГАС) на иммобилизационный стресс с помощью радиоиммунологического метода с использованием собственных антисывороток определяли содержание в крови основного глюкокортикоидного гормона крыс кортистерона [10].

Для оценки экспрессии белков кортистероидных рецепторов в гиппокампе крыс использовали иммуноцитохимический метод с компьютерным анализом микроизображений. Крыс декапитировали и извлекали головной мозг, который фиксировали в 4%-м параформальдегиде, приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 24 ч, и подвергали гистологической обработке по стандартному протоколу. Изготавливали серии чередующихся парафиновых фронтальных срезов мозга толщиной 7 мкм на уровне -2,8 мм от брегмы [27] и монтировали их на предметные стекла. Для этого после стандартных процедур депарафинизации, регидратации и демаскировки антигена, срезы в течение ночи при +4°C инкубировали с первичными моноклональными мышинными антителами к крысиным GR («Calbiochem», США, разв. 1:100), а далее использовали авидин-биотиную систему детекции («Vector Labs», США). Для визуализации реакции использовали диаминобензидин. После обезвоживания и заключения срезов в желатин проводили количественный анализ иммунореактивности нейронов с использованием системы, состоящей из светового микроскопа Jenaval («Carl Zeiss», Германия), цифровой камеры Baumer CX05c («Baumer Optronic», Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением Videotest Master Morphology. На основании оценки оптической плотности иммунопозитивные клетки разделяли на 2 класса: слабо- и интенсивно меченые. Анализировали общее число иммунореактивных клеток и их распределение по классам интенсивности. Результаты статистически обрабатывали с помощью пакетов анализа данных Statistica 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2003, использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA ( $P < 0,05$ ). Все результаты представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  SEM (от англ. standard error of the mean).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние пренатальной гипоксии на обучение в водном лабиринте Морриса. В водном лабиринте Морриса тестирование животных осуществлялось согласно протоколу, разработанному для выявления специфических нарушений рабочей памяти. Тест в водном лабиринте Морриса основан на поиске оптимальной стратегии для избегания воды с минимумом усилий, а именно поиске кратчайшей дистанции до спрятанной под водой платформы на основании предыдущей памяти об ее местонахождении.

Полученные результаты свидетельствуют о дефиците рабочей памяти только у самцов, перенесших воздействие гипоксии на 14–16-е сутки пренатального онтогенеза (рис. 1). У самок, матери которых подвергались воздействию гипоксии при беременности, достоверных отличий от контрольной группы при тестировании их в водном лабиринте Морриса выявлено не было.

Влияние пренатальной гипоксии на функции ГАС. Данная серия опытов была проведе-

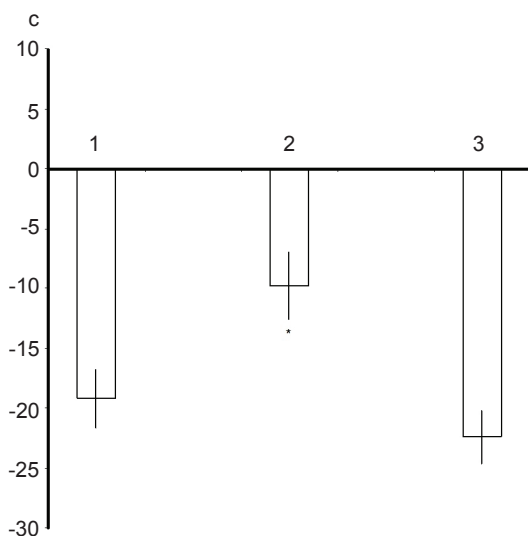


Рис.1 Сокращение времени поиска платформы в водном лабиринте Морриса между первой и второй пробами у контрольных животных (1) и крыс-самцов, подвергавшихся воздействию гипоксии на 14-16-е (2) или 17-19-е (3) сутки пренатального онтогенеза. \* $P < 0,05$  по сравнению с контролем;  $n=6$  для каждой точки

на с применением теста на быструю стресс-реактивность ГАС. Результаты тестирования самок крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии, представлены на рис. 2,а. Показано, что пренатальная гипоксия модифицировала реактивность ГАС на иммобилизационный стресс у самок, но не у самцов. Так, у самок, потомков крыс, испытавших действие пренатальной гипоксии на 14–16-е сутки гестации, иммобилизационный стресс вызывал постепенное повышение содержания кортикостерона в крови, который достигал максимальных значений на 60-й минуте после начала иммобилизации. Сходные изменения содержания кортикостерона в первые 60 мин действия иммобилизационного стресса были выявлены и в контрольной группе. Однако в контрольной группе его концентрация сни-

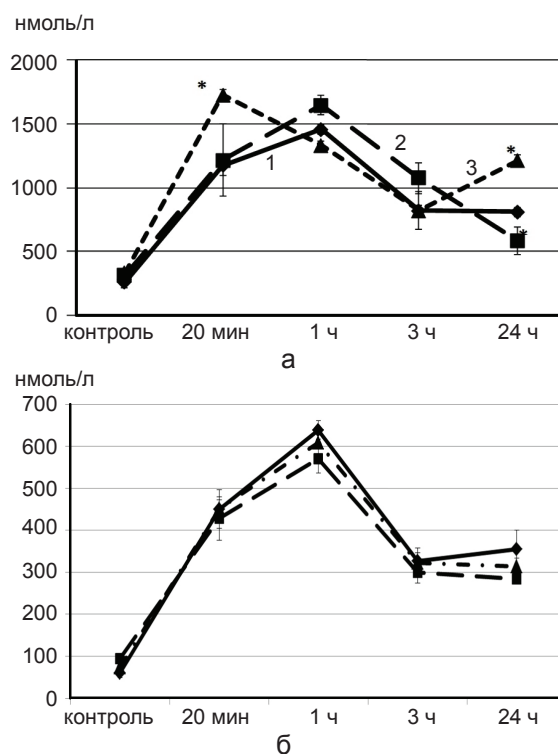


Рис. 2. Динамика стресс-реактивности гипоталамо-адреноренальной системы (по уровню содержания кортикостерона в плазме крови взрослых крыс-самок (а) и крыс-самцов (б), переживших тяжелую гипобарическую гипоксию: 1 – контроль, 2 – гипоксия на 14–16-е сутки гестации, 3 – гипоксия на 17–19-е сутки гестации. \* $P < 0,05$  по сравнению с контролем;  $n=6$  для каждой точки

жались к 24-часовому сроку. У крыс, перенесших гипоксию на 14–16-е сутки, через 24 ч после начала иммобилизации содержание кортикостерона оставалось повышенным по сравнению с контролем. В группе самок, подвергавшихся пренатальному воздействию гипоксии на 17–19-е сутки гестации, при иммобилизации наблюдалось резкая активация ГАС со значительным подъемом концентрации кортикостерона уже к 20-й минуте. В дальнейшем в этой и контрольной группах, содержание кортикостерона снижалось.

У взрослых самцов крыс, подвергавшихся воздействию тяжелой гипоксии на 14–16-е и 17–19-е сутки пренатального онтогенеза не обнаружено выраженных изменений кривой стресс-реактивности по сравнению с контрольной группой (см. рис. 2,б)

Влияние пренатальной гипоксии на экспрессию глюкокортикоидных рецепторов в нейронах гиппокампа и теменной области коры. Методом количественной иммуноцитохимии исследовали модификации экспрессии GR в поле CA1 гиппокампа (CA1), зубчатой извилине гиппокампа (DG) и слое II неокортекса.

У контрольных самок и самцов выявлен достаточно высокий уровень иммунореактивности к GR во всех исследованных областях мозга. Воздействие гипоксии в пренатальном периоде на 14–16-е сутки приводило к достоверному повышению GR-иммунореактивности в неокортексе взрослых самцов (рис. 3). Так, общее число иммунореактивных клеток в слое II неокортекса у животных этой группы увеличилось в среднем на 45 % ( $P < 0,05$ ). Уровень GR-иммунореактивности в неокортексе взрослых самцов, подвергшихся воздействию гипоксии в пренатальном периоде на 17–19-е сутки, не отличался от контроля. Не было обнаружено также значительного изменения иммунореактивности GR в областях CA1 и DG гиппокампа самцов крыс, подвергшихся воздействию пренатальной гипоксии как на 14–16-е сутки, так и на 17–19-е сутки.

Достоверного изменения GR-иммунореактивности в неокортексе, CA1 и DG

гиппокампа взрослых самок, подвергшихся воздействию пренатальной гипоксии на 14–16-е или 17–19-е сутки, выявлено не было.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, показано, что при обучении крыс в водном лабиринте Морриса долгосрочные последствия пренатальной гипоксии обнаруживаются лишь у самцов. Выявляемые нарушения рабочей памяти наиболее выражены у животных, испытавших воздействие гипоксии на 14–16-е сутки периода пренатального развития. Представляет интерес сопоставление результатов, полученных в настоящей работе, с данными более ранних наших исследований, показавших, что 14–16-е сутки периода пренатального развития являются критическими для формирования определенных адаптивных реакций в более поздние сроки онтогенеза. Ранее нами было показано, что гипоксия в указанные сроки впоследствии вызывает разнонаправленные изменения в поведении самок и самцов в «открытом поле» [2] и приподнятом крестообразном лабиринте. Кроме того, показано, что пренатальная гипоксия на 14–16-е сутки приводит к улучшению показателей выработки и воспроизведения условного рефлекса

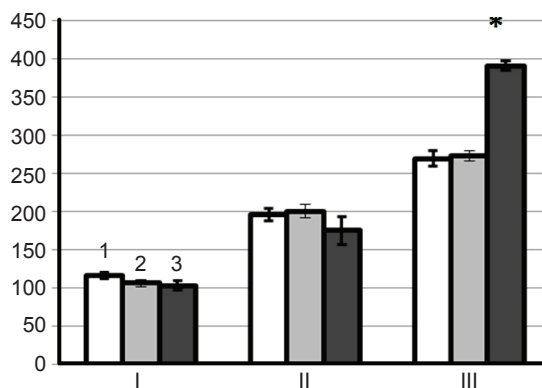


Рис. 3. Изменения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в области CA1 (I), зубчатой извилине гиппокампа (II) и неокортексе (III) взрослых крыс-самцов, подвергавшихся гипобарической гипоксии на 14–16-е (2) и 17–19-е сутки гестации (3) по сравнению с контрольными животными (1). По оси ординат – количество иммунопозитивных клеток. \* $P < 0,05$  по сравнению с контролем



пассивного избегания (УРПИ) у самок [3, 4]. У самцов после экспозиции к гипоксии на 14–16-е сутки пренатального периода каких либо изменений в характере обучения УРПИ не обнаруживается.

Известно, что механизмы, контролирующие обучение в лабиринте Морриса и УРПИ, различны, вместе с тем обе эти формы обучения осуществляются при непосредственном участии гиппокампа [20]. Интересные попытки анализа гиппокампальных механизмов, опосредующих процессы обучения, содержатся в работах, выполненных с использованием мышей разных инбредных линий [5, 25, 28, 29]. Особое внимание исследователей привлекло взаимодействие аксонов гранулярных нейронов зубчатой фасции (так называемых мшистых волокон) с пирамидными клетками поля СА3 гиппокампа. Описаны два проекционных поля аксонов гранулярных клеток зубчатой фасции – изменчивая по размеру зона интра- и инфрапирамидных окончаний и большая и более стабильная по размеру зона супрапирамидных окончаний. Показано, что способности к пространственной ориентации в тесте водного лабиринта Морриса и успешность обучения активному избеганию в челночной камере корреляционно связаны с размером зоны интра- и инфрапирамидных проекций от гранулярных клеток. В опытах с обучением в лабиринте Морриса выявлена положительная, а при обучении активному избеганию – отрицательная корреляция между показателями обучения и размером этой зоны. Имеются также данные, что между размером гиппокампа и способностью к обучению УРПИ обнаруживается высокая отрицательная корреляция [29].

По-видимому, гипоксия у самок и самцов приводит к неодинаковым изменениям функции гиппокампа, а также других структур, причастных к обучению. Какова природа этих изменений, в настоящее время еще до конца не ясно. Гистологические исследования свидетельствуют о значительных поражениях нервных клеток различных структур головного мозга крыс, возникающих вследствие

действия гипоксии в пренатальном периоде. Соответствующие поражения выявляются пренатально или непосредственно сразу после рождения [8, 24]. Когда мозг достигает определенного уровня зрелости, поражения нервных клеток не проявляются [17]. Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что отклонения в поведении взрослых животных, подвергавшихся действию гипоксии в пренатальном периоде, очевидно, не обусловлены грубыми структурными повреждениями головного мозга. Они скорее связаны с разнообразными нейрохимическими нарушениями. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты наших предыдущих работ [12–15], в которых показаны нарушения метаболизма полифосфоинозитидной системы,  $\text{Ca}^{2+}$ -опосредованной сигнальной трансдукции метаболитных глутаматных рецепторов I группы, соотношения про- и антиоксидантных систем мозга крыс, перенесших пренатальную гипоксию на 14–16-е сутки гестации. В настоящем исследовании показано достоверное повышение GR-иммунореактивности в неокортексе взрослых самцов, испытавших воздействие гипоксии в пренатальном периоде на 14–16-е сутки.

Вызванные пренатальной гипоксией нарушения в поведении у животных, достигших зрелого возраста, могут быть связаны также с расстройством регуляции гормональных систем. Это предположение не подтвердилось при исследовании стресс-реактивности ГАС у самок и самцов крыс при воздействии пренатальной гипоксии в настоящем исследовании. Значительное увеличение стрессового содержания кортикостерона было выявлено лишь у самок, подвергшихся воздействию гипоксии в пренатальном периоде на 17–19-е сутки. Более того, не было выявлено корреляции между уровнем экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и неокортексе и стрессовым повышением содержания кортикостерона в крови самок и самцов, подвергшихся воздействию пренатальной гипоксии. Стоит отметить, в регуляции ги-

поталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы ключевую роль играет гипоталамус. Возможно, что функциональные сдвиги именно на уровне гипоталамуса обуславливают изменение в содержании стрессовых кортикостероидов у животных, испытывших воздействие гипоксии в пренатальном онтогенезе. Очевидно, что проблема участия различных регуляторных звеньев в реализации эффектов пренатального стресса требует дальнейшего исследования.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00812.*

**К.И. Тюлькова, Л.А. Ватаева, Т.С. Глущенко, С.Г. Пивина**

### **ВПЛИВ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ НА ФУНКЦІЮ ГІПОФІЗАРНО-АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЇ СИСТЕМИ І РОБОЧУ ПАМ'ЯТЬ У ЩУРІВ**

У проведеному дослідженні з використанням кількісного імуноцитохімічного методу вперше проведено порівняльний аналіз впливу важкої гіпобаричної гіпоксії в різні періоди пренатального розвитку на характер експресії глюкокортикоїдних рецепторів GR у дорсальному (CA1) і вентральному (зубчаста звивина) гіпокампі та неокортексі щурів, їх стрес-реактивність і робочу пам'ять. Згідно з отриманими результатами, важка гіпоксія в пренатальному періоді індукує виражені порушення експресії GR в нейронах неокортексу дорослих самців, але не самиць, що корелює з дефіцитом робочої пам'яті у самців, які перенесли вплив гіпоксії на 14–16-ту добу пренатального онтогенезу. Збільшення стресового вмісту кортикостерону було виявлено лише у самиць, які зазнали впливу гіпоксії в пренатальному періоді на 17–19-у добу. Гіпоксія у самиць і самців призводить до неоднакових змін функції гіпокампа, а також інших структур, причетних до навчання. Ключові слова: пренатальна гіпоксія, гіпокамп, неокортекс, глюкокортикоїдні рецептори, гіпофизарно-адренокортикальна система, робоча пам'ять.

**E.I. Tyulkova, L.A. Vataeva, T.S. Gluschenko, S.G. Pivina**

### **EFFECTS OF THE PRENATAL HYPOXIA ON HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS FUNCTIONING AND WORKING MEMORY IN RATS**

A comparative analysis of the effects of severe hypobaric hypoxia in different prenatal periods on expression profiles

of glucocorticoid receptors (GR) in dorsal (CA1) and ventral (dental gyrus) hippocampus and neocortex of rats, their stress reactivity and working memory has been performed in the present study for the first time. According to the data obtained, severe hypoxia in the prenatal period induces remarkable disturbances of GR expression in the neurons of neocortex of adult males but not females, that correlates to the disruption of working memory in adult males exposed to hypoxia on the prenatal 14–16<sup>th</sup> days. Elevation of stress plasma corticosterone levels have been observed only in the females subjected to hypoxia on the prenatal 17–19<sup>th</sup> days. Hypoxia in the females and males results in the differential changes in functions of hippocampus, as well as of other brain areas involved in learning. Key words: prenatal hypoxia, hippocampus, neocortex, glucocorticoid receptors, hypothalamic pituitary adrenal axis, working memory.

*Pavlov Institute of Physiology RAS, St.Petersburg, Russia*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Аршавский И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. – М.: Наука, – 1982. – 270 с.
2. Ватаева Л. А., Косткин В. Б., Макухина Г. В., Хожай Л. И., Отеллин В. А. Поведение в «открытом поле» у самок и самцов крыс, подвергавшихся действию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития // ДАН. – 2001. – **380**, № 1. – С. 1–3.
3. Ватаева Л.А. Косткин В.Б., Макухина Г.В., Хожай Л.И., Отеллин В.А. Условнорефлекторная реакция пассивного избегания у самок и самцов крыс, подвергшихся воздействию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 2004. – **40**, № 3. – С. 250–253.
4. Ватаева Е.И., Тюлькова Е.И. Хожай Л.И., Отеллин В.А., Самойлов М.О. Обучение в водном лабиринте Морриса самок и самцов крыс, подвергавшихся действию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития // Там же. – 2005. – **41**. – С. 532–535.
5. Дмитриев Ю. С., Бачманов А. А., Дмитриева Н. И., Гоццо С, Якобино К., Д'Удинс Б. Некоторые особенности в структуре гиппокампа как нейроанатомическая основа различий в поведении // Там же. – 1987. – **23**, № 5. – С.663–667.
6. Дубровская Н.М., Журавин И.А. Онтогенетические особенности поведения крыс, перенесших гипоксию на 14-е или 18-е сутки эмбриогенеза // Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова. – 2008. – **58**, № 6. – С. 718–727.
7. Дунаева Т.Ю., Трофимова Л.К., Граф А.В., Маслова М.В., Маклакова А.С., Крушинская Я.В., Соколова Н.А. Трансгенерационные эффекты антенатальной острой гипоксии периода раннего органогенеза // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – **146**, № 10. – С. 364–366.
8. Журавин И.А., Туманова Н.Л., Потапов Д.О. Струк-

- турные изменения в сенсомоторной коре мозга в раннем постнатальном онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 2001. – 37, № 6. – С. 518–520.
9. Кассиль В.Г., Отеллин В.А., Хожай Л.И., Косткин В.Б. Критические периоды развития головного мозга // Рос. физиол. журн. – 2000. – 86, № 11. – С. 1129–1136.
  10. Морозов В.И., Чайковский В.С., Прияткин С.А., Рогожкин В.А., Савченко О.М. Радиоиммунологический анализ стероидов, научно-практические аспекты // Физиол. журн. СССР. – 1988. – 74, № 8. – С. 473–476.
  11. Пальчик А.Б., Шабалов Н.П. Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных. – С-Пб.: ПИТЕР, 2001. – 224 с.
  12. Строев С.А., Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Пельто-Хьюкко М.Т. Влияние пренатальной гипоксии на экспрессию тиоредоксина-1 в гиппокампе крыс на разных сроках постнатального онтогенеза // Нейрохимия. – 2011. – 28, № 3. – С. 226–231.
  13. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на активность фосфоинозитидной системы мозга крыс // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 2010. – 46, № 5. – С. 406–409
  14. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Отеллин В.А. Механизмы формирования реакций мозга на действие гипобарической гипоксии в различные сроки пренатального периода у крыс // Журн. акушерства и женских болезней. – 2010. – 59, №4. – С. 99–110.
  15. Тюлькова Е.И., Семенов Д.Г., Ватаева Л.А., Беляков А.В., Самойлов М.О. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на активность глутаматергической сигнальной трансдукции мозга крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2011. – 151(3). – С. 224–228.
  16. Boksa P. Animal models of obstetric complications in relation to schizophrenia//Brain Res. Rev. – 2004. – 45. – P. 1–17.
  17. Cai Z., Xiao F., Lee B., Paul J. A., Rhodes P. G. Prenatal hypoxia-ischemia alters expression and activity of nitric oxide synthase in the young rat brain and causes learning deficits // Brain Res. Bull. – 1999. – 49, № 5. – P. 359–365.
  18. Choi D.C., Furay A.R., Evanson N.K., Ostrander M.M., Ulrich-Lai Y.M., Herman J.P. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs // J. Neurosci. – 2007. – 27(8). – P. 2025–2034.
  19. Cullinan W.E., Záborszky L. Organization of ascending hypothalamic projections to the rostral forebrain with special reference to the innervation of cholinergic projection neurons // J. Comp. Neurol. – 1991. – Apr 22. – 306(4). – P. 631–667.
  20. Florian C., Roulet P. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice // Behavioural. Brain Res. – 2004. – 154, № 2. – P. 365–374.
  21. Golan H., Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development^ short- and long-term consequences demonstrated in rodent models // Developmental. Sci. – 2006. – 9. – P. 338–349.
  22. Herman J.P., Patel P.D., Akil H., Watson S.J. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat // Mol Endocrinol. – 1989. – 3(11). – P. 1886–1894.
  23. Jason J.R., Kristin L.G., Paul E.S. A. Discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response // J. Neurosci. – 2009. – 29(22). – P. 7330–7340.
  24. Khozhai L.I., Otellin V.A., Kostkin V.B. Formation of the neocortex in rats after prenatal hypoxia // Neurosci. and Behav. Physiol. – 2004. – 34, № 2. – P. 207–211.
  25. Lipp H.P., Wolfer D.P. Genetically modified mice and cognition // Curr. Opin. Neurobiol. – 1998. – 8, № 2. – P. 272–280.
  26. O'Neill C. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling in mammalian preimplantation embryo development // Reproduction. – 2008. – 136. – P. 147–156.
  27. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. – Sydney: Acad. Press. – 1986.
  28. Schopke R, Wolfer D. P., Lipp H. P., Leisinger-Trigona M. C. Swimming navigation and structural variations of the infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of the mouse // Hippocampus. – 1991. – 1, № 3. – P. 315–328.
  29. Wimer C.C., Wimer R.E., Roderick T.H. Some behavioral differences associated with relative size of hippocampus in the mouse // J. Comp. Physiol. Psychol. – 1971. – 76. – P. 57–65.
  30. Winick M. Cellular growth during early malnutrition // Pediatrics. – 1971. – 47, № . – С. 969–978.

ФГБУН Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: [anoxia@pavlov.infran.ru](mailto:anoxia@pavlov.infran.ru)

Материал поступил в  
редакцию 31.04.2013

А.Г. Портниченко<sup>1,2</sup>, Т.Ю. Лапикова-Бригинская<sup>1,2</sup>, М.И. Василенко<sup>1</sup>,  
Г.В.Портниченко<sup>1,2</sup>, Л.Н. Маслов<sup>3</sup>, А.А. Мойбенко<sup>2</sup>

## Экспрессия киназы Akt в желудочках сердца при гипоксическом прекондиционировании и ремоделировании миокарда

*Исследовали влияние гипоксического прекондиционирования и ремоделирования на экспрессию киназы Akt в желудочках сердца. Крыс-самцов линии Вистар, выращенных на равнине или в среднегорье (2100 м над уровнем моря), подвергали гипоксическому прекондиционированию путем «подъема» в барокамере на «высоту» 5600 м на 3 ч. Экспрессию Akt определяли методом иммуоблоттинга в правом и левом желудочках сердца. Установлено, что гипоксическое прекондиционирование вызывает индукцию киназы Akt в желудочках сердца в течение периода отсроченной кардиопротекции (1-3-и сутки после воздействия). Ремоделирование миокарда при хронической гипоксии в среднегорье было ассоциировано с повышенным уровнем экспрессии Akt в миокарде, в большей степени в левом желудочке сердца. Прогрессия гипоксического ремоделирования миокарда, выявленная у части животных, сопровождалась редукцией гипоксической реактивности клеток, в том числе индукции Akt в ответ на прекондиционирование. Таким образом, установлено участие киназы Akt в механизмах позднего гипоксического прекондиционирования и ремоделирования миокарда при хронической гипоксии. Обнаружен ингибиторный регуляторный механизм, лимитирующий индукцию Akt в ремоделированном миокарде.*

*Ключевые слова: гипоксическое прекондиционирование миокарда, гипоксическое ремоделирование миокарда, экспрессия киназы Akt.*

### ВВЕДЕНИЕ

Активация сигнальных путей кардиомиоцитов определяет развитие клеточного ответа при стимуляции или повреждении миокарда. Важным регуляторным звеном этих механизмов может быть киназа Akt, также известная как протеинкиназа В (PKB). Как и другие серин-треониновые киназы, Akt обладает функцией предотвращать повреждение клеток, поддерживать их жизнеспособность и подавлять апоптоз [8, 20]. Благодаря этому активация Akt в миокарде, в том числе в таких клетках, как кардиомиоциты, фибробласты, гладкомышечные клетки сосудов и эндотелиоциты, признана протекторной [1–3, 8, 15, 25]. Участие Akt во множественных каскадах сигнальных путей позволяет определить ее

роль как молекулы, которая интегрирует внутриклеточные сигналы и запускает адаптивный ответ [20]. Показано, что эта киназа участвует в регуляции процессов роста, пролиферации или гибели клетки, а также влияет на клеточный метаболизм, транспорт глюкозы, экспрессию генов и межклеточную коммуникацию путем индукции пара- и аутокринных факторов [8, 13, 20], что указывает на ее возможную роль в кардиопротекции при прекондиционировании и ремоделировании миокарда.

Основные сигнальные пути, определяющие возможную роль Akt в этих механизмах, представлены на рис. 1. Стимуляция ряда клеточных рецепторов через PI3-киназу (PI3K) активирует Akt и множественные ко-

нечные эффекторы этого сигнального пути. Так, действие инсулиноподобного фактора роста (IGF-I) приводит к Akt-опосредованной редукции апоптотической гибели кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии, перегрузке давлением и оксидативном стрессе [2, 3, 6], а снижение активности Akt стимулирует апоптоз при сердечной недостаточности [1]. Среди эффекторных звеньев Akt-зависимых механизмов, способствующих выживанию клеток, нужно выделить деактивацию проапоптотических белков семейства Bcl-2 и транскрипционных факторов Forkhead (FOXO), регуляцию обмена  $Ca^{2+}$ , поддержание выживания эндогенных стволовых клеток сердца, замещающих нехватку кардиомиоцитов [7, 13, 22, 24]. Важным эффектом является стимуляция эндотелиальной продукции NO, обеспечивающего релаксацию желудочков сердца и регулирующего ангиогенез и ремоделирование миокарда [6, 9, 19].

Развитие ремоделирования определяется соотношением процессов роста, пролиферации или программируемой гибели клетки, которые также могут опосредоваться киназой Akt (см. рис. 1). В эмбриональном сердце Akt регулирует пролиферацию кардиомиоцитов с помощью нескольких эффекторных механизмов, прежде всего, ингибирования киназы гликогенсинтазы GSK-3 $\beta$  и FOXO [10, 12]. В отличие от неонатальных, кардиомиоциты взрослого организма растут преимущественно путем гипертрофии [4]. Среди механизмов, восстанавливающих клеточный цикл в кардиомиоцитах взрослых особей, идентифицирован сигнальный путь IGF-I/Akt, активирующий циклины D/E/A и индуцирующий синтез ДНК [4, 5]. В патологических условиях, в том числе при ишемическом повреждении миокарда, рост активности Akt сопровождается привлечением стволовых клеток сердца, ингибирование Akt редуцирует их пролиферацию, а ингибирование GSK-3 $\beta$  стимулирует их клеточный рост [21, 22]. Эти данные свидетельствуют, что активация пути PI3K/Akt играет ключевую

роль в пролиферации кардиомиоцитов и их клеток-предшественников.

Роль Akt в развитии гипертрофии представляется противоречивой [11]. Показано, что Akt положительно регулирует гипертрофию кардиомиоцитов путем ингибирования FOXO, а нарушение этого сигнального механизма вызывает патологическое ремоделирование [10]. Функция киназы регулируется также благодаря ее транслокации [18], оверэкспрессия ядерной Akt повышает кардиопротекцию и противодействует гипертрофии [17, 23].

Ввиду участия киназы Akt во множественных сигнальных путях и возможности взаимной регуляции их звеньев представляется важной последовательность активации этих механизмов в течение ответа на повреждение или стимуляцию. Однако такие временные характеристики активации процессов выживания, пролиферации или клеточного роста в тканях в ответ на раздражители крайне недостаточно исследованы [11].

Исследования роли Akt в прекодиционировании в основном касаются раннего «окна» кардиопротекции и выполнены на модели ишемического прекодиционирования. Роль сигнального пути PI3K/Akt в немедленной кардиопротекции признается неоднозначной, его защитное действие направлено на ограничение размера инфаркта и апоптоза, но не на развитие аритмий [14, 16, 25]. Однако участие Akt-опосредованных сигнальных путей в гипоксическом прекодиционировании и их роль в позднем периоде кардиопротекции до сих пор не охарактеризованы.

На основании имеющихся данных можно высказать предположение о возможном прямом или опосредованном действии гипоксии на Akt-зависимые сигнальные пути кардиомиоцитов (см. рис. 1) не только путем активации этой киназы, но и путем индукции ее экспрессии в миокарде, что может вызывать как кардиопротекторные эффекты, так и ремоделирование миокарда. Целью работы было определить изменения экспрессии Akt

при гипоксическом прекондиционировании и ремоделировании миокарда у крыс.

## МЕТОДИКА

Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар в возрасте 6-8 мес, выращенных и постоянно содержавшихся на равнине (г. Киев, 1-я группа) или в условиях среднегорья (2100 м над уровнем моря, Приэльбрусье, 2-я группа). Все манипуляции с животными проводили согласно требованиям «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых с экспериментальными и другими научными целями» (Страсбург, 1986). Гипоксическое прекондиционирование осуществляли с помощью воздействия на крыс обеих групп острой гипобарической гипоксии («подъем» в барокамере на «высоту» 5600 м в течение 3 ч). Образцы тканей отбирали через 1, 3, 5 сут после гипоксического прекондиционирования. Крыс гепаринизировали, под уретановым наркозом (1,5 г/кг массы тела) вскрывали грудную клетку и быстро извлекали сердце, помещали в физиологический раствор хлорида натрия при 0 °С. Отделяли правый желудочек сердца

от левого (с перегородкой), образцы тканей немедленно замораживали в жидком азоте. Развитие гипоксического ремоделирования сердца животных определяли с помощью расчета индекса отношения массы правого желудочка сердца к массе левого желудочка с перегородкой.

Для экстракции белков после механического измельчения в жидком азоте образцы тканей гомогенизировали в лизис-буфере (Трис-НСl - 5 ммоль / л, рН 7,5, глицерин - 10%, ЭДТА и ЭГТА - по 0,5 ммоль / л, дитиотреитол - 2 ммоль / л, фенилметилсульфонил фторид - 0,2 ммоль / л, смесь ингибиторов протеаз - 1%, Тритон X-100 - 0,1%), центрифугировали 20 мин (10000 g, 4 °С). В супернатантах определяли содержание белка бицинониновым методом с помощью набора реактивов BCA-1 («Sigma», США).

Экспрессию белков изучали методом иммуноблоттинга (Western blotting) с использованием моноклональных анти-Akt антител фирмы «BD Pharmingen» (США), реактивов фирмы «Sigma» (США), аппаратуры «BioRad Labs» (США) и протоколов производителей. Денатурированные супернатанты (по 100 мкг белка) разделяли на 7,5% SDS-PAGE

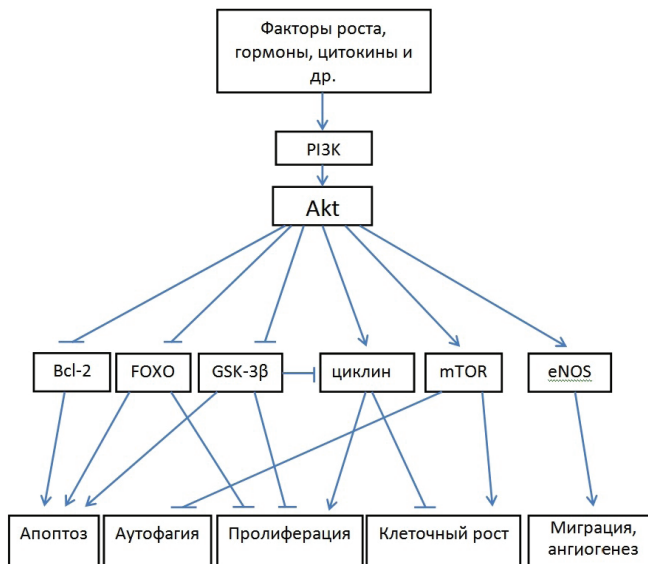


Рис. 1. Схема Akt-опосредованных механизмов клеточных реакций

и переносили на поливинилдифторидные мембраны. Инкубацию со специфическими антителами проводили в разведении 1 мкг/мл в течение 1 ч. Для детекции белков использовали набор ProteoQuest Western blotting kit («Sigma», США). Иммуносвязывание проводили видоспецифическим иммуноглобулином G, меченным пероксидазой, окрашивание осуществляли в реакции с тетраметилбензидином. Интенсивность окрашивания определяли с помощью компьютерной денситометрии и представляли в условных единицах.

Обработку результатов проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики, для оценки значимости статистических показателей применяли критерии t Стьюдента и Уилкоксона-Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Условия хронической гипоксии в среднегорье являются фактором, стимулирующим гипоксическое ремоделирование сердца. При определении морфометрических показателей сердца у крыс 1-й группы не было обнаружено гипертрофии миокарда (рис. 2). В то же время у животных 2-й группы выявлено гипоксическое ремоделирование, причем крысы распределялись на две подгруппы с достоверно различной степенью гипертрофии правого желудочка сердца ( $P < 0,05$ ), которые были обозначены нами (в условиях данного эксперимента) как гипертрофия I и II степени (см. рис. 2).

При определении экспрессии киназы Akt у крыс 1-й группы выявлено ее преобладание в правом желудочке сердца ( $P < 0,05$ , рис. 3), тогда как у акклиматизированных к среднегорью животных наблюдали преобладание показателей в левом желудочке. При гипертрофии правого желудочка I степени возрастала экспрессия киназы в левом желудочке по сравнению с равнинным контролем, тогда как в правом желудочке рост экспрессии ограничивался ( $P < 0,05$ , см. рис. 3).

При гипертрофии правого желудочка II степени показатели экспрессии были выше в 1,9-2,4 раза в обоих желудочках по сравнению с таковыми при I степени гипертрофии ( $P < 0,05$ , см. рис. 3). Это свидетельствует о связи степени роста кардиомиоцитов с экспрессией Akt, с одной стороны, и об усилении цитопротекторных механизмов при росте гипоксического ремоделирования миокарда, с другой, при этом в левом желудочке эти процессы более выражены. Полученные результаты могут указывать на прогипертрофическую роль киназы при хронической гипоксии и соответствуют данным литературы о положительной регуляции Akt процессов гипертрофии миокарда [10].

В случае воздействия гипоксического прекодиционирования экспрессия киназы в миокарде желудочков сердца значительно изменялась. У крыс 1-й группы наблюдали отчетливую индукцию Akt в обоих желудочках сердца с преобладанием в левом (см. рис. 3) через сутки после воздействия острой гипоксии, в дальнейшем показатели экспрессии постепенно уменьшались. Следует отметить, что в правом желудочке показатели нормализовались на 3-и сутки после действия острой гипоксии, что соответствует длительности второго (позднего) «окна» кардиопротекции

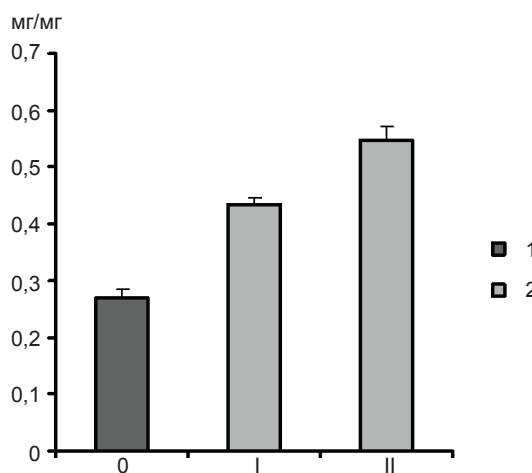


Рис. 2. Соотношение массы правого и левого желудочков сердца у крыс 1-й (1) и 2-й (2) групп. 0, I, II - степень гипертрофии правого желудочка сердца

при preconditionировании. В то же время в левом желудочке индукция киназы была гораздо более высокой, чем в правом, уже на 1-е сутки, и сохранялась повышенной на 5-е сутки после preconditionирования. Эти показатели позволяют сделать ряд заключений: 1) индукция Akt в обоих желудочках сердца

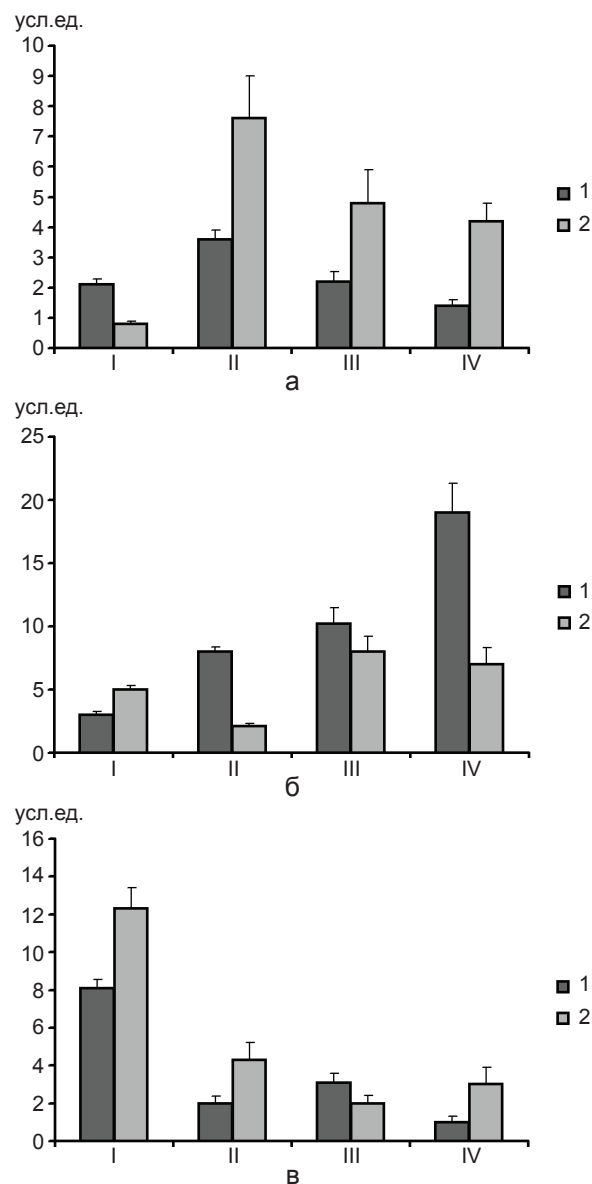


Рис. 3. Экспрессия белка Akt после гипоксического preconditionирования в миокарде крыс 1-й группы (а) и 2-й группы с I (б) и II (в) степенью гипертрофии правого желудочка. 1 – правый желудочек, 2 – левый желудочек; I – контроль, II, III, IV – через 1, 3, 5 сут после preconditionирования

играет роль в цитопротекторных механизмах позднего preconditionирования; 2) из-за возможной прогипертрофической роли Akt при действии гипоксии индукция киназы в правом желудочке органичивается как по величине прироста, так и по длительности экспрессии.

Ремоделирование миокарда вследствие хронической гипоксии существенно изменяло реакцию на preconditionирование. У крыс 2-й группы с гипертрофией миокарда I степени экспрессия киназы Akt в правом желудочке значительно возрастала уже через сутки после воздействия острой гипоксии и продолжала расти на 5-е сутки ( $P < 0,05$ , см. рис. 3). В отличие от этого, в левом желудочке наблюдали уменьшение экспрессии Akt на 1-е сутки после воздействия, последующий рост показателей был менее значительным, чем в правом желудочке, с максимумом на 3 сутки эксперимента (см. рис. 3). При сравнении с показателями на равнине следует отметить, что в левом желудочке максимальная экспрессия не изменялась количественно, но развивалась в более позднем периоде. В правом желудочке, однако, наблюдался количественный прирост экспрессии во все сроки исследования и длительное сохранение повышенных показателей, что может указывать на дополнительную стимуляцию индукции Akt (или прекращение действия ограничительных механизмов) ввиду функционального напряжения правого желудочка при хронической гипоксии.

Напротив, в желудочках сердца с гипертрофией II степени экспрессия Akt достоверно уменьшались после воздействия острой гипоксии ( $P < 0,05$ , см. рис. 3). Таким образом, прогрессия гипертрофии сопровождалась редукцией гипоксической реактивности белка Akt, что можно рассматривать как протекторный ограничительный механизм, предупреждающий развитие патологического ремоделирования миокарда.

Исследования роли Akt в кардиопротекции при хронической гипоксии проводились до сих пор в единичных работах. В частности,



установлено, что PI3K/Akt частично опосредовали уменьшение размера инфаркта у крыс, предварительно адаптированных к прерывистой гипобарической гипоксии [16]. Согласно данным экспериментов с использованием блокаторов, при ишемическом прекондиционировании роль PI3K/Akt в кардиопротекции представлялась более весомой, чем при хронической гипоксии [16]. Однако эти исследования касались только активации киназы без определения изменений экспрессии белка.

Полученные нами результаты значительно уточняют характеристику исследуемых процессов и дают основания для дифференциации роли Akt в молекулярных механизмах позднего прекондиционирования в зависимости от степени ее индукции. Неадаптированные к гипоксии животные демонстрируют наибольшую способность к индукции Akt в ответ на прекондиционирующий стимул. Это хорошо согласуется с данными литературы о роли этой киназы в опосредовании инфарктлимитирующего эффекта прекондиционирования [14, 16]. В нашей работе впервые показано, что во время позднего «окна» кардиопротекции происходит рост экспрессии Akt. Это может значительно усиливать протекторный ответ клетки при инфаркте.

У акклиматизированных к среднегорью крыс экспрессия Akt значительно возрастает, положительно коррелируя со степенью гипоксического ремоделирования правого желудочка. Наличие двух разных степеней гипертрофии и разного паттерна реактивности кардиомиоцитов у этих животных может быть обусловлено различием чувствительности к гипоксии (большая степень гипертрофии у низкоустойчивых к гипоксии животных), однако в эксперименте мы не устанавливали этой зависимости ввиду значительного влияния метода определения устойчивости к гипоксии на кардиопротекторные феномены. В то же время у животных с гипертрофией способность Akt к дальнейшей индукции (при прекондиционировании) прогрессивно снижается: при I степени гипертрофии при-

рост экспрессии развивается более медленно, а при II степени вообще редуцируется. Такое снижение гипоксической реактивности кардиомиоцитов может быть направлено, прежде всего, на ограничение дальнейшего клеточного роста, однако и Akt-опосредованные механизмы прекондиционирования при этом постепенно утрачивают свою роль. Эти результаты также хорошо согласуются с данными литературы о меньшем участии Akt-зависимых механизмов в кардиопротекции, вызванной хронической гипоксией, нежели ишемическим прекондиционированием [16]. Кроме того, показано, что активация Akt и наличие PI3K-зависимого сигнала коррелируют с пролиферативным ростом кардиомиоцитов, а при последующей дифференциации клеток активность Akt редуцируется [15, 20–22]. Исходя из этого, можно предполагать, что суппрессия гипоксической индукции киназы Akt в гипертрофированном сердце является звеном протекторного механизма, направленного на предотвращение дальнейшего клеточного роста и патологического ремоделирования миокарда.

## ВЫВОДЫ

Гипоксическое прекондиционирование вызывает индукцию киназы Akt в желудочках сердца в течение периода отсроченной кардиопротекции (1-3-и сутки после воздействия).

Ремоделирование миокарда при хронической гипоксии ассоциировано с повышенным уровнем экспрессии Akt в миокарде, в большей степени в левом желудочке сердца.

Прогрессия гипоксического ремоделирования миокарда сопровождается редукцией гипоксической реактивности клеток, в том числе индукции Akt в ответ на прекондиционирование.

*Работа поддержана грантом НАН Украины по программе „Фундаментальные основы молекулярных и клеточных биотехнологий” и совместным грантом РФФИ № 13-04-90413 и ГФФИ Украины № Ф53.4/074.*

**А.Г.Портниченко, Т.Ю.Лапікова - Бригінська,  
М.І.Василенко, Г.В.Портніченко, Л.М.Маслов,  
О.О.Мойбенко**

## **ЕКСПРЕСІЯ КІНАЗИ АКТ У ШЛУНОЧКАХ СЕРЦЯ ПРИ ГІПОКСИЧНОМУ ПРЕКОНДИЦІОНАННІ ТА РЕМОДЕЛЮВАННІ МІОКАРДА**

Активация Akt-залежних механізмів може відігравати істотну роль у клітинній відповіді при гіпоксичному прекодиціонуванні та ремоделюванні міокарда. Досліджували вплив гіпоксичного прекодиціонування та ремоделювання на експресію кинази Akt в шлуночках серця. Щурів - самців лінії Вістар, які проживали на рівнині або середньогір'ї (2100 м н.р.м.), піддавали гіпоксичному прекодиціонуванню шляхом «підйому» в барокамері на «висоту» 5600 м на 3 год. Експресію Akt визначали методом імуноблотингу в правому і лівому шлуночках серця. Встановлено, що гіпоксичне прекодиціонування викликає індукцію кинази Akt в шлуночках серця протягом періоду відстроченої кардіопротекції (1-3-тя доба після впливу). Ремоделювання міокарда при хронічній гіпоксії у середньогір'ї було асоційоване з підвищеним рівнем експресії Akt в міокарді, більшою мірою в лівому шлуночку серця. Прогресія гіпоксичного ремоделювання міокарда, виявлена у частині тварин, супроводжувалася редукцією гіпоксичної реактивності клітин, в тому числі індукції Akt у відповідь на прекодиціонування. Таким чином, виявлено участь кинази Akt у механізмах пізнього гіпоксичного прекодиціонування і ремоделювання міокарда при хронічній гіпоксії. Виявлено інгібіторний регуляторний механізм, який лімітує індукцію Akt в ремодельованому міокарді.

**A.G.Portnychenko, T.Yu.Lapikova - Bryginska,  
M.I.Vasilenko, G.V.Portnichenko, LN Maslov,  
AA Moibenko**

## **THE EXPRESSION OF AKT KINASE IN THE HEART VENTRICLES UNDER HYPOXIC PRECONDITIONING AND MYOCARDIAL REMODELING**

Activation of Akt-dependent mechanisms may play a significant role in the cellular response under hypoxic preconditioning and myocardial remodeling. The impact of hypoxic preconditioning, and remodeling on the expression of Akt kinase in the heart ventricles was investigated. Wistar male rats, the residents of plains or middle altitude (2100 m above sea level), were exposed to hypoxic preconditioning by «lifting» in the barochamber at the «height» of 5,600 m in 3 h. In the right and left ventricles of the heart, Akt protein expression was determined by Western blotting. It was shown, that hypoxic preconditioning causes the induction of Akt kinase in the ventricles during the period of delayed cardioprotection (1-3 days after preconditioning). Myocardial

remodeling induced by chronic hypoxia in middle altitude was associated with elevated Akt expression in the myocardium, more pronounced in the left ventricle. Progression of hypoxic myocardial remodeling found in part of the animals was accompanied by a reduction of the cell hypoxic reactivity, including Akt induction in response to preconditioning. Thus, Akt kinase is involved in the mechanisms of hypoxia induced late preconditioning and myocardial remodeling in chronic hypoxia. Inhibitory regulatory mechanism was found to limit the induction of Akt in myocardium after remodeling.

Key words: hypoxic myocardial preconditioning, hypoxic myocardial remodeling, Akt kinase expression.

*International Centre for Astronomical, Medical and Ecological Research, NAS of Ukraine, Kyiv;*

*Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv;*

*FGBO SRI of Cardiology, Siberian Branch of RAMS, Tomsk, Russia*

## **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Ananthkrishnan R., Moe G.W., Goldenthal M.J., Marin-Garcia J. Akt signaling pathway in pacing-induced heart failure // *Mol. Cell. Biochem.* - 2005. - 268. - P. 103-110.
2. Armstrong S.C. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury // *Cardiovasc. Res.* - 2004. - 61. - P. 427-436.
3. Bae S., Zhang L. Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2005. - 315. - P. 1125-1135.
4. Bergmann O., Bhardwaj R.D., Bernard S., Zdunek S., Barnabe-Heider F., Walsh S., Zupicich J., Alkass K., Buchholz B.A., Druid H., Jovinge S., Frisen J. Evidence for cardiomyocytes renewal in humans // *Science.* - 2009. - 324. - P. 98-102.
5. Bicknell K.A., Coxon C.H., Brooks G. Can the cardiomyocyte cell cycle be reprogrammed? // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2007. - 42. - P. 706-721.
6. Ceci M., Gallo P., Santonastasi M., Grimaldi S., Latronico M.V., Pitisci A., Missol-Kolka E., Scimia M.C., Catalucci D., Hilfiker-Kleiner D., Condorelli G. Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice by increasing angiogenesis and reducing apoptosis // *Cell. Death. Differ.* - 2007. - 14. - P. 1060-1062.
7. Cittadini A., Monti M.G., Iaccarino G., Di Rella F., Tschlis P.N., Di Gianni A., Stromer H., Sorriento D., Peschle C., Trimarco B., Sacca L., Condorelli G. Adenoviral gene transfer of Akt enhances myocardial contractility and intracellular calcium handling // *Gene Ther.* - 2006. - 13. - P. 8-19.
8. De Jonge N., Goumans M.J., Lips D., Hassink R., Vlug E.J., van der Meel R., Emmerson C.D., Nijman J., de Windt L., Doevendans P.A. Controlling cardiomyocyte survival // *Novartis Found Symp.* - 2006. - 274. -

- P. 41–51.
9. Dimmeler S., Zeiher A.M. Exercise and cardiovascular health: get active to “AKTivate” your endothelial nitric oxide synthase // *Circulation*. – 2003. – **107**. – P. 3118–3120.
  10. Evans-Anderson H.J., Alfieri C.M., Yutzey K.E. Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors // *Circ. Res.* – 2008. – **102**. – P. 686–694.
  11. Gosselin H., Beliveau L., Burelle Y., Clement R., Lajoie C., El-Helou V., Calderone A. Disparate regulation of signaling proteins after exercise and myocardial infarction // *Med. Sci. Sports Exercise*. – **38**. – P. 455–462.
  12. Kerkela R., Kockeritz L., Macaulay K., Zhou J., Doble B.W., Beahm C., Greytak S., Woulfe K., Trivedi C.M., Woodgett J.R., Epstein J.A., Force T., Huggins G.S. Deletion of GSK-3beta in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation // *J. Clin. Invest.* – **118**. – P. 3609–3618.
  13. Khan M., Mohsin S., Avitabile D., Siddiqi S., Nguyen J., Wallach K., Quijada P., McGregor M., Gude N., Alvarez R., Tilley D.G., Koch W.J., Sussman M.A.  $\beta$ -Adrenergic regulation of cardiac progenitor cell death versus survival and proliferation // *Circ. Res.* – 2013. – **112**. – P. 476–486.
  14. Ledvenyiova V., Pancza D., Matejiková J., Ferko M., Bernatova I., Ravingerova T. Impact of age and sex on response to ischemic preconditioning in the rat heart: differential role of the PI3K-AKT pathway // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2013. – **91**. – P. 640–647.
  15. Oudit G.Y., Penninger J.M. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – **82**. – P. 250–260.
  16. Ravingerová T., Matejiková J., Neckár J., Anđelová E., Kolár F. Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart // *Mol. Cell. Biochem.* – 2007. – **297**. – P. 111–120.
  17. Rota M., Boni A., Urbanek K., Padin-Iruegas M.E., Kajstura T.J., Fiore G., Kubo H., Sonnenblick E.H., Musso E., Houser S.R., Leri A., Sussman M.A., Anversa P. Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility // *Circ. Res.* – 2005. – **97**. – P. 1332–1341.
  18. Rubio M., Avitabile D., Fischer K., Emmanuel G., Gude N., Miyamoto S., Mishra S., Schaefer E.M., Brown J.H., Sussman M.A. Cardioprotective stimuli mediate phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide dependent kinase 1 nuclear accumulation in cardiomyocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2009. – **47**. – P. 96–103.
  19. Shiojima I., Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway // *Genes Dev.* – 2006. – **20**. – P. 3347–3365.
  20. Sussman M.A., Völkens M., Fischer K., Bailey B., Cottage C.T., Din S., Gude N., Avitabile D., Alvarez R., Sundararaman B., Quijada P., Mason M., Konstantin M.H., Malhowski A., Cheng Z., Khan M., McGregor M. Myocardial AKT: the omnipresent nexus // *Physiol. Rev.* – 2011. – **91**. – P. 1023–1070.
  21. Taniyama Y., Ito M., Sato K., Kuester C., Veit K., Tremp G., Liao R., Colucci W.S., Ivashchenko Y., Walsh K., Shiojima I. Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2005. – **38**. – P. 375–385.
  22. Tateishi K., Ashihara E., Honsho S., Takehara N., Nomura T., Takahashi T., Ueyama T., Yamagishi M., Yaku H., Matsubara H., Oh H. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3beta signaling // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – **352**. – P. 635–641.
  23. Tsujita Y., Muraski J., Shiraishi I., Kato T., Kajstura J., Anversa P., Sussman M.A. Nuclear targeting of Akt antagonizes aspects of cardiomyocyte hypertrophy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103**. – P. 11946–11951.
  24. Urbanek K., Rota M., Cascapera S., Bearzi C., Nascimbene A., De Angelis A., Hosoda T., Chimenti S., Baker M., Limana F., Nurzynska D., Torella D., Rotatori F., Rastaldo R., Musso E., Quaini F., Leri A., Kajstura J., Anversa P. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival // *Circ. Res.* – 2005. – **97**. – P. 663–673.
  25. Whittington H.J., Harding I., Stephenson C.I., Bell R., Hausenloy D.J., Mocanu M.M., Yellon D.M. Cardioprotection in the aging, diabetic heart: the loss of protective Akt signalling // *Cardiovasc. Res.* – 2013. – **99**. – P. 694–704.

<sup>1</sup>Международ. центр астроном. и медико-экол. исследований НАН Украины, Киев;

<sup>2</sup>Ин-т физиологии им. Богомольца НАН Украины, Киев;

<sup>3</sup>ФГБУ «НИИ кардиологии» Сибирского отделения РАМН, Томск, Россия  
E-mail: port@biph.kiev.ua

Материал поступил в редакцию 31.04.2013

М.О. Самойлов, А.В. Чурилова, Т.С. Глущенко, К.А. Баранова

## Паттерн нейрональной экспрессии транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B при предъявлении различных режимов гипобарической гипоксии

*Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B играет важную роль в механизмах выживания/гибели нейронов мозга в экстремальных условиях, к которым в первую очередь относятся различные формы гипоксии. В настоящей работе с использованием количественного иммуноцитохимического метода проведен анализ экспрессии различных субъединиц NF- $\kappa$ B (p65 и c-Rel) в неокортексе крыс в ответ на тяжелую повреждающую гипобарическую гипоксию (ГГ), а также при действии сеансов умеренной протектирующей ГГ различной кратности. Показано, что тяжелая ГГ, приводящая к гибели нейронов мозга, не изменяет уровень экспрессии p65 и подавляет экспрессию c-Rel. Вместе с тем многократные, но не однократные, сеансы прекодиционирования умеренной ГГ, редуцирующие нейрональные повреждения, способствуют индукции экспрессии p65 и предотвращают подавление экспрессии c-Rel вследствие тяжелой ГГ. Умеренная ГГ в режиме прекодиционирования вызывает экспрессию обеих субъединиц NF- $\kappa$ B только при ее трехкратном применении, а одно- и шестикратные сеансы не оказывают такого эффекта. Выявленные особенности экспрессии субъединиц NF- $\kappa$ B (p65 и c-Rel) свидетельствуют об их вовлечении в механизмы формирования толерантности нейронов мозга к тяжелой ГГ.*

*Ключевые слова:* NF- $\kappa$ B, гипобарическая гипоксия, гипоксическое прекодиционирование.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что гипобарическая гипоксия (ГГ) может вызывать как структурно-функциональное повреждение мозга, так и нейропротективное действие при предъявлении тяжелой и умеренной гипоксии соответственно [1, 2]. Важное место в формировании адаптивных и патологических нейрональных механизмов, индуцируемых ГГ различной степени выраженности, принадлежит индуцибельным (c-Fos, NGFI-A, HIF-1 $\alpha$ ) и активационным транскрипционным факторам (ТФ), к которым относится семейство NF- $\kappa$ B [1, 2]. Оно состоит из 5 основных субъединиц p50, p65 (RelA), c-Rel, RelB и p52, которые, взаимодействуя друг с другом, образуют активные димеры. В нервной системе наиболее распространенными и хорошо изученными являются мономеры p50, p65, c-Rel [11, 23].

Наличие большого количества генов-мишеней определяет широкий круг биологических процессов, в которых участвует NF- $\kappa$ B: от нейрогенеза, дифференциации нейронов до синаптической пластичности и механизмов гибели/выживания нейронов мозга [16, 22, 23, 24]. Существуют противоречивые мнения относительно участия различных членов семейства NF- $\kappa$ B в механизмах протекции и повреждения нервных клеток [12, 15, 22, 26]. В ряде работ показано, что активация NF- $\kappa$ B способствует выживанию нейронов при оксидативном стрессе и ишемии [5, 9, 16, 20, 23, 37], предотвращению развития апоптоза [10]. В то же время имеются данные об их участии в нейродегенеративных процессах: NF- $\kappa$ B может стимулировать воспалительные реакции и способствовать гибели нейронов мозга при ишемии, эксайтотоксичности и других воздействиях [8, 12, 14, 26, 34]. Таким

© М.О. Самойлов, А.В. Чурилова, Т.С. Глущенко, К.А. Баранова

образом, эффекты активации NF- $\kappa$ B неоднозначны и, очевидно, зависят от характера экспериментального воздействия. Удобной экспериментальной моделью, используемой в качестве экстремального повреждающего или умеренного протективного воздействия, является ГГ. Нами было показано, что тяжелые формы гипоксии вызывают структурные повреждения нейронов гиппокампа и неокортекса, а умеренные прекондиционирующие воздействия, напротив, способствуют повышению устойчивости нейронов мозга к последующему тяжелому воздействию [1, 29, 30]. При этом эффекты умеренной ГГ зависят от параметров ее применения, в частности, от кратности и продолжительности воздействия. Однократные, в отличие от многократных, прекондиционирующие воздействия не оказывают корректирующего эффекта на структурные повреждения нейронов, индуцируемые ТГ [4]. Наиболее действенным режимом по нашим данным является трехкратное прекондиционирование (ПК): оно восстанавливает структурно-функциональные нарушения, вызываемые тяжелой ГГ, а также приводит к выраженной экспрессии ТФ NGFI-A, c-Fos, CREB и проадаптивных белков, в частности факторов семейства Bcl-2, антиоксидантов [1–3, 29–31]. Известно, что гены ряда проадаптивных белков являются мишенями NF- $\kappa$ B [22, 23]. Однако характер экспрессии различных субъединиц семейства ТФ NF- $\kappa$ B, в частности p65 и c-Rel, при предъявлении как повреждающей, так и различных режимов протективной гипоксии практически не изучен. Настоящая работа посвящена выяснению этого вопроса.

## МЕТОДИКА

Работа выполнена на взрослых самцах крыс линии Вистар массой 200–250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах

Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И. П. Павлова РАН. Тяжелую ГГ создавали в барокамере проточного типа при атмосферном давлении 180 мм рт. ст. в течение 3 ч. В режиме ПК крысам предъявляли умеренную ГГ (давление в барокамере составляло 360 мм рт.ст.; 2 ч). Эти два режима использовали в различных комбинациях для воздействия на животных следующих экспериментальных групп (по 6 крыс в каждой группе): 1-я – крысы, подвергнутые действию тяжелой ГГ; 2, 3, 4-я – крысы, подвергнутые одному, трем или шести сеансам гипоксического ПК (в случае трех- и шестикратного ПК интервал между сеансами 24 ч) и спустя 24 ч – тяжелой ГГ; 5, 6 и 7-я – крысы, подвергнутые только одному, трем или шести сеансам гипоксического ПК; 8-я – контрольная группа животных. Через 3 и 24 ч после тяжелой ГГ или через 24 ч после последнего сеанса ПК крыс декапитировали и извлекали головной мозг, который фиксировали в 4%-м параформальдегиде, приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4), в течение 24 ч, и подвергали гистологической обработке по стандартному протоколу. Изготавливали серии чередующихся парафиновых фронтальных срезов мозга толщиной 7 мкм на уровне -2,8 мм от брегмы [25] и монтировали их на предметные стекла. Для оценки экспрессии субъединиц NF- $\kappa$ B (p65 и c-Rel) в V слое неокортекса крыс использовали иммуноцитохимический метод с компьютерным анализом микроизображений. Для этого после стандартных процедур депарафинизации, регидратации и демаскировки антигена, срезы в течение ночи при +4°C инкубировали с первичными поликлональными антителами к p65 («Santa Cruz Biotechnology», INC, США, разведение 1:100) и c-Rel («Santa Cruz Biotechnology», INC, США, разведение 1:100) и далее использовали авидин-биотиновую си-

стему детекции («Vector Labs», США), а для визуализации реакции – диаминобензидин. После обезвоживания и заключения срезов в желатин проводили количественный анализ иммунореактивности нейронов с использованием системы, состоящей из светового микроскопа Jenaval («Carl Zeiss», Германия), цифровой камеры Baumer CX05c («Baumer Optronic» Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением Videotest Master Morphology. На основании оценки оптической плотности иммунопозитивные клетки разделяли на 2 класса: слабо- и интенсивно меченые (иммунопозитивные). Анализировали общее число иммунореактивных клеток, и их распределение по классам интенсивности. Результаты статистически обрабатывали с помощью пакетов анализа данных Statistica 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2003, использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA ( $P < 0,05$ ). Все результаты представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего и выражены в процентах от контроля (100 %).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В неокортексе контрольной группы животных наблюдался низкий уровень иммунореактивности к р65. Умеренная ГГ во всех трех используемых режимах приводила к увеличению общего числа иммунореактивных к р65 нервных клеток. Усиление интенсивности нейрональной экспрессии наблюдалось только в ответ на трехкратное ПК (число интенсивно иммунопозитивных клеток возрастало на 480 %; рис. 1). Тяжелая ГГ и однократно прекондиционированная тяжелая ГГ не вызывали изменений экспрессии р65. Изменения иммунореактивности к р65 после тяжелой ГГ наблюдались при предъявлении многократных сеансов ПК. При этом происходило увеличение как общего числа иммунореактивных клеток, так и интенсивности экспрессии. В ответ на трехкратное ПК отмечалось выраженное (500 %) увеличение числа

интенсивно экспрессирующих р65 клеток к 24 ч после тяжелой ГГ. В случае шестикратного ПК наблюдалось умеренное (300–350 %) увеличение интенсивности экспрессии р65 к 3 и 24 ч (рис. 2).

В контрольной группе животных выявлялись единичные иммунореактивные к с-Rel нервные клетки. В ответ на умеренную ГГ изменения экспрессии наблюдались лишь при трехкратном ее предъявлении. При этом количество с-Rel-интенсивно позитивных клеток увеличивалось на 900 % (рис. 3). Тяжелая ГГ приводила к снижению уровня экспрессии с-Rel к 3 ч после воздействия.

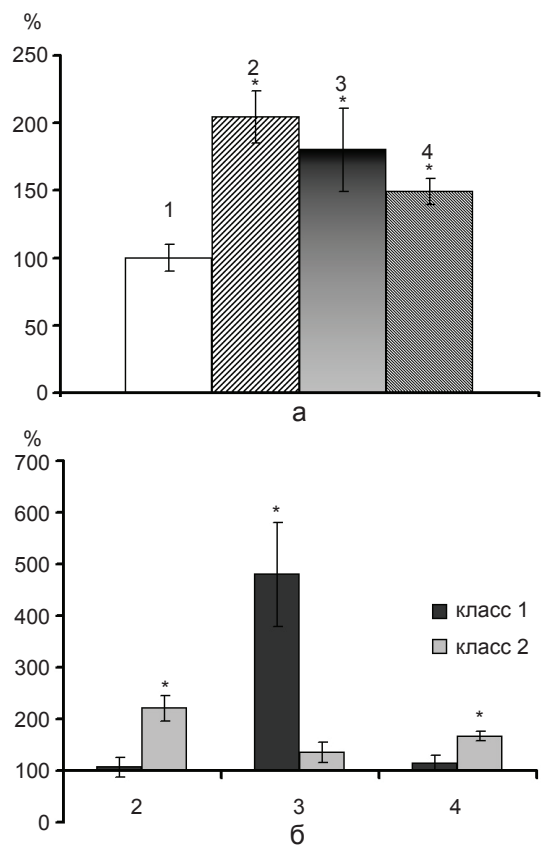


Рис. 1. Характер экспрессии субъединицы р65 в неокортексе крыс через 24 ч после одного, трех и шести сеансов прекондиционирования: а – общее количество иммунореактивных клеток, б – распределение иммунореактивных клеток по классам интенсивности, выраженное в процентах от контроля: класс 1 – интенсивно меченые клетки, класс 2 – слабо меченые клетки. 1 – контроль, 2, 3, 4 – один, три и шесть сеансов прекондиционирования соответственно. \*  $P \leq 0,05$

Это выразилось в уменьшении общего числа иммунопозитивных клеток (на 30 %) и снижении интенсивности экспрессии (на 40 %). У крыс с однократным прекодиционированием вслед за тяжелой ГГ отмечалось снижение количества с-Rel-иммунопозитив-

ных клеток (на 40 %) к 24 ч. Трехкратное ПК не изменяло уровня экспрессии с-Rel, а шестикратное приводило к ее увеличению к 3–24 ч после тяжелой ГГ за счет увеличения доли с-Rel-интенсивно иммунопозитивных клеток (рис. 4).

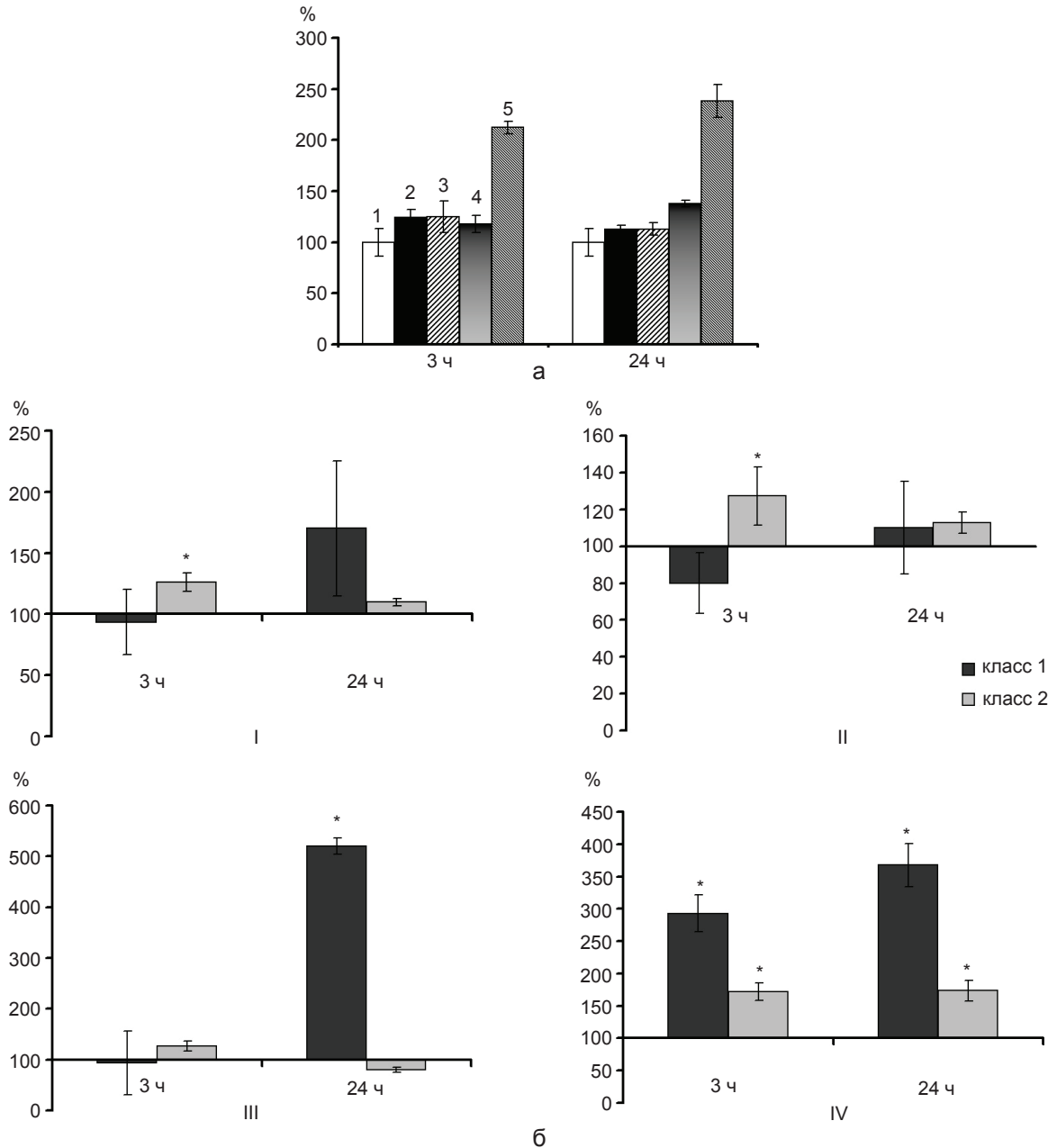


Рис. 2. Изменения экспрессии субъединицы р65 в неокортексе «непрекondиционированных» и «прекondиционированных» крыс через 3–24 ч после тяжелой гипоксии: 1 – контроль, 2 – тяжелая гипоксия, 3, 4, 5 – один, три и шесть сеансов прекодиционирования соответственно; I – тяжелая гипоксия, II, III и IV – тяжелая гипоксия и один, три, шесть сеансов прекодиционирования соответственно

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии специфических изменений экспрессии ТФ NF-kB (p65 и c-Rel) в неокортексе крыс при предъявлении различных режимов ГГ. В ответ на повреждающую тяжелую ГГ в течение 3–24 ч после воздействия экспрессия p65 не изменяется, но происходит снижение количества и доли c-Rel-интенсивно-позитивных нервных клеток. Однократно прекондиционированная ГГ также индуцирует снижение количества c-Rel-позитивных клеток. В отличие от этого, у крыс с трех- и шестикратным преконди-

ционированием крыс вслед за ГГ отмечается выраженное нейрональное повышение экспрессии p65, а также предотвращение снижения или усиление экспрессии c-Rel. Следует отметить, что использование трех сеансов умеренной ГГ в режиме ПК приводит к выраженному повышению нейрональной экспрессии как p65, так и c-Rel. Ранее нами было обнаружено, что трехкратное ПК умеренной ГГ также вызывает в нейронах неокортекса оверэкспрессию другой субъединицы семейства NF-kB – белка p50 [31]. Причем схожим образом тяжелая ГГ подавляла его экспрессию, а у крыс с трехкратным прекондиционированием выявлялось ее повышение. Следовательно, три субъединицы семейства NF-kB (p65, p50, c-Rel) вовлекаются в реакции нейронов неокортекса на ГГ различной степени выраженности. Полученные нами результаты совпадают с данными ряда исследователей. В частности, выявлено, что тяжелая ишемия редуцирует уровень NF-kB в уязвимых образованиях мозга [6].

В то же время установлено, что в механизмы нейропротекции к повреждающим воздействиям (ишемии, различным оксидативным стрессам, эксайтотоксичности) вовлекаются субъединицы семейства NF-kB [9, 10, 21, 22, 28]. Показано, что гипоксическое/ишемическое, оксидативное ПК индуцирует экспрессию NF-kB в нейронах мозга [5, 28, 31]. При этом следует учесть, что этот фактор активирует гены ряда проадаптивных и антиапоптотических белков, таких как пептидный антиоксидант MnSOD, факторы Bcl-2, Bcl-xL и других [7, 23, 35, 36], участвующих в механизмах нейропротекции.

Вместе с тем, по мнению ряда авторов, субъединицы ТФ NF-kB могут вовлекаться в механизмы гибели нейронов при действии ишемии [8, 12, 14, 34]. Полагают, что активация субъединицы c-Rel оказывает нейропротективное, а субъединицы p65 и p50 – нейрорегенеративное действие [27, 32]. Однако, очевидно, процессы регуляции активности NF-kB гораздо сложнее. В последнее время

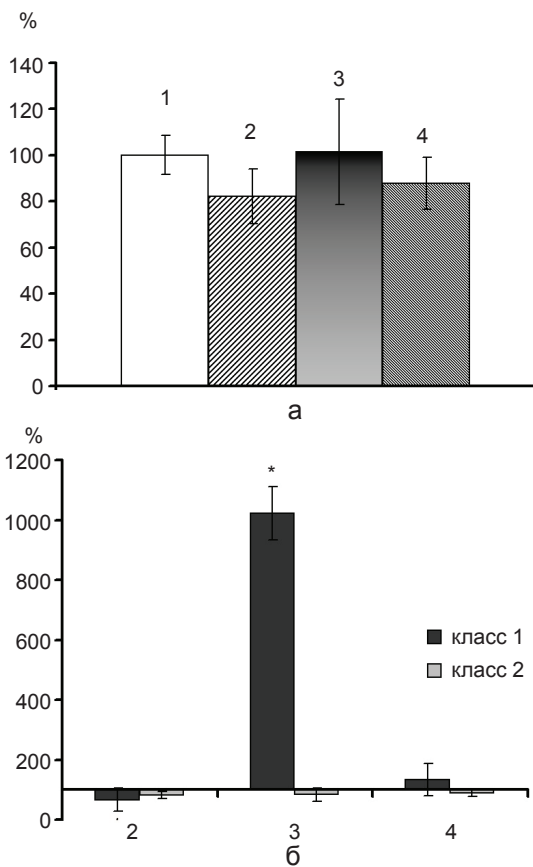


Рис. 3. Характер экспрессии субъединицы c-Rel в неокортексе крыс через 24 ч после одного, трех и шести сеансов прекондиционирования: а – общее количество иммунореактивных клеток, б – распределение иммунореактивных клеток по классам интенсивности, выраженное в процентах от контроля: класс 1 – интенсивно меченые клетки, класс 2 – слабо меченые клетки; 1 – контроль, 2, 3, 4 – один, три и шесть сеансов прекондиционирования соответственно. \*  $P \leq 0,05$



предполагается, что помимо классического пути активации NF-κB и отделения за счет фосфорилирования ингибирующей субъединицы IκB [17], существует ряд эпигенетических механизмов регуляции активности NF-κB [33]. Этот фактор может подвергаться пострансляционным модификациям: метили-

рованию, ацетилированию и фосфорилированию [13]. В зависимости от сайта, в котором произошла модификация, NF-κB может являться как активатором, так и ингибитором транскрипции гена-мишени, что, очевидно, во многом определяет конечный ответ клетки на внешний стимул. В частности, при кисло-

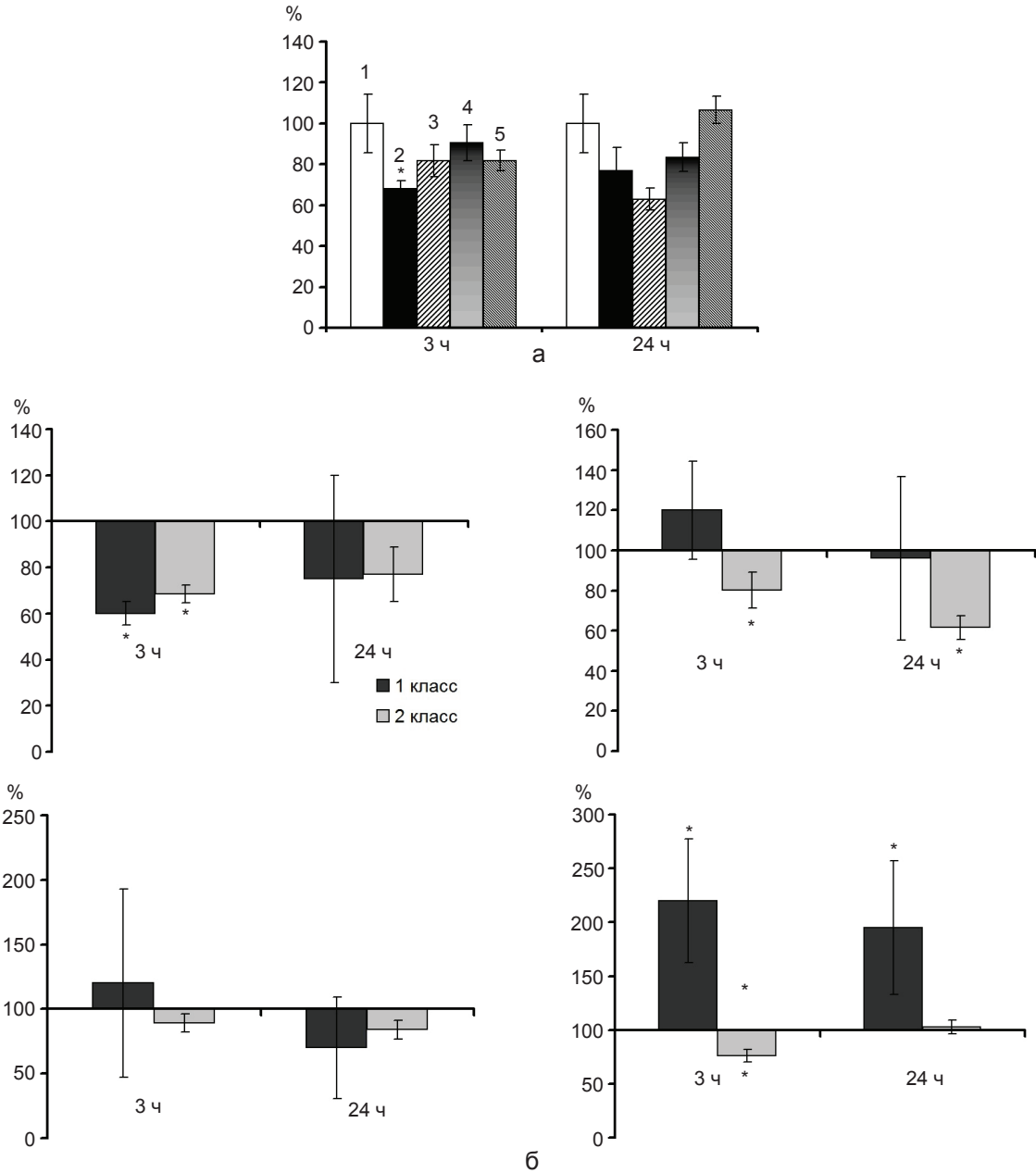


Рис. 4. Изменения экспрессии субъединицы c-Rel в неокортексе непрекондиционированных и прекондиционированных крыс через 3–24 ч после тяжелой гипоксии: класс 1 – интенсивно меченые клетки, класс 2 – слабо меченые клетки; 1 – контроль, 2, 3, 4 – один, три и шесть сеансов прекоондиционирования соответственно. \* P<0,05

родно-глюкозної депривації, приводящої до гібели нейронів *in vitro*, в клітках спостережувався низький рівень ацетилювання p65 (RelA) по лизину. Ацетилювання p65 передувало гібели нейронів [19]. Високий рівень ацетилювання цієї субодиниці NF-κB також спостережувався в відповідь на помірну (прекондиціонуючу) ішемію [18]. С урахуванням цих даних необхідно провести додаткові дослідження, спрямовані на розкриття ефектів дії різних субодиниць NF-κB. На цьому етапі дослідження можна зробити висновок, що згідно отриманих нами результатів з використанням моделі різних режимів ГГ, субодиниць p65 (RelA), p50, c-Rel беруть участь в механізмі нейропротекції, індукуючи багаторазово (особливо багаторазово), а не однократною прекодиціонуючими впливами. Очевидно, індукуючи багаторазово гіпоксичним ПК виражена кооперативна активація індукційних і активаційних ТФ в уязвимих структурах мозку сприяє ефективній експресії проадаптивних білків і запобігає структурно-функціональним пошкодженням, викликаним важкими формами гіпоксії [1].

*Робота підтримана грантом РФФІ № 11-04-00677.*

**М.О. Самойлов, Г.В. Чурилова, Т.С. Глушенко, К.О. Баранова**

### **ПАТЕРН НЕЙРОНАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ NF-κB ПРИ ЗАСТОСУВАННІ РІЗНИХ РЕЖИМІВ ГІПОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ**

Транскрипційний фактор NF-κB відіграє важливу роль у механізмах виживання/загибелі нейронів мозку при дії екстремальних впливів, до яких у першу чергу відносяться різні форми гіпоксії. У представленій роботі з використанням кількісного імуноцитохімічного методу проведено аналіз експресії різних субодиниць NF-κB (p65 і c-Rel) у неокортексі шурів у відповідь на тяжку гіпобаричну гіпоксію (ГГ), а також при дії сеансів помірної протективної ГГ різної кратності. Показано, що тяжка ГГ, яка приводить до загибелі нейронів

мозку, не змінює рівень експресії p65 і пригнічує експресію c-Rel. Разом з тим багаторазові, але не одноразові, сеанси прекодиціювання помірною ГГ, які зменшують нейрональні пошкодження, сприяють індукції експресії p65 і попереджують пригнічення експресії c-Rel внаслідок тяжкої ГГ. Помірна ГГ у режимі прекодиціювання індукуює експресію обох субодиниць NF-κB тільки при її триразовому застосуванні, а одно- і шестиразові сеанси не спричиняють такого ефекту. Виявлені особливості експресії субодиниць NF-κB (p65 і c-Rel) свідчать про їх залучення в механізми формування толерантності нейронів мозку до тяжкої ГГ.

**Ключові слова:** NF-κB, гіпобарична гіпоксія, гіпоксичне прекодиціювання.

**M.O. Samoilov, A.V. Churilova, T.S. Gluschenko, K.A. Baranova**

### **PATTERN OF NEURONAL EXPRESSION OF TRANSCRIPTION FACTORS NF-κB UNDER DIFFERENT MODES OF HYPOBARIC HYPOXIA**

Transcription factor NF-κB plays a pivotal role in mechanisms of brain neuron survival and degeneration under injurious stimuli, first of all different types of hypoxia. In the present work, using quantitative immunohistochemistry, we provide analysis of expression of different subunits of NF-κB (p65 and c-Rel) in the rat neocortex in response to severe injurious hypobaric hypoxia (HH) or after a single or multiple sessions of mild protective HH. Severe hypoxia (SH), resulting in loss of brain neurons, has no effect on the level of expression of p65 but suppresses expression of c-Rel. Multiple (but not single one) trials of preconditioning using mild HH which reduce neuronal damage promote p65 expression and prevent suppression of c-Rel level after SH. Triple session of mild HH itself when applied as a preconditioning stimulus upregulate expression of both subunits, while single administration or sixfold trials has no effect on the level of immunoreactivity of both subunits. The revealed peculiarities of the expression of p65 and c-Rel implies that these subunits of NF-κB appear to contribute to the mechanisms of brain tolerance to SH

**Key words:** NF-κB, hypobaric hypoxia, hypoxic preconditioning.

*Pavlov Institute of Physiology, RAS, St. Petersburg, Russia*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* – 2012. – **98**, № 1. – С. 108–126.

2. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В. Сигнальные молекулярные и гормональные механизмы формирования протективных эффектов гипоксического preconditionирования // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2012. – № 3. – С. 3–10.
3. Строев С.А., Самойлов М.О. Эндогенные антиоксиданты и гипоксическая толерантность мозга – СПб Ин-т физиологии им. И.П.Павлова РАН, 2006.
4. Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Изменения нейронов гиппокампа и неокортекса крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии // Морфология. – 2012. – **141**, № 1. – С. 7–11.
5. Blondeau N., Widmann C., Lazdunski M., Heurteaux C. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance // J. Neurosci. – 2001. – **21**. – С. 4668–4677.
6. Botchkina G.I., Geimonen E., Bilof M.L., Villarreal O., Tracey K.J. Loss of NF-kappaB activity during cerebral ischemia and TNF cytotoxicity // Mol. Med. – 1999. – **5**. – С. 372–381.
7. Bui N.T., Livolsi A., Peyron J.F., Prehn J.H. Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha // J. Cell Biol. – 2001. – 152. – С. 753–764.
8. Clemens J.A., Stephenson D.T., Smalstig E.B., Dixon E.P., Little S.P. Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats // Stroke. – 1997. – **28**, № 5. – P. 1073–1080.
9. Duckworth E.A., Butler T., Collier L., Collier S., Pennypacker K.R. NF-kappaB protects neurons from ischemic injury after middle cerebral artery occlusion in mice // Brain Res. – 2006. – **1088**. – P. 167–175.
10. Fridmacher V., Kaltschmidt B., Goudeau B., Ndiaye D., Rossi F.M., Pfeiffer J., Kaltschmidt C., Israël A., Mémet S. Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection // J Neurosci. – 2003. – **23**, № 28. – P. 9403–9408.
11. Gilmore T.D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives // Oncogene. – 2006. – **25**, № 51. – P. 6680–6684.
12. Grilli M., Memo M. Nuclear factor-kappaB/Rel proteins: a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction // Biochem. Pharmacol. – 1999. – **57**, № 1. – P. 1–7.
13. Huang B., Yang X.D., Lamb A., Chen L.F. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway // Cell Signal. – 2010. – **22**, № 9. – P. 1282–1290.
14. Inta I., Paxian S., Maegele I., Zhang W., Pizzi M., Spano P., Sarnico I., Muhammad S., Herrmann O., Inta D., Baumann B., Liou H.C., Schmid R.M., Schwaninger M. Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF-kappa B subunit RelA in cerebral ischemia // J Neurosci. – 2006. – **26**, № 50. – P. 12896–12903.
15. Kaltschmidt B., Heinrich M., Kaltschmidt C. Stimulus-dependent activation of NF-kappaB specifies apoptosis or neuroprotection in cerebellar granule cells // Neuro-molecular Med. – 2002. – **2**, № 3. – P. 299–309.
16. Kaltschmidt B., Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2009. – **1**, № 3. – a001271.
17. Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity // Annu Rev Immunol. – 2000. – **18**. – P. 621–663.
18. Lanzillotta A., Sarnico I., Ingrassia R., Boroni F., Branca C., Benarese M., Faraco G., Blasi F., Chiarugi A., Spano P., Pizzi M. The acetylation of RelA in Lys310 dictates the NF-kB-dependent response in post-ischemic injury // Cell Death Dis. – 2010. – **1**. – e96.
19. Lanzillotta A., Pignataro G., Branca C., Cuomo O., Sarnico I., Benarese M., Annunziato L., Spano P., Pizzi M. Targeted acetylation of NF-kappaB/RelA and histones by epigenetic drugs reduces post-ischemic brain injury in mice with an extended therapeutic window // Neurobiol. Dis. – 2012. – **49**. – P. 177–189.
20. Mattson M.P., Goodman Y., Luo H., Fu W., Furukawa K. Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration // J. Neurosci. Res. – 1997. – **49**, № 6. – P. 681–697.
21. Mattson M.P., Culmsee C., Yu Z., Camandola S. Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity // J. Neurochem. – 2000. – **74**, № 2. – P. 443–456.
22. Mark P. Mattson and Simonetta Camandola. NF-kB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders // J. Clin. Invest. – 2001. – **107**, № 3. – P. 247–254.
23. Mattson M.P., Meffert M.K. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease // Cell Death Differ. – 2006. – **13**, № 5. – P. 852–860.
24. Mémet S. NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease // Biochem Pharmacol. – 2006. – **72**, № 9. – P. 1180–1195.
25. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates // Academic Press. Sydney, Orlando, San Diego, New York, Austin, London, Montreal, Tokyo, Toronto, 1986. -
26. Pizzi M., Spano P. Distinct roles of diverse nuclear factor-kappaB complexes in neuropathological mechanisms // Eur. J. Pharmacol. – 2006. – **545**, № 1. – P. 22–28.
27. Pizzi M, Sarnico I, Lanzillotta A, Battistin L, Spano P. Post-ischemic brain damage: NF-kappaB dimer heterogeneity as a molecular determinant of neuron vulnerability // FEBS J. – 2009. – **276**, № 1. – P. 27–35.
28. Ravati A., Ahlemeyer B., Becker A., Klumpp S., Kriegstein J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB // J. Neurochem. – 2001. – **78**. – P. 909–919.
29. Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E., Gluschenko T., Otellin V., Pelto-Huikko M, Samoilov M. Preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and

- suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia // *Beh. Brain Res.* – 2005. – **160**. – P. 107–114.
30. Rybnikova E., Sitnik N., Gluschenko T., Tjulkova E., Samoilo M. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats // *Brain Res.* – 2006. – **1089**. – P. 195–202.
31. Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E., Churilova A., Jaroshevich O., Baranova K., Samoilo M. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia // *J. Neurochem.* – 2008. – **106**, № 3. – P. 1450-1458.
32. Sarnico I., Lanzillotta A., Benarese M., Alghisi M., Baiguera C., Battistin L., Spano P., Pizzi M. NF-kappaB dimers in the regulation of neuronal survival // *Int Rev Neurobiol.* – 2009. – **85**. – P. 351–362.
33. Sarnico I., Branca C., Lanzillotta A., Porrini V., Benarese M., Spano P.F., Pizzi M. NF-κB and epigenetic mechanisms as integrative regulators of brain resilience to anoxic stress // *Brain Res.* – 2012. – **1476**. – P. 203–210.
34. Schneider A., Martin-Villalba A., Weih F., Vogel J., Wirth T., Schwaninger M. NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia // *Nat Med.* – 1999. – **5**, № 5. – P. 554–559.
35. Sompol P., Ittarat W., Daosukho C., St Clair D. NF-kappaB-associated MnSOD induction protects against beta-amyloid-induced neuronal apoptosis // *J. Mol. Neurosci.* – 2006. – **29**. – P. 279–288.
36. Song Y.S., Lee Y.S., Narasimhan P., Chan P.H. Reduced oxidative stress promotes NF-kappaB-mediated neuroprotective gene expression after transient focal cerebral ischemia: lymphocytotropic cytokines and antiapoptotic factors // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2007. – **27**. – P. 764–775.
37. Valerio A., Dossena M., Bertolotti P., Boroni F., Sarnico I., Faraco G., Chiarugi A., Frontini A., Giordano A., Liou H.C., De Simoni M.G., Spano P., Carruba M.O., Pizzi M., Nisoli E. Leptin is induced in the ischemic cerebral cortex and exerts neuroprotection through NF-kappaB/c-Rel-dependent transcription // *Stroke.* – 2009. – **40**, № 2. – P. 610–617.

*Ин-т физиологии имени И.П. Павлова РАН, Москва*  
*E-mail: samoilov@pavlov.infran.ru*

*Материал поступил в редакцию 31.04.2013*

Л.Д. Лукьянова

## Сигнальная роль митохондрий при адаптации к гипоксии

*обосновывается биоэнергетический механизм формирования срочной адаптации к гипоксии. Доказывается, что происходящее на ранних стадиях гипоксии репрограммирование работы субстратного участка дыхательной цепи (переключение окисления НАД-зависимых субстратов на сукцинатоксидазный путь) выполняет регуляторную роль в трех важнейших функциональных аспектах жизнедеятельности организма при гипоксии: 1) в сохранении на ранних стадиях аэробного синтеза энергии; 2) инициации HIF-1-зависимых транскрипционных процессов, участвующих в формировании реакций адаптации; 3) рецепторной функции и реакциях межклеточной сигнализации, т.е. в системной регуляции. Все это позволяет рассматривать сукцинат как сигнальную молекулу, участвующую в регуляции кислородного гомеостаза организма.*

*Ключевые слова: гипоксия, адаптация, репрограммирование работы дыхательной цепи, митохондриальные ферментные комплексы I и II, HIF-1 $\alpha$ , GPR91.*

### Регуляторная роль митохондрий в жизнедеятельности организма

В последнее десятилетие произошла ревизия роли митохондрий в жизнедеятельности организма. Она обусловлена огромным количеством фактического материала, который свидетельствует о том, что эти уникальные органеллы принимают участие не только в энергосинтезирующей функции, но и во внутриклеточной, внеклеточной и системной регуляции [2–5, 12, 25, 28, 30, 32, 39, 47, 64, 70, 71, 90]. Их исключительная роль в жизнедеятельности организма определяется тремя особенностями структурно-морфологической организации, отличающими их от всех других органелл: 1) наличием ферментов дыхательной цепи, предназначенных для аэробного синтеза энергии; 2) наличием собственного генома; 3) способностью к подвижности: делению, слиянию и перемещению в клетке.

Митохондрии играют ведущую роль в клеточном метаболизме. Они содержат ряд

ключевых, лимитирующих ферментов биосинтеза стероидов, синтеза гема, мочевой кислоты, секретируют желудочного сока. В сложных внутриклеточных сигнальных путях координируют обмен кальция и калия, особенно в специализированных клетках. Между цитозолем и митохондриями поддерживается постоянный интенсивный поток неорганических ионов и метаболитов. В силу того, что внутренняя митохондриальная мембрана проницаема только для H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> и NH<sub>3</sub>, другие гидрофильные метаболиты и все органические биологически важные ионы транспортируются через нее благодаря наличию специфических каналов и белковых переносчиков.

Митохондрии участвуют в регуляции различных физиологических функций, обеспечивая энергией большинство внутриклеточных процессов, необходимых для жизнедеятельности организма. К ним относятся прежде всего сократительная функция сердца, глад-

© Л.Д. Лукьянова

кой мускулатуры пищеварительного тракта, сосудов, легких, поддержание ионных градиентов в возбудимых тканях, аккумуляция секретируемого материала в везикулах и поддержание гормональной и нейротрансмиттерной функции. С сигнальными свойствами митохондрий связаны такие процессы, как рост, старение, биогенез, термогенез, работа ионных каналов, апоптоз, секреция инсулина в  $\beta$ -клетках, формирование адаптивных реакций и др. [2,3, 20–22, 24, 25, 29, 31, 35, 37, 58, 67, 70, 73, 74, 77, 80, 90, 104, 106]. Нарушение функции митохондрий неизбежно ведет к различным патологиям и даже к смерти.

Тем не менее, главная функция митохондрий – их регуляторная роль в кислородном гомеостазе, которая проявляется как на системном, так и клеточном уровнях. Вдыхаемый нами воздух в конечном счете отражает состояние и запросы митохондрий в кислороде, так как именно они являются главными его потребителями: до 98 % кислорода, поступающего в организм, связано с митохондриальным дыханием. В результате этого процесса в клетках различных тканей млекопитающих генерируется до 80–90 % АТФ. Благодаря этой функции, от которой зависит жизнеспособность и жизнедеятельность аэробных организмов, в процессе эволюции были созданы сложнейшие физиологические системы доставки кислорода к митохондриям и поддержания в клетке оптимальной оксигенации (акт дыхания, легочный перенос кислорода, сердечно-сосудистая циркуляция, система масса-переноса крови, эритроциты, гемоглобин). Организация пищеварения, включая утилизацию продуктов питания и их последующую поэтапную ферментативную переработку, также продиктована прежде всего необходимостью снабжения субстратами реакций митохондриального окисления и окислительного фосфорилирования [21, 66]. Более того, митохондрии определяют концентрационный градиент кислорода, поступающий из окружающей среды в клетку, так как именно они являются конечным звеном

взаимодействия с молекулярным кислородом. [4, 5, 21].

Таким образом, очевидно, что митохондрии вовлечены в механизмы внутриклеточной и внеклеточной сигнализации и функционируют как активные сигнальные органеллы, принимающие участие в передаче информации по самым различным внутриклеточным сигнальным путям. Все это позволило в настоящее время выделить вопросы, связанные с сигнальной функцией митохондрий, в самостоятельный раздел молекулярной биологии – митохондриальную физиологию [36].

### **Регуляторная роль митохондрий при гипоксии**

Митохондрии являются мишенью для гипоксии/ишемии. Кислород, как субстрат терминального фермента дыхательной цепи – цитохромоксидазы, принимает участие в реакциях аэробного синтеза. Поэтому его дефицит в окружающей клетку среде может подавлять аэробный синтез и снижать содержание макроэргов (АТФ, КФ), а также мембранный потенциал. В результате происходит угнетение широкого спектра энергезависимых реакций: ионного транспорта, электрогенной и рецепторной функции клетки, мышечного сокращения и др. Ответ организма на гипоксию включает различные адаптивные реакции, способствующие устранению функционально-метаболических нарушений, типичных для этого состояния и направленных прежде всего на сохранение функции митохондрий. При этом используются 2 типа механизмов: а) срочный компенсаторный, цель которого – предотвращение последствий острой гипоксии и быстрое восстановление в постгипоксический период, и б) долгосрочные механизмы адаптации к гипоксии, которые формируются в течение более длительного периода и способствуют увеличению неспецифической резистентности к дефициту кислорода. Эти механизмы базируются на регуляторном репрограм-

мировании активности митохондриальных ферментных комплексов (МФК).

В нормоксических условиях работа дыхательной цепи, как правило, зависит от окисления НАД-зависимых субстратов – основного поставщика восстановительных эквивалентов для дыхательной цепи через МФК I. Вклад этого пути в интактных клетках, оцениваемый по потреблению кислорода, может составлять до 55–65 %. Тем не менее 25–30 % митохондриального дыхания в этих условиях связано с МФК II и окислением сукцината (рис.1, а), содержание которого в матриксе митохондрий невелико (0,2–0,4 ммоль/л) [57].

В гипоксических условиях происходит регуляторное репрограммирование работы дыхательной цепи: обратимое подавление электронно-транспортной функции МФК I и компенсаторная активация МФК II. При этом резко возрастают содержание сукцината в крови и тканях [27, 86, 87, 97] и вклад сукцинатаоксидазного окисления в общее дыхание. Последнее может достигать 70–80 % [4,5, 65, 66]. Эффект обратимой инактивации электронно-транспортной функции МФК I в условиях гипоксии и при разных патологиях, включающих гипоксическую

компоненту, описанный нами впервые 25 лет назад, является одной из трех стадий развития митохондриальных нарушений при гипоксии, которые коррелируют с фазными изменениями, наблюдаемыми при гипоксии на системном уровне (см. рис. 1, б) [2, 3, 59–62]. Этот феномен известен в литературе как митохондриальная дисфункция. В настоящее время имеется большое количество экспериментальных подтверждений нарушения электронно-транспортной функции МФК I в условиях гипоксии, которая сохраняется и даже усиливается в постгипоксический период (первые 30 мин – 2 ч реоксигенации) [13–15, 19, 31, 35, 56, 68, 69, 79,82, 83, 85, 89].

Наряду с этим имеются многочисленные данные, свидетельствующие об особой роли сукцината в окислительном метаболизме ткани на ранней стадии гипоксии. Так, установлено, что его содержание в тканях и в крови уже в первые 30 мин гипоксии возрастает на порядок, достигая 4–7 ммоль/л, и продолжает увеличиваться в ранний период реоксигенации, что позволяет некоторым авторам считать его маркерной молекулой гипоксии [38, 44, 46–48, 53, 57].

Одновременно при гипоксии наблюдается

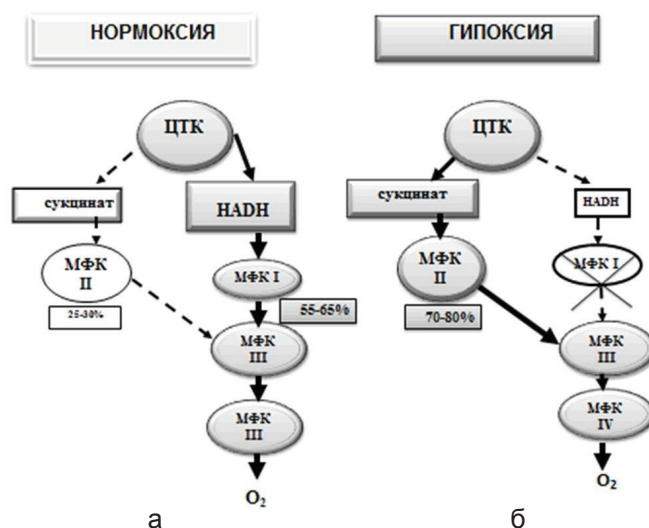


Рис. 1. Репрограммирование работы митохондриальной дыхательной цепи в условиях нормоксии (а) и гипоксии (б). На а: главный путь окисления – НАД-зависимые субстраты (МФК I). На б: при гипоксии происходит подавление МФК I и активируется сукцинатаксидазный путь (МФК II). МФК – митохондриальный ферментный комплекс. ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

активация сукцинатдегидрогеназы и сукцинатаксидазного окисления, а также увеличение вклада последнего в дыхание и синтез энергии [6–8, 13, 14, 16, 26, 27, 33, 36, 41, 51, 54, 57, 64, 66, 75, 97, 100, 101–105].

При этом меняются и кинетические свойства основных ферментов комплексов I и II [8, 64]. Так, в неокортексе низкоустойчивых к гипоксии крыс любое гипоксическое воздействие приводит к противоположным изменениям константы Михаэлиса ( $K_m$ ) обоих ферментов комплексов: увеличению значений  $K_m$  НАДН-убихинон-оксидоредуктазы (МФК I) и уменьшению значений  $K_m$  сукцинатдегидрогеназы (МФК II). Процесс отражает снижение эффективности работы фермента в первом случае и его увеличение – во втором. Таким образом, переключение при разных формах гипоксических воздействий путей окисления субстратов дыхательной цепи от НАД-зависимого на сукцинатаксидазный путь обусловлено кинетическими причинами и является срочным регуляторным и компенсаторным механизмом адаптации, который реализуется в условиях дефицита кислорода в большинстве тканей (мозг, миокард, печень, почки, лимфоциты). Он предупреждает или ослабляет характерные для гипоксии нарушения синтеза АТФ и оказывает нормирующее действие на параметры аденилатного пула, а также на жизненно важные функции организма, способствует устранению гипоксического ацидоза [12], увеличению резистентности организма к дефициту кислорода и формированию срочной резистентности [4, 7, 8, 60–65, 97, 100, 101]. Если такое переключение не происходит (некомпенсированная дисфункция МФК I), наблюдается более ранняя дезэнергизация клеток, сопровождающаяся гораздо более выраженными нарушениями функционально-метаболических показателей, контролирующей жизнедеятельность клетки.

Благодаря тканево-специфическим особенностям энергетического обмена, пути образования эндогенного сукцината при ги-

поксии могут различаться. Тем не менее в их основе лежат аспартат- и глутаматзависимые аминотрансферазные реакции [23, 38, 44, 46–48, 54, 67, 87, 97, 100, 101]. В мозгу мощным источником глутамата при гипоксии может быть специфическая для него активация в этих условиях глутаматергической системы. Однако скорость образования эндогенного сукцината при гипоксии, по-видимому, может быть недостаточной для оптимальной компенсации энергетического дефицита. Именно этим можно объяснить тот факт, что экзогенно введенный сукцинат или сукцинатсодержащие препараты обладают выраженными антигипоксическими свойствами, способствуя увеличению внутриклеточного пула АТФ и предупреждая ранние нарушения энергетического обмена (энерготропное действие сукцината). При этом одновременно увеличивается переносимость животными острой гипоксии [2, 5–7, 61–66].

Увеличение содержания эндогенного сукцината при гипоксии в цитозоле и в крови говорит о его способности проникать из матрикса митохондрий через плазматические мембраны. Считается, что при гипоксии увеличивается пассивная проницаемость мембран для сукцината, его анионного антипорта с малатом, а также транспорта по концентрационному градиенту с использованием различных переносчиков [34, 90]. Возможен и обратный процесс – транспорт экзогенного сукцината в клетку. Изотопный анализ превращений сукцината в организме показал, что, введенный *per os*, он быстро проникает из желудка в кровь и ткани и через 30 мин до 16 % препарата аккумулируется в различных органах (скелетные мышцы > печень > плазма крови > почки). Гипоксия усиливает этот процесс [12, 46, 47].

Репрограммирование работы субстратного участка дыхательной цепи при гипоксии происходит очень быстро. Нами показано, что изменения кинетических показателей основных ферментов МФК I и II наблюдаются уже через 30 мин после самых различных



гипоксических воздействий [8, 65, 66].

В настоящее время не вызывает сомнений, что переключение окисления НАД-зависимых субстратов в дыхательной цепи на окисление сукцината является обязательным эволюционно сформированным срочным сигнальным компенсаторным механизмом, благодаря которому обеспечивается сохранение энергосинтезирующей функции дыхательной цепи при нарушении кислородного гомеостаза [2–5, 63, 64].

### **О роли митохондрий в транскрипционной активности HIF-1 при гипоксии**

Согласно современным представлениям, ведущая роль в формировании адаптации к гипоксии принадлежит специфическому белковому фактору, индуцируемому при гипоксии – HIF-1 (от англ. Hypoxia Inducible Factor) [92–96, 99]. Роль HIF-1 в формировании молекулярных механизмов долгосрочной (хронической) адаптации достаточно хорошо изучена. Согласно последним данным, прямыми или опосредованными мишенями HIF-1 являются около 180 генов, экспрессирующих специфические белки, необходимые в условиях сниженного снабжения O<sub>2</sub> для активации альтернативных компенсаторных аэробных и анаэробных реакций, ответственных за синтез энергии и сохранение функциональной активности. Этот список непрерывно пополняется.

Гораздо менее изучены эффекты HIF-1 и его взаимодействие с другими сигнальными системами на ранней стадии адаптации. Фаза индукции адаптации – это период срочного генерализованного ответа на любое гипоксическое воздействие, в результате которого происходит одномоментная активация различных сигнальных регуляторных систем и увеличение срочной толерантности (резистентности) организма к гипоксии, которая в постгипоксический период сравнительно быстро возвращается к исходному уровню. Ведущую роль в этом процессе играет гипоталамо-гипофизарно-адреналовый комплекс

и основные медиаторы системы – катехоламины и кортикостероиды. В этот период активируются множественные соподчиненные сигнальные системы, которые обеспечивают формирование срочной компенсаторной защитной реакции организма от гипоксии и составляют основу для формирования отсроченных геномзависимых защитных эффектов долгосрочной адаптации. Известно, например, что в таком случае происходит выброс аденозина, NO, опиоидов, брадикинина и других интермедиатов, которые связываются с рецепторами G-белков (GPCR) и инициируют сигнальные пути, контролируемые различными киназами. Однако до настоящего времени остается открытым вопрос о роли всех излучаемых сигнальных путей в срочной индукции HIF-1. Неясно также, может ли этот фактор претендовать на главную роль в процессе формирования срочной адаптации. Так как регуляция активности HIF-1 определяется преимущественно субъединицей HIF-1 $\alpha$ , то вполне понятно, что рассматриваемый вопрос касается прежде всего значимости последней во всем процессе.

Проведенные нами исследования показывают, что при гипоксических воздействиях в режиме прекондиционирования ни свободнорадикальные процессы, ни цитокины, ни NO не выполняют функцию сигнальных механизмов срочной адаптации, ответственных за аккумуляцию HIF-1 $\alpha$  в ранний постгипоксический период и являются, скорее всего, лишь вторичными мессенджерами, играющими важную роль в формировании отсроченной адаптации [1, 7–12].

В то же время известно, что кислородзависимый процесс пролилгидроксилирования и протеасомной деградации HIF-1 $\alpha$ , протекающий в цитозоле нормоксических клеток, сопряжен с утилизацией НАД-зависимого субстрата цикла Кребса –  $\alpha$ -кетоглутарата, в то время как другой субстрат цикла трикарбоновых кислот сукцинат – аллостерический ингибитор этого процесса [52]. При гипоксии работа малатаспартатного шунта, поставля-

ющего  $\alpha$ -кетоглутарат в цитозоль, ингибируется, а синтез сукцината усиливается. В силу этого создаются предпосылки (наряду с дефицитом  $O_2$  и  $Fe^{2+}$ ) для инактивации пролилгидроксилазных реакций и стабилизации HIF-1 $\alpha$ , его накопления и усиления его транскрипционной активности. В таком случае должна существовать прямая зависимость между активацией сукцинатоксидазного пути окисления при гипоксии и образованием HIF-1 $\alpha$  (рис. 2).

Действительно, в литературе имеются подтверждения того, что экспрессия HIF-1 $\alpha$  или ее подавление определяются состоянием митохондриальной дыхательной цепи [3–15, 26, 45, 51, 91, 103]. Так, у мышей C57BL/6 однократная внутрибрюшинная индукция ингибитора МФК I нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР) подавляла аккумуляцию HIF-1 $\alpha$  в стриатуме в ответ на последовательные гипоксические воздействия (8 %  $O_2$ , 4 ч). Точно так же в нейрональной культуре, где имелся 40%-й дефицит активности МФК I, гипоксическая индукция HIF-1 $\alpha$  и его связывание в ядре с ДНК (образование транскрипционного активного комплекса HRE), были резко снижены, однако они восстанавливались в присутствии сукцината.

Нами показано, что и срочная и долгосрочная активация экспрессии HIF-1 $\alpha$  после гипоксических воздействий коррелировала с активностью сукцинатоксидазного окисления и характеризовалась как ткане-, так и феноспецифичностью. В неокортексе неустойчивых к гипоксии крыс при гипоксических воздействиях в режиме прекодиционирования наблюдается быстрая инактивация МФК I и переключение работы на сукцинатоксидазное окисление [1–3, 8, 64–66], коррелирующее со срочной экспрессией HIF-1 $\alpha$ , а также снижением формирования срочной и отсроченной резистентности. При тяжелых формах гипоксии способность к экспрессии HIF-1 $\alpha$  и формированию срочной и долгосрочной резистентности у неустойчивых к гипоксии животных нарушалась. Если, однако, переключения работы дыхательной цепи при гипоксических воздействиях от МФК I к МФК II не происходило, как, например, в КГМ высокоустойчивых к гипоксии крыс, аккумуляция HIF-1 $\alpha$  была снижена, либо вообще отсутствовала [2, 3–5, 60–63, 65, 66], и ни срочная, ни долгосрочная резистентность не формировались. Таким образом, индукция HIF-1 $\alpha$  усиливается в условиях низкой активности МФК I и высокой активности МФК II.

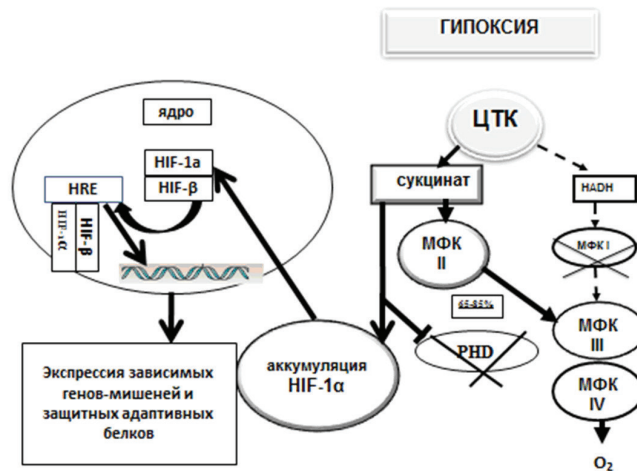


Рис. 2. Взаимодействие в условиях гипоксии сукцинатоксидазного окисления (МФК II) и транскрипционной активности HIF-1 $\alpha$ . Активация при гипоксии МФК-II способствует ингибированию пролилгидроксилазных реакций (PFD), аккумуляции HIF-1 $\alpha$ , его транслокации в ядро и экспрессии HIF-1 $\alpha$ -зависимых генов адаптации. МФК – митохондриальный ферментный комплекс. ЦТК – цикл трикарбоновых кислот. PFD – пролилгидроксилазные реакции

В свою очередь показано, что HIF-1 $\alpha$  может влиять на работу дыхательной цепи: через активацию пируватдегидрогеназы киназы I он способствует ингибированию пируватдегидрогеназы и тем самым подавляет окисление пирувата, что может быть одной из причин инактивации МФК I (см. рис. 2) [50].

Итак, существует генетически детерминированная сопряженность в функционировании митохондриальной дыхательной цепи и транскрипционной экспрессии индуцируемых гипоксией генов в условиях гипоксии, в которой субстраты цикла Кребса выполняют сигнальную функцию и регулируют активность пролилгидроксилазных реакций. Все эти факты указывают на участие митохондриальной дыхательной цепи и ее субстрата сукцината в регуляции транскрипционной экспрессии индуцируемых гипоксией генов (см. рис. 2).

Следует, однако, учитывать, что избыточное накопление сукцината в тканях при разных патологиях, связанное либо с нарушением окислительной функции сукцинатдегидрогеназы или дефицитом этого фермента, может быть причиной гипервысокого содержания HIF-1 $\alpha$  в тканях, что ведет к стимуляции пролиферативной активности, энцефалопатиям и образованию опухолей [26]. Показано, например, что мутации сукцинатдегидрогеназы ведут к карциноме почек, желудка, раку щитовидной железы [18, 91]. При этом в тканях происходит снижение пролилгидроксилазной активности, накопление HIF-1 $\alpha$  в ядре и цитозоле, которое может быть связано с ингибированием ( $\alpha$ )-кетоглутаратзависимых оксигеназ, в том числе проколлаген-пролилгидроксилазы, контролирующей его протеасомную деградацию [13–15, 51, 91].

### **Роль митохондрий в межклеточных взаимодействиях**

Сенсационным открытием последнего десятилетия стало установление факта, что интермедиаты цикла Кребса сукцинат и

$\alpha$ -кетоглутарат, помимо их участия в электронно-транспортной функции митохондриальной дыхательной цепи, являются специфическими лигандами двух G-белок-сопряженных рецепторов из семейства P2Y пуринорецепторов: GPR91 и GPR99 [42]. Поэтому гены, кодирующие эти рецепторы, были названы соответственно SUCNR1 (для сукцинатзависимого рецептора) и OXGR1 (для  $\alpha$ -кетоглутарат- или оксиглутаратзависимого рецептора) [77]. Поступая из клеток в кровь, в которой эти субстраты обнаруживаются в микромолярных концентрациях, они выполняют регуляторную функцию сигнальных молекул, ответственных в конечном счете за поддержание метаболического гомеостаза на системном уровне.

Сигнальная функция сукцината подтверждается многочисленными фактами. Так, известно, что его экстраклеточная аккумуляция увеличивает реабсорбцию фосфата и глюкозы, стимулирует гликолиз, увеличивает уровень гемоглобина, тромбоцитов и нейтрофилов у мышей при моделировании индуцированной хематотерапией миелосупрессии [42]. С усилением сукцинатоксидазного окисления при гипоксии связывают увеличение содержания Са в цитозоле и матриксе и сопряженный процесс активации фосфолипазы A2, набухание митохондрий, снижение постгипоксического ацидоза, активацию митохондриального  $K_{ATP}$ -зависимого канала [100–102]. Сукцинат увеличивает реабсорбцию фосфата и глюкозы в проксимальных трубчатках и стимулирует глюконеогенез [40].

Сукцинат принимает активное участие во внутриклеточном метаболизме. Яркое подтверждение этого – его роль в метаболизме инсулина в клетках островков Лангергенса [66]. Он обладает антиацидотическими свойствами и оказывает нормирующее действие на буферные свойства крови, увеличивая сродство кислорода к гемоглобину, т.е. облегчает его высвобождение в гипоксических условиях. Улучшается венозный отток, оксигенация тканей и работа сердечно-со-

судистой системы как в центральном, так и периферическом участках. В глюконеогенез вовлекаются недоокисленный лактат и другие метаболиты [12]. Имеются данные о том, что существует сукцинатконтролируемый электронный шунт между периферическими клетками и легкими. В условиях гипоксии сукцинат транспортируется с кровью из периферических гипоксических тканей в легкие, где его синтез затруднен в связи с более высокой оксигенацией, и используется там в качестве энергетического субстрата, необходимого для легочной вазоконстрикции. При этом он окисляется в митохондриях легких до фумарата, который через кровь снова поступает к периферическим клеткам и в фумаратредуктазной реакции вновь образует сукцинат [23, 76].

На настоящий день установлено, что сукцинатзависимый GPR91 локализован в плазматической мембране [43]. Он обнаружен более чем в 20 тканях и спектр его локализации постоянно расширяется. Наибольшей способностью к его экспрессии при гипоксии обладают почки (корковый слой и дистальные трубочки), а также печень [27], селезенка, тонкая кишка, мочевого пузыря. Рецептор специфически активируется только сукцинатом, который способствует также его интернализации [43]. Активация рецептора сукцинатом реализуется по крайней мере через два сигнальных пути (PI3K и ERK). Так как сукцинат индуцирует аккумуляцию инозитолфосфата и увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , а также активирует Erk, предполагается, что его активирующее действие на GPR91 сопряжено, по крайней мере, с передачей сигнала через  $G_i/G_o$  и  $G_q$  [43, 102]. Тем не менее рецепторно-сигнальная функция сукцината, по-видимому, тканеспецифична [43].

В почках индуцированная сукцинатом экспрессия GPR91, сопровождающаяся его интернализацией, вовлекает ренин-ангиотензиновую систему. Эта активация является звеном специфического для почек паракринного сигнального пути, инициируемого

высокой концентрацией глюкозы [17, 88, 98, 102]. GPR91-сигнальный каскад включает локальную аккумуляцию сукцината, а также экспрессию и интернализацию в эндотелиальных клетках почечных канальцев рецептора GPR91. При этом в процессе сигнальной трансдукции увеличиваются эндотелиальное содержание  $Ca^{2+}$ , образование NO и простагландина (PGE2) и их паракринное действие на смежные ренинпродуцирующие клетки. Этот каскад может модулировать почечную функцию и способствовать удалению различных продуктов метаболизма путем гиперфилтрации. Однако при длительной гиперэкспрессии сукцината он может, видимо, служить связующим звеном в развитии таких патологий, как диабет или синдром гиперактивации ренин-ангиотензивной системы, системной гипертензии и органических нарушений и способствует развитию сосудисто-почечной гипертензии, которая в свою очередь провоцирует развитие атеросклероза, диабета и почечной недостаточности. [43, 86].

При ишемии печени рецептор GPR91 экспрессируется в звездчатых клетках органа. Однако сукцинатзависимый эффект в этом случае не связан с гипертензией. Рецептор трансформирует сигнал, связанный с увеличением внеклеточной концентрации сукцината, во внутриклеточный, способствующий активации звездчатых клеток в ответ на повреждение органа. [27]. Таким образом, и в этом случае при ишемии печени действие сукцината следует рассматривать, как паракринный сигнал [27].

Сукцинатзависимая экспрессия GPR91 при ишемии обнаружена в дендритных клетках. Ее результатом является продукция различных ангиогенных факторов, в том числе сосудистого фактора роста VEGF [84, 49]. Происходит сукцинатзависимая мобилизация Ca в клетке, индуцируется миграционная активность и активируются лиганды Толл-подобных рецепторов, продуцирующих провоспалительные цитокины.

Сукцинат усиливает антигенспецифиче-

скую активацию хелперовских Т-клеток у человека и мышей, т.е. участвует в иммунных реакциях организма. Сукцинатзависимая GPR9-регуляция включается в распознавание иммунологической опасности, контролируя способность ткани к отторжению трансплантатов [84].

Сукцинатзависимая активация GPR91 обнаружена в ретине грызунов, где он экспрессируется преимущественно в слое ретинальных ганглиев [88] и способствует васкуляризации, активируя продукцию проангиогенных гормонов и регулируя рост сосудов. Однако при диабете и ретинальной ишемии увеличение содержания сукцината усиливает нейроваскуляризацию, ведущую к ретинопатии [84].

GPR91 регулирует липолиз в адипоцитах [84]. Его активация способствует подавлению липолиза в условиях гипогликемии и избыточного накопления жирных кислот. Таким образом, сигнальная функция интермедиатов цикла трикарбоновых кислот участвует в регуляции энергетического гомеостаза [81].

Установлена роль сукцината и его рецептора в стимуляции роста гемопоэтических прогениторных клеток. мРНК GPR91 и

экспрессия белка были обнаружены в прогениторных клетках CD34<sup>+</sup> костного мозга человека, а также в эритроидных и мегакариотных культурах и эритролейкемических клетках линии TF-1 [42].

Однако тканеспецифические эффекты рецептора не ограничиваются локальными реакциями. Имеются данные о том, что сукцинатсопряженные реакции включаются в экспрессию генов глутамат- и допаминергических систем сигнализации [72]. Более того, получены экспериментальные доказательства, что через GPR91 и GPR99 может осуществляться метаболическая связь окислительных процессов в митохондриях с адренергической и холинергической системами [55]. Показано, например, что стимуляция физиологических функций адреналином включает избирательную активацию сукцинатдегидрогеназы, а сукцинат, действующий в микромолярных концентрациях как субстрат окисления, является сигнальной молекулой, стимулирующей выделение адреналина и норадреналина. Точно такая же обратная сигнальная связь существует между субстратом метаболизма митохондрий  $\alpha$ -кетоглутаратом и ацетилхолином .

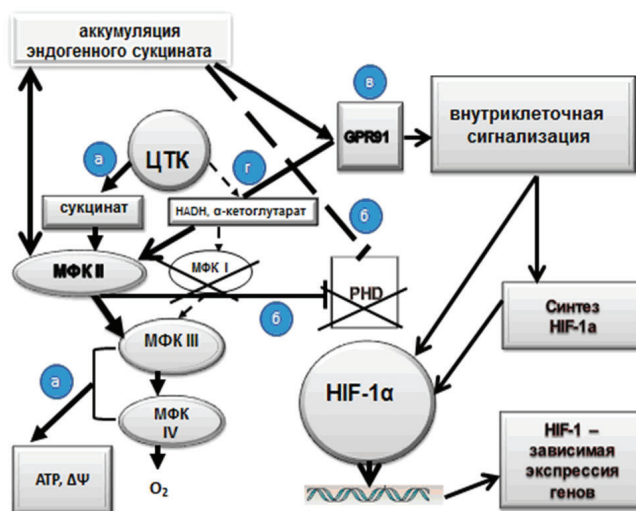


Рис. 3. Взаимодействие в условиях гипоксии митохондриальной дыхательной цепи (МФК II) и GPR91. Внутри- и внеклеточная аккумуляция сукцината при гипоксии приводит к активации МФК II (а), подавлению пролигидроксилазных реакций (б), активации сигнальной функции GPR91(в), контролирующей активность МФК II (г). Все в целом приводит к аккумуляции HIF-1 $\alpha$  и усилению его транскрипционной активности

Все в целом свидетельствует о том, что ответная реакция организма на гипоксию, первично реализуемая через активацию МФК II на субклеточном, митохондриальном уровне, способствует инициации каскада сукцинатзависимых взаимодействующих регуляторных механизмов, формирующихся как на клеточном, так и системном уровнях и контролирующая поддержание метаболического гомеостаза организма (рис. 3).

Таким образом, митохондриальная дыхательная цепь через сигнальные молекулы вовлечена не только в систему внутриклеточной, но и трансмембранной и межклеточной сигнализации, а сами митохондрии функционируют, как активные сигнальные органеллы и играют ключевую роль в важнейших регуляторных физиологических процессах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный в статье материал свидетельствует о том, что митохондрии вовлечены в механизмы внутриклеточной и межклеточной сигнализации и принимают участие в передаче информации по самым различным внутриклеточным сигнальным путям. К их первоначальной функции, связанной с уникальными свойствами терминального фермента дыхательной цепи цитохромоксидазы, добавилась новая – участие в регуляции кислородного гомеостаза не только клетки, но и организма в целом. Характерные фазные изменения в состоянии ферментов субстратного участка митохондриальной дыхательной цепи (МФК I и II) при гипоксии и переключение от окисления НАД-зависимых субстратов на сукцинатоксидазный путь являются регуляторным механизмом, реализующимся при любых формах кислородной недостаточности.

Этот механизм участвует по крайней мере в четырех важнейших регуляторных функциях: 1) сенсорной, связанной с изменением кинетических свойств МФК I и МФК II в ответ на градуальное снижение concentra-

ции кислорода в среде и направленной на выбор наиболее эффективного пути окисления энергетических субстратов в условиях гипоксии; 2) компенсаторной, ответственной за формирование срочных реакций адаптации при гипоксии, определяющих резистентность организма в этих условиях (эффекты прекодиционирования); 3) транскрипционной, направленной на активацию образования HIF-1 и генов, обеспечивающих длительную адаптацию организма к низким  $pO_2$ ; 4) рецепторной, отражающей участие митохондрий в системе межклеточной сигнализации. Во всех случаях необходимый результат достигается через активацию сукцинатоксидазного окисления, что позволяет рассматривать сукцинат как сигнальную молекулу.

Таким образом, митохондриальная дыхательная цепь в условиях гипоксии не только принимает непосредственное участие в формировании как ранних, так и поздних адаптивных признаков, но и вовлекается в сложнейшую систему внутриклеточной и межклеточной сигнализации, благодаря которой обеспечивается формирование системного ответа организма на дефицит кислорода.

Л.Д. Лукьянова

## СИГНАЛЬНА РОЛЬ МІТОХОНДРІЙ ПРИ АДАПТАЦІЇ ДО ГІПОКСІЇ

Обґрунтовується біоенергетичний механізм формування негайної адаптації до гіпоксії. Доводиться, що репрограмування роботи субстратної ланки дихального ланцюга (переключення окиснення НАД-залежних субстратів на сукцинатоксидазний шлях), яке відбувається на ранніх стадіях гіпоксії, виконує регуляторну роль у трьох найважливіших функціональних аспектах життєдіяльності організму при гіпоксії: 1) збереженні на ранніх стадіях аеробного синтезу енергії; 2) ініціації HIF-1 – залежних транскрипційних процесів, які беруть участь у формуванні реакцій адаптації, 3) рецепторній функції і реакціях міжклітинної сигналізації, тобто в системній регуляції. Все це дозволяє розглядати сукцинат як сигнальну молекулу, що бере участь у регуляції кисневого гомеостазу організму. Ключові слова: гіпоксія, адаптація, репрограмування роботи дихального ланцюга, митохондриальні ферментні комплекси I і II, HIF-1 $\alpha$ , GPR91.

L.D. Lukyanova

## MITOCHONDRIA SIGNALING IN ADAPTATION TO HYPOXIA

A bioenergetic mechanism for development of urgent adaptation to hypoxia is considered. Hypoxia induces reprogramming of respiratory chain function and switching from oxidation of NAD-related substrates (complex I) to succinate oxidation (complex II). Transient, reversible, compensatory activation of respiratory chain complex II is a major mechanism of urgent adaptation to hypoxia necessary for 1) succinate-related energy synthesis in conditions of oxygen deficiency and formation of urgent resistance in the body; 2) succinate-related stabilization of HIF-1 $\alpha$  and initiation of its transcriptional activity related with formation of urgent and long-term adaptation; 3) succinate-related activation of a succinate-specific receptor GPR91. Therefore succinate is a signaling molecule, and its effects are realized at three levels in hypoxia, intramitochondrial, intracellular and intercellular.

Keywords: hypoxia, adaptation, respiratory chain reprogramming, mitochondrial complexes I and II, HIF-1 $\alpha$ , GPR91.

*Institute of General Pathology and Pathophysiology, RAMS, Moscow, Russia*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1 $\alpha$  в неортексе крыс при различных режимах гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2012. – **154**(12). – С. 681–686.
- Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия. понятие, механизмы, коррекция // Там же. – 1997. – **124** (9). – С. 244–254.
- Лукьянова Л.Д. Митохондриальная дисфункция – типовой патологический процесс, молекулярный механизм гипоксии. – В кн.: Проблемы гипоксии. молекулярные, физиологические и клинические аспекты / Под ред. Лукьяновой Л.Д., Ушакова И.Б. – М., 2004. – С. 5–31.
- Лукьянова Л.Д. Сигнальная функция митохондрий при гипоксии и адаптации // Патогенез. – 2008, № 3. – С. 4–12.
- Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2011, № 1. – С. 3–19.
- Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Цыбина Т.А., Чернобаева Г.Н. Энерготропное действие сукцинатсодержащих производных 3-оксипиридина // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – **148**(10). – С. 388–392.
- Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекодиционирования. роль гипоксического периода и реоксигенации // Там же. – 2009. – **147**(4). – С. 380–384.
- Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М., Цыбина Т.А., Германова Э.Л., Ткачук Е.Н., Эренбург И.В. Действие интервальной нормобарической гипоксии на кинетические свойства митохондриальных ферментов // Там же. – 2007, № 12. – С. 644–651.
- Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. Влияние гипоксического прекодиционирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии // Там же. – 2011. – **151**(3). – С. 263–267.
- Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // Биол. мембраны. – 2012, №4. – С. 238–252.
- Лукьянова Л.Д., Сукоян Г.В., Кирова Ю. И. О роли провоспалительных факторов, NO и некоторых показателей липидного обмена в формировании срочной адаптации к гипоксии и аккумуляции HIF-1 $\alpha$  // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2012. – **11**. – С. 510–514.
- Маевский Е.И., Розенфельд А.С., Гришина Е.В., Кондрашова М.Н. Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий. – Пушино, 2001.
- Agani F. H., Pichiule P., Chavez J.C., La Manna J.C.. The role of Mitochondria in the regulation of Hypoxia-inducible Factor 1 Expression during Hypoxia // JBC. – 2000. – **275**(46). – P. 35863–35867.
- Agani F. H., Puchowicz M., Chavez J.C., Pichiule P., LaManna J. Inhibitors of mitochondrial complex I attenuate the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 during hypoxia in Hep3B cells // Compar. Biochem. and Physiol. – 2000. – **132**(1). – P. 107–109.
- Agani F.H., Pichule P., Chavez C., LaManna J.C. Inhibitors of mitochondrial complex I attenuate the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 during hypoxia in Hep3B cells // Compar. Biochem. Physiol. – Part A. – 2002. – **132**(1). – P. 107–109.
- Aithal H.N., Ramasarma T. Activation of liver succinate dehydrogenase in rats exposed to hypobaric conditions // Biochem J. – 1969. – **115**(1). – P. 77–83.
- Baumbach L., Leyssac P.P., Skinner S.L. Studies on rennin release from isolated superfused glomeruli. effects of temperature, urea, ouabain and ethacrynic acid // J. Physiol. – 1976. – **258**. – P. 243–256.
- Baysal B.E. On the association of succinate dehydrogenase mutations with hereditary paraganglion // Trends Endocrinol. Metab. – 2003. – **14**. – P. 453–459.
- Brandt U. Proton translocation by membrane-bound NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction // Biochem. Biophys. Acta. – 1997. – **1318**. – P. 79–91.
- Briere J.-J., Chretien D., Benit P., Rustin P. Respiratory chain defects. what do we know for sure about their consequences in vivo // BBA. – 2004. – **1659**. – P. 172–177.
- Brunk U.T., Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging // Eur. J. Biochem. – 2002. – **269**. – P. 1996–2002.

22. Butow R.A., Avadhani N.G. Mitochondria signaling // The retrograde response. *Molecular Cell*. – 2004. – **14**(1). – P. 1–15.
23. Cascarano J., Ades I.Z., O’Conner J.D. Hypoxia. a succinate-fumarate electron shuttle between peripheral cells and lung // *J Exp Zool*. – 1976. – **198**(2). – P. 149–153.
24. Chandel N.S., Schumacker P.T. Cell depleted of mitochondrial DNA ( $\rho^0$ ) yield insight into physiological mechanisms // *FEBS Lett*. – 1999. – **454**. – P. 173–176.
25. Chandel N.S., Schumacker P.T. Cellular oxygen sensing by mitochondria. old questions, new insight // *J. Amer. Physiol*. – 2000. – **88**. – P. 1880–1889.
26. Chavez J.C., Agani F., Pichule P., LaManna J.C. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the brain of rats during chronic hypoxia // *Ibid*. – 2000. – **89**(5). – P. 1937–1942.
27. Correa P.R., Kruglov E.A., Thompson M., Leite M.F., Dranoff J.A., Nathanson M.H. Succinate is a paracrine signal for liver damage // *J. Hepatology*. – 2007. – **47**. – P. 262–269.
28. Das J. The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation // *Bioessays*. – 2006. – **28**(9). – P. 890–901.
29. Da Silva M.M., Sartori A., Belisle E., Kowaltowsky A.J. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release, and enhances K<sup>+</sup> transport // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. – 2003. – **285**. – P. 154–162.
30. Devin A., Rigoulet M. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells // *Amer. J. Physiol. Cell Physiol*. – 2007. – **292**(1). – P. 52–58.
31. Di Lisa F., Ziegler M. Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD<sup>+</sup> metabolism // *FEBS Lett*. – 2001. – **492**. – P. 4–8.
32. Duchon M.R. Roles of Mitochondria in Health and Disease. *Diabetes*. – 2004. – **53**. – P. 96–102.
33. Feldkamp T., Kribben A., Roeser N.F., Senter R.A., Kemner S., Venkatachalam M.A., Nissim I., Weinberg J.M. Preservation of complex I function during hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial injury in proximal tubules // *Amer. J. Renal. Physiol*. – 2004. – **286**(4). – P. 749–759.
34. Fiermonte G. Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier. evolution of the carrier family // *Bioch. J*. – 1999. – **344**. – P. 953–960.
35. Felty Q., Roy D. Estrogen, mitochondria, and growth of cancer non cancer cells // *J. Carcinogenesis*. – 2005. – **4**, №1. – P. 1–34.
36. Genova M.I., C. Castelluccio, R. Fato, G. Parenti-Castelli, M. Merlo-Pich, G. Formigini, C. Bovina, M. Marchetti, G. Lenaz. Major changes in Complex I activity in mitochondria from aged rats may not be detected by direct assay of NADH-coenzymeQ reductase // *Biochem. J*. – 1995. – **311**. – P. 105–109.
37. Gnaiger E. Mitochondrial Physiology. The many Faces and functions of an organelle. MiP // Austria, 2005.
38. Goldberg N. D., Passonneau J. V., Lowry O.H. Effects of Changes in Brain Acid Cycle Intermediates // *J. Biol. Chem*. – 1966. – **241**. – P. 3997–4003.
39. Grai M.W., Burger G., Lang B.F. Mitochondrion evolution // *Science*. – 1999. – **283**. – P. 1467–1481.
40. Gullans, S. R., Kone, B. C., Avison, M. J., Giebisch, G. Succinate alters respiration, membrane potential, and intracellular K<sup>+</sup> in proximal tubule // *Amer. J. Physiol*. – 1988. – **55**. – P. F1170–F1177.
41. Gutman M. Modulation of mitochondrial succinate dehydrogenase activity, mechanism and function. *Mol // Cell Biochem*. – 1978. – **20**. – P. 41–60.
42. Hakak Y., Lehmann-Bruinsma K., Phillips Sh., Le Th., Llaw Ch., Connolly DT., Behan D.P. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis // *J. Leukoc. Boil*. – 2009. – **85**. – P. 229–243.
43. He W., Miao F.J., Lin D.C. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan-G-protein-coupled receptors // *Nature*. – 2004. – **429**. – P. 188–193.
44. Hems, D. A., Brosnan, J. T. Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo // *Biochem. J*. – 1970. – **120**. – P. 105–111.
45. Hewitson K. S., Lienard B. M., McDonough M. A., Clifton I. J., Butler D., Soares A. S., Oldham N.J., McNeill L.A., Schofield C.J. Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates // *J. Biol Chem*. – 2007. – **282**(5). – P. 3293–3230.
46. Hochachka P. W., Dressendorfer R. H. Succinate accumulation in man during exercise // *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol*. – 1976. – **35**. – P. 235–242.
47. Hochachka P.W., Somero G.N. *Biochemical Adaptation – Mechanism and Process in Physiological Evolution* // New York. – Oxford University Press, 2001.
48. Hohl C., Oestreich R., Rösen P., Wiesner R., Grieshaber M. Evidence for succinate production by reduction of fumarate during hypoxia in isolated adult rat heart cells // *Arch Biochem, and Biophys*. – 1987. – **59**(2). – P. 527–535.
49. Kermorvant-Duchemin E., Sapieha P., Sirinyan M., Beauchamp M., Checchin D., Hardy P., Sennlaub F., Lachapelle P., Chemtob S. Understanding ischemic retinopathies. emerging concepts from oxygen-induced retinopathy // *Doc Ophthalmol*. – 2010. – **120**. – P. 51–60.
50. Kim J-W., Tchernyshyov I., Semenza G. L., Dang C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase. A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia // *Cell Metabolism*. – 2006. – **3**(3). – P. 150–151.
51. King A., Selak M. A., Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase. linking mitochondrial dysfunction and cancer // *Oncogene*. – 2006. – **25**(34). – P. 4675–4682.
52. Kolvunen P., Hirsila M., Remes A.M., Hassinen I.E., Kivirikko K.I., Myllyharju J. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydrolases by citric acid cycle intermediates. possible links between cell metabolism and stabilization of HIF // *J Biol Chem*. – 2007. – **82**(7). – P. 4524–4532.



53. Komaromy-Hiller G., Sundquist P.D., Jacobsen L.J., Nuttall K.L. Serum succinate by capillary zone electrophoresis. marker candidate for hypoxia // *Ann Clin Lab Sci.* – 1997. – **27**(2). – P. 163–168.
54. Kondrashova M. N. The formation and utilization of succinate in mitochondria as a control mechanism of energization and energy state of tissue. – In: Chance B. (Ed.). *Biological and Biochemical Oscillators* // New York: Acad. Press. – 1993. – P. 373–397.
55. Kondrashova M.N., Doliba N.M. Polarographic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine // *FEBS Lett.* – 1989. – **243**. – P. 153–155.
56. Kunz W.S. Kudin A.P., Vielhaber S., Blumke I. Mitochondrial complex I deficiency in epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy // *Ann. Neurol.* – 2000. – **48**. – P. 766–773.
57. Kushnir, M. M., Komaromy-Hiller, G., Shushan, B., Urry, F. M., Roberts, W. L. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine // *Clin. Chem.* – 2001. – P. 1993–2002.
58. Kusnetsov A.V., Schneeberger S., Seiler R., Brandacher G., Mark W., Steurer W., Sacs V., Usson Y, Margreiter R, Gnaiger E. Mitochondria. defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion // *Amer. J. Heart. Circ. Physiol.* – 2004. – **286**. – P. H1633–H1641.
59. Lukyanova L.D. Limiting steps of energy metabolism in brain in hypoxia // *Neurochem. Intern.* – 1988. – **13**(I). – P. 146–147.
60. Lukyanova L.D. Molecular, metabolic and functional mechanisms of individual resistance to hypoxia. In: Sharma B.K., Takeda N., et al. (eds), *Adaptation Biology and Medicine*, Narosa Publishing House New Dehli, India. – 1997. – **I**. – P. 261–272.
61. Lukyanova L. D. Cellular mechanism responsible for beneficial effects of hypoxic therapy. In: *Adaptation Biology and Medicine*. Moravec, et al. (eds), Narosa Publishing House New Dehli, India. – 2002. – **3**. – P. 290–303.
62. Lukyanova L.D. Novel approaches to the understanding of molecular mechanisms of adaptation. – In: *Adaptation Biology and Medicine*. Hargens A., Takeda N., Singal P.K. (eds). – 2004. – **4**. – P. 11–22.
63. Lukyanova L. D., A. M. Dudchenko. Regulatory role of the adenylate pool in the formation of hepatocyte resistance to hypoxia. – In: K.B. Pandolf, N. Takeda, P.K. Singal (eds.), *Adaptation Biology and Medicine*. Narosa Publishing House New Dehli, India. – 1999. – **2**. – P. 139–150.
64. Lukyanova L.D., Dudchenko A.V., Tsybina T.A., Germanova E.L., Tkatchuk E.N. Mitochondrial signaling in adaptation to hypoxia. – In: *Adaptation Biology and Medicine*. Eds Lukyanova L., Singal P., Takeda N. New Dehli, India. Narosa Publ. House. – 2008. – **5**. – P. 5–15.
65. Lukyanova L.D., Dudchenko A.M., Germanova E.L., Tsybina T.A., Kapaladse R.A., Ehrenbourg I.V., Tkatchouk E.N. Mitochondria signaling in formation of body resistance to hypoxia. Intermittent Hypoxia. from molecular mechanisms to clinical applications / Eds. Lei Xi, Serebrovskaya T. Nova Science Publishers, USA Chapter. – 2009. – **20**. – P. 423–450.
66. Lukyanova L. D., Germanova E. L., Kirova Yu. I. The Signal Function of Succinate and Free Radicals in Mechanisms of Preconditioning and Long-term Adaptation to Hypoxia. – In: *Adaptation Biology and Medicine. Cell Adaptations and Challenges*. Wang P., Kuo C.-H., Takeda N. and Singal P.K. (eds). – 2011. – **6**. – P. 251–277.
67. MacDonald M.J., Fahien L.A., Brown L.J., Hasan N.M., Buss J.D., Kendrick M. A. Perspective. emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products insulin secretion // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2005. – **288**. – P. E1–E15.
68. Maklashinas E., Sher E., Zhou H-Z, Gray M. Effect of anoxia/ reperfusion on the reversible active/de-active transition of complex I in rat heart // *BBA, Bioenergetics.* – 2002. – **1556**(1). – P. 6–12.
69. Mela L., Goodwin C.W., Miller L.D. In vivo control of mitochondrial enzyme concentrations and activity by oxygen // *Amer. J. Physiol.* – 1976. – **231**. – P. 1811–1816.
70. Michiels K. Physiological and pathological responses to hypoxia // *Amer. J. Pathology.* – 2004. – **164**. – P. 1875–1882.
71. Murphy E. Primary and Secondary Signaling Pathways in Early Preconditioning That Converge on the Mitochondria to Produce Cardioprotection // *Circulat. Res.* – 2004. – **94**. – P. 7–16.
72. Napolitano M., Centoze D., Gubellini P., Rossi S., Spiezia S., Bernardi G., Gulino F., Calabresi P. Inhibition of mitochondrial complex II alters strial expression of genes involved in glutamatergic signaling. possible implications for Huntington's disease // *Neurobiol. Dis.* – 2004. – **15**(2). – P. 407–414.
73. Nichols D.G., Samantha L.B. Mitochondria and Neuronal Survival // *Physiol Rev.* – 2000. – **80**(1). – P. 315–360.
74. Nishimura G, Proske R, Jm Doyama H, Higuchi M. Regulation of apoptosis by respiratory substrates // *FEBS Letters.* – 2001. – **505**, №3. – P. 399–404.
75. Nowak G., Clifton G. L, Bakajsova D. Succinate ameliorates energy deficits and prevents dysfunction of complex I in injured renal proximal tubular cells // *J. Pharmacol. Exp Therap.* – 2008. – **324**(3). – P. 1155–1162.
76. Paddenber R., Ishak B., Goldenberg A., Faulhammer P., Rose F., Weissmann N., Braun – Dullaues R., Kummer W. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in pulmonary vasculature // *Amer. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* – 2003. – **284**. – P. 1710–1719.
77. Peers Ch., Kemp P.J. Acute oxygen sensing. diverse but convergent mechanisms in airway and arterial chemoreceptors // *Respirat. Res.* – 2001. – **2**(3). – P. 145–149.
78. Peter M.T. Deen and Joris H. Robben Succinate Receptors in the Kidney // *J. Amer. Soc Nephrol.* – 2011. – **22**. – P. 1416–1422,
79. Pitkänen S., B.H. Robinson. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide

- radicals and induction of superoxide dismutase // *J. Clin. Invest.* – 1996. – **98**. – P. 345–351.
80. Porwol T., Eheleben W., Brand V., Acker H. Tissue oxygen sensor function of NADPH oxidase isoforms, an unusual cytochrome  $a_3$  and reactive oxygen species // *Respirat. Physiol.* – 2001. – **128**(3). – P. 331–348.
81. Regard J.B., Sato I.T., Coughlin S.R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression // *Cell.* – 2008. – **135**. – P. 561–571.
82. Robinson B.H. Human Complex I deficiency. Clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1998. – **1364**. – P. 271–286.
83. Rouslin W., Millard R.W. Canine myocardial ischemia. defect in mitochondrial electron transfer complex I // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 1980. – **12**. – P. 639–645.
84. Rubic T., Lametschwandtner G., Hinteregger S., Kund J. (Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity // *Nat Immunol.* – 2008. – **9**. – P. 1261–1269.
85. Sadek H.A., Sweda P.A., Sweda L.I. Modulation of mitochondrial complex I activity by reversible  $Ca^{2+}$  and NADH mediated superoxide anion dependent inhibition // *Biochemistry.* – 2004. – **43**. – P. 8494–8502.
86. Sadagopan N., Roberds S.L., Major T., Preston G.M., Yu Y., Tones M.A. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease // *Amer. J. Hypertens.* – 2007. – **20**. – P. 1209–1215.
87. Sanborn T., Gavin W., Berkowitz S., Perille T., Lesch M. Augmented conversion of aspartate and glutamate to succinate during anoxia in rabbit heart // *Amer. J. Physiol.* – 1979. – **237**. – P. H535–H541.
88. Sapielha P., Sirinyan M., Hamel D., Zaniolo K, Joya J.-S., Cho J.-H., Honoré J.-C., Kermorvant-Duchemin E., Varma D. R., Tremblay S., Leduc M., Rihakova L., Hardy P., Klein W. H., Mu X., Mamer O., Lachapelle P., Di Polo A., Beauséjour C., Andelfinger G., Mitchell G., Sennlaub F., Chemtob S., The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis // *Nat. Med.* – 2008. – **14**. – P. 1067–1076.
89. Sardanelli A.M., Papa S. Phosphorylation of an 18 kDa subunit of bovine Heart complex I by camp dependent kinase // *FEBS Lett.* – 1996. – **379**. – P. 299–301.
90. Sekine T., Miyazaki H., Endou H. Molekular physiology of renal organic anion transporters // *Amer. J. Renal Physiol.* – 2006. – **290**. – P. F251–F261.
91. Selak M.A, Armour S.M., McKenzie E. D. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase // *Cancer Cell.* – 2005. – **7**. – P. 77–85.
92. Semenza G.L. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1 // *Bioch. Pharmacol.* – 2002. – **64**. – P. 993–998.
93. Semenza G.L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1 // *Biochem J.* – 2007. – **405**(1). – P. 1–9.
94. Semenza G.L. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis // *Blood.* – 2009. – **114**(10). – P. 2015–2019.
95. Semenza G.L., Wang G. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation // *Mol. Cell Biol.* – 1992. – **12**. – P. 5447–5454.
96. Stroka D.M., Burkhardt T., Desballerts I. HIF-1 is expressed in normoxia tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia // *FASEB J.* – 2001. – **15**. – P. 2445–2453.
97. Taegmeyer H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. increased production of succinate by rabbit papillary muscles // *Circ Res.* – 1978. – **43**. – P. 808–815.
98. Toma I., Kang J.J., Sipos A., Vargas S., Bansal E., Hanner F., Meer E., Peti-Peterdi J. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney // *J. Clin. Invest.* – 2008. – **118**. – P. 2526–2534.
99. Wang G., Semenza G.L. Characterization of hypoxia-inducible factor I and regulation of DNA binding activity by hypoxia // *J. Biol Chem.* – 1993. – **268**. – P. 21513–21518.
100. Weinberg J.M., Venkatachalm M.A, Nancy F. Anaerobic and aerobic pathways for salvage of proximal tubules from hypoxia-induced mitochondrial injury // *Amer. J. Renal. Physiol.* – 2000. – **279**. – P. F927–F943.
101. Weinberg J.M., Venkatachalm M.A., Nancy F. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates // *PNAS.* – 2000. – **97**(3). – P. 2826–2831.
102. Vargas S.L., Toma I., Kang J.J., Meer E.J., Peti-Peterdi J. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release // *J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2009. – **20**. – P. 1002–1011.
103. Vaux E.C., Metzen E., Yeates K.M., Ratcliffe P.J. Regulation of hypoxia-inducible factor is reserved in the absence of a functioning respiratory chain // *Blood.* – 2001. – **98**. – P. 296–302.
104. Voos W., Rotgers K. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis // *BBA.* – 2002. – **1592**. – P. 51–62.
105. Zoccarato F., Cavallini L., Bortolami S., Alexandre A. Succinate modulation of  $H_2O_2$  release at NADH.ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in brain mitochondria // *Biochem J.* – 2007. – **406**(1). – P.125–129.
106. Zhu H., Bunn F. Oxygen sensing and signaling. impact on regulation of physiologically important genes // *Respir Physiol.* – 1999. – **2**. – P. 239–247.

ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии  
РАМН, Москва, Россия  
E-mail: ldlukyanova@gmail.com

Материал поступил в  
редакцию 31.04.2013

М.М. Ткаченко, Т.Ф. Любарець

## Канцерогенні аспекти індетерміністичних ефектів опромінення

*В огляді представлені результати клінічних і епідеміологічних досліджень щодо виявлення злоякісних захворювань різноманітної локалізації у осіб, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання. Наводяться дані стосовно захворюваності на пухлини молочної та щитоподібної залоз, бронхолегеневої і кровотворної систем у осіб, опромінених у різних дозах.*

*Ключові слова: іонізуюче випромінювання, індетерміністичні ефекти, рак, лейкемія, мієлодиспластичний синдром.*

Відкриття та застосування іонізуючого випромінювання (ІВ) для діагностичних і лікувальних цілей зумовило необхідність вивчення наслідків його впливу на організм людини. Суттєву частку в спектрі індетерміністичних (стохастичних) ефектів ІВ становлять його канцерогенні наслідки. В 1859 р. було описано розвиток раку легень у працівників уранових шахт. Через 7 років після відкриття рентгенівських (X) променів В.К. Рентгеном (1895), у 1902 р., Фрібер описав випадок раку шкіри у людини після їх застосування, таким чином підтвердивши канцерогенний ефект опромінення. У 1922 р. Бек надрукував дані щодо виникнення саркоми кісток після інтенсивної рентгенотерапії у хворих на кісткову форму туберкульозу. У 1929 р. Мартланд сповістив про розвиток саркоми кісток у працівників підприємств в США, де використовувалися такі радіоактивні речовини, як радій і мезоторій. Застосування торотрасту (діоксиду торію) як рентгеноконтрастної речовини в 30–40-х роках минулого століття в подальшому призвело до збільшення захворюваності на пухлини печінки, нирок, легень, а також саркоми верхньощелепних пазух.

Наявні епідеміологічні дослідження свідчать про достовірний зв'язок виникнення онкологічної патології з дією ІВ. Найвищі

ризики відмічаються стосовно неоплазій кровотворної системи, новоутворень шкіри, кісток, легень, молочної і щитоподібної залоз, яєчників [13]. Так, вплив ІВ в дозі 1 мЗв протягом життя призводить до додаткової появи 495 випадків злоякісних новоутворень і 65 випадків лейкемії з розрахунку на 100 тис. населення [39]. Загалом 3–5 % усіх злоякісних захворювань людини зумовлені дією радіаційного чинника [43, 45]. Серед злоякісних захворювань, індукованих ІВ, суттєву частку становить рак різноманітної локалізації. Оцінка ризику захворюваності на рак внаслідок опромінення проводиться низкою організацій, насамперед Науковим комітетом по дії атомної радіації (НКДАР) ООН, Міжнародною комісією з радіологічного захисту (ICRP), Комітетом Національної академії наук США з біологічних ефектів ІВ (BEIR) тощо.

У доповідях НКДАР ООН (1988, 2000) для прогнозування ризику раку внаслідок опромінення рекомендується використовувати емпіричні моделі, які базуються на екстраполяції індивідуальних доз. Досвід спостереження за опроміненими в Японії свідчить, що середня одномоментна доза зовнішнього опромінення 22,0 сГр індукувала зростання злоякісних захворювань, насампе-

ред лейкемій, які сягали максимуму через 10 років після контакту з ІВ. Спостереження за постраждалими внаслідок атомного бомбардування в Хіросімі та Нагасакі дали змогу розрахувати ризики онкологічної патології в залежності від поглинутої дози ІВ [57].

У жителів Нагасакі через 30 років після атомного бомбардування [58] встановлено значне підвищення кількості злоякісних пухлин порівняно з контролем; дозозалежне зростання вікової частоти неоплазій; обернено пропорційну залежність між віком опромінення і латентним періодом виникнення злоякісних пухлин; в спектрі раків першим діагностувався рак щитоподібної залози, в подальшому – рак шийки матки, хоріокарцинома та рак молочної залози у жінок репродуктивного віку (через 10 років після опромінення). Також спостерігалось підвищення частоти захворюваності на рак легень, шлунка, товстого кишечника, печінки, яєчників, сечового міхура і шкіри.

Моніторинг протягом 30 років населення Східно-Уральського радіоактивного сліду, яке зазнало комбінованої (зовнішньої та внутрішньої) дії хронічного  $\gamma$ -опромінення в діапазоні малих і середніх доз (поглинуті дози) виявив достовірне збільшення смертності від злоякісних пухлин порівняно з контролем [16].

При оцінці ризиків раку внаслідок опромінення малими дозами або дозами, пролонгованими в часі, існує низка невизначеностей [21]. Неоднозначними є погляди щодо діапазону малих доз. Деякі дослідники (переважно спеціалісти в галузі радіаційної гігієни) вважають такими дози, які наближаються до фонового рівня, або перевищують його на 1–2 порядки [18]. За даними інших авторів, значення малих доз варіює в межах 0,01–0,1 Гр [4, 27, 31]. Деякі вчені приймають за малі дози, які не перевищують 1 Зв, а стосовно аварії на Чорнобильській АЕС – дози порядку 0,2 Зв [3]. Спеціалісти Фонду наукових досліджень (Японія) вважають, що малими є дози в діапазоні до 0,2 Зв. Інші дослідни-

ки до категорії малих доз відносять дозові навантаження порядку 0,1–1,0 Гр [22]. На думку окремих учених малі дози – це дози, прийняті в медичній радіології (до 0,5 Зв) [5]. За даними НКДАР ООН, до цієї категорії доз слід віднести такі, що не перевищують 0,2 Зв. МКРЗ, ВЕІР та інші міжнародні організації, які регламентують питання ядерної безпеки, провели незалежну оцінку ефектів ІВ і встановили межі доз, які ґрунтуються на різному ступені чутливості органів і тканин. У 1977 р. МКРЗ визначив допустиму еквівалентну дозу за рік для населення 0,5 сЗв. У 1985 р. була рекомендована експозиція, яка протягом життя не перевищує 0,1 сЗв на рік.

Аналізуючи особливості дії малих доз на організм людини, виділяють три теорії їх впливу: 1) лінійної залежності зростання небажаних наслідків опромінення від величини дози, навіть при найбільш низьких її значеннях; 2) наявності порогу впливу ІВ (або кумулятивної дози); 3) позитивної біологічної дії (радіаційного гормезису) [8, 21]. Погоджуючись з першими двома теоріями, більшість учених заперечує стимулювальний вплив ІВ щодо організму людини та тварин, хоча допускає ймовірність такого ефекту відносно рослинних організмів [10, 11, 14, 17, 30, 34, 50]. Варіабельність наслідків опромінення організму людини в малих дозах може бути зумовлена різним ступенем радіочутливості та радіорезистентності конкретного індивідуума. ІВ може бути чинником, що дає змогу генетичним поліморфізмам певної особи реалізуватись і призводити до виникнення патологічного процесу.

Тривалий моніторинг стану здоров'я постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС, який проводиться спеціалістами лабораторії імуногенетики ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, підтвердив, що ідентифікація НЛА-типу дає можливість виявити наявність або відсутність імуногенетичних маркерів радіочутливості та радіорезистентності, а також маркерів реалізації соматичної патології у

опромінених осіб [23].

Зазвичай припускається, що існує лінійна залежність виникнення канцерогенних ефектів для діапазону малих доз. Цей факт враховується при розробці стандартів щодо допустимих рівнів опромінення.

Вагомі результати отримані при використанні моделі відносного ризику, відповідно до якої ризик захворіти на рак оцінюється як пропорційний “спонтанному” або “природному” ризику, тобто очікується зростання кількості випадків захворюваності зі збільшенням віку опромінених осіб.

Важливим є встановлення взаємозв'язку відносної біологічної ефективності випромінювання та його енергії [28]. Є дані щодо більш високої “ефективності” впливу низькоенергетичних нейтронів та  $\alpha$ -частинок відносно біологічного ушкодження організму порівняно з високоенергетичними частинками (з розрахунку на одиницю абсорбованої дози). Висновки BEIR, ICRP і деяких інших організацій свідчать, що малі дози та швидкість їх накопичення при опроміненні низькоінтенсивним ІВ більш небезпечні з точки зору ймовірності захворіти на рак і лейкемію, ніж при високих дозах та високих темпах їх накопичення (тобто при низьких дозах і темпах накопичення ефект не є лінійним) [5, 46]. Ці дані потребують подальших епідеміологічних досліджень.

Аналіз медичних наслідків аварії на ЧАЕС підтверджує правомірність існуючих поглядів щодо індетерміністичних впливів

опромінення. Дані 25-річного спостереження за учасниками ліквідації наслідків аварії (УЛНА) на ЧАЕС 1986–1987 рр. свідчать про зростання у них частоти виявлення злоякісних захворювань [6].

Аналіз показників захворюваності серед жіночої частини населення України до (1977–1985 рр.) і після Чорнобильської катастрофи (1986–1994 рр.) показав значне зростання, окрім числа випадків раку молочної залози, раку матки та яєчників [7].

Динаміка захворюваності на рак молочної залози серед постраждалого жіночого населення України була такою: для жінок-УЛНА цей показник підвищився упродовж 1990–2004 рр. у 1,9 раза порівняно з неопроміненими; для евакуйованих жінок – в 1,6 раза (табл. 1).

Через 25 років після аварії серед усіх форм неоплазій найбільшого рівня сягала захворюваність на рак щитоподібної залози (у 5,6 разів) (табл. 2) [6]. Захворюваність на рак молочної залози перевищувала очікуваний рівень для цієї категорії осіб жіночої статі у 1,5 раза. Прогнозується підвищена захворюваність і смертність від злоякісних новоутворень для опромінених внаслідок аварії на ЧАЕС протягом найближчих 40 років.

Серед стохастичних наслідків опромінення ендокринної системи значну частку становить тиреоїдна патологія. У дітей, які проживали в штатах Юта і Невада та були опромінені в результаті випадіння осадів після випробувань атомної зброї на полігоні Невада

**Таблиця 1.** Стандартизовані показники захворюваності на рак молочної залози у різних групах постраждалого жіночого населення України (дані ДУ “ННЦРМ НАМН України”)

Групи за період спостереження у 1990–2004 рр.	Очікувана кількість випадків	Виявлена кількість випадків	Стандартизований показник ризику, SIR (%)	95%-й довірчий інтервал
Жінки - учасниці ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС	100,2	279	278,5	245,8–311,2
Жінки, евакуйовані з 30-кілометрової зони	254,1	198	77,9	67,1–88,8
Жінки - мешканки радіоактивно забруднених територій	1153,1	756	65,6	60,9–70,2

**Таблиця 2. Захворюваність учасників ліквідації наслідків аварії (УЛНА) на ЧАЕС на окремі форми злоякісних новоутворень (дані ДУ “ННЦРМ НАМН України”)**

Група постраждалих (період спостереження) та нозологія за МКХ-10	Очікувана кількість випадків	Виявлена кількість випадків	Стандартизований показник ризику, SIR (%)	95%-й довірчий інтервал
УЛНА 1986–1987 рр. (2004–2007 рр.): злоякісні новоутворення (С.00-С.96)	6649	7190	108,1	105,6–110,6
УЛНА 1986–1987 рр. (2004–2007 рр.): рак щитоподібної залози (С.73)	53	299	564,2	500,2–628,1
УЛНА 1986–1987 рр. (2004–2007 рр.): рак молочної залози (С.00-С.96)	149	226	151,7	131,9–171,5

у 50-х роках минулого століття, збільшувалася частота випадків раку щитоподібної залози [48]. Високий рівень радіоактивних опадів внаслідок термоядерних випробувань зумовив дозозалежне зростання частоти раку щитоподібної залози у опроміненних у дитинстві жителів Маршалових островів, у опроміненних внаслідок атомного бомбардування в Японії, у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС [33, 36].

Починаючи з 1989 р., встановлене збільшення захворюваності на рак щитоподібної залози у дитячого населення України. За даними Інституту ендокринології та обміну речовин НАМН України, протягом 1989–2004 рр. було прооперовано 3400 таких дітей. Починаючи з 2001 р. захворюваність була в межах 311–374 випадків, без тенденції до зниження,

переважна кількість нових випадків реєструвалася серед дітей, вік яких не перевищував 14 років на момент опромінення [20].

Серед УЛНА 1986–1987 рр. після 2001 р. зареєстровано прогнозований надлишок тиреоїдного раку (серед чоловіків – перевищення загальнонаціонального рівня в 4 рази, загалом за період 1998–2004 рр. – у 9 разів; серед жінок-УЛНА в 9,7 і 13 разів відповідно). Зареєстровано також неочікуване підвищення захворюваності в інших групах населення: у евакуйованих – у 4 рази впродовж 1990–1997 рр. і в 6 разів протягом періоду 1998–2004 рр.; у дорослого населення, яке мешкає на радіаційно забруднених територіях – у 4 рази в 1990–2004 рр. порівняно з 1980–1989 рр. (табл. 3) [7].

**Таблиця 3. Стандартизовані показники захворюваності на рак щитоподібної залози у різних групах постраждалого населення України (дані ДУ “ННЦРМ НАМН України”)**

Групи за період спостереження 1990–2004 рр.	Очікувана кількість випадків	Виявлена кількість випадків	Стандартизований показник ризику, SIR (%)	95%-й довірчий інтервал
Учасників ліквідації наслідків аварії	28,1	156	554,3	467,3–641,3
Евакуйовані з 30-кілометрової зони	1,1	175	563,5	480,0–647,0
Мешканці радіоактивно забруднених територій	151,5	247	163,1	142,7–183,4

Аналогічні відомості отримані науковцями Росії та Білорусі. Відповідно до даних Національного радіаційно-епідеміологічного реєстру Росії протягом 1992–2006 рр. відмічено підвищення онкологічної захворюваності серед УЛНА на 20 % порівняно з національним рівнем [12]. Виявлена кореляція показників онкологічної захворюваності УЛНА з дозовими навантаженнями.

Моніторинг постраждалого внаслідок Чорнобильської катастрофи населення Росії (Білгородська обл.) також виявив особливості росту онкологічної патології: зростання протягом першого та другого п'ятирічних періодів спостереження (1986–1990 рр. і 1991–1995 рр.) та поступове зниження протягом 1996–2000 рр. Показники збільшення захворюваності на злоякісні пухлини протягом вищенаведених періодів спостереження для чоловіків становили 10,3, 12,4 і 5,1 %, для жінок – 7,3, 12, 4 і 8,8 %. Більш високий темп росту онкологічної захворюваності встановлено у дітей віком 0-14 років (у хлопчиків – на 50 %, у дівчаток – на 60,3 %), максимальне підвищення – у осіб віком від 70 років (у чоловіків – на 105,3 %, у жінок – на 210,6 %) [13].

Серед постраждалого внаслідок аварії на ЧАЕС населення Росії та Білорусі відмічено суттєве підвищення числа випадків раку щитоподібної залози, особливо у опроміненних у дитячому віці [24, 51]. Мінімальний латентний період становив 5–6 років, пік захворювань був максимальним через 10 років після опромінення.

Суттєву роль в індукції пухлин має шлях потрапляння радіонукліда до організму. Дані міжнародних організацій, які регламентують питання ядерної безпеки, свідчать, що до 10 % раку легень можуть бути зумовлені впливом радону приміщень [20]. Інгаляційного впливу радіоактивного плутонію ( $^{239}\text{Pu}$ ) призводить до виникнення бронхопальмональної карциноми [2, 15, 58]. У працівників підприємств з вироблення плутонію встановлено зростання захворюваності на рак легень (вузлова форма

– 45,8 %, центральна локалізація – 48,6 %) з переважанням перибронхіального росту (60,0 %), частим метастазуванням у печінку (51,4 %), надниркові залози (45,8 %) і нирки (22,2 %) [1, 7], особливо у випадках дрібноклітинних карцином та карцином змішаної гістологічної структури.

Індетерміністичні наслідки впливу ІВ щодо кровотворної системи включають різноманітні види лейкемій, мієлодиспластичного синдрому (МДС), хронічних мієлопроліферативних захворювань (ХМПЗ), у тому числі хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) [35, 37, 49, 55].

Зростання частоти виникнення лейкемій, в тому числі – ХМЛ, спостерігається у професійних робітників підприємств атомної промисловості; у пацієнтів, опроміненних в медичних цілях; у осіб, які зазнали опромінення внаслідок технологічних аварій (населення, яке проживало поблизу р. Теча) [19, 38, 42]. Вплив пролонгованого зовнішнього  $\gamma$ -опромінення в діапазоні від 1 до 10 Гр на персонал ПО “Маяк” зумовив лінійну залежність ризику лейкемій, який становив 1,9 (95%-й довірчий інтервал 0,9–3,8) на 1 Гр з мінімальним латентним періодом виникнення захворювань 2 роки та їх максимумом через 2–5 років [19]. Серед опроміненних в Японії найвища частота лейкемій (особливо ХМЛ) спостерігалася в період з 1955 по 1959 рр. (переважали випадки захворювань серед чоловіків віком до 29 років на момент опромінення, які знаходились на відстані до 1500 м від епіцентру вибуху) [52]. Мієлоїдні форми лейкемій перевищували 50 % усіх радіаційно-індукованих лейкемій.

Панцитопенія і зміни кісткового мозку, подібні до МДС, виявлені у робітників, які протягом тривалого часу працювали за умов впливу радону ( $^{226}\text{Ra}$  і  $^{228}\text{Ra}$ ). Підвищена захворюваність на вторинний МДС відмічається у осіб, яким проводили радіаційну терапію з приводу спондиліту [37].

У дитячого населення штатів Юта і Невада, які зазнали впливу радіаційного чинника

внаслідок випробувань атомної зброї на полігоні Невада протягом 1950-х років, відмічено зростання частоти випадків гострої лейкемії. Збільшення захворюваності на гостру лейкемію було виявлено у Великій Британії у дітей – мешканців регіонів поблизу заводів по переробці ядерних матеріалів (Селлафільд, Даунрей) [41].

Дослідження [41] серед опромінених в Японії свідчить про наявність у частини з них клінічних ознак МДС. Аналіз морфологічних особливостей препаратів кісткового мозку 190 випадків лейкемії у постраждалих, які знаходились на відстані до 9000 м від епіцентру вибуху, призвів до рекласифікації 11 випадків гострої лейкемії в МДС. МДС характеризувався фібротизацією кісткового мозку у поєднанні з гіпер- або гіпоклітинністю. Це свідчить про необхідність переоцінки даних дослідження “Life Span Study” в Хіросімі та Нагасакі з урахуванням сучасних класифікацій онкогематологічних захворювань. Дані аутопсій 1960-х років свідчать про підвищену частоту виникнення ідіопатичного мієлофіброзу у опроміненого японського населення, виявлена залежність частоти виникнення цього захворювання від знаходження об’єкту відносно епіцентру вибуху [53].

Останні дані щодо ризиків онкогематологічної патології серед опромінених внаслідок атомного бомбардування в Японії, отримані протягом 51-го року спостереження (1950–2001 рр., «Life Span Study» дослідження) свідчать, що, хоча ризик лейкемії в цілому знижується з урахуванням часу після опромінення, має місце зростання ризиків гострої мієлобластної лейкемії протягом усього періоду спостереження [44]. Як і в попередніх результатах аналізу, відслідковується помірний взаємозв’язок між дозою опромінення та випадками неходжкінських злоякісних лімфом (НЗЛ) серед чоловічого населення при відсутності такого ефекту у жінок. Однак не виявлено радіаційно зумовленого ексцесу ризиків для НЗЛ і множинної мієломи.

В Україні через 25 років після аварії з’явилася тенденція до збільшення числа випадків

лейкемії серед УЛНА, що одержали значні дози опромінення: серед реконвалесцентів ГПХ було зареєстровано 4 випадки онкогематологічних захворювань [1].

Аналіз радіаційних ризиків лейкемії в понад 110 000 чоловіків-УЛНА в рамках українсько-американського епідеміологічного дослідження [43, 56] показав, що в перші 15 років після опромінення виявлено додатковий надлишковий ризик лейкемії (табл. 4), протягом останніх 5 років спостерігається зниження радіаційних ризиків. Протягом 1986–2000 рр. серед цього контингенту виявлено збільшення числа випадків хронічної лімфатичної лейкемії (ХЛЛ) порівняно з аналогічними показниками по Україні в цілому (60 проти 42 %). Відсоток УЛНА, хворих на ГМЛ, відносно неопромінених становить 6 проти 13 %, для осіб з ХМЛ – 17 щодо 12 % відповідно.

Подовження терміну спостереження до 2006 р. включно [60] свідчить, що частота виявлення випадків ХЛЛ залишилась такою ж високою (58 %). Хоча цей тип лейкемії характерний для популяції слов’ян в цілому, на відміну від азійської раси, серед якої переважає захворюваність на НЗЛ, кількість випадків ХЛЛ за 20-річний період спостереження в цій когорті була на 60 % вищою від очікуваної. Оскільки середні розрахункові дози на червоний кістковий мозок внаслідок пролонгованого опромінення в діапазоні малих доз встановлено на рівні 81,8 мГр для випадків і 132,3 мГр для контролів, виявлені особливості щодо ХЛЛ у учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС можуть бути зумовлені саме такими рівнями дозового навантаження.

Серед мешканців забруднених радіонуклідами територій відповідно до результатів дослідження франко-німецької Чорнобильської ініціативи ексцесу лейкемії не виявлено [26]. Дані щодо захворюваності на лейкемії дітей, опромінених внутрішньоутробно, потребують подальшої верифікації.

За даними Національного радіаційно-епідеміологічного реєстру Росії, починаючи



**Таблиця 4. Ризики лейкемії в учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС (за даними українсько-американського проекту з дослідження лейкемії, жовтень 2010 р., ННЦРМ НАМН України)**

Період спостереження, роки	Відносний надлишковий ризик, ERR	95% довірчий інтервал	Ступінь вірогідності, p
1986–2000	3,44	0,47–9,78	<0,03
1986–2006	1,37	0,08–3,78	0,03

з 1992–1995 рр. серед УЛНА зареєстровано майже подвійне збільшення частоти захворюваності на лейкемії, у тому числі ХМЛ, порівняно зі спонтанною. У наступні роки спостереження (1996–2000 рр.) захворюваність УЛНА почала зменшуватись і наблизилась до популяційного рівня [9, 47, 54]. Однак цей феномен потребує подальшого уточнення.

Узагальнюючи наведені вище результати клінічних та епідеміологічних досліджень, слід зазначити, що у спектрі етіологічних чинників виникнення злоякісних пухлин, у т. ч. захворювань гемопоєзу, ІВ належить суттєва роль [25, 29]. Незалежно від існуючих відмінностей у поглядах стосовно діапазону малих доз, наведені дані переконливо підтверджують, що тривале опромінення такими дозами ІВ зумовлює такий самий широкий спектр виникнення онкологічної патології у постраждалих контингентів, як і опромінення значними дозами. Проведений аналіз дає змогу заперечувати теорію радіаційного гормезису щодо організму людини. Результати клінічних спостережень за опроміненими особами підтверджують наявність у них, окрім підвищеної частоти розвитку, певних особливостей перебігу онкологічних захворювань, що зумовлює необхідність тривалого клініко-епідеміологічного моніторингу цих контингентів.

**М.Н. Ткаченко, Т.Ф. Любарець**

#### **КАНЦЕРОГЕННЫЕ АСПЕКТЫ ИНДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ ЭФФЕКТОВ ОБЛУЧЕНИЯ**

В обзоре представлены результаты клинических и эпидемиологических исследований по выявлению злокачественных заболеваний разнообразной локализации у лиц,

подвергшихся воздействию ионизирующего излучения. Представлены данные о заболеваемости опухолями молочной и щитовидной железы, бронхо-легочной и кроветворной систем у облученных в разных дозах лиц. Ключевые слова: индетерминистические эффекты, ионизирующее излучение, рак, лейкемия, миелодиспластический синдром.

**M.N. Tkachenko, T.F. Liubarets**

#### **CANCER ASPECTS OF INDETERMINISTIC EFFECTS OF IONIZING RADIATION PROBLEM**

The results of clinical and epidemiological investigations on cancer diseases with different localization in irradiated persons are reviewed in the paper. The data on mechanisms of morbidity of mamma, thyroid, broncho-pulmonary, blood cancer in exposed to different doses of ionizing radiation persons are analyzed.

Key words: indeterministic effects, ionizing radiation, cancer, leukemia, myelodysplastic syndrome.

*O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv  
National Science Center of Radiation Medicine AMS of  
Ukraine, Kyiv.*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бебешко В.Г., Коваленко А.Н., Белый Д.А. Острый радиационный синдром и его последствия. – Тернополь: ТГМУ “Укрмедкнига”, 2006. – 436 с.
2. Белосохов М.В. Патоморфологическая характеристика рака легкого у работников завода по производству плутония: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Челябинск, 2006. – 45 с.
3. Бриллиант М.Д., Воробьев А.И., Гогин Е.Е. Отдаленные последствия действия малых доз ионизирующей радиации на человека // Терап. архив. – 1987. – 59, № 6. – С. 3–8.
4. Виленчик М.М. Радиобиологические эффекты и окружающая среда. – М.: Энергоатомиздат, 1983. – 136 с.
5. Владимиров В. Г. Биологические эффекты при внешнем воздействии малых доз ионизирующих излучений // Воен.-мед. журн. – 1989. – № 4. – С. 44–46.
6. Двадцять п'ять років Чорнобильської катастрофи. Безпека майбутнього. Національна доповідь України. – К.: КІМ, 2011. – 355 с.

7. Двадцять років Чорнобильської катастрофи. Погляд у майбутнє. Національна доповідь України. – К.: Атіка, 2006. – С. 72-74.
8. Деетъен П. Некоторые аспекты биологического и клинического действия на организм малых доз ионизирующей радиации // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. культуры. – 1985. – № 5. – С. 27–31.
9. Заболевимость населения России злокачественными новообразованиями в 1995 г. / Под ред. Ременник Л.В., Мокиной В.Д., Петровой Г.В. и др. – М.: МНИОИ, 1997. – 236 с.
10. Ильин Б.Н. Биологические и медицинские аспекты действия малых уровней радиации // Радиационная гигиена: Сб. науч. тр. – 1986. – С. 27–35.
11. Ильин Л.А. Калистратова В.С. Биологическое действие инкорпорированных радионуклидов и основы защиты организма // Радиационная медицина. Руководство для врачей-исследователей, организаторов здравоохранения и специалистов по радиационной безопасности / Под общ. ред. акад. РАМН Л.А. Ильина. Т. 1. Теоретические основы радиационной медицины. – М.: Изд-во АТ, 2004. – С. 604–653.
12. Кашеев В.В. Радиационные риски онкологической заболеваемости и онкологической смертности среди участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Обнинск, 2009. – 21 с.
13. Коваленко Б.А. Комплексный анализ заболеваемости злокачественными новообразованиями населения Белгородской области в постчернобыльский период: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Обнинск, 2005. – 39 с.
14. Когтл Дж. Биологические эффекты радиации. – М.: Энергоатомиздат, 1986. – 184 с.
15. Кошурникова, Н. А. Отдаленные последствия вдыхания плутония-239 у человека и животных: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – М., 1978. – 435 с.
16. Кошурникова Н.А., Комлева Н.И., Байсоголов Г.И. Эффект облучения у персонала ПО «Маяк». – М.: НИМБ ЯО СССР, 1992. – № 4. – С. 18–21.
17. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). – М.: Физматлит, 2004. – 448 с.
18. Кузин А.М. Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы (к проблеме биологического действия малых доз). – М.: Атомиздат, 1977. – 135 с.
19. Кузнецова И.С. Заболеваемость и смертность от лейкоза среди персонала ПО «Маяк» и остального населения города Озерска: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2004. – 37 с.
20. Лихтарев и.А., Кайро И.А., Шпак В.М., М., Тронько Н.Д., Богданова Т.Н. Радиоиндуцированный и спонтанный рак щитовидной железы у детей Украины (дозиметрическая интерпретация) // Международ. журн. радиац. медицины. – 1999. – № 3-4. – С. 51–66.
21. Любарец Т.Ф. Современные представления о воздействии ионизирующего излучения на организм человека // Лікар. справа. – 1995. – № 3-4. – С. 15–22.
22. Мальцев В.Н., Евсеева Н.К. Естественный иммунитет и аутоенсибилизация в отдаленные сроки после воздействия ионизирующей радиации / Отдаленные последствия лучевых поражений. – М.: Атомиздат, 1971. – С. 113–119.
23. Мічченко Ж.М. Імуногенетичні чинники в механізмах радіочутливості організму людини і ризику реалізації пострадіаційних ефектів на рівні дисфункцій в імунопоезі та формуванні соматичної патології в осіб, опромінених внаслідок аварії на ЧАЕС // Медичні наслідки аварії на Чорнобильській атомній електростанції / За ред. Возіанова О.Ф., Бебешка В.Г., Базики Д.А. – К.: ДІА, 2007. – С. 413–421.
24. Паршков Е.М., Соколов В.А., Прошин А.Д., Степаненко В.Ф. Рак щитовидной железы у детей и взрослого населения Брянской области после аварии на Чернобыльской АЭС // Вопр. онкологии. – 2004. – **50**, № 5. – С. 533–539.
25. Пилипенко М.І. Стохастичні ефекти опромінення // Укр. радіол. журн. – 2012. – **20**, вип. 1. – С. 44–50.
26. Присяжнюк А.Є., Романенко А.Ю., Грищенко В.Г., Федоренко З.П., Гулак Л.О., Горох С.Л., Гудзенко Н.А., Троцюк Н.К., Сліпенюк К.М., Поліщук Ж.М. Узагальнення 20-річного досвіду дослідження можливих онкологічних наслідків Чорнобильської катастрофи в Україні // Медичні наслідки аварії на Чорнобильській атомній електростанції / За ред. Возіанова О.Ф., Бебешка В.Г., Базики Д.А. – К.: ДІА, 2007. – С. 91–106.
27. Рамзаев П. В., Мирецкий Г. И., Троицкая М. Н. Гигиеническая оценка радиационной обстановки в районах, прилегающих к Новоземельскому испытательному полигону: Отчет о НИР Ленинградского НИИ радиационной гигиены, 1991. – 70 с.
28. Соколов В.А. Биологические и радиационно-химические эффекты нейтронного облучения клеток *Escherichia coli* и макромолекул: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Обнинск, 1984. – 188 с.
29. Ткаченко М.М., Любарец Т.Ф. Генетичні аспекти індетерміністичних ефектів іонізуючого випромінювання // Фізіол. журн. – 2012. – **58**, № 5. – С. 76–83.
30. Филиппова Л.Г., Нифатов А.П. Опухолевые эффекты у крыс после воздействия малых доз гамма-излучения // Всесоюз. конф. по действию малых доз иониз. радиации, Севастополь, октябрь, 1984: тезисы докл. – К.: Наук. думка, 1984. – С. 97–98.
31. Цыб А.Ф., Будагов Р.С., Замулаева И.А. Радиация и патология / Под общ. ред. А.Ф. Цыба. – М.: Высш. школа, 2005. – 341 с.
32. Beir V. Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiations. Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation – National Academy of Sciences, National Research Council // Washington: Nat. Acad. press, 1990. – 421 p.
33. Boice J.D. Thyroid disease 60 years after Hiroshima and 20 years after Chernobyl // JAMA. – 2006. – **295**. – P. 1060–1062.
34. Bond V.P. The Cancer Risk Attributable to Radiation

- Exposure: Some Practical Problems // *Health Physics*. – 1981. – **40**. – P. 111–113.
35. Brenner D.J., Hall E.J. Computed tomography is incrising source of radiation exposure // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – **357**. – P. 2277–2284.
  36. Brindel P., Doyon F., Bourgain C., Rachédi F., Boissin J.L., Sebbag J., Shan L., Bost-Bezeaud F., Petitdidier P., Paoaafaite J., Teuri J., de Vathaire F. Family history of thyroid cancer and the risk of differentiated thyroid cancer in French Polynesia // *Thyroid*. – 2010. – **20**, № 4. – P. 393–400.
  37. Cardis E., Vrijheid M., Blettner M., Gilbert E., Hakama M., Hill C., Howe G., Kaldor J., Muirhead C. R., Schu-bauer-Berigan M., Yoshimura T., Bermann F., Cowper G., Fix J., Hacker C., Heinmiller B., Marshall M., Thierry-Chef I., Utterback D., Ahn Y.-O., Amoros E., Ashmore P., Auvinen A., Bae J.-M., Bernar J., Biau A., Combalot E., Deboodt P., Diez Sacristan A., Eklöf M., Engels H., Engholm G., Gulis G., Habib R.R., Holan K., Hyvonen H., Kerekes A., Kurtinaitis J., Malker H., Martuzzi M., Mastauskas A., Monnet A., Moser M., Pearce M. S., Richardson D. B., Rodriguez-Artalejo F., Rogel A., Tardy H., Telle-Lamberton M., Turai I., Usel M., Veress K. The 15-country collaborative study of cancer risk among radiation workers in the nuclear industry: estimates of radiation-related cancer risks // *Rad. Res.* – 2007. – **167**, № 4. – P. 396–416.
  38. Cardis E., Gilbert E.S., Carpenter L., Howe G., Kato I., Armstrong B.K., Beral V., Cowper G., Douglas A., Fix J., Fry S.A., Kaldor, Lave C., Salmon L., Smith P.G., Voelz G.L., Wiggs L.D. Effects of low doses and low dose rates of external ionizing radiation: cancer mortality among nuclear industry workers in three countries // *Ibid.* – 1995. – **142**. – P. 117–132.
  39. Darby S.C., Doll R., Gill S.K., Smith P.G. Long term mortality after a single teratment course with X-rays in patients treated for ankylosing spondylities // *Brit. J. Cancer*. – 1987. – **55**. – P. 179–190.
  40. Field R.W. Environmental Factors in Cancer: Radon, Reviews on Environmental Health – Special Edition (Part 2). – 2010. – **25** (1). – P. 25–31.
  41. Finch S.C. Radiation-induced leukemia: lessons from history // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* – 2007. – **20**. – P. 109–118.
  42. Frazer P., Carpenter L., Maconochie N. Cancer mortality and morbidity in employees of the United Kindom Atomic Energy Authority, 1946–1986 // *Brit. J. Cancer*. – 1993. – **67**, № 3. – P. 615–624.
  43. Hatch M., Ron E., Bouville A., Zablotska L., Howe G. The Chernobyl disaster: cancer following the accident at the Chernobyl // *Nucl. Power Plant. Epid. Rev.* – 2005. – **27**. – P. 56–66.
  44. Hsu W.-L., Preston D.L., Soda M., Sugiyama Y., Funamoto S., Kodama K., Kimura A., Kamada N., Dohy H., Tomonaga M., Iwanaga M., Miyazaki Y., Cullings H.M., Suyama A., Ozasa K., Shorea R.E., Mabuchii K. The Incidence of Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma among Atomic Bomb Survivors: 1950–2001 // *Radiat. Res.* – 2013. – **179**. – P. 361–382.
  45. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Ionizing Radiation, Part 1: X- and Gamma ( $\gamma$ )-Radiation, and Neutrons- Lyon: IARC press, 2000. – Vol. 75. – 491 p.
  46. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Ionizing Radiation, Part 2: Some Internally Deposited Radionuclides. – Lyon: IARC press. – 2001. – Vol. 78. – 595 p.
  47. Ivanov V.K., Tsyb A.F., Gorsky A.I., Maksyutov M.A., Rastopchin E.M., Konogorov A.P., Korelo A.M., Biryukov A.P., Matiash V.A. Leukemia and thyroid cancer in emergency workers of the Chernobyl accident: estimation of radiation risks // *Rad. Invir. Biophys.* – 1997. – **36**. – P. 9–16.
  48. Kerber R.A. A cohort study of thyroid disease in relation to fallout from nuclear weapons testing // *JAMA*. – 1993. – **270**, № 17. – P. 2076–2082.
  49. Linet M.S., Murbeth S., Rousarova M., Scherb H., Lengfelder E. Thyroid cancer has increased in the adult population of countries moderately affected by Chernobyl fallout // *Med. Sci. Monit.* – 2004. – **108**, № 7. – P. 300–306.
  50. Morgan W.F. Non-target and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation induced genomic instability and bystander effect in vitro // *Radiat. Res.* – 2009. – **165**. – P. 567–580.
  51. Murbeth S., Rousarova M., Scherb H., Lengfelder E. Thyroid cancer has increased in the adult population of countries moderately affected by Chernobyl fallout // *Med. Sci. Monit.* – 2004. – **108**, № 7. – P. 300–306.
  52. Pierce D., Shimizu Y., Preston D., Vaeth M., Mabuchi K. Studies of the mortality of atomic bomb survivors. Report 12. Part I. Cancer: 1950–1990 // *Radiat. Res.* – 1996. – **146**. – P. 1–27.
  53. Preston D.L., Kusumi S., Tomonaga M., Izumi S., Ron E., Kurato N., Dohy N., Matsui T., Nonaka H., Thompson D.H., Soda M., Mabuchi K. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950–1987 // *Ibid.* – 1994. – **137**. – P. 68–97
  54. RADECS-2005 (The 8th European Conference on Radiation and its Effects on Components and Systems Overview, Cap d'Agde, Sept. 19-23, 2005 // *IEEE Trans. Nucl. Sci.* – 2005. – **53**, № 4, Pt. 1. – P. 1412–1429.
  55. Rericha V., Kulich M., Rericha R. Shore D.L., Sandleret D.P. Incidence of leukemia, lymphoma and multiple myeloma in Czech uranium miners: a case-control study // *Envir. Health Res.* – 2006. – **114**, № 6. – P. 818–822.
  56. Romanenko A., Bebesko V., Hatch M., Bazyka D., Finch S., Dyagil I., Reiss R., Chumak V. The Ukrainian-American study of leukemia and related disoders among Chornobyl cleanup workers: I. Study methods // *Radiat. Res.* – 2008. – **170**, № 6. – P. 691–697.
  57. Shimizu Y., Kato H., Schull W.J. Studies of the mortality of Atomic bomb survivors. Mortality: 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised doses (DS86) // *Ibid.* – 1990. – **21**. – P. 120–141.

58. Tefferi A., Thiele J., A. Orazi A., Kvasnicka H. M., Barbui T., Hanson C.A., Barosi G., Verstovsek S., Birgegard G., Mesa R., Reilly J.T., Gisslinger H. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an international expert panel // *Blood*. – 2007. – **110**, № 4. – P. 1092–1097.
59. Tokarskaya Z.B., Okladnikova N.D., Belyaeva Z.D., Drozhko E.G. Multifactorial analysis of lung cancer dose-response relationships for workers at the Mayak nuclear enterprise // *Health Phys.* – 1997. – **73**, № 6. – P. 899–905.
60. Zablotska L.B., Bazyka D.A., Lubin J.H., Gudzenko N., Little M.P., Hatch M., Finch S., Dyagil I., Reiss R.F., Chumak V.V., Bouville A., Drozdovitch V., Kryuchkov V.P., Golovanov I., Bakhanova E., Babkina N., Lubarets T., Bebesko V., Romanenko A., Mabuchi K. Radiation and the Risk of Chronic Lymphocytic and Other Leukemias among Chernobyl Cleanup Workers // *Environmental Health Perspectives*. – 2013. – **121**, № 4. – P. 59–65.

*Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ;  
ДУ “Нац. наук. центр радіац. медицини НАМН  
України”, Київ  
E-mail: mtkachenkodeprad@mail.ru*

*Матеріал надійшов  
до редакції 22.11.2012*

Я.В. Ганіткевич

## Історія кафедри фізіології людини і тварин Чернівецького університету

Університет у Чернівцях засновано в 1875 р. за панування Австро-Угорщини на базі духовної семінарії. Мав тоді лише 3 факультети: богословський, юридичний і філософський, викладання проводилося німецькою мовою. Після переходу Буковини до складу Румунії (1918) Чернівецький університет у 1920 р. перетворено в румунський. Після приєднання Північної Буковини до УРСР (1940) він став державним радянським, організовано 6 факультетів, в тому числі біологічний, запроваджували викладання українською мовою [1, 2].

Після звільнення Чернівців від німецької окупації (1944) в процесі розвитку Чернівецького державного університету прийнято рішення про заснування кафедри фізіології людини і тварин. Уперше її організував і 12 років очолював (1946–1957 рр.) доцент Д.О. Кочерга, який захистив кандидатську дисертацію в Дніпропетровському медичному інституті, пізніше працював в Інституті фізіології АН УРСР ім. О.О. Богомольця. В ці роки вивчали проблеми фізіології дихання, завідувач кафедри та науковці Н.Р. Мірза, В.А. Євдокимова, Р.Ю. Гутник (пізніше Хролінська) виконали понад 20 праць про рефлекторні впливи рецепторів плеври на різні функціональні системи організму, зокрема на серцево-судинну систему та органи дихання.

У період 1957–1961 рр. кафедрою завідував проф. Г.В. Попов, розвивався новий

науковий напрямок – дослідження фізіології праці. Досліджували електричну активність м'язів при роботі і при втомі, вивчали фізіологічний механізм «мертвої точки». Опубліковано близько 20 праць Г.В. Попова, В.О. Воскобойникової, Р.Ю. Гутник та ін.

Протягом 1958–1967 рр. співробітники кафедри В.О. Ткачук, К.І. Орчук і В.В. Зажаєва досліджували морфологічні особливості рецепторного апарату фасцій м'язів хребетних тварин. Вивчали роль інтероцепторів сім'яників (Р.Ю. Хролінська), вплив каротинної підгодівлі на продуктивність сільськогосподарських птахів (М.І. Яворський), вплив плавальних навантажень на стан печінки білих щурів (В.О. Паскар) та ін.

З 1962 по 1971 рр. кафедру очолював проф. П.Д. Рудько, доктор біологічних наук, тематика окремих праць кафедри та навчальний процес були пов'язані із сільським господарством. Колектив кафедри вивчав фізіологічні особливості росту, розвитку та продуктивності великої рогатої худоби у різних умовах вирощування. Ці проблеми досліджували П.Д. Рудько, доцент В.О. Воскобойникова, співробітники М.В. Остапович, П.І. Шкурган, Т.В. Удовицька. На кафедрі панувала російська мова.

Доценти Д.О. Кочерга та В.О. Воскобойникова були також деканами факультету. Про стан навчальної роботи відомості не збереглися.

В 1970 р. на кафедрі обрано доктора медичних наук Я.В. Ганіткевича, до цього – доцента кафедри нормальної фізіології Івано-Франківського медичного інституту. В цей час в роботі кафедри основну увагу приділено підвищенню рівня навчального процесу. Розроблено нові програми і плани нормативних і спецкурсів, малого і великого практикуму, навчальної та виробничої практики. Опрацьовані нові спецкурси з фізіології центральної нервової системи, фізіології залоз внутрішньої секреції, фізіології травлення, фізіології праці тощо. Складено і вперше надруковано програми 5 спецкурсів, розроблено нові заняття з малого практикуму, вперше запроваджено великий практикум. Налагоджено роботу віварію, студенти отримали можливість проводити хронічні та гострі дослідження на тваринах (собаки, кролики, морські свинки, щури, білі миші). При допомозі ректорату (ректор – проф. К.О. Червінський) та деканату (декани – доц. П.І. Лопушанський, доц. Д.В. Бевзюк), партійного бюро факультету (секретар Д.В. Бевзюк) оновлено наочне обладнання кафедри. Всю навчально-методичну роботу кафедри переведено на українську мову.

Студентів стали залучати до наукової роботи. Розроблено і видано методичні рекомендації для проведення науково-дослідної роботи. Вони вперше почали виконувати курсові і дипломні роботи на актуальні теми, деякі студентські роботи були на високому науковому рівні та увійшли в публікації кафедри. Кращі випускники кафедри цього періоду стали аспірантами, кандидатами наук, доцентами і професорами (Роман Янчій, Леся Байдан, Валентин Швець, Євгеній Халаїм, Марія Сенік).

Кафедра розпочала розробляти новий науковий напрямок фізіології – дослідження фізіологічної ролі ендогенних (біогенних) і абіогенних поверхнево-активних речовин. Запропоновану завідувачем тематику схвалили наукові ради біологічної секції МВССО УРСР та наукова рада з мембранології АН СРСР, Я.В. Ганіткевича ввели до складу цих нау-

кових рад, до екологічної секції Національного комітету СРСР з поверхнево-активних речовин, редколегії міжвідомчого збірника МВССО УРСР.

На кафедрі проводили наукову і педагогічну роботу доценти І.І. Лещинюк, Л.І. Сандуляк, І.М. Павлюк, асистенти М.В. Остапович, Р.Ю. Хролінська, старші лаборанти Л.І. Черненко, Г.Г. Пендерещка, П.І. Шкурган, О.А. Ясюченя, науковий співробітник М.Г. Грішина. При сприятливій ректорату на кафедрі формувалася невелика наукова група.

Була налагоджена тісна співпраця з кафедрою фізичної та колоїдної хімії університету (доц. В.П. Руді), кафедрами гістології, фізіології та з клінікою внутрішніх хвороб Чернівецького медичного інституту (проф. І.А. Шевчук, доц. В.Ф. Мислицкий, проф. Л. Самсон). Встановлено наукові зв'язки кафедри зі столичним університетом ім. Т.Г. Шевченка (Інститут фізіології, акад. П.Г. Богач), Інститутом фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР (акад. П.Г. Костюк, М.Ф. Шуба, В.Я. Березовський), лабораторією поверхневих явищ Інституту хімії полімерів АН УРСР, налагоджено контакти з лабораторією акад. А.М. Уголева в Інституті фізіології АН СРСР (Ленінград). Спільно проводилися наукові дослідження, виконувалися дисертаційні роботи, готувалися наукові публікації. Виробничу практику студенти-фізіологи проходили в Києві в згаданих інститутах, деякі виконували там дипломні роботи (В.І. Швець).

У 1970–1971 рр. співробітниками кафедри проведено психофізіологічні дослідження на Чернівецькому текстильному об'єднанні «Восход», надано підприємству допомогу у розробці плану спеціального розвитку.

За 10 років кандидатські дисертації захистили М.В. Остапович, Р.Ю. Хролінська, Л.В. Байдан, дещо пізніше – В.І. Швець, Р.І. Янчій, М.І. Сенік, Є.А. Халаїм.

Співробітниками кафедри за цей час опубліковано понад 80 наукових праць, в тому

числі 26 у всесоюзних виданнях, в зарубіжних – 5 [3]. Отримано авторське свідоцтво на винахід – ефективну підкормку сільсько-господарських тварин поверхнево-активними речовинами.

Кафедра брала участь в ІХ, Х і ХІ з'їздах Українського фізіологічного товариства. Наукові роботи кафедри були представлені завідувачем кафедри в складі групи науковців СРСР на ХІІ з'їзді Польського фізіологічного товариства (Ольштин, 1972), на ІІ Конгресі товариства фізіологічних наук Болгарії (Софія, 1974), на ХІІІ конгресі Польського фізіологічного товариства (Гданьск, 1975), на VІІІ Міжнародному конгресі з поверхнево-активних речовин (Москва, 1978), на найбільш престижному ХХVІІІ міжнародному конгресі фізіологічних наук (Будапешт, 1980). Великий огляд праць кафедри з фізіологічної ролі поверхнево-активних речовин опубліковано в міжнародному журналі «Tenside-Detergents» (Мюнхен, 1978).

Кафедра стала відомим в Україні та в СРСР центром дослідження поверхневих явищ в біології та медицині. До Чернівців приїздили для обміну досвідом та захисту дисертацій. У 1975 р. кафедра фізіології людини і тварин ЧДУ спільно з АН СРСР та АН УРСР уперше на факультеті провела за своєю тематикою Всесоюзний симпозиум «Фізіологічна роль поверхнево-активних речовин», в якому взяло участь 150 науковців Києва, Харкова, Донецька, Вінниці, Сімферополя, Москви, Ленінграда, Томська, Ташкента, Іжевська, Риги і Єлгави (Латвія), Пушціно, Шебекино, Щолкіно, Іжевська, Караганди, Благовещенська (Росія) та ін. [4]. Основними питаннями було обговорення ролі поверхневих явищ в механізмі дії фізіологічно активних речовин, вивчення взаємозв'язку будови і фізіологічної дії поверхнево-активних речовин, їх взаємодія з біологічними та штучними мембранами. Багато доповідей були присвячені фізіологічній ролі жовчних кислот, якісній характеристиці та регуляції їх метаболізму. Значну увагу при-

ділили поверхнево-активним речовинам, які діють на біологічні мембрани, анестетикам, анальгетикам тощо, солюбілізації ферментів поверхнево-активними речовинами. Цікавими були доповіді з Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР про легеневі сурфактанти, їх роль у різних порушеннях легневих функцій (Березовський В.Я.).

У 1980 р. за сприяння Інституту фізіології АН УРСР у видавництві «Наукова думка» вийшла у світ монографія Я.В. Ганіткевича «Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма», яка стала настільною книгою для багатьох фахівців, науковців, аспірантів. Пізніше видано методичну книжку «Я.В. Ганиткевич, Я.И. Карбач. Исследование желчи. Биохимические и биофизические методы» (Київ, 1985. –136 с.).

Кафедра фізіології людини і тварин за рівнем наукової та педагогічної роботи стала однією з провідних на біологічному факультеті, готувала на належному високому рівні вчителів-біологів, активно розвивала фізіологічну науку.

Проте з часом підтримка керівництвом університету і факультету починань кафедри, надання потрібної допомоги та сприяння припинилися. Я.В. Ганіткевич не став брати участі в черговому конкурсі та в 1981 р. залишив Чернівецький університет.

Завідувачем кафедри обрано доктора біологічних наук проф. С.А. Кузнєцова з Кишинєва, під його керівництвом стали досліджувати функціональні можливості рухового аналізатора, проводити навчальний процес російською мовою. У 1983 р. С.А. Кузнєцова звільнено, самостійно функціонуючу 40 років кафедру фізіології людини і тварин об'єднано з кафедрою зоології – створено кафедру зоології та фізіології людини і тварин, завідувачем стала доц. Д.В. Бєвзюк – зоолог, кандидат біологічних наук, декан факультету.

У 1985 р. повністю ліквідовано кафедру фізіології людини і тварин, яка є основною на біологічних факультетах України та інших країн, дає необхідну підготовку викладачам

біології, випускникам біологічних факультетів університетів. Невеликий курс фізіології людини і тварин залишався при кафедрі зоології [5].

Під кінець радянської доби біологічний факультет різко змінено в напрямку агробіології, наближено до рівня агрономічного або сільськогосподарського навчального закладу, з 1990 р. почато випуск ґрунтознавців, які стали працювати в господарствах Чернівецької та сусідніх областей, в станціях хімізації сільського господарства тощо.

За незалежної України ліквідовано кафедру зоології та гідробіології, відкрито кафедру молекулярної генетики та біотехнології (2005), вчена рада університету перейменувала (2009) біологічний факультет на факультет біології, екології та біотехнології [6]. Хоч в університеті кількість кафедр різко зросла (з 56 до 75 за роки 1995–2005) кафедри фізіології людини і тварин не відновлено.

Згадані матеріали про кафедру фізіології людини і тварин Чернівецького національного університету імені Ю. Федьковича доповнять історію біологічного факультету університету та історію розвитку фізіологічної науки у вищих навчальних закладах України.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Чернівецький державний університет. – Львів, 1975. – С. 171–172.
2. Чернівецький національний університет // Режим доступу до сайту: [ar.chnu.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/107/1/ChNU.pdf](http://ar.chnu.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/107/1/ChNU.pdf).
3. Вибрані праці до 80-ліття від дня народження Ярослава Ганіткевича // Бібліографічний покажчик. Лікарський збірник. – Нова серія. – Том XVII. – НТШ. – Львів, 2009. – 424 с.
4. Всесоюзний симпозиум «Физиологическая роль поверхностно-активных веществ». – Тезисы докладов. – Черновцы, 1975. – 131 с.
5. Чернівецький університет. 1875–1995. Сторінки історії. – Чернівці, Рута, 1995. – С.140.
6. Чернівецький національний університет імені Ю.Федьковича // Режим доступу до сайту: <http://www.chnu.cv.ua/index.php?page=ua/colleges> ; <http://bio.chnu.edu.ua/>.

*Львів. нац.мед. ун-т ім. Данила Галицького*  
*E-mail: hanitkevych@yahoo.com*



## ПАМ'ЯТНІ ДАТИ

### Михайло Михайлович Середенко



17 листопада виповнилося б 80 років відомому вченому-патофізіологу, доктору медичних наук, професору Михайлу Михайловичу Середенку.

Михайло Михайлович народився у м. Харкові, закінчив Київський медичний інститут ім. О.О. Богомольця. Після закінчення інституту деякий час працював лікарем у Київській обласній лікарні. Бажання займатися науковою роботою сприяло тому, що у 1959 р. він вступив до аспірантури Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, після чого його творчий шлях був назавжди пов'язаний з цим закладом. Михайло Михайлович успішно захистив кандидатську дисертацію і тривалий час очолював лабораторію газообміну при відділі фізіології дихання. У 1980 р. М.М. Середенко захистив докторську дисертацію і у 1981 р. став завідувачем відділу з вивчення гіпоксичних станів, яким керував до своєї передчасної смерті у 2003 р. У його науковому доробку близько 350 наукових

праць в Україні та за кордоном, серед яких 4 монографії і монографічні видання, 2 патенти на винаходи і способи лікування. Під його безпосереднім керівництвом розроблялися та проходили апробацію численні медичні препарати, які і дотепер знаходять широке застосування у клінічній практиці.

М.М. Середенко був високоєрудованим талановитим ученим, видатним організатором. Він створив наукову школу вчених-гіпоксистів; під його керівництвом захищено 21 кандидатських і 6 докторських дисертацій. У сферу його наукових інтересів входив широкий спектр проблем фізіології та патофізіології дихання, патофізіології гіпоксичних станів, вікової фізіології, клінічної патофізіології, спортивної медицини, порушень транспорту й утилізації кисню в організмі, пошуків шляхів їх корекції.

Визнанням досягнутих М.М. Середенко успіхів стало присудження йому Державної премії України в галузі науки і техніки в 2000 р. Він був обраний членом Нью-Йоркської Академії наук, тривалий час виконував обов'язки заступника голови експертної ради ВАК України, члена експертної комісії науково-технічної ради Українського Антарктичного центру МОН України, члена спеціалізованої вченої ради при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, члена правління науково-медичного товариства патофізіологів України.

М.М. Середенко завжди був життєрадісною, оптимістично налаштованою, світлою особистістю. До нього завжди тягнулися люди, кожному він міг дати пораду.

Співробітники та учні намагаються бути гідними його високих наукових і моральних принципів, наслідувати його творчі та життєві заповіді.



**Юрій Петрович Лиманський**

24 листопада 2013 р. на 84-му році життя після тривалої важкої хвороби помер видатний нейрофізіолог, професор, доктор біологічних наук, завідувач відділу фізіології стовбура мозку Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України Юрій Петрович Лиманський.

Свою наукову діяльність Юрій Петрович розпочав у 1958 р., вступивши до аспірантури у відділ загальної фізіології нервової системи під керівництвом Платона Григоровича Костюка. Він став першим аспірантом цього видатного нейрофізіолога. Перед вступом до аспірантури Юрій Петрович після закінчення Ставропольського медичного інституту 4 роки працював лікарем у республіці Казахстан та в м. Ставрополь.

Перші роботи Ю.П. Лиманського присвячені дослідженню синаптичних потенціалів ретикулярної формації довгастого мозку. Вони виконані з використанням електрофізіологічних методів внутрішньоклітинного відведення електричних потенціалів за допомогою мікроелектродів і отримали широке визнання на міжнародному рівні. Подальші дослідження Ю.П. Лиманського функціо-

нальної організації сенсорних і моторних черепно-мозкових нервів і регуляції їх діяльності низхідними системами головного мозку викристалізували новий напрямок його досліджень. Експериментальні дані, отримані при дослідженні структур трійчастого нерва, поставили завдання з дослідження фізіології болю та знеболення, особливо нефармакологічними методами. Були одержані об'єктивні докази ефективності застосування для боротьби з болем електромагнітних полів (ЕМП) вкрай низької інтенсивності. Вивчено протибольову дію ЕМП різного хвильового діапазону аж до видимої частини спектра. Виявилося, що низькоінтенсивні ЕМП статистично достовірно послаблюють біль при дії на протибольові точки акупунктури або безпосередньо на осередок болю. Ю.П. Лиманським уперше були проведені дослідження протибольової дії низькоінтенсивного поляризованого світла. Показано, що ступінь анальгезії залежить від тривалості експозиції світла, зони, на яку направлене світло, і від довжини хвилі (кольору). Встановлений ефект підсилення малих доз фармакологічних анальгетиків дією низькоінтенсивного поляризованого світла на точку акупунктури. Були вивчені механізми анальгетичної дії низькоінтенсивних електромагнітних діапазонів з низькою щільністю потоку потужності. Доведено, що анальгезія, викликана дією низькоінтенсивних ЕМП на точки акупунктури, опосередковується опіоїдною, серотонінергічною і дофамінергічною антиноцицептивними системами мозку. Важливо також зазначити, що анальгетична дія електромагнітних полів може підсилювати дію фармакологічних препаратів. Досконально було вивчено функціональну організацію моноамінергічних антиноцицептивних систем стовбура мозку, їх вплив на рівні сенсорних ядер довгастого мозку ядер таламуса та сенсорної зони кори головного мозку.

---

Ю.П.Лиманський постійно удосконалював методику експериментальних досліджень. Він був ініціатором і активним розробником блоку електронного обладнання для вивчення функціональної діяльності нейронів спинного і головного мозку. За цю роботу разом з групою співробітників він був відзначений Державною премією УРСР у галузі науки і техніки. За досягнення в дослідженні фізіології центральної нервової системи Ю.П. Лиманський одержав премію ім. О.О. Богомольця.

Ю.П. Лиманський – автор і співавтор 191 наукових праць, у тому числі 8 монографій, двох глав у посібниках і двох авторських свідоцтв на винаходи. Ним зроблені теоретичні узагальнення стосовно структурно-функціональної організації системи трійчастого нерва (монографія, 1976 р.), запропонована нова гіпотеза про біль (монографія, 1986 р.), сформульована концепція про три морффунк-

ціональні системи стовбура мозку і їх місце в інтегративній діяльності ЦНС (монографія, 1987 р.), сформульовані принципи комплексного лікування больових синдромів остеохондрозу хребта людини (монографія, 1988 р.), видані практичні посібники з використання акупресури в невідкладних станах (посібник, 1995 р.) і лікування різних патологічних станів у людини при дії низькоінтенсивних електромагнітних полів на специфічні зони тіла (2001 р.).

Ю.П. Лиманський був членом Міжнародної організації з вивчення мозку, членом Міжнародної організації з вивчення болю, умілим керівником та організатором наукових досліджень. Ним підготовлено 9 аспірантів, які успішно захистили дисертації і стали кандидатами наук. Юрій Петрович був також доброю, чуйною, простою і доступною у спілкуванні людиною.

Добра пам'ять про Ю.П. Лиманського назавжди залишиться в наших серцях.

## CONTENTS

N.A. Strutynska, R.B. Strutynskiy, S.V. Chorna, O.M. Semenykhina, L.A. Mys, O.O. Moibenko, V.F. Sagach. New fluorine-containing openers of atp-sensitive potassium channels flokalin and tioflokalin inhibit calcium-induced mitochondrial pore opening in rat hearts	3
S.V. Goncharov, V.L. Gurianova, D.O. Stroy, T.I. Drevytska, S.P. Kaplinskii, E.A. Nastenکو, M. Litvinenko, R.V. Terletskiy, M.V. Khaitovych, O.O. Moibenko, V.E. Dosenko. Genetic predisposition to essential hypertension in children: analysis of 17 single nucleotide polymorphisms	12
Yu.M. Kolesnik, E.V. Kadzharyan, A.V. Abramov. The influence of the intermittent hypoxia trainings on the functional status of corticoliberin- and beta-endorphin-synthesizing neurons of the paraventricular nucleus hypothalamus in rats	25
TN Boychuk, TP Savchuk. Morphofunctional changes in vascular endothelialdiencephalon of rats in experimental ischemia-reperfusion injury in the background diabetes	30
I.P.Pasteur, N.I.Levchuk, M.D.Tronko. Characteristization of microencapsulated human adrenal cortex tissue in long-term culture	37
P.I. Yanchuk, O.O. Vingradova, O.M. Pasichnichenko, S.S. Kostenko. Participation of eicosanoids in the mechanisms of contractile reactions of portal vein to adrenaline and noradrenaline	43
A.A: Basov, M.G. Baryshev, S.S. Jimak, I.M. Bykov, R.I. Sepiashvili, I.I. Pavlyuchenko. The effect of consumption of water with modified isotope content on the parameters of free radical oxidation in vivo	49
G.I. Khodorovskiy, R.R. Dmitrenko, O.V.Yasinska. The role of retinal-hypotalamic-pineal system in pro- and antyoxoydant processes in gingival tissues of adult male albino rats	57
S.B. Drozdovska, O.M. Lysenko, V.E. Dosenko, V.M. Ilyin, O.O.Moybenko. T <sup>-786</sup> →C promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene (eNOS) and exercise performance	63
S. Yu. Tsiporenko. Influence of immunocorrection on the inflammatory process in the urogenital tract in men with infertility	72
N.V. Kozyavkina, L.G. Barylyak, O.R. Yanchiy, O.L. Fuchko. Immediate thyrotropic effects of bioactive water naftussya, their vegetative relevance and possibility to forecast	81
E.A. Rybnikova, K.A.Baranova, T.S.Gluschenko, O. Vetrovoy, M. Sidorova, I. Portnichenko. Involvement of transcriptional factor in the neuronal mechanisms of adaptation to psychoemotional and hypoxic stress in rats	88
Yu.I. Kirova, E.L. Germanova, L.D. Lukyanova. Phenotypic characteristics of HIF-1 alpha expression and redox status in rat neocortical cells at different stages of adaptation to hypoxia	98
M.V. Sidorova, E.A. Rybnikova, A.V. Churilova, V.I. Portnichenko, M.O. Samoilov. The impact of mild hypobaric hypoxia in different modes on expression of hif-1α in rat neocortex	111
E.I. Tyulkova, L.A. Vataeva, T.S. Gluschenko, S.G. Pivina. Effects of the prenatal hypoxia on hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning and working memory in rats	116
A.G.Portnychenko, T.Yu.Lapikova - Bryginska, M.I.Vasilenko, G.V.Portnichenko, LN Maslov, AA Moibenko. The expression of Akt kinase in the heart ventricles under hypoxic preconditioning and myocardial remodeling	124
M.O. Samoilov, A.V. Churilova, T.S.Gluschenko, K.A.Baranova. Pattern of neuronal expression of transcription factors nf-kb under different modes of hypobaric hypoxia	132
<b>REVIEWS</b>	
L.D. Lukyanova. Mitochondria signaling in adaptation to hypoxia	141
M.N. Tkachenko, T.F. Liubarets. Indeterministic effects of ionizing radiation: cancer aspects of the problem	155
<b>HISTORY OF SCIENCE</b>	
Y. Hanitkevych. History of the Department of Human and Animal PhysiologyChernivtsi University	165