

Фізіологічний журнал

ТОМ 61 № 1 2015

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

- Кочуруба А.В., Коп'як Б.С., Сагач В.Ф., Співак М.Я.* Вільнорадикальні процеси зумовлюють зниження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів старих щурів, яке запобігається нанодисперсним діоксидом церію 3
- Minchenko D.O., Davydov V.V., Budreiko O.A., Moliavko O.S., Kuliashova D.K., Tiazhka O.V., Minchenko O.H.* The expression of *CCN2*, *IQSEC*, *RSP01*, *DNAJC15*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1*, and *IRS2* genes in blood of obese boys with insulin resistance 10
- Гарбузова В.Ю., Строй Д.А., Досенко В.Є., Дубовик Є.І., Бороденко А.О., Шимко К.А., Обухова О.А., Атаман О.В.* Асоціація поліморфізму генів системи матричного Gla-протеїну з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту 19
- Грушка Н.Г., Павлович С.І., Бризгіна Т.М., Сухіна В.С., Макогон Н.В., Янчій Р.І.* Генотоксичний стрес і шляхи загибелі клітин тимуса та лімфовузлів мишей за умов системної імунокомплексної патології 28
- Вірченко О.В., Фалалєєва Т.М., Берегова Т.В., Співак М.Я., Лазаренко Л.М., Демченко О.М.* Вплив моно-, полі- та комбінованих пробіотиків на виразкоутворення, викликане іммобілізаційним стресом 35
- Фоменко І.С., Корнійчук О.П., Гураль А.Р., Шкула Р.Г., Ільків І.І., Склярів О.Я.* Роль циклооксигенази у модифікації мікрофлори кишки при стресі 42
- Вовкун Т.В., Янчук П.І., Штанова Л.Я., Весельський С.П., Шаламай А.С.* Участь парасимпатичної ланки нервової системи в реалізації дії біофлавоноїдів на шлункову секрецію у щурів 50
- Плотнікова Л.М., Березовський В.Я., Весельський С.П.* Вплив зниженої концентрації кисню та сірководню на амінокислотний метаболізм і проліферацію мезенхімальних клітин 56
- Вінничук Ю.Д., Гуніна Л.М.* Фактор росту ендотелію судин при фізичних навантаженнях з різним механізмом енергозабезпечення м'язової діяльності 63

<i>Родинський О.Г., Зінов'єва О.Г., Трушенко О.С., Качан М.Я.</i> Викликана активність аферентних волокон дорсального корінця спинного мозку білих щурів за умов експериментального цукрового діабету	72
<i>Сторчило О.В.</i> Радіопротекторний ефект їжі в асиміляції вуглеводних субстратів різного ступеня полімерності у двох поколінь нащадків опромінених щурів	78
<i>Войтенко Л.П., Ніконенко О.Г.</i> Модифікація експериментальної ротенонової моделі хвороби Паркінсона	83
ОГЛЯДИ	
<i>Гошовська Ю.В.</i> Участь мітохондріальних роз'єднувальних білків у механізмах захисту міокарда від окисного стресу	91
<i>Могильницька Л.А.</i> Ендотеліальний моноцитаактивуєчий поліпептид-II: властивості, функції та патогенетичне значення	102

А.В. Коцюруба¹, Б.С. Коп'як¹, В.Ф. Сагач¹, М.Я.Співак²

Вільнорадикальні процеси зумовлюють зниження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів старих щурів, яке запобігається нанодисперсним діоксидом церію

¹Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;

²Інститут мікробіології і вірусології ім Д.К. Заболотного, НАН України, Київ;

E-mail: toliko49@ukr.net

Встановлено, що у старих щурів в плазмі, і в еритроцитах збільшується інтенсивність оксидативного і нітрозативного стресу. Внаслідок цього зростає частка нестабільних до кислотного гемолізу еритроцитів. У старих тварин вона становить 63,3 %, що у 5 разів більше порівняно з дорослими (12,6 %). Введення старим щурам per os протягом 14 діб 0,1мг/кг нанодисперсного діоксиду церію (НДЦ) інгібувало інтенсивність і оксидативного, і, особливо, нітрозативного стресу, що відновлювало стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу. При цьому повністю нормалізувалася частка нестабільних еритроцитів, а також підвищувався (від 190,1±23,4 до 693,8±74,7 ум.од.) інтегральний індекс стійкості сумарної популяції еритроцитів до кислотного гемолізу. НДЦ у старих щурів нормалізує циркулюючі пули сірководню – підвищує знижені плазмові і, навпаки, знижує підвищені еритроцитарні.

Ключові слова: еритроцити, нанодисперсний діоксид церію, оксидативний і нітрозативний стрес, сірководень, старі щури

ВСТУП

Раніше [1] ми показали, що в плазмі та еритроцитах крові старих щурів підвищується генерація не тільки активних форм кисню (АФК), але і синтез активних форм азоту (АФА). Саме еритроцити є основними продуцентами оксиду азоту (NO) в організмі, причому в цих клітинах наявний як de novo синтез NO із L-аргініну [2], так і реутилізаційний [3,4]. Саме надмірний синтез NO вважається основною причиною передчасного старіння [5]. Ще не зовсім зрозуміла в цьому процесі роль нещодавно відкритого газового трансмітера – сірководню (H₂S). У старих щурів спостерігається «закиснення» крові і посилення в ній вільнорадикальних процесів. При цьому еритроцити піддають-

© А.В. Коцюруба, Б.С. Коп'як, В.Ф. Сагач, М.Я.Співак

ся атаці АФК і АФА, що супроводжується окисненням білків плазматичної мембрани, внаслідок чого, як було показано раніше [6], значно підвищується їх проникність для іонів H⁺, що може мати наслідком передчасну некротичну загибель клітин через кислотний гемоліз. Ці передумови актуалізують пошук ефективних нетоксичних антиоксидантів, які для запобігання кислотного гемолізу здатні пригнічувати не лише надмірну генерацію АФК, але також і АФА в плазмі та еритроцитах. Останнім часом як антиоксидант, у т.ч. для інгібування АФК-залежного апоптозу, широко використовують нанодисперсний діоксид церію (НДЦ) [7-10]. Доведено кардіо- і нейропротекторну його дію завдяки здатності інгібувати генерацію АФК і їх токсичний вплив [11-14]. Даних про вплив НДЦ на син-

тез АФА і H_2S нема. Слід зауважити, що саме еритроцити часто використовують для оцінки антиоксидантної дії різних речовин [15,16]. Мета роботи – дослідити дію НДЦ на генерацію АФК і АФА та синтез H_2S в крові старих тварин як можливих регуляторів кислотного гемолізу еритроцитів.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на 10 дорослих безпородних щурах віком 6 міс і 10 старих особинах віком 24 міс. Старих щурів розділяли на дві групи по 5 тварин у кожній. Контрольній групі згодовували протягом 14 днів стандартний раціон віварію, а в питну воду добавляли буфер, тоді як тваринам дослідної групи у питну воду добавляли суспензію НДЦ в буфері, приготовлену в Інституті мікробіології і вірусології НАН України з розрахунку по 0,1 мг/кг на добу. Через 14 днів тварин декапітували, відбирали кров, яку розділяли на плазму й еритроцити. Для оцінки мембраностабілізуючої дії НДЦ використовували кінетичний метод кислотного гемолізу [17] суспензії еритроцитів в ізотонічному середовищі 0,14 М NaCl. У плазмі крові і в водному лізаті еритроцитів визначали стаціонарні пули H_2S і показники, які характеризують ступінь окисативного та нітрозативного стресу. Вміст H_2S визначали за описаним методом [18], використовуючи дипіридилдисульфат (N,N-DPD, „Sigma”, США), вміст нітрат-аніона за методом Jsukahara [19], використовуючи бруцин („Sigma”, США), вміст H_2O_2 визначали за Kuthan та співавт. [20], швидкість генерації супероксидного радикала (O_2^-) за окисненням цитохрому с („Sigma”, США) методом Nuwiler та Kohler [21], швидкість генерації гідроксильного радикала (OH) з використанням 2-дезоксид-рибози („Sigma”, США) за методом Conte та співавт. [22], вміст дієнових кон’югатів (ДК) за Gavrilov та співавт. [23], малонового діальдегіду (МДА) за Uchiyama та Mihara [24]. вміст вільного заліза і сечової кислоти фотометричними методами

з використанням добірок реактивів фірми “Філісит діагностика” (Україна, Дніпропетровськ), вміст білка в плазмі крові та лізаті еритроцитів методом Лоурі [25]. Всі роботи з тваринами проводили відповідно до Закону України від 21.02.2006 №3447-IV „Про захист від жорстокого поводження” та у відповідності з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), SDUDENT (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Мембранопротекторна дія НДЦ. Кислотна резистентність характеризує цілісність мембрани еритроцитів і ступінь її пошкодження за дії різних факторів (в т.ч. АФК і АФА) в процесі старіння. Її оцінювали за кінетичними показниками кислотного гемолізу, що індукували 0,004N HCl [17]. З рис. 1 видно, що у старих щурів частка лабільних („старих”) еритроцитів, що гемолізуються менше ніж за 2,5 хв, становить 63,3 %, що у 5 разів більше порівняно з дорослими щурами (12,6 %). Це зумовлюється легкою проникністю протонів у значній кількості червоних клітин крові контрольних старих тварин. У тварин яким вводили НДЦ повністю нормалізувалася частка лабільних еритроцитів, а також значно (від $190,1 \pm 23,4$ до $693,8 \pm 74,7$ ум.од.) підвищувався інтегральний індекс стійкості еритроцитів до кислотного гемолізу.

Вплив НДЦ на вміст H_2S і рівні оксидативного та нітрозативного стресу в еритроцитах і в плазмі крові старих щурів. У табл. 1-4 показано результати потужної антиокисної дії НДЦ як у плазмі, так і в еритроцитах, що може бути однією з причин відновлення ним стійкості мембран еритроцитів старих щурів до проникнення протонів і, як наслідок, до кислотного гемолізу, на що вказувалося вище.

Таблиця 1. Дія нанодисперсного діоксиду церію (НДЦ) на перекисне окиснення ліпідів у плазмі крові старих щурів (M ± m, n=5)

Показник	Дорослі	Старі	Старі та НДЦ
Дієнові кон'югати, нг/мг білка	3,44 ± 0,76	11,73 ± 1,76*	5,32 ± 1,09**
Негемове залізо, нмоль/мг білка	1,05 ± 0,12	16,81 ± 4,33*	2,86 ± 0,92*/**
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка	15,95 ± 2,65	35,02 ± 5,79*	19,85 ± 3,07**

*P<0,05 відносно значення у дорослих щурів; **- P<0,05 відносно значення у контрольних старих щурів, які не отримували НДЦ

З табл. 1 видно, що в плазмі крові старих щурів значно посилюється інтенсивність вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Більш ніж у 3 рази підвищується вміст раних продуктів ПОЛ - дієнових кон'югатів. Вміст пізнього продукту ПОЛ малонового діальдегіду зростає більш ніж удвічі. Така інтенсифікація процесу ПОЛ відбувається внаслідок зростання у 16 разів пулів вільного негемового заліза, що передбачає можливу надпродукцію $\cdot\text{OH}$ -радикала „класичним” шляхом із H_2O_2 у реакції Фентона. Введення НДЦ зменшувало пули вільного заліза і, як наслідок, інтенсивність ПОЛ.

З табл.2 видно, що в плазмі крові старих щурів збільшується швидкість генерації $\cdot\text{OH}$ -радикала та $\cdot\text{O}_2^-$ (відповідно, у 5 та 3,6 рази), утричі зростає вміст стабільного H_2O_2 . НДЦ властива активність і супероксиддисмутази (СОД) [26], і каталази [27], він не лише інгібує генерацію $\cdot\text{O}_2^-$ і його дисмутацію в H_2O_2 , але і сприяє „деактивації” H_2O_2 , перетворюючи його на кисень. Тим самим інгібується утворення токсичного $\cdot\text{OH}$ -радикала – ініціатора ланцюгової реакції ПОЛ.

Якщо швидкість генерації $\cdot\text{OH}$ -радикала і вміст H_2O_2 в плазмі за дії НДЦ лише повністю нормалізувалися, то швидкість утворення $\cdot\text{O}_2^-$ навіть достовірно знизилася відносно такого у дорослих тварин (див. табл.2). На відміну від неферментативного вільнорадикального утворення $\cdot\text{OH}$ -радикала в реакції Фентона, $\cdot\text{O}_2^-$, в основному, утворюється ферментативно при роботі різних оксидаз. Одна з найбільш активних з них, ксантиноксидаза активується за гіпоксичних умов і є ключовим ферментом глибокої деградації пуринових нуклеотидів. Окиснюючи гіпоксантин до ксантину, а останній до сечової кислоти, ксантиноксидаза одночасно генерує два радикали $\cdot\text{O}_2^-$ [28]. Отже, пули сечової кислоти є одночасно маркерами генерації $\cdot\text{O}_2^-$ ксантиноксидазою, гіпоксичного стану і ступеня деградації пуринових нуклеотидів.

З табл.3 видно як у старих тварин змінюються і як впливає НДЦ на вміст у плазмі крові сечової кислоти, H_2S та нітрат-аніона. Майже вдвічі знижуються циркулюючі пули H_2S і, навпаки, зростають пули сечової кислоти. Водночас циркулюючі пули нітрат-аніона

Таблиця 2. Дія нанодисперсного діоксиду церію (НДЦ) на швидкість генерації активних форм кисню і пули стабільного H_2O_2 в плазмі крові старих щурів (M ± m, n=5)

Показник	Дорослі	Старі	Старі та НДЦ
H_2O_2 , пмоль/мг білка	2,11 ± 0,17	7,71 ± 0,49*	1,17 ± 0,1*/**
Швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$, ум.од.	1,46 ± 0,22	4,34 ± 0,78*	1,22 ± 0,28**
Швидкість генерації $\cdot\text{OH}$, ум.од.	1,32 ± 0,17	6,11 ± 1,13*	1,81 ± 0,16**

*P<0,05 відносно значення у дорослих щурів; P<0,05 відносно значення у контрольних старих щурів, які не отримували НДЦ

Таблиця 3. Дія нанодисперсного діоксиду церію (НДЦ) на пули сечової кислоти, сірководню та нітрат-аніона в плазмі крові старих щурів (M ± m, n=5)

Показник	Дорослі	Старі	Старі та НДЦ
Сечова кислота, нмоль/мг білка	2,86 ± 0,22	4,16 ± 0,43*	2,34 ± 0,21**
H ₂ S, пмоль/ мг білка	27,1 ± 1,8	16,2 ± 3,1*	28,7 ± 2,4**
NO ₃ ⁻ , нмоль/мг білка	12,03 ± 1,18	54,80 ± 7,02*	37,22 ± 3,30*/**

*P<0,05 відносно значення у дорослих щурів; ** - P<0,05 відносно значення у контрольних старих щурів, які не отримували НДЦ

зростають більше ніж у 4 рази, що свідчить про значне утворення пероксинітриту (рис.2) при взаємодії оксиду азоту і супероксиду, а, отже, і про наявність ознак як оксидативного, так і нітрозативного стресу. Введення НДЦ нормалізувало вміст сечової кислоти і H₂S, але не нітрату, вміст якого знижувався до рівня втричі вищого від такого у дорослих тварин. Таким чином, у старих щурів НДЦ інгібує не лише утворення [•]O₂⁻ за оксидативного і NO за нітрозативного стресів, але саме завдяки цьому також і спонтанне утворення при їх взаємодії пероксинітриту та його вільнорадикальний (на радикали [•]NO₂ і [•]ОН) розпад, або нерадикальне утворення аніонів NO₃⁻ при дисоціації (рис.2). Нетоксичний нітрат-аніон є основним циркулюючим метаболітом оксиду азоту, він містить атоми кисню, що походять із обох (нітрозативного та оксидативного) шляхів метаболізму кисню (рис.2). Таким чином, підвищений вміст NO₃⁻ є достатнім маркером для встановлення наявності і оксидативного, і нітрозативного стресу в плазмі і еритроцитах (табл.4) крові старих щурів, а також їх інгібування за дії НДЦ.

З табл.4 видно, що в еритроцитах старих щурів проявляються як оксидативний, так і нітрозативний стрес, про що свідчать підвищений у 2,5 рази вміст нітрат-аніона. Як наслідок октивації ПОЛ радикалами [•]NO₂ і [•]ОН в еритроцитах старих щурів у 3,5 рази збільшується вміст МДА. Еритроцитарний пул сірководню у старих щурів підвищується у 1,5 рази, на відміну від плазми крові, де він знижувався (див. табл.3). В еритроцитах, як і в мітохондріях, наявний потужний фермент 3-меркаптопіруватсульфотрансфераза, який може утворювати H₂S не лише за допомогою синтезу de novo, але і внаслідок реутилізації сульфит-аніонів. За дії НДЦ в еритроцитах старих щурів не лише відсутні прояви оксидативного і нітрозативного стресу, про що свідчить повна нормалізація еритроцитарних пулів NO₃⁻ і МДА, але і знижуються, навіть нижче рівня у дорослих тварин, еритроцитарні пули H₂S.

На гігантського розміру активній поверхні НДЦ атоми кисню можуть відновлювати іони Ce⁴⁺ до Ce³⁺ [9]. Це зумовлює описані його надзвичайні антиоксидантні властивості за дії токсикантів, радіації, чи в пато-

Таблиця 4 Дія нанодисперсного діоксиду церію (НДЦ) на пули сірководню, нітрат-аніона та малонового діальдегіду в еритроцитах крові старих щурів (M ± m, n=5)

Показник	Дорослі	Старі	Старі та НДЦ
H ₂ S, пмоль мг/ білка	76,1 ± 8,2	115,3 ± 10,7*	54,2 ± 4,1*/**
NO ₃ ⁻ , нмоль/мг білка	2,46 ± 0,36	6,1 ± 1,3*	1,69 ± 0,32**
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка	0,86 ± 0,11	3,04 ± 0,34*	1,23 ± 0,26**

*P<0,05 відносно значення у дорослих щурів; ** - P<0,05 відносно значення у контрольних старих щурів, які не отримували НДЦ

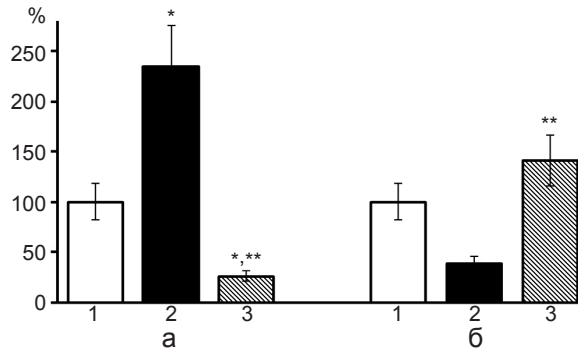


Рис.1. Зміни відсотка лабільних “старих” клітин (а) і індексу стійкості (б) в еритроцитах дорослих (1), старих (2) та старих щурів, які отримували нанодисперсний діоксид церію (3).

*P<0,05 відносно значення у дорослих щурів; ***P<0,05 відносно значення у контрольних старих щурів, які не отримували нанодисперсний діоксид церію

фізіологічних ситуаціях, як то за умов ішемії/реперфузії серця чи головного мозку [7-14].

Надлишковий синтез NO не лише спричинює розвиток багатьох судинних патологій [29], але і порушує еритропоез [30], що шкідливо для поповнення популяції еритроцитів у крові старих тварин молодими, стійкими до кислотного гемолізу еритроцитами. Тим більше, що значна частина еритроцитів в крові старих тварин може легко гемолізуватися протонами (див.рис.1). Той факт, що

НДЦ одночасно знижує кількість нестійких до кислотного гемолізу еритроцитів (див. рис.1) і проявляє потужні антиоксидантні властивості (див. табл.1-4) показує, що ці процеси взаємопов'язані. При цьому нами вперше показано значне пригнічення за дії НДЦ не лише оксидативного, але і нітрозативного стресу. Вперше показано також регуляцію циркуляторних як плазмових, так і еритроцитарних пулів H₂S, що також може забезпечувати антигемолітичну дію НДЦ.

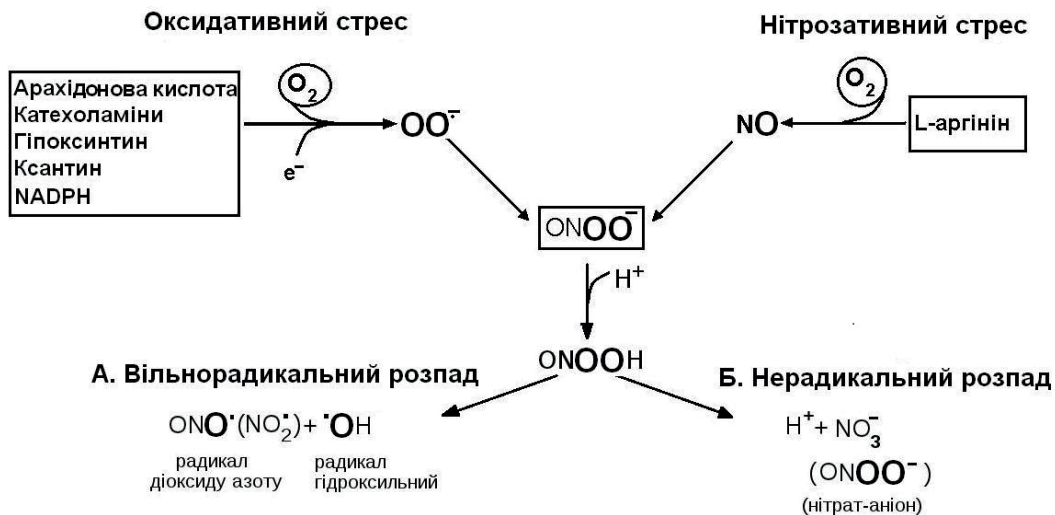


Рис.2. Схема утворення ·OH-радикалу та аніонів NO₃⁻ за одночасної індукції у старих щурів і оксидативного, і нітрозативного стресу (жирним шрифтом виділено атоми кисню в молекулі нітрат-аніону, які походять із молекули супероксиду).

ВИСНОВКИ

1. У крові старих щурів збільшується інтенсивність як оксидативного, так і нітрозативного стресу. Внаслідок цього знижується стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу.

2. Введення старим щурам 0,1 мг/кг НДЦ per os протягом 14 днів повністю відновлює стійкість мембрани еритроцитів до кислотного гемолізу.

3. Важливим біохімічним механізмом відновлення стійкості еритроцитів старих щурів за дії НДЦ є інгібування оксидативного стресу, тобто підвищеного генерування АФК в плазмі крові та в самих еритроцитах.

4. Вперше встановлено, що у старих щурів НДЦ пригнічує генерацію АФА, в т.ч. токсичного пероксинітриду, а також нормалізує циркулюючі пули сірководню - підвищує знижені плазмові, і навпаки, знижує підвищені еритроцитарні.

А.В.Коцюруба, Б.С.Копьяк, В.Ф.Сагач, Н.Я.Спивак

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ОБУСЛАВЛИВАЮТ СНИЖЕНИЕ СТОЙКОСТИ К КИСЛОТНОМУ ГЕМОЛИЗУ ЭРИТРОЦИТОВ СТАРЫХ КРЫС, КОТОРОЕ ПРЕДОТВРАЩАЕТСЯ НАНОДИСПЕРСНЫМ ДИОКСИДОМ ЦЕРИЯ

Встановлено, что у старых крыс в плазме и в эритроцитах крови увеличивается интенсивность оксидативного и нитрозативного стресса. Как следствие, возрастает часть нестабильных, гиперчувствительных к кислотному гемолизу эритроцитов. У старых животных она составляет 63,3%, что в 5 раз больше чем у взрослых (12,6%). Введение старым крысам per os на протяжении 14 суток 0,1 мг/кг нанодисперсного диоксида церия (НДЦ) снижало интенсивность и оксидативного, и, особенно, нитрозативного стресса, что восстанавливало стойкость эритроцитов к кислотному гемолизу. При этом полностью нормализовалась часть нестабильных эритроцитов, а также увеличивалась (от $190,1 \pm 23,4$ до $693,8 \pm 74,7$ усл.ед.) интегральный индекс стойкости сумарной популяции эритроцитов к кислотному гемолизу. НДЦ у старых животных нормализует циркулирующие пулы сероводорода – увеличивает сниженные плазменные и, наоборот, увеличивает повышенные эритроцитарные. Ключевые слова: эритроциты, нанодисперстный диоксид церия, оксидативный и нитрозативный стресс, сероводород.

A.V. Kotsuruba¹, B.S. Kopjak¹, V.F. Sagach¹, N.Ja.Spivak²

NANOCERIUM RESTORES THE ERYTHROCYTES STABILITY TO ACID HEMOLYSIS BY INHIBITION OF OXYGEN AND NITROGEN REACTIVE SPECIES IN OLD RATS

In experiments in vivo the effect of nanocerium (cerium oxide nanoparticles) on the stability of red blood cells to acid hemolysis, levels of both ROS and RNS generation and H₂S pools in plasma and erythrocytes of old rats were investigated. In red blood cells of old rats the proton penetration into the matrix of erythrocytes showed a significant raising and the fate of labile «aging» erythrocytes in old animals compared with adult were up-regulated. These phenomena paralleled with significant up-regulation of ROS and RNS generation. Introduction for 14 days per os to old rats 0.1 mg / kg of nanocerium fully restored resistance of erythrocytes to acid hemolysis by ROS and RNS in both plasma and erythrocytes reduction. Nanocerium decreased the erythrocytes and, conversely, significantly increased the plasma's pools of H₂S.

Key words: erythrocytes, acid hemolysis, old rats, proton penetration, cerium oxide nanoparticles, reactive oxygen and nitrogen metabolites, H₂S.

¹*O.O. Bogomoletz Institute of physiology NAS of Ukraine, Kyiv;*

²*Institute of microbiology and virusology NAS of Ukraine, Kyiv*

REFERENCES

1. Sagach VF, Baziljuk OV, Stepanenko LG, Korkach YuP, Kotsuruba AV. Enalapril action on nitric oxide synthesis, oxidative metabolism and vascular tone of aging rat. *Fiziol Zh.* 2007; 53(4):15–26 (Ukrainian).
2. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood.* 2006; 107(7): 2943 - 51.
3. Huang Z, Shiva S, Daniel B, Kim-Shapiro DB, Rakesh P. et al. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest.* 2005; 115(7): 2099-107.
4. Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, Shiva S, Chacko BK, et al. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood.* 2006; 107(2): 566 - 74.
5. Barbarash NA, Kuvshinov D, Chichlenko MV, Kolesnikov AO. Nitric oxide and human aging. *Adv Gerontol.* 2011; 24(2):256-9.
6. Fedorov SM, Baziljuk OV, Kotsuruba AV, Korkach YuP, Sagach VF. Magnetic-Laser influence on the system of nitric oxide and contractile activity of smooth muscles of rat aorta under hypertension. *Fiziol. Zh.* 2012; 58(6):36–47 (Ukrainian).
7. Chen S, Hou Y, Cheng G, Zhang C, Wang S, Zhang J. Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from

- apoptosis induced by oxidative stress. *Biol Trace Elem Res.* 2013; 154(1):156-66.
8. Hirst SM, Karakoti A, Singh S, Self W, Tyler R, et al. Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environ Toxicol.* 2013; 28(2):107-18.
 9. Celardo I, De Nicola M, Mandoli C, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Ce³⁺ ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano.* 2011; 5(6):4537-49.
 10. Hussain S, Garantziotis S. Interplay between apoptotic and autophagy pathways after exposure to cerium dioxide nanoparticles in human monocytes. *Autophagy.* 2013 Jan;9(1):101-3.
 11. Pagliari F, Mandoli C, Forte G, Magnani E, Pagliari S, Nardone G, et al. Cerium oxide nanoparticles protect cardiac progenitor cells from oxidative stress. *ACS Nano.* 2012; 22(5):3767-75.
 12. Alili L, Sack M, von Montfort C, Giri S, Das S, et al. Downregulation of tumor growth and invasion by redox-active nanoparticles. *Antioxid Redox Signal.* 2013 ; 19(8):765-78.
 13. Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A, et al. Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(6):1155-63.
 14. Ciofani G, Genchi GG, Mazzolai B, Mattoli V. Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in PC12 cells following treatment with cerium oxide nanoparticles. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(1): 495-506.
 15. Botta A, Martínez V, Mitjans M, Balboa E, Conde E, Vinardell MP. Erythrocytes and cell line-based assays to evaluate the cytoprotective activity of antioxidant components obtained from natural sources. *Toxicol In Vitro.* 2014; 28(1):120-4.
 16. Martín-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Martínez-Pinna R, Ramos-Mozo P, Blanco-Colio LM, et al. Erythrocytes, leukocytes and platelets as a source of oxidative stress in chronic vascular diseases: detoxifying mechanisms and potential therapeutic options. *Thromb Haemost.* 2012;108(3): 435-42.
 17. Terskov IA, Gittelzon II. Method chimicheskikh (kislotnich) erythrogram. *Biophysika.* 1957; 2(2): 259-66 (Russian).
 18. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. *Anal Biochem.* 1980; 107(1): 51 – 5.
 19. Jszakahara H. Effect of NOS inhibitions on bone methabolizm in growing rats. *Am J Physiol.* 1996; 270(5): E840-5.
 20. Kuthan H, Ullrich V, Estabrook RW. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem J.* 1982; 203(3): 551-8.
 21. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H2O2/iodide system. *Eur J Biochem.* 1984; 141(1): 69-74.
 22. Conte D, Narindrasorasa KS, Sarkar B. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. *Eur J Biochem.* 1996; 271(9): 5125-30.
 23. Gavrilov VB, Gavrilova AP, Chmara NF. Heptane and iso-propanol estracts for diene conjugates concentration in blood plasma. *Lab. delo.* 1988; (2): 60-4 (Russian).
 24. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978; 86(1): 271-8.
 25. Lowery OH, Rosebrough NI, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
 26. Heckert G, Karakoti AS, Seal S. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials.* 2008; 29(9): 2705–9.
 27. Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E, et al. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun.* 2010; 46(8): 2736–8.
 28. Khan SA, Lee K, Minhas KM, Gonzalez DR, Raju SVY, et al. Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(45): 15944-8.
 29. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch.* 2010;459(6):923-39.
 30. Ghaffari S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxid Redox Signal.* 2008 ;10(11):1923-40.

Матеріал надійшов до редакції 01.12.2014

D. O. Minchenko^{1,2}, V.V. Davydov³, O.A. Budreiko³, O.S. Moliavko¹, D.K. Kulieshova³, O.V. Tiazhka², O.H. Minchenko¹

The expression of *CCN2*, *IQSEC*, *RSPO1*, *DNAJC15*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1*, and *IRS2* genes in blood of obese boys with insulin resistance

¹Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Bohomolets National Medical University, Kyiv;

³SI "Institute of children and adolescent health care National Academy of Medical Science of Ukraine", Kharkiv; E-mail: ominchenko@yahoo.com

*The development of obesity and its metabolic complications is associated with dysregulation of various intrinsic mechanisms, which control basic metabolic processes via changes in the expression of numerous regulatory genes. We studied the expression of the subset of genes, which responsible for control of cell growth and glucose metabolism, in blood cells of obese boys with normal and impaired insulin sensitivity as well as in normal (control) individuals. It was shown that obesity with normal insulin sensitivity enhances the expression of *IRS1*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *RSPO1*, *IQSEC*, and *CCN2* genes, but decreases the expression level *IRS2* and *DNAJC15* genes in the blood cells as compared to control group. Insulin resistance in obese boys leads to up-regulation of *IRS2*, *RSPO1*, and *DNAJC15* gene expressions as well as to down-regulation of *IRS1* and *RIPK2* genes in the blood cells versus obese patients with normal insulin sensitivity. Results of this study provide evidence that obesity affects the expression of the subset of genes related to cell growth and glucose metabolism in blood cells and that insulin resistance in obesity is associated with changes in the expression level of *IRS1*, *IRS2*, *RIPK2*, *RSPO1*, and *DNAJC15* genes, which contribute to the development of insulin resistance and glucose intolerance and possibly reflect some changes in fat tissue.*

Key words: mRNA expression; CCN2; IQSEC; RSPO1; DNAJC15; RIPK2; IL13RA2; IRS1; IRS2; blood; obesity; insulin resistance.

INTRODUCTION

The development of obesity as well as its metabolic complications, the most profound public health problems, is associated with dysregulation of numerous intrinsic mechanisms, which control most key metabolic processes, including cellular growth, glucose and lipid metabolism as well as insulin sensitivity [1–5]. Moreover, obesity as well as metabolic syndrome results from interactions between genes and environmental factors and is associated with changes in gene expressions of regulatory network in various organs and tissues, but preferentially in adipose tissue [5–9]. Adipose tissue growth

is in a center of obesity and tightly associated with glucose and lipid metabolism as well as cell proliferation processes and controlled by different interconnected regulatory factors and enzymes [10]. At the same time, the blood reflects numerous changes in different organs and tissues in diseases including obesity [7, 10]. Special interest deserves the key regulatory enzymes and factors, which control glucose and lipid metabolism as well as cell growth [4, 2].

The insulin receptor substrate 1 (*IRS1*) as well as *IRS2* is a cytoplasmic signaling molecule that mediates effects of insulin, insulin-like growth factor 1, and other cytokines by acting as a molecular adaptor between diverse recep-

tor tyrosine kinases and downstream effectors through phosphorylation by the insulin receptor tyrosine kinase upon receptor stimulation as well as other kinases [11, 12]. Moreover, mutations in *IRS1* and *IRS2* genes are associated with type 2 diabetes and susceptibility to insulin resistance because these factors mediate the control of various cellular processes by insulin and dysregulation of these insulin receptor substrates is associated with PDGF-induced cell proliferation [12, 13]. There is data that genetic variation near *IRS1* gene associates with reduced adiposity, decreased IRS1 expression, and an impaired metabolic profile, including an insulin resistance, dyslipidemia, risk of diabetes and decreased adiponectin levels [14]. Furthermore, *IRS1* and *IRS2* genes have both common and different regulatory mechanisms because the double-stranded RNA-dependent protein kinase differentially regulates IRS1 and IRS2 in HepG2 cells [15].

The IL-13RA2 (interleukin-13 receptor-alpha2) is overexpressed in malignant tumors and may induce invasion and metastasis in pancreatic cancer [16, 17]. Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (RIPK2 receptor-interacting protein-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein (CLARP) kinase, is a multifunctional protein, which controls apoptosis [18, 19]. CCN family member 2 (CCN2), also known as CTGF (connective tissue growth factor), is responsible for proliferation, differentiation, and cell adhesion, including mesenchymal stromal cells differentiation into adipocytes [20, 21]. The *IQSEC2* (IQ motif and Sec7 domain 2) gene encodes a guanine nucleotide exchange factor for the ARF family of GTP-binding proteins, which plays multifunctional role including the regulation of cell proliferation. The RSPO1 (R-spondin homolog, *Xenopus laevis*, regulates WNT signaling and controls beta-cell growth and insulin secretagogue [22, 23]. DNAJC15 (DNAJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15) functions as co-chaperone of the human TIM23 pre-protein translocase and acts in the import of proteins

into human mitochondria as well as promotes c-Jun degradation [24, 25].

The endoplasmic reticulum stress is also recognized as an important determinant of obesity, insulin resistance, and impaired glucose tolerance and contributes to the expression profile of many regulatory genes resulting in peripheral insulin resistance and other obesity complications [6, 10, 26-28], although detailed molecular mechanisms cannot be ruled out.

It is possible that identification of real mechanisms of metabolic abnormalities in obesity as well as its complications at molecular and cellular levels helps to better understanding why obesity develops and why only a part of the obese individuals develops secondary metabolic disorders. However, a detailed molecular mechanism of the involvement of different genes of regulatory network in the development of obesity and its complications are not clear yet and remains to be determined.

The main goal of this study was to clarify the role of the subset of gene expressions, encoding for important cell growth factors and enzymes, which control glucose and lipid metabolism, in blood cells of obese boys for evaluation of its possible significance to development of obesity and insulin resistance.

METHODS

The 15 boys participate in this study. They were divided into three equal groups (5 subjects in each group): normal individuals as control and patients with obesity and with or without insulin resistance. All participants gave written informed consent and the studies were approved by the local research ethics committees of Institute of Children and Adolescent Health Care of the National Academy of Medical Science of Ukraine.

Clinical characteristics of the study participants are shown in Table 1. The normal (control) participants were individuals with mean age 14 ± 0.7 years and mean body mass index (BMI) 18.7 ± 0.12 kg/m². The obese participants with

normal insulin sensitivity as well as the patients with insulin resistance were individuals with mean age (14 ± 0.6 and 14 ± 0.4 years, correspondingly) and mean BMI (31.0 ± 0.40 and 34.2 ± 2.39 kg/m², correspondingly).

Thus, BMI, which is a main criteria of obesity, in these last two groups of patients was significantly higher (+66 and +83 %, correspondingly; $P < 0.05$ in both cases) as compared to control individuals (Table 1). Moreover, no significant changes were found in insulin resistance index in obese individuals as compared to control group, but in obese patients with impaired insulin sensitivity, versus control boys as well as obese subjects with normal insulin sensitivity, the insulin resistance index is significantly increased (3.7 and 3.2 fold, correspondingly; $P < 0.05$ in both cases), but decreased (almost two fold; $P < 0.05$) (Table 1). Similar results were observed in the fasting insulin levels: no significant changes in obese individuals and strong increase in obese children with insulin resistance (3.3 fold; $P < 0.05$) as compared to control group. Fasting blood glucose levels were similar in all three groups of the study participants, but 2hrs oral glucose tolerant test was increased in obese boys with insulin resistance versus control group (+25 %; $P < 0.05$) (Table 1).

RNA isolation. Trisol reagent (Invitrogen, USA) was used for RNA extraction from blood of normal (control) and obese individuals with or without insulin resistance.

Reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction analysis.

The expression levels of genes related to regulation of cell growth and glucose homeostasis (*CCN2*, *IQSEC*, *RSPO1*, *DNAJC15*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1*, and *IRS2*) were measured in blood cells by real-time quantitative polymerase chain reaction of complementary DNA (cDNA). QuaniTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Germany) was used for cDNA synthesis. The 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), Absolute QPCR SYBRGreen Mix (Thermo Scientific, UK) and pair of primers specific for each studied gene (Sigma/Aldrich, USA) were used for quantitative polymerase chain reaction (Table 2).

The expression of beta-actin mRNA was used as control of analyzed RNA quantity. The amplified DNA fragments were analyzed on a 2 % agarose gel and that visualized by 5x Sight DNA Stain (EUROMEDEA). An analysis of quantitative PCR was performed using special computer program "Differential expression calculator".

Statistical analyses were performed according to Student's *t*-test using OriginPro 7.5 software. All values are expressed as mean \pm SEM from five independent experiments; $P < 0.05$ was considered as significant difference.

RESULTS AND DISCUSSION

We studied the expression of *CCN2*, *IQSEC*, *RSPO1*, *DNAJC15*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1*,

Table 1. Characteristics of the study participants.

Variable	Control	Obesity	Obesity + IR
Age at visit (years) (<i>n</i>)	14 ± 0.73 (5)	14 ± 0.6 (5)	14 ± 0.38 (5)
Body mass index (BMI) (kg/m ²) (<i>n</i>)	18.7 ± 0.12 (5)	31 ± 0.40 * (5)	34.2 ± 2.39 * (5)
Insulin resistance index (HOMA) (<i>n</i>)	2.36 ± 0.17 (5)	2.70 ± 0.28 (5)	8.70 ± 1.41 * [^] (5)
Fasting insulin (μ IU/ml) (<i>n</i>)	13.0 ± 0.95 (5)	14.1 ± 1.35 (5)	43.4 ± 6.70 * [^] (5)
Fasting glucose (mmol/l) (<i>n</i>)	4.1 ± 0.22 (5)	4.3 ± 0.14 (5)	4.5 ± 0.08 (5)
2h oral glucose tolerance test (OGTT) glucose (mmol/l) (<i>n</i>)	4.28 ± 0.08 (5)	5.08 ± 0.11 (5)	5.36 ± 0.18 * (5)

Data are means \pm SEM; IR – insulin resistance;

* $P < 0.05$ versus control group; [^] - $P < 0.05$ versus obese group.

and *IRS2* genes in blood cells of three groups: normal (control) individuals, obese boys with normal insulin sensitivity and obese patients with insulin resistance. As shown in Fig. 1, the expression level of *IRS1* gene is increased (+68 %; $P < 0.05$) in blood cells of obese boys with normal insulin sensitivity as compared to the group of control children. At the same time, the expression level of *IRS2* gene is significantly decreased (more than 4fold; $P < 0.05$) in blood cells of this experimental group of obese children (Fig. 1). Moreover, the development of

insulin resistance in obese individuals is associated with down-regulation of *IRS1* gene expression (-32 %; $P < 0.05$) in blood cells as compared to group of children with obesity and normal insulin sensitivity. We have also shown that the expression level of *IRS2* gene is increased (+29 %; $P < 0.05$) in blood cells of obese children with impaired glucose tolerance versus group of obese boys without insulin resistance (Fig. 1).

This data has clearly demonstrated that obesity leads to significant dysregulation of

Table 2. Characteristics of the primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction.

Gene symbol	Gene name	Primer's sequence	Nucleotide numbers in sequence	GenBank accession number
<i>CCN2</i> (<i>CTGF</i> , <i>IGFBP8</i>)	CCN family member 2 (connective tissue growth factor; insulin-like growth factor-binding protein 8)	F: 5'- actgtcccggagacaatgac R: 5'- tgctcctaaagccacacctt	1198–1217 1527–1508	NM_001901
<i>IQSEC2</i> (<i>BRAGL1</i>)	IQ motif and Sec7 domain 2 (a Sec7 domain-containing protein BRAG1)	F: 5'- atatggaggctcctgtggtg R: 5'- atatggaggctcctgtggtg	771–790 1012–993	NM_015075
<i>IRS1</i>	insulin receptor substrate 1	F: 5'- agtcccagcaccaacagaac R: 5'- tcatccgaggagatgaaacc	1094–1113 1341–1322	NM_005544
<i>IRS2</i>	insulin receptor substrate 2	F: 5'- acctacgccagcattgactt R: 5'- aacaagggaaagaggcaggt	4469–4488 4725–4706	NM_003749
<i>DNAJC15</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15	F: 5'- tgagttagcgagaagctggt R: 5'- gcatcaatgttgggtggtg	676–695 857–838	NM_013238
<i>RSP01</i>	R-spondin homolog (Xenopus laevis)	F: 5'- tctgagtgatcgcttgggtg R: 5'- atctcagctggggacagaga	416–435 650–631	NM_001038633
<i>RIPK2</i> (<i>CARDIAK</i>)	receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (CARD-containing interleukin-1 beta-converting enzyme-associated kinase)	F: 5'- ttccaatttgggaatttgc R: 5'- atgcgccacttggataaacc	550–569 829–810	NM_003821
<i>IL13RA2</i> (<i>CT19</i>)	interleukin 13 receptor, alpha 2 (cancer/testis antigen 19)	F: 5'- tcttgaaacctggcatagg R: 5'- tctgatgcctccaataggg	591–610 742–723	NM_000640
<i>ACTB</i>	beta-actin	F: 5'- ggacttcgagcaagagatgg R: 5'- agcactgtgtggcgtacag	747–766 980–961	NM_001101

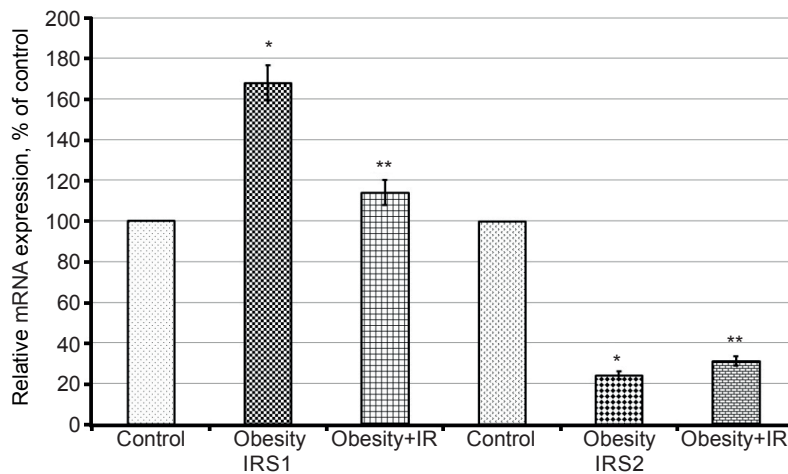


Fig. 1. Relative expression level of insulin receptor substrate 1 (IRS1) and IRS2 mRNA in blood cells of normal boys (Control) and obese individuals with normal insulin sensitivity (Obesity) and obese patients with insulin resistance (Obesity + IR). The values of IRS1 and IRS2 mRNA expression were normalized to the beta-actin mRNA and are expressed as mean \pm SEM and represented as a percent of control (100 %); $n = 5$; * - $P < 0.05$ vs group of control individuals; ** $P < 0.05$ vs group of obese boys with normal insulin sensitivity

IRS1 and *IRS2* gene expressions in blood cells, being more robust for *IRS2* gene and that this dysregulation of insulin receptor substrate genes is contributed to the development of insulin resistance and enhanced cell proliferation. Moreover, we have shown that development of impaired insulin sensitivity in obese individuals is associated with down-regulation of both *IRS1* and *IRS2* gene expressions. This data correlates to results of Yang et al. [15] that IRS1 and IRS2 are differentially regulated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase in HepG2 cells and other authors [12, 13] that both of these genes may participate in the development of obesity and insulin resistance [30, 31].

Investigation of the expression level of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 gene in blood cells of obese boys with normal insulin sensitivity shown significant up-regulation of this gene expression (+69 %; $P < 0.05$) as compared to the group of control children (Fig. 2). At the same time, the expression level of *RIPK2* gene is slightly decreased in blood cells of obese children, which have

insulin resistance, versus group of obese boys with normal insulin sensitivity. As shown in Fig. 2, the expression level of other gene encoded interleukin 13 receptor-alpha 2 is also strongly increased in blood cells of obese children (+82 %; $P < 0.05$), but development of insulin resistance does not change significantly the level of this gene expression.

It is possible that overexpression of *IL13RA2* and *RIPK2* genes in obesity reflects its contribution to development of obesity as regulatory factors controlling cellular growth, apoptosis, invasion and metastasis, because interleukin-13 receptor-alpha2 is overexpressed in malignant tumors [16, 17]. Moreover, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 as multifunctional protein controls both apoptosis and cytokine responses [18, 19].

We also studied the expression of *CCN2* gene encoded connective tissue growth factor as well as *IQSEC2* gene encodes a guanine nucleotide exchange factor for the ARF family of GTP-binding proteins in blood cells of obese children with and without insulin resistance. As shown in Fig. 3, the expression of *CCN2* and *IQSEC2* genes is increased in obesity, being more robust for *IQSEC2* gene (+19% for *CCN2* gene

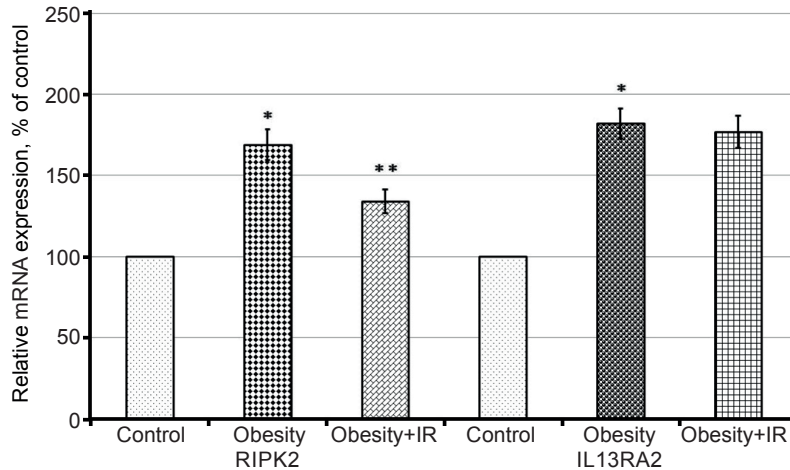


Fig. 2. Relative expression level of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (RIPK2) and interleukin 13 receptor-alpha 2 (IL13RA2) mRNA in blood cells of normal boys (Control) and obese individuals with normal insulin sensitivity (Obesity) and obese patients with insulin resistance (Obesity + IR). The values of RIPK2 and IL13RA2 mRNA expression were normalized to the beta-actin mRNA and are expressed as mean \pm SEM and represented as a percent of control (100 %); $n = 5$; * $P < 0.05$ vs group of control individuals; ** $P < 0.05$ vs group of obese boys with normal insulin sensitivity

and +57 % for *IQSEC2* gene; both $P < 0.05$), though development of insulin resistance does not change significantly the expression level of both these genes. Enhanced expression of both *CCN2* and *IQSEC2* genes possibly contributes to obesity, because there is data that *CCN2* gene is responsible for proliferation, differentiation, and cell adhesion, including mesenchymal stromal cells differentiation into adipocytes [20, 21].

We next tested whether obesity also affects the expression of *RSPO1* and *DNAJC15* genes. As shown in Fig. 4, the expression level of *RSPO1* gene is up-regulated in blood cells of obese boys with normal insulin sensitivity (+35 %; $P < 0.05$). Furthermore, the development of insulin resistance in obese individuals leads to additional increase of this gene expression (+12 %; $P < 0.05$). At the same time, *DNAJC15* gene has

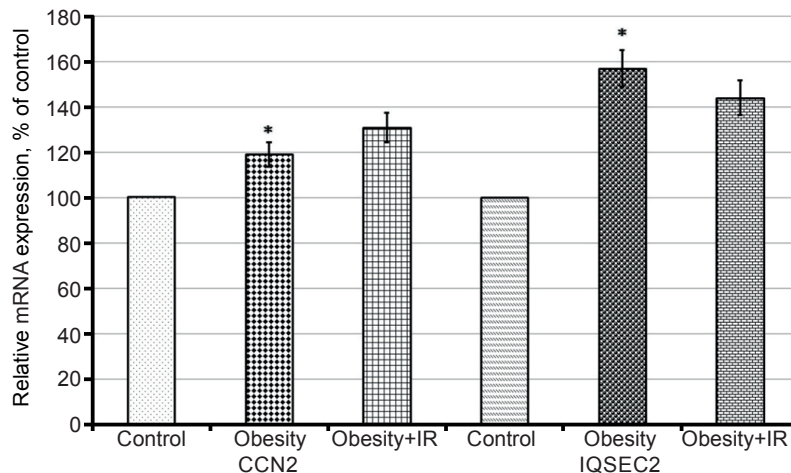


Fig. 3. Relative expression level of CCN family member 2 (CCN2), also known as connective tissue growth factor (CTGF), and IQ motif and Sec7 domain 2 (IQSEC2) mRNA in blood cells of normal boys (Control) and obese individuals with normal insulin sensitivity (Obesity) and obese patients with insulin resistance (Obesity + IR). The values of CCN2 and IQSEC2 mRNA expression were normalized to the beta-actin mRNA and are expressed as mean \pm SEM and represented as a percent of control (100 %); $n = 5$; * $P < 0.05$ vs group of control individuals

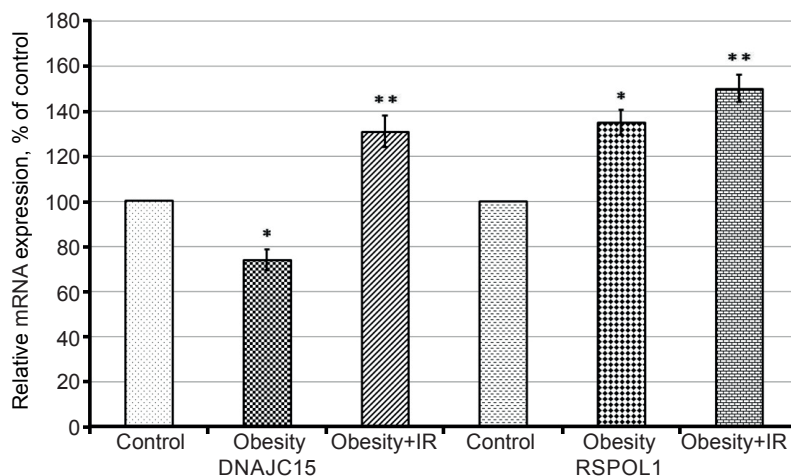


Fig. 4. Relative expression level of DNAJC15 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15) and RSPOL1 (R-spondin homolog, *Xenopus laevis*) mRNA in blood cells of normal boys (Control) and obese individuals with normal insulin sensitivity (Obesity) and obese patients with insulin resistance (Obesity + IR). The values of DNAJC15 and RSPOL1 mRNA expression were normalized to the beta-actin mRNA and are expressed as mean \pm SEM and represented as a percent of control (100 %); $n = 5$; * $P < 0.05$ vs group of control individuals; ** $P < 0.05$ vs group of obese boys with normal insulin sensitivity

been shown to exhibit distinct pattern of expression in blood cells in obesity with and without insulin resistance (Fig. 4). Thus, the expression level of *DNAJC15* gene is decreased in obese children with normal insulin sensitivity (-26 %; $P < 0.05$) and strongly increased in boys with obesity and insulin resistance (+77 %; $P < 0.05$).

There is data that obesity is associated with insulin resistance and hyperinsulinemia [29] and increased expression of RSPOL1 is agreed with this data, because this protein regulates WNT signaling and controls beta-cell growth as well as insulin secretagogue [22, 23].

Thus, results of this study provide evidence that obesity affects the expression of the subset of genes related to cell growth, apoptosis, and glucose metabolism in blood cells and that impaired insulin sensitivity in obesity is associated with changes in the expression level of *IRS1*, *IRS2*, *RIPK2*, *RSPO1*, and *DNAJC15* genes, which possibly contribute to the development of insulin resistance and glucose intolerance as well as reflect some changes in other tissues, including fat tissue.

CONCLUSIONS

1. Obesity (with normal insulin sensitivity) enhances the expression of *IRS1*, *RIPK2*,

IL13RA2, *RSPO1*, *IQSEC*, and *CCN2* genes, which control glucose metabolism and cell growth, in the blood cells versus control.

2. The expression of *IRS2*, *RSPO1*, and *DNAJC15* genes is up-regulated in blood cells of obese boys with insulin resistance versus obese patients with normal insulin sensitivity; however, the expression of *IRS1* and *RIPK2* genes is down-regulated.

3. This study has demonstrated that obesity affects the expression of the subset of genes related to the control of glucose metabolism and cellular growth and that insulin resistance in obesity is associated with changes in the expression level of *IRS1*, *IRS2*, *RIPK2*, *RSPO1*, and *DNAJC15* genes in blood cells contributing to the development of the obesity and its complications.

Д.О. Мінченко, В.В. Давидов, О.А. Бурдейко,
О.С. Молявко, Д.К. Кулешова, О.В. Тяжка,
О.Г. Мінченко

**ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *CCN2*, *IQSEC*, *RSPO1*,
DNAJC15, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1* ТА *IRS2* У
КРОВІ ДІТЕЙ ЧОЛОВІЧОЇ СТАТІ ЗА УМОВ
ОЖИРІННЯ ТА РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО
ІНСУЛІНУ**

Розвиток ожиріння та його метаболічних ускладнень зумовлений дисрегуляцією ключових механізмів, що контролюють

люють основні метаболічні процеси за допомогою змін в експресії численних регуляторних генів. Ми дослідили експресію групи генів, які відповідальні за контроль росту клітин та метаболізму глюкози, у дітей чоловічої статі з ожирінням, що мали нормальну або порушену чутливість до інсуліну, а також у нормальних (контроль) індивідуумів. Показано, що ожиріння без порушення чутливості до інсуліну призводить до посилення експресії генів *IRS1*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *RSPO1*, *IQSEC* та *CCN2*, але знижує рівень експресії генів *IRS2* та *DNAJC15* у клітинах крові при порівнянні з контрольною групою дітей. Порушення чутливості до інсуліну у дітей з ожирінням призводить до посилення експресії генів *IRS2*, *RSPO1* і *DNAJC15* та до зниження експресії генів *IRS1* і *RIPK2* у клітинах крові у порівнянні з пацієнтами, що мали ожиріння і нормальну чутливість до інсуліну. Результати цієї роботи свідчать про те, що ожиріння змінює у клітинах крові експресію групи генів, які контролюють ріст клітин та метаболізм глюкози, і що резистентність до інсуліну за умов ожиріння асоціюється зі змінами в рівні експресії генів *IRS1*, *IRS2*, *RIPK2*, *RSPO1* та *DNAJC15*, які роблять певний внесок у розвиток цієї резистентності та порушення толерантності до глюкози і можливо віддзеркалюють певні зміни в інших тканинах.

Ключові слова: експресія мРНК; *CCN2*; *IQSEC*; *RSPO1*; *DNAJC15*; *RIPK2*; *IL13RA2*; *IRS1*; *IRS2*; кров; ожиріння; резистентність до інсуліну.

Д.А. Минченко, В.В. Давыдов, Е.А. Бурдейко, О.С. Молявко, Д.К. Кулешова, А.В. Тяжкая, А.Г. Минченко

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *CCN2*, *IQSEC*, *RSPO1*, *DNAJC15*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *IRS1* И *IRS2* В КРОВИ ДЕТЕЙ МУЖСКОЙ СТАТИ ПРИ ОЖИРЕНИИ И РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ

Развитие ожирения и его метаболических осложнений обусловлено дисрегуляцией ключевых механизмов, что контролируют основные метаболические процессы путем изменений в экспрессии многочисленных регуляторных генов. Мы изучили экспрессию группы генов, которые ответственны за контроль роста клеток и метаболизм глюкозы, у детей мужского пола с ожирением, что имели нормальную или нарушенную чувствительность к инсулину, а также у нормальных (контроль) индивидумов. Показано, что ожирение без нарушения чувствительности к инсулину приводит к усилению экспрессию генов *IRS1*, *RIPK2*, *IL13RA2*, *RSPO1*, *IQSEC* и *CCN2*, но снижает уровень экспрессии генов *IRS2* и *DNAJC15* в клетках крови при сравнении с контрольной группой детей. Резистентность к инсулину у детей с ожирением приводит к усилению экспрессии генов *IRS2*, *RSPO1* и *DNAJC15* и к снижению экспрессии генов *IRS1* и *RIPK2* в клетках крови в сравнении с пациентами, что имели ожирение и нормальную чувствительность к инсулину. Результаты этой работы

свидетельствуют о том, что ожирение изменяет в клетках крови экспрессию группы генов, контролирующей рост клеток и метаболизм глюкозы. Более того, резистентность к инсулину при ожирении ассоциируется с изменениями в уровне экспрессии генов *IRS1*, *IRS2*, *RIPK2*, *RSPO1* и *DNAJC15*, которые вносят определенный вклад в развитие этой резистентности и нарушение толерантности к глюкозе и возможно отражают определенные изменения в других тканях.

Ключевые слова: экспрессия мРНК; *CCN2*; *IQSEC*; *RSPO1*; *DNAJC15*; *RIPK2*; *IL13RA2*; *IRS1*; *IRS2*; кровь; ожирение; резистентность к инсулину.

REFERENCES

1. Bray MS, Young ME. The role of cell-specific circadian clocks in metabolism and disease. *Obes Rev* 2009; 10(Suppl 2): 6–13.
2. Bray MS, Young ME. Regulation of fatty acid metabolism by cell autonomous circadian clocks: time to fatten up on information? *J Biol Chem* 2011; 286 (14): 11883–9.
3. Kovac J, Husse J, Oster H. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock. *Mol Cells* 2009; 282: 75–80.
4. Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2013; 123 (7): 2764–72.
5. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest* 2011; 121 (6): 2133–41.
6. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 2012; 197 (7): 857–67.
7. Ando H, Kumazaki M, Motosugi Y, Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa E, Fujimura A. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. *Endocrinology* 2011; 152 (4): 1347–54.
8. Shimba S, Ogawa T, Hitosugi S, Ichihashi Y, Nakadaira Y, Kobayashi M, Tezuka M, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y, Komiyama K, Okamatsu-Ogura Y, Kimura K, Saito M. Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PLoS One* 2011; 6 (9): e25231.
9. Duong HA, Robles MS, Knutti D, Weitz CJ. A molecular mechanism for circadian clock negative feedback. *Science* 2011; 332 (6036): 1436–9.
10. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306: 457–61.
11. Ridderstrale M, Degerman E, Tornqvist H. Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in primary adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270 (8): 3471–4.
12. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity

- by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 2012; 55(10): 2565-82.
13. Zhao Y, Biswas SK, McNulty PH, Kozak M, Jun JY, Segar L. PDGF-induced vascular smooth muscle cell proliferation is associated with dysregulation of insulin receptor substrates. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2011; 300 (6): C1375-85.
 14. Kilpelainen TO, Zillikens MC, Stancakova A, Finucane FM, Ried JS, Langenberg C, Zhang W, Beckmann JS, Luan J, Vandenput L. et al. Genetic variation near *IRS1* associates with reduced adiposity and an impaired metabolic profile. *Nat Genet* 2011; 43 (8): 753-60.
 15. Yang X, Nath A, Opperman MJ, Chan C. The double-stranded RNA-dependent protein kinase differentially regulates insulin receptor substrates 1 and 2 in HepG2 cells. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 3449-58.
 16. Fujisawa T, Joshi B, Nakajima A, Puri RK. A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2009; 69 (22): 8678-85.
 17. Lai EW, Joshi BH, Martiniova L, Dogra R, Fujisawa T, Leland P, de Krijger RR, Lubensky IA, Elkahoul AG, Morris JC, Puri RK, Pacak K. Overexpression of interleukin-13 receptor-alpha2 in neuroendocrine malignant pheochromocytoma: a novel target for receptor directed anti-cancer therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94 (8): 2952-7.
 18. Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Imazeki F, Yokosuka O. Knockdown of receptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (*RIPK2*) affects EMT-associated gene expression in human hepatoma cells. *Anticancer Res* 2012; 32: 3775-83.
 19. Tigno-Aranjuez JT, Asara JM, Abbott DW. Inhibition of *RIP2*'s tyrosine kinase activity limits *NOD2*-driven cytokine responses. *Genes Dev* 2010; 24: 2666-77.
 20. Chang CC, Hsu WH, Wang CC, Chou CH, Kuo MY, Lin BR, Chen ST, Tai SK, Kuo ML, Yang MH. Connective tissue growth factor activates pluripotency genes and mesenchymal-epithelial transition in head and neck cancer cells. *Cancer Res* 2013; 73 (13): 4147-57.
 21. Battula VL, Chen Y, Cabreira Mda G, Ruvolo V, Wang Z, Ma W, Konoplev S, Shpall E, Lyons K, Strunk D, Bueso-Ramos C, Davis RE, Konopleva M, Andreeff M. Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. *Blood* 2013; 122 (3): 357-66.
 22. Wong VS, Yeung A, Schultz W, Brubaker PL. R-spondin-1 is a novel beta-cell growth factor and insulin secretagogue. *J Biol Chem* 2010; 285 (28): 21292-302.
 23. Lau YF, Li Y. The human and mouse sex-determining *SRY* genes repress the *Rspol*/beta-catenin signaling. *J Genet Genomics* 2009; 36 (4): 193-202.
 24. Schusdziarra C, Blamowska M, Azem A, Hell K. Methylation-controlled J-protein *MJC* acts in the import of proteins into human mitochondria. *Hum Mol Genet* 2013; 22 (7): 1348-1357.
 25. Hatle KM, Neveu W, Dienz O, Rymarchyk S, Barrantes R, Hale S, Farley N, Lounsbury KM, Bond JP, Taatjes D, Rincon M. Methylation-controlled J protein promotes c-Jun degradation to prevent *ABC1* transporter expression. *Mol Cell Biol* 2007; 27 (8): 2952-2966.
 26. Lee J, Ozcan U. Unfolded Protein Response Signaling and Metabolic Diseases. *J Biol Chem* 2014; 289 (3): 1203-11.
 27. Minchenko OH, Kubaichuk KI, Minchenko DO, Kovalenska OV, Kulinich AO, Lypova NM. Molecular mechanisms of *ERN1*-mediated angiogenesis. *Int J Physiol Pathophysiol* 2014; 5 (1): 1-22.
 28. Yuzefovych LV, Musiyenko SI, Wilson GL, Rachek LI. Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice. *PLoS One* 2013; 8 (1): e54059.
 29. Minchenko D, Ratushna O, Bashta Y, Herasyenko R, Minchenko O. The expression of *TIMP1*, *TIMP2*, *VCAN*, *SPARC*, *CLEC3B* and *E2F1* in subcutaneous adipose tissue of obese males and glucose intolerance. *CellBio* 2013; 2 (2): 25-33.
 30. Long YC, Cheng Z, Copps KD, White MF. Insulin receptor substrates *Irs1* and *Irs2* coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways. *Mol Cell Biol* 2011; 31 (3): 430-41.
 31. Guo S, Copps KD, Dong X, Park S, Cheng Z, Poci A, Rossetti L, Sajan M, Farese RV, White MF. The *Irs1* branch of the insulin signaling cascade plays a dominant role in hepatic nutrient homeostasis. *Mol Cell Biol* 2009; 29 (18): 5070-83.

Received 08.09.2014

В.Ю. Гарбузова¹, Д.А. Строй², В.Є. Досенко², Є.І. Дубовик¹, А.О. Бороденко¹,
К.А. Шимко¹, О.А. Обухова¹, О.В. Атаман¹

Асоціація поліморфізму генів системи матриксного Gla-протеїну з розвитком ішемічного атеротромботичного інсульту

¹ Сумський державний університет;

² Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
vikgarbuzova@yandex.ru

Наведено результати визначення 10 поліморфізмів генів системи матриксного Gla-протеїну (ген MGP – T¹³⁸→C (rs1800802), G⁻⁷→A (rs1800801), Thr₈₃→Ala (rs4236); ген VDR – FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236), ген GG CX – Arg₃₂₅→Gln (rs699664), ген VKORC1 – T²²⁵⁵→C (rs2359612), ген BMP-2 – Ser₃₇→Ala (rs2273073)) у 170 хворих з ішемічним атеротромботичним інсультом (ІАТІ) і 124 здорових індивідумів (контрольна група). Встановлено, що існує зв'язок між ІАТІ і поліморфними варіантами генів MGP (G⁻⁷→A) та VKORC1 (T²²⁵⁵→C). Ризик розвитку ІАТІ у носіїв мінорного алеля А/А (G⁻⁷→A-поліморфізм) у 2,6 вищий, ніж у носіїв основного алеля (G/A+G/G), а у осіб з генотипом С/С (T²²⁵⁵→C-поліморфізм) у 2,2 раза більший, ніж у гомозигот за основним алелем. Збіг у пацієнтів генотипів Т/С і G/G, С/С і G/A, а також генотипу А/А (G⁻⁷→A-поліморфізм) із будь-яким з генотипів за T²²⁵⁵→C-поліморфізмом збільшує ризик розвитку ІАТІ.

Ключові слова: матриксний Gla-протеїн, поліморфізм генів, ішемічний інсульт.

ВСТУП

Чинниками, з якими пов'язують розвиток ускладнень артеріосклерозу, серед яких і ІАТІ, є кальцифікація артерій, яка може відбуватися як в інтимі (мінералізація атеросклеротичних бляшок), так і в середньому шарі судинної стінки (склероз Менкеберга) [1,2]. На думку багатьох авторів відкладання солей кальцію в структурах артерій - несприятливий прогностичний фактор, що свідчить про високу ймовірність настання фатальних ускладнень [3,4]. Однією з центральних ланок у захисті судин від ектопічної кальцифікації є білок – матриксний Gla-протеїн (MGP), наявність якого в тканинах перешкоджає як ініціюванню патологічного обвапнення, так і його поширенню [5,6]. У великій кількості праць удалося з'ясувати механізми регуляції

експресії гена MGP, і виявити можливі шляхи реалізації антикальциногенних властивостей відповідного білка. Це дало підстави говорити про функціональну систему MGP, до якої можуть бути зараховані, крім самого протеїну, такі чинники, як рецептор вітаміну D (VDR) – важливий регулятор експресії гена MGP, ферменти, що беруть участь у біохімічних перетвореннях MGP, вітамін К-оксидоредуктаза (VKOR) і γ-глутамілкарбоксилаза (GGCX), а також можливі мішені для MGP, зокрема кістковий морфогенетичний протеїн (BMP-2). Ефективна діяльність цієї системи може залежати від багатьох факторів, серед яких поліморфізм генів, що кодують структуру відповідних білків. Сьогодні вивчається зв'язок різних алельних варіантів гена MGP з серцево-судинними захворюваннями (ате-

© В.Ю. Гарбузова, Д.А. Строй, В.Є. Досенко, Є.І. Дубовик, А.О. Бороденко, К.А. Шимко, О.А. Обухова, О.В. Атаман

росклероз, інфаркт міокарда, інсульт) [7-11], остеопорозом [12], сечокам'яною хворобою [13], втратою зубів [14], інтоксикацією свинцем [15]. Отримані дані неоднозначні і досить суперечливі. Комплексні дослідження, у яких би вивчалася роль генетичного поліморфізму *MGP* і пов'язаних із ним протеїнів у розвитку серцево-судинних недуг, до цього часу не проводилися. У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчення частоти алельних варіантів генів системи MGP (*MGP*, *VDR*, *VKORC1*, *GGCX*, *BMP-2*) у хворих з ІАТІ і проведення аналізу комплексного впливу вивчених поліморфізмів на розвиток хвороби.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено із використанням венозної крові 170 хворих з ІАТІ (42,4% жінок і 57,6% чоловіків) віком від 40 до 85 років (середній вік – $64,7 \pm 0,73$ роки), що перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні Сумської клінічної лікарні №5.

Ішемічний характер інсульту встановлювався за даними анамнезу і клінічної картини хвороби, результатами МРТ-дослідження головного мозку. Патогенетичний варіант інсульту визначали відповідно до критеріїв TOAST [16].

Група контролю складалася з 124 практично здорових донорів, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували збирання анамнестичних даних, зняття електрокардіограми і вимірювання артеріального тиску.

Контрольна група і група хворих з ІАТІ не відрізнялися за співвідношенням осіб різної статі ($P=0,294$ за χ^2 -критерієм), проте середній вік першої ($76,7 \pm 0,93$ роки) був істотно вищим, ніж другої ($P < 0,001$). Остання обставина збільшувала надійність контролю, оскільки зменшувалася ймовірність розвитку ІАТІ у пацієнтів контрольної групи в майбутньому.

Венозну кров набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл із калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кис-

лоти (11,7 мМ) ("Sarstedt", Німеччина), заморожували та зберігали при температурі -20 °С. ДНК виділяли з цільної крові з використанням наборів DIAAtom DNA Prep 200 («Isogene», Росія).

У роботі було вивчено 10 поліморфізмів: промотору гена *MGP* T¹³⁸→C (rs 1800802), стартової точки гена *MGP* G⁻⁷→A (rs 1800801), 4-го екзону гена *MGP* Thr₈₃→Ala (rs 4236), 2-го екзону гена *VDR* FokI (rs 2228570), 8-го інтрону гена *VDR* BsmI (rs 1544410) і *ApaI* (rs 7975232), 9-го екзону гена *VDR* TaqI (rs 731236), 8-го екзону гена *GGCX* Arg₃₂₅→Gln (rs 699664), 2-го інтрону гена *VKORC1* T²²⁵⁵→C (rs 2359612), 2-го екзону гена *BMP-2* Ser₃₇→Ala (rs 2273073).

Алельний поліморфізм вивчали методом полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) (табл. 1). Використовували праймери, синтезовані фірмою "Metabion" (Німеччина), і ферменти (Taq-полімераза і рестриктази) фірми "Thermo Scientific" (США). PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія).

Статистичний аналіз провели з використанням середовища для статистичної обробки інформації R, а також програми MDR версії 2.0. Перевірку різниці розподілу генотипів здійснювали за допомогою χ^2 -критерію Пірсона. Відмінність вважали статистично значимою при $P < 0,05$. Для прогнозування ризику виникнення ІАТІ використовували метод логістичної регресії. Вибір головних предикторів розвитку ускладнень атеросклеротичного процесу серед вивчених поліморфізмів здійснювали методом "Random Forest" [17-20]. І нарешті для виявлення та характеристики міжгенних взаємодій використовували метод MDR (від англ. multifactor dimensionality reduction) [21].

Таблиця 1. Методика проведення полімеразної ланцюгової реакції

Ген, поліморфізми	Праймери	Температура відпалу (час)	Розмір ампліфікатів (пари основ)	Рестриктаза	Розмір фрагментів рестрикції
<i>MGP</i> , T ¹³⁸ →C (rs 1800802)	П: 5'-AAGCATACGATGGCCAAAATTCTGCA-3' 3: 5'-GAACTAGCATTGGAACSTTTCCCAACC-3'	57°C (60 с)	142	<i>Bse</i> NI	118, 24
<i>MGP</i> , G ⁻⁷ →A (rs 1800801)	П: 5'-CTAGTTCAGTGCCAACCSTTCCCCACC-3' 3: 5'-TAGCAGCAGTAGGGAGAGAGGGCTCCCA-3'	64,5°C (45 с)	500	<i>Nco</i> I	240, 260
<i>MGP</i> , Thr ₈₃ →Ala (rs 4236)	П: 5'-TCAATAGGGAAGCCTGTGATG-3' 3: 5'-AGGGGG ATACAAAATCAGGTG-3'	64,5°C (45 с)	173	<i>Eco</i> 47I	127, 46
<i>VDR</i> , FokI (rs 2228570)	П: 5'-AGCTGGCCTGGCACTGACTCTG-3' 3: 5'-ATGGA AACACSTTGTCTTCTTCCCTC-3'	64,5°C (45 с)	267	<i>Fok</i> I	204, 63
<i>VDR</i> , BsmI (rs 1544410)	П: 5'-AGGGAGACGTAGCAAAAAGGAG-3' 3: 5'-TGTCCCAAGGTCACAATAAC-3'	60°C (45 с)	425	<i>Bsm</i> I	232, 193
<i>VDR</i> , ApaI (rs 7975232)	П: 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' 3: 5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3'	64,5°C (45 с)	501	<i>Apa</i> I	284, 217
<i>VDR</i> , TaqI (rs 731236)	П: 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' 3: 5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3'	64,5°C (45 с)	501	<i>Taq</i> I	294, 207
<i>GGCX</i> , Arg ₃₂₅ →Gln (rs 699664)	П: 5'-GGAGAAGTCTCCTAAGGGAACG-3' 3: 5'-AGTC CAGCSTTTGTGTACACT -3'	65°C (30 с)	384	<i>Xmn</i> I	216, 168
<i>VKORC1</i> , T ²²⁵⁵ →C (rs 2359612)	П: 5'-GAACAGAGAGAGGAACCAAGGGAGTGGA-3' 3: 5'-TCTGAACCATGTGTCAGCCAGGACC-3'	62,5°C (45 с)	198	<i>Nco</i> I	172, 26
<i>BMP-2</i> , Ser ₃₇ →Ala (rs 2273073)	П: 5'-CTCAGTCGGTCCCTGTC C-3' 3: 5'-CCCTGCTCCATGCCTCAC-3'	60°C (60 с)	393	<i>Hpy</i> 99I	253, 140

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генотипування хворих із ІАТІ по десяти сайтах генів системи *MGP* і порівняння одержаних даних з результатами рестрикційного аналізу в контрольній групі дало змогу встановити частоту, з якою зустрічаються певні варіанти цих генів (табл. 2). Розподіл алейних варіантів у хворих із ІАТІ і практично здорових осіб достовірно відрізнявся тільки для генів *MGP* за поліморфізмом G⁻⁷→A (P = 0,051) і *VKORC1* за поліморфізмом T²²⁵⁵→C (P = 0,043). Таким чином, існує зв'язок між даними поліморфізмами і розвитком ІАТІ. Використання методу логістичної регресії підтвердило цей висновок: у носіїв генотипу А/А за поліморфізмом G⁻⁷→А ризик розвитку ІАТІ у 2,6 рази вищий, ніж у носіїв основного алейя (G/A+G/G). У жінок він ще

більший: особи жіночої статі, гомозиготні за мінорним алейем (А/А), у 6,6 рази частіше хворіють на ІАТІ, ніж жінки-носії основного алейя (G/A+G/G) (табл. 3). У носіїв генотипу C/C за поліморфізмом T²²⁵⁵→C гена *VKORC1* ризик ІАТІ у 2,2 рази більший, ніж у гомозигот за основним алейем (табл. 4).

Результати комплексного аналізу частоти алейних варіантів генів системи *MGP* у пацієнтів з серцево-судинними захворюваннями нечисленні. У 2010 р. Shyu та співавт. досліджували зв'язок поліморфних варіантів генів *GGCX* (Gln₃₂₅→Arg), *VKORC1* (rs9923231) та *NQO1* (Pro₁₈₇→Ser) з ІАТІ і виявили статистично значимий протективний ефект зазначених поліморфізмів відносно ризику розвитку ішемічного інсульту. Синергізм досліджуваних локусів був більш вираженим у пацієнтів, які не вживали спиртних напоїв

Таблиця 2. Розподіл алельних варіантів за поліморфізмами генів системи MGP у контрольній групі та у хворих з ішемічним атеросклеротичним інсультом (ІАТІ)

Ген, поліморфізми	Контрольна група (1/1 : 1/2 : 2/2)	Хворі на ІАТІ (1/1 : 1/2 : 2/2)	P
<i>MGP</i> , T ¹³⁸ →C (rs 1800802)	59,7 : 35,5 : 4,8	61,2 : 31,2 : 7,6	0,521
<i>MGP</i> , G ⁻⁷ →A (rs 1800801)	43,5 : 50,0 : 6,5	35,9 : 48,8 : 15,3	0,051
<i>MGP</i> , Thr ₈₃ →Ala (rs 4236)	34,7 : 53,2 : 12,1	39,4 : 48,8 : 11,8	0,701
<i>VDR</i> , FokI (rs 2228570)	27,4 : 48,4 : 24,2	23,5 : 53,5 : 22,9	0,654
<i>VDR</i> , BsmI (rs 1544410)	46 : 41,9 : 12,1	41,8 : 43,5 : 14,7	0,707
<i>VDR</i> , ApaI (rs 7975232)	31,5 : 42,7 : 25,8	26,5 : 50,0 : 23,5	0,454
<i>VDR</i> , TaqI (rs 731236)	43,5 : 45,2 : 11,3	40,0 : 48,2 : 11,8	0,829
<i>GGCX</i> , Arg ₃₂₅ →Gln (rs 699664)	36,3 : 50,8 : 12,9	31,8 : 50,0 : 18,2	0,423
<i>VKORC1</i> , T ²²⁵⁵ →C (rs 2359612)	36,3 : 42,7 : 21,0	25,3 : 42,4 : 32,4	0,043
<i>BMP-2</i> , Ser ₃₇ →Ala (rs 2273073)	44,4 : 39,5 : 16,1	38,2 : 37,6 : 24,1	0,231

Примітка: 1/1:1/2:2/2 – співвідношення гомозигот за основним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем; P – показник значимості відмінностей у розподілі генотипів між контрольною групою та хворими на ІАТІ

та не були курцями [22]. Дослідження інших авторів довели, що поліморфізм першого інтрону C¹¹⁷³→T гена *VKORC1* асоційований з кальцифікацією кровоносних судин і є важливим генетичним фактором розвитку атеросклерозу [23]. Wang та співавт., вивча-

ючи розподіл генотипів за T²²⁵⁵→C-поліморфізмом гена *VKORC1*, виявили, що наявність C-алелю більше ніж удвічі підвищує ризик розвитку ішемічної хвороби серця та інсульту та понад у три рази – розшарування аорти [24]. Проте Hindorff та співавт. не підтвердили

Таблиця 3. Аналіз ризику ішемічного атеросклеротичного інсульту залежно від генотипу за G⁻⁷→A поліморфізмом гена MGP в осіб жіночої і чоловічої статей

Група	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
Загалом	0,962	0,423	5,174	0,023	2,618	1,142	6,000
Жінки	1,894	0,775	5,976	0,015	6,645	1,456	30,339
Чоловіки	0,207	0,550	0,142	0,706	1,230	0,419	3,617

Примітка: порівнюються гомозиготи за мінорним алелем (A/A) з носіями основного алеля (G/A+G/G); CR – коефіцієнт регресії; SE – стандартна похибка; WS – статистика Вальда; P – статистична значимість; OR – відношення ризику; CI – довірчий інтервал

Таблиця 4. Аналіз ризику ішемічного атеросклеротичного інсульту залежно від генотипу за T²²⁵⁵→C поліморфізмом гена *VKORC1*

Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
C/C	0,795	0,320	6,184	0,013	2,214	1,183	4,141
T/C	0,352	0,280	1,582	0,208	1,422	0,822	2,460

Примітка: порівняння проводилося відносно гомозигот за основним алелем (Т/Т); CR – коефіцієнт регресії; SE – стандартна похибка; WS – статистика Вальда; P – статистична значимість; OR – відношення ризику; CI – довірчий інтервал

цього висновку. Вивчаючи зв'язок групи поліморфізмів гена *VKORC1*, серед яких T²²⁵⁵→C, з інфарктом міокарда та іншими серцево-судинними хворобами, автори показали, що жоден із досліджуваних поліморфних варіантів не був асоційований з розвитком захворювань серця і судин, що вивчалися [25].

Наступним кроком нашого дослідження стало вивчення поєднаного впливу поліморфізму генів системи MGP і з'ясування їх спільного внеску в розвиток ІАТІ. Подібний аналіз надав можливість виявити найінформативніші комбінації поліморфних локусів, які у разі поєднаного впливу мають найбільше значення у розвитку ІАТІ. Першим в алгоритмі аналізу даних був застосований метод "Random Forest". Він дав змогу побудувати

модель, яка відображає всі досліджувані поліморфізми (предиктори) згідно з рівнем їх важливості (ступенем внеску в розвиток ІАТІ та здатністю прогнозувати ризик його виникнення). Згідно з цим методом дослідження найбільш важливим серед усіх предикторів є T²²⁵⁵→C-поліморфізм гена *VKORC1* (рис. 1).

Для вдосконалення класифікаційної моделі був використаний метод селекції найбільш значимих предикторів, запропонований С. Strobl [20]. Згідно з цим, рандомізаційна значимість факторів ризику, що мають незначний вплив на ризик виникнення захворювання, коливається близько нуля. Абсолютне значення чинника з найменшим показником рандомізаційної важливості є пороговою і опорною величиною для вертикальної лінії.

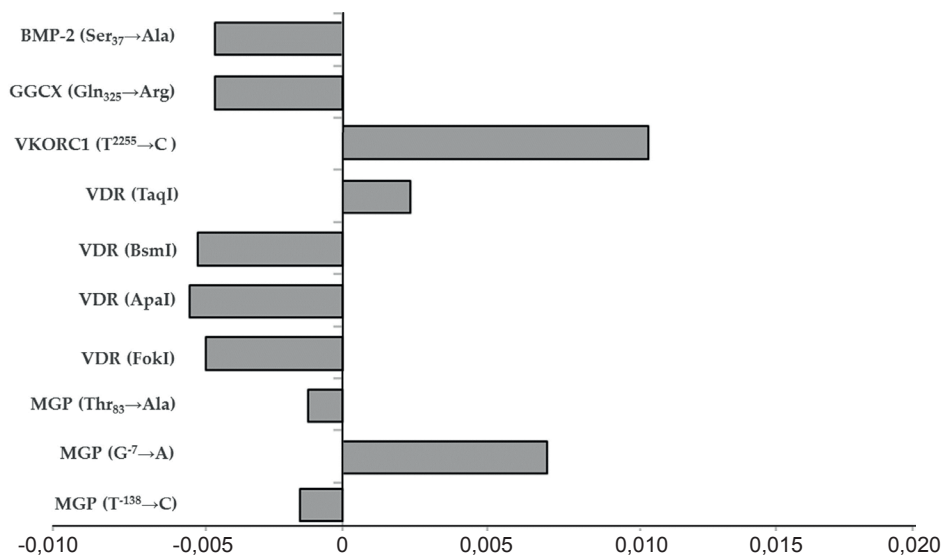


Рис. 1 Предиктори розвитку ішемічного атеросклеротичного інсульту за рівнем їх значимості (метод "Random Forest")

Усі значущі предиктори повинні перетнути цю межу (рис. 2). Як і при попередньому

аналізі, підтверджено, що найбільш вагомим предиктором розвитку ІАТІ є $T^{2255} \rightarrow C$ -

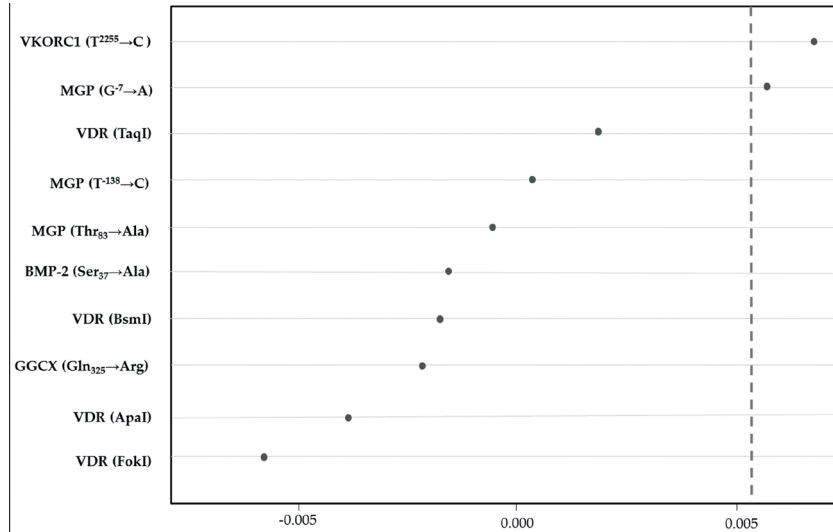


Рис. 2 Результати методу фільтрації «шумів». Важливі предиктори розміщені праворуч від пунктирної лінії

ліморфізм гена *VKORC1*. Для подальшого дослідження були обрані лише ті поліморфні варіанти вивчених генів, які розміщені праворуч від пунктирної лінії. На їх основі була створена класифікаційна модель, яка мала прогностичну значущість 58% з крос-перевірочною здатністю 10/10.

На рис. 3 відображена комбінація генотипів $T^{2255} \rightarrow C$ та $G^{-7} \rightarrow A$. Виявлено, що у разі збігу генотипів T/C і G/G, C/C і G/A, а також генотипу A/A ($G^{-7} \rightarrow A$ - поліморфізм) із будь-яким з генотипів за $T^{2255} \rightarrow C$ -поліморфізмом ризик розвитку ІАТІ зростає. Методом MDR встановлено, що найбільша частка ентропії стосовно до статусу «випадок-контроль» пов'язана з поліморфними сайтами $G^{-7} \rightarrow A$ та $T^{2255} \rightarrow C$ і дорівнює 1,54 % та 1,55 % відповідно (рис. 4). Проте аналіз міжгенних взаємодій виявив, що синергічний ефект даних локусів хоча і наявний, але виражений слабо (0,80 %). Характер та сила взаємодії між іншими предикторами є ще менш значними та важливими. Насамкінець нами були проведені пермутаційні тести, які не виявили статистичної значущості створеної моделі для ІАТІ ($P > 0,05$). Отже, результати проведених

аналізів показали, що важливими предикторами ІАТІ є поліморфізми $G^{-7} \rightarrow A$ (ген *MGP*) та $T^{2255} \rightarrow C$ (ген *VKORC1*). Проте створені на їх основі класифікаційні моделі виявили слабку прогностичну здатність. Подальша

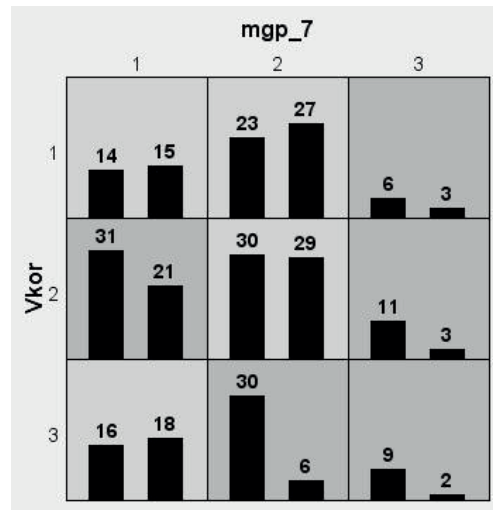


Рис. 3 Комбінації генотипів за $G^{-7} \rightarrow A$ та $T^{2255} \rightarrow C$ поліморфізмами, пов'язані з високим і низьким рівнями ризику ішемічного атеросклеротичного інсульту. Лівий стовпчик у межах кожної клітинки відображає кількість випадків, правий стовпчик – кількість контролю. Темно-сірі клітинки відповідають високому ризику, а світло-сірі – низькому ризику розвитку ішемічного атеросклеротичного інсульту

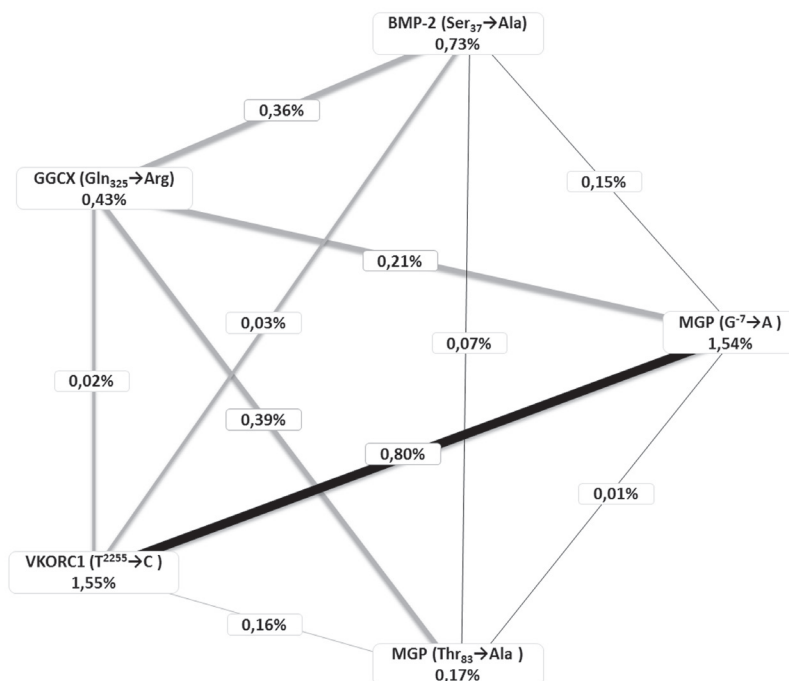


Рис. 4 Графік кластерного аналізу результатів моделювання міжгенної взаємодії методом мультифакторної просторової редукції при ішемічному атеросклеротичному інсульті. Жирною лінією позначена синергічна взаємодія

обробка даних із використанням бінарної логістичної регресії є наразі недоцільною, оскільки застосовується лише з метою підтвердження результатів MDR-аналізу і є, порівняно з останнім, більш слабким методом.

ВИСНОВКИ

Існує зв'язок між ІАТІ і поліморфними варіантами генів *MGP* ($G^{-7} \rightarrow A$) та *VKORC1* ($T^{2255} \rightarrow C$). Ризик розвитку ІАТІ у носіїв мінорного алеля А/А (поліморфізм $G^{-7} \rightarrow A$) у 2,6 вищий, ніж у носіїв основного алеля ($G/A + G/G$), а у осіб з генотипом С/С (поліморфізм $T^{2255} \rightarrow C$) у 2,2 раза більший, ніж у гомозигот за основним алелем. Збіг у пацієнтів генотипів Т/С і G/G, С/С і G/A, а також генотипу А/А (поліморфізм $G^{-7} \rightarrow A$) із будь-яким з генотипів за $T^{2255} \rightarrow C$ -поліморфізмом збільшує ризик розвитку ІАТІ.

В.Ю. Гарбузова, Д.А. Строй, В.Е. Досенко, Е.И. Дубовик, А.А. Бороденко, К.А. Шимко, О.А. Обухова, А.В. Атаман

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СИСТЕМЫ МАТРИКСНОГО GLA-ПРОТЕИНА (MGP) С РАЗВИТИЕМ ИШЕМИЧЕСКОГО АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Приведены результаты определения 10 полиморфизмов генов системы матриксного Gla-протеина (ген *MGP* – $T^{138} \rightarrow C$ (rs1800802), $G^{-7} \rightarrow A$ (rs1800801), $Thr_{83} \rightarrow Ala$ (rs4236), ген *VDR* – FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236), ген *GGCX* – $Arg_{325} \rightarrow Gln$ (rs699664), ген *VKORC1* – $T^{2255} \rightarrow C$ (rs2359612), ген *BMP-2* – $Ser_{37} \rightarrow Ala$ (rs2273073)) у 170 пациентов с ишемическим атеротромботическим инсультом (ИАТИ) и 124 здоровых индивидумов (контрольная группа). Установлено, что существует связь между ИАТИ с полиморфными вариантами генов *MGP* ($G^{-7} \rightarrow A$) и *VKORC1* ($T^{2255} \rightarrow C$). Риск развития ИАТИ у носителей мінорного алеля А/А ($G^{-7} \rightarrow A$ - полиморфизм) в 2,6 выше, чем у носителей основного аллеля ($G/A + G/G$), а у лиц с генотипом С/С ($T^{2255} \rightarrow C$ -поліморфізм) в 2,2 раза больше, чем у гомозигот по основному алелю. Совпадение у пациентов генотипов Т/С и G/G, С/С и G/A, а также генотипа А/А

(G⁷→A-поліморфізм) с любым из генотипов по T²²⁵⁵→C-поліморфізму увеличивает риск развития ИАТИ.
Ключевые слова: матриксный Gla-протеин; поліморфізм генів; ішемічний атеротромботичний інсульт.

Сумський державний університет;
Інститут фізіології ім. А.А. Богомольця

**V.Yu. Garbuzova, D.A. Stroy, V.E. Dosenko,
Ye.I. Dubovyk, A.O. Borodenko, K.A. Shimko,
O.A. Obukhova, O.V. Ataman**

ASSOCIATION OF ALLELIC POLYMORPHISMS OF GENES MATRIX GLA-PROTEIN SYSTEM WITH ISCHEMIC ATHEROTHROMBOTIC STROKE

There are results of the determination of 10 polymorphisms of matrix Gla-protein system (gene *MGP* – T¹³⁸→C (rs1800802), G⁷→A (rs1800801), Thr₈₃→Ala (rs4236), gene *VDR* – FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236), gene *GGCX* – Arg₃₂₅→Gln (rs699664), gene *VKORS1* – T²²⁵⁵→C (rs2359612), gene *BMP-2* – Ser₃₇→Ala (rs2273073)) into 170 patients with ischemic atherothrombotic stroke (IATS) and 124 healthy individual is (control group). It is established that there is a connection between the IATS and polymorphic variants of genes *MGP* (G⁷→A) and *VKORC1* (T²²⁵⁵→C). The risk of IATS in carriers of minor allele A/A (G⁷→A polymorphism) in 2.6 times higher than in carriers of the major allele (G/A + G/G), and C/C genotype (T²²⁵⁵→C polymorphism) in 2.2 times higher than the homozygotes of major allele. The coincidence of patients T/C and G/G, C/C and G/A genotypes, and A/A genotype (G⁷→A polymorphism) with any genotype T²²⁵⁵→C polymorphism are increases the risk of IATS.

Key words: matrix Gla-protein; gene polymorphism; ischemic atherothrombotic stroke.

*Sumy State University;
O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of NAS Ukraine, Kyiv*

REFERENCES

1. Abedin M, Tintut Y, Demer L. Vascular calcification. Mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1161-70.
2. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification. Pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 2006; 99:1044-59.
3. Lanzer P. Mediakazinose Mönckeberg. *Z Kardiol.* 1998; 87:586-93.
4. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16(8):978-83.
5. Garbuzova VYu, Ataman AV. Matrix Gla-Protein and Its Role in Vascular Calcification. *Int J Physiol Pathophysiol.* 2012; 3(1):79-99.

6. Proudfoot D, Shanahan CM. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton).* 2006; 11:455-61.
7. Ataman AV, Garbuzova VYu, Ataman YuA, Matlaj OI, Obukhova OA. Investigation of the MGP promoter and exon 4 polymorphisms in patients with ischemic stroke in the Ukrainian population. *Journal of Cell and Molecular Biology.* 2012; 10(1):19-26.
8. Crosier MD, Booth SL, Peter I, Dawson-Hughes B, Price PA, O'Donnell CJ, et al. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2009; 55:59-65.
9. Garbuzova VYu, Gurianova VL, Stroy DA, Dosenko VE, Parkhomenko AN, Ataman AV. Association of matrix Gla protein gene allelic polymorphisms (G⁷>A, T-138>C and Thr83>Ala) with acute coronary syndrome in the Ukrainian population. *Exp Clin Cardiol.* 2012; 17(1):30-33.
10. Herrmann SM, Whatling C, Brand E, Nikaud V, Garipey J, Simon A, et al. Polymorphisms of the human matrix Gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:2386-93.
11. Kobayashi N, Kitazawa R, Maeda S, Schurgers LJ, Kitazawa S. T-138C polymorphism of matrix Gla protein promoter alters its expression but is not directly associated with atherosclerotic vascular calcification. *Kobe J Med Sci.* 2004; 50:69-81.
12. Kim JG, Ku SY, Lee DO. Relationship of osteocalcin and matrix Gla protein gene polymorphisms to serum osteocalcin levels and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Menopause.* 2006; 13:467-73.
13. Gao B, Yasui T, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Apolymorphism of matrix Gla protein gene is associated with kidney stones. *J Urol.* 2007; 177:2361-65.
14. Hirano H, Ezura Y, Ishiyama N, Yamaguchi M, Nasu I, Yoshida H, et al. Association of natural tooth loss with genetic variation at the human matrix Gla protein locus in elderly women. *J Hum Genet.* 2003; 48:288-92.
15. Shaik AP, Kaiser J. Polymorphisms in MGP gene and their association with lead toxicity. *Toxicol Mech Methods.* 2009; 19:209-13.
16. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993; 24:35-41.
17. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning.* 2001; 45:5-32.
18. Breiman L, Friedman JH, Olshen RA. Classification and Regression Trees. 1st ed. Belmont: Wadsworth; 1984.
19. Bureau A, Dupuis J, Falls K, Lunetta KL, Hayward B, Keith TP, Eerdewegh PV. Identifying SNPs Predictive of Phenotype Using Random Forests. *Genetic Epidemiology.* 2005; 28:171-82.
20. Strobl C, Boulesteix AL, Kneib T, Augustin T, Zeileis A. Conditional variable importance for random forests. *BMC*

- Bioinformatics. 2008; 9:307.
21. Alison AM, Marylyn D. Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene – gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. Human genomics. 2006; 2(5):318-28.
 22. Shyu HY, Fong CS, Fu YP, Shieh JC, Yin JH, Chang CY, et al. Genotype polymorphisms of GGCX, NQO1, and VKORC1 genes associated with risk susceptibility in patients with large-artery atherosclerotic stroke. Clin Chim Acta. 2010; 411:840-5.
 23. Porojan M, Dumitraşcu DL. Genetic polymorphism of VKORC 1 and KLOTHO genes associated with atherosclerosis. Clujul Medical. 2012; 85(4):533-6.
 24. Wang Y, Zhang W, Zhang Y, Yang Y, Sun L, Hu S, et al. VKORC1 Haplotypes Are Associated With Arterial Vascular Diseases (Stroke, Coronary Heart Disease, and Aortic Dissection). Circulation. 2006; 113:1615-21.
 25. Hindorff LA, Heckbert SR, Smith N, Marcianti KD, Psaty BM. Common VKORC1 variants are not associated with arterial or venous thrombosis. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2007; 5:2025-27.

Матеріал надійшов до редакції 01.11.2013

Н.Г. Грушка, С.І. Павлович, Т.М. Бризгіна, В.С. Сухіна, Н.В. Макогон, Р.І. Янчій

Генотоксичний стрес і шляхи загибелі клітин тимуса та лімфовузлів мишей за умов системної імунокомплексної патології

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
E-mail: grusha@i.ua, tas@biph.kiev.ua

Вивчали генотоксичний стрес та шляхи загибелі імунокомпетентних клітин (ІКК) (апоптоз і некроз) при моделюванні системного імунокомплексного пошкодження за допомогою імунізації мишей лінії СВА бичачим сироватковим альбуміном (БСА). Імунофлюоресцентними дослідженнями імунізованих мишей встановили фіксацію імунних комплексів у тканинах печінки, селезінки, нирок і аорти. Гістологічний аналіз цих органів показав ураження судинної системи і меншою мірою паренхіми. Встановлено, що при імунізації БСА індекс ДНК-комет збільшувався в 1,4 раза в клітинах лімфовузлів і в 1,5 раза у клітинах тимуса. Спостерігалось підвищення кількості клітин з максимальним пошкодженням ДНК в препаратах тимуса (у 3,4 раза) і лімфовузлів (в 3,3 раза), що свідчить про сильний генотоксичний стрес. Знижувалася кількість живих ІКК і збільшувалася їх загибель, у тому числі прозапальним і імуногенним некротичним шляхами. Показано, що генералізований імунокомплексний патологічний процес призводить до пошкодження ДНК і загибелі ІКК як центрального (тимуса), так і периферичних органів імунної системи (лімфовузлів, селезінки). Генотоксичний стрес ІКК і посилення їх загибелі некротичним шляхом можуть відігравати значну роль у розвитку імунокомплексних захворювань. Ці показники кількості лімфоцитів периферичної крові можуть бути перспективною тест-системою для оцінки тяжкості аутоімунних та імунокомплексних захворювань і ефективності їх лікування.

Ключові слова: пошкодження ДНК; апоптоз; некроз; лімфоцити; імунокомплексна патологія.

ВСТУП

Однією з найважливіших функцій імунної системи є підтримання клітинного та гуморального гомеостазу організму. Відомо, що проліферація й активація клітин вродженого та адаптивного імунітету підвищує їх загибель, яка за фізіологічних умов відбувається через апоптоз і не викликає запалення та імунної відповіді. Однак запальні процеси, які супроводжуються зростанням генерації активних радикалів кисню й азоту, можуть посилити перекисне окиснення ліпідів, ушкодження білків та ДНК (генотоксичний стрес) і переключати загибель з апоптозу на некроз. Некроз є прозапальним і імуногенним

шляхом загибелі, оскільки вихід клітинного вмісту в тканини спричиняє активацію клітин вродженого й адаптивного імунітету та може викликати імунну реакцію проти власних антигенів і розвиток аутоімунних захворювань [1]. Виділяють ще один різновид загибелі з розривом плазматичної мембрани клітини – вторинний (постапоптотичний) некроз, патогенетичній ролі якого останнім часом приділяють велику увагу. Він відбувається при недостатніх енергетичних ресурсах для завершення апоптозу, а також недостатньому фагоцитозі апоптотичних клітин [2]. Некроз клітин, у тому числі імунокомпетентних (ІКК), які у великій кількості мігрують в ушкодженій тканині, буде багаторазово посилю-

© Н.Г. Грушка, С.І. Павлович, Т.М. Бризгіна, В.С. Сухіна, Н.В. Макогон, Р.І. Янчій

вати запальну та імунну реакцію. Таким чином, дослідження генотоксичного стресу, апоптозу і некрозу ІКК актуальне з точки зору патофізіології, оскільки клітинна загибель, в залежності від її шляху, може бути як важливим механізмом обмеження імунної реакції та запалення, так і посилювати імунозапальні процеси. Слід зазначити, що це питання практично не досліджене за умов, пов'язаних із імунокомплексною патологією. Виділяють низку захворювань, при яких ІКК є визначальним ушкоджувальним агентом (тип 3 алергічних реакцій за класифікацією Джела і Кумбса). Однак останнім часом визнають наявність імунокомплексного механізму як складової частини патогенезу таких імунозапальних хвороб як системні васкуліти, вірусні гепатити В і С, системний червоний вовчак, артрит тощо [3–5]. Один з методів моделювання аутоімунних захворювань, зокрема їх імунокомплексного компонента, базується на імунізації – інтенсивному впливі антигенного стимулу.

Мета нашої роботи – дослідження генотоксичного стресу та шляхів загибелі ІКК при моделюванні системного імунокомплексного ушкодження за допомогою імунізації мишей бичачим сироватковим альбуміном.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих самицях мишей лінії СВА віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Усі тварини на початку експерименту (2–2,5 міс) мали масу 16–18 г. При роботі дотримувались Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин Ради Європи (Страсбург, 1986).

Модель системного хронічного патологічного процесу імунокомплексного генезу відтворювали за допомогою імунізації мишей бичачим сироватковим альбуміном (БСА, «Sigma», США) протягом 6 тиж внутрішньовенно раз на тиждень за такою схемою: 1=й тиждень введення 150 мг БСА/кг; 2=й - 175 мг/кг; 3=й - 200 мг/кг; 4=й - 225 мг/кг; 5=й -

250 мг/кг; 6=й - 275 мг/кг маси миші. На 7-му добу після останньої імунізації тварин піддавали ефірному наркозу та брали кров, тимус, лімфовузли, печінку, селезінку, нирки й аорту для подальших досліджень. Контрольними були миші, яким вводили фізіологічний розчин за цією самою схемою. ІКК тимуса та лімфовузлів виділяли за загальноприйнятою методикою м'якого механічного диспергування органів з наступним відмиванням клітин центрифугуванням у забуференому фосфатами фізіологічному розчині. Відсоток живих та ушкоджених ІКК в отриманих суспензіях встановлювали рутинним методом виключення барвника – трипанового синього.

Ступінь ушкодження ДНК визначали на клітинах тимуса та лімфовузлів мишей методом лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay») за Afanasieva та співавт. [6] з деякими модифікаціями. Суть методу полягає в тому, що при електрофорезі клітин в агарозному гелі петлі і фрагменти ушкодженої ДНК в електричному полі витягуються в напрямку до анода, що надає їм вигляд комет. Розміри хвоста ДНК-комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК [7,8,9]. Електрофорез препаратів (після їх стабілізації протягом 20 хв в лужному електрофоретичному буфері) проводили за допомогою приладу Multiphor II («LKB», Швеція) при напрузі 24 В та силі току 100 мА протягом 30 хв. Аналіз ДНК-комет на електрофореграмах, забарвлених Хехст 33342 (700 мкмоль/л) протягом 15 хв, здійснювали візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп ЛЮМАМ И-1, Росія) та відеосистему передачі зображення на комп'ютер при застосуванні водно-імерсійного об'єктива ($\times 30$). Застосовували напівкількісний метод оцінки інтенсивності забарвлення та довжини хвостів комет, на кожному мікропрепараті аналізували не менше ніж 100 окремо розташованих ДНК-комет. Їх поділяли за загальновизнаною класифікацією на 5 класів з відповідним числовим значенням від 0 до 4, залежно від

співвідношення ДНК у “голові” та “хвості” комети [10]. Ступінь ушкодження ДНК при цьому визначали як індекс «ДНК – комет» ($I_{\text{ДК}}$), який обчислювали за формулою:

$I_{\text{ДК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma$, де $n_0 - n_4$ – число ДНК–комет кожного типу, Σ – сума підрахованих ДНК–комет [9].

Шляхи клітинної загибелі вивчали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот (йодидом пропідіуму і Хехст 33342) [11,12]. Клітини (не менш як 200) досліджували на люмінесцентному мікроскопі з водно-імерсійним об’єктивом х85.

Шматочки печінки, селезінки та черевної аорти після фіксації 10% м нейтральним формаліном обробляли за загальноприйнятою гістологічною методикою та заливали у парафін. Гістологічне дослідження зрізів проводили при забарвленні гематоксилін-еозином, дослідження клітин крові – при забарвленні мазків за Романовським–Папенгеймом.

Імунофлуоресцентні дослідження проводили на відбитках печінки, селезінки, нирок та внутрішньої поверхні черевної аорти, які висушували при кімнатній температурі, фіксували 1%-ю спирт-пікриновою сумішшю та обробляли міченими флуоресцеїнізотіоціанатом антитілами проти імуноглобулінів миші («Sigma», США).

Перевірку розподілу отриманих результатів на нормальність проводили за тестом Колмогорова–Смирнова. У разі нормального розподілу статистичну обробку результатів при порівнянні значень двох груп даних проводили з використанням критерію t Стьюдента за допомогою програми GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, США); $P < 0,05$ вважалося статистично вірогідним. Результати виражали як середнє \pm стандартне відхилення ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імунофлуоресцентними дослідженнями фіксації імуноглобулінів в тканинах вста-

новилено наявність специфічного світіння в усіх зразках (печінки, селезінки, нирок та аорти), проте кількість клітин, що світяться та інтенсивність світіння суттєво відрізнялася. Найбільш інтенсивне світіння клітин визначалося у всіх препаратах печінки та селезінки та в окремих препаратах аорти. В нирках спостерігалось незначне світіння поодиноких клітин в деяких препаратах. Ці результати свідчать про різну ступінь фіксації антитіл у досліджуваних органах. В наших попередніх дослідженнях встановлено, що багатократне тривале введення БСА викликало імунозапальні процеси, як в окремих органах, так і на рівні організму [13].

Макроскопічно внутрішні органи дослідних тварин відрізнялися від контрольних бугристою структурою селезінки, неоднорідністю судинного рисунку та темнішим кольором тканини печінки, у деяких випадках – вираженим судинним рисунком легень. Вивчення препаратів виявило дистрофічні зміни тканин печінки, селезінки, нирок та аорти. Морфоструктурні порушення судинного русла були більш виражені. Вони включали набряки навколо судин, набрякання судинних стінок та їх помірне розшарування. Відмічалася проліферація та вогнищева десквамація ендотеліоцитів у просвіт судин. Подекуди спостерігалася наявність незначних червоних змішаних тромбів з наявністю лімфоцитів, плазмоцитів та поодиноких поліморфноядерних лейкоцитів. Таким чином, гістологічні дослідження виявили ураження судинної системи і меншою мірою паренхіми органів. За показниками лейкограми крові імунізація призводила до збільшення відносної кількості клітин-ефекторів запалення нейтрофілів (з $6,3 \pm 0,6$ % до $28,8 \pm 3,0$ %), в тому числі відсоток паличкоядерних нейтрофілів збільшувався в 4,4 раза ($P < 0,001$).

Встановлено, що через 6 тиж після початку імунізації БСА $I_{\text{ДК}}$ збільшувався в 1,4 раза ($P < 0,01$ порівняно з контролем) в клітинах лімфовузлів та в 1,5 раза ($P < 0,001$) в клітинах тимуса, що свідчить про зростання

пошкодження ДНК. Більшість комет ІКК імунізованих мишей відносилася до 4-го класу, який характеризує максимальне ушкодження ДНК (Рис 1,2). Ми спостерігали подібне у разі збільшення кількості клітин з сильним пошкодженням ДНК у препаратах тимуса (в 3,4 раза) і лімфовузлів (в 3,3 раза, $P < 0,001$ відносно контролю в обох випадках). $I_{ДК}$ – це загальноприйнятий інтегральний показник [9], який враховує зміни кількості всіх типів комет із різною інтенсивністю світіння, тобто ступенем ушкодження ДНК. Так, якщо за умов імунізації в клітинах лімфовузлів збільшувався відсоток комет 4-го типу (в 3,3 раза), а відсоток комет 1-го та 2-го типів зменшувався (в 1,7 та 2,2 раза відповідно), ми маємо збільшення сумарного показника ушкодження ДНК ($I_{ДК}$) в 1,4 раза. Це вказує на розвиток генотоксичного стресу за умов імунокомплексного патологічного процесу в ІКК як центрального, так і периферичного органів імунної системи.

Відомо, що за умов імунокомплексного синдрому активуються клітини вродженого імунітету із посиленою продукцією прозапальних чинників. Збільшується генерація активних форм кисню нейтрофілами, що було показано як у наших попередніх дослідженнях, так і на інших моделях гіперімунно-

комплексемії [3,13]. Запалення, індуковане ІКК, призводить також до експресії індукцибельної NO-синтази та до відповідного збільшення утворення реактивних форм азоту [4]. Ці сполуки за умов недостатнього антиоксидантного захисту можуть спричинити генотоксичний стрес, що було встановлено в наших дослідженнях методом ДНК-комет на моделі імунокомплексного патологічного процесу.

При ушкодженні ДНК може відбутися або її репарація, або клітинна загибель. Реалізація програми апоптотичної загибелі - найважливіший механізм захисту від трансформації клітин. Однак за сильних ушкоджувальних впливів або при недостатніх енергетичних ресурсах клітини може розвинути некроз, який є прозапальним і імуногенним шляхом клітинної загибелі. Тому в наших дослідженнях визначено життєздатність та шляхи загибелі ІКК за допомогою барвників йодидом пропідіуму і Хехст 33342. Вони дають змогу встановити ушкодження плазматичної мембрани, а також морфологічні характеристики ядерного матеріалу, притаманні апоптозу, тобто оцінити кількість живих, апоптотичних, некротичних і вториннонекротичних клітин.

Доведено, що за умов імунокомплексної патології суттєво зменшувався відсоток жи-

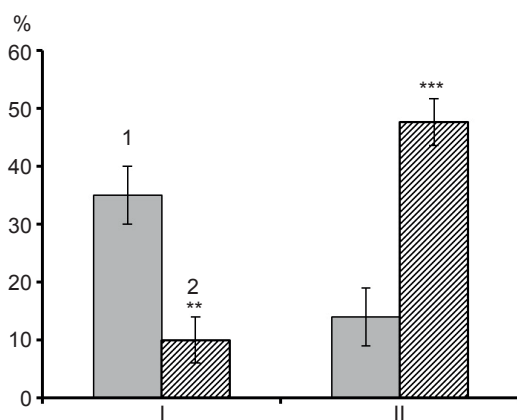


Рис. 1. Зміни кількості ДНК-комет клітин тимуса з інтактною або з мінімально ушкодженою (I) та з максимально ушкодженою ДНК (II) за умов імунізації бичачим сироватковим альбуміном; 1- контроль, 2 – імунізація. * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ - відносно контролю

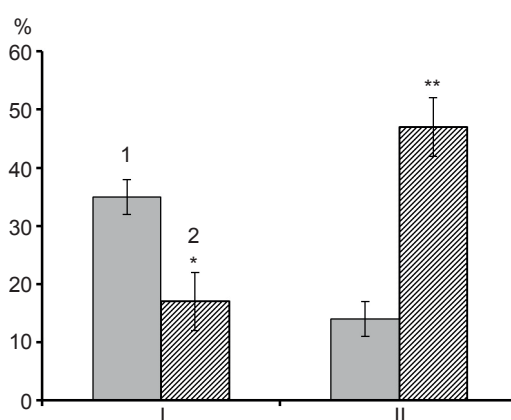


Рис. 2. Зміни кількості ДНК-комет клітин лімфовузлів з інтактною або з мінімально ушкодженою (I) та з максимально ушкодженою ДНК (II) за умов імунізації бичачим сироватковим альбуміном; 1-контроль, 2- імунізація. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ - відносно контролю

вих лімфоцитів, виділених з лімфовузлів, який становив $87,1 \pm 1,5$ в контролі і $76,9 \pm 1,2$ ($P < 0,001$) у імунізованих тварин. Введення БСА викликало послаблення життєздатності внаслідок підвищення кількості клітин лімфовузлів з морфологічними ознаками як апоптозу, так і некрозу (рис.3.). Показники клітинної загибелі (відсоток апоптотичних і некротичних клітин) та $I_{ДНК}$ характеризують різне їхнє ушкодження. Клітина може репарувати ушкодження ДНК і бути живою. За умов сильного ураження ДНК може відбуватися як некротична, так і апоптотична клітинна загибель, в залежності від енергетичних ресурсів, прозапальних факторів тощо. Так, клітини з максимально ушкодженою ДНК можуть мати як апоптотичний, так і некротичний фенотип. Хоча з літератури відомо, що після опромінення збільшення комет 4-го класу з сильним ушкодженням ДНК вказує на реалізацію загибелі частини лімфоцитів по типу некрозу. Однак це не є загальнопринятною точкою зору, оскільки некроз може розвиватися як самостійний процес, який протікає паралельно з апоптозом, а також як вторинний процес, що завершує апоптоз (постапоптотичний некроз), що було показано в наших дослідженнях. Виявлено також

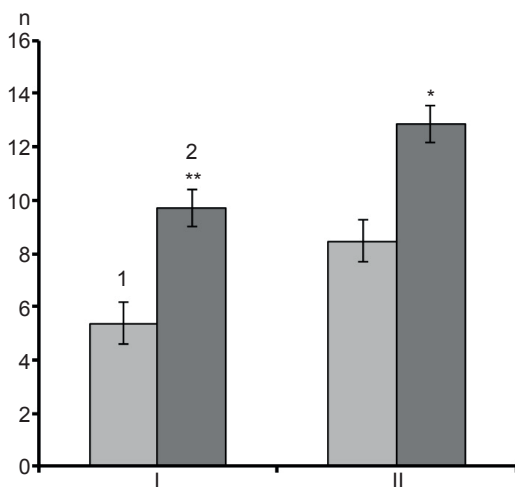


Рис. 3. Вплив імунізації бичачим сироватковим альбуміном на кількість некротичних (I) та апоптотичних (II) клітин лімфовузлів мишей; 1- контроль, 2- імунізація. * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ - відносно контролю

посилення вторинного постапоптотичного некрозу цих клітин в 1,6 раза, з $3,6 \pm 0,9$ до $5,9 \pm 0,6$ % ($P < 0,05$ порівняно з контролем). Однією з можливих причин збільшення вторинного некрозу може бути те, що загибель клітини, яка почалася як апоптоз, завершується розривом плазматичної мембрани через виснаження енергетичних ресурсів. Це було показано при вивченні апоптозу лімфоцитів *in vitro* [14, 15]. При дослідженні клітин, виділених із тимуса, з'ясувалося, що зміни життєздатності та загибелі в умовах імунокомплексного патологічного процесу були подібні до змін, виявлених у лімфоцитах, ізольованих із лімфовузлів. Зменшувалася життєздатність клітин тимуса з $91,7 \pm 0,8$ % у контролі до $87,6 \pm 1,3$ % при імунізації БСА ($P < 0,05$). Встановлено посилення некрозу тимоцитів (який становив у контрольних тварин $2,7 \pm 0,4$ %, при введенні БСА – $4,4 \pm 0,7$ %, $P < 0,05$) та виявлено тенденцію до посилення їх апоптозу у контролі – $5,6 \pm 0,7$ %, при імунізації – $8,0 \pm 1,4$ %, $P = 0,13$).

Посилення апоптозу ІКК за умов імуноної відповіді, в тому числі і при імунокомплексних хворобах, є важливим механізмом обмеження надмірної активації імуноної системи. Однак збільшення кількості клітин зі втратою цілісності плазматичної мембрани (некроз і постапоптотичний некроз) призводить до виходу клітинного вмісту назовні, провокує або посилює запальні та аутоімуноні процеси. Це відноситься і до ІКК, які інфільтрують ушкоджені тканини, а посилення їх некротичної загибелі, яке було виявлене в наших дослідженнях, може бути одним з механізмів розвитку та хронізації імунокомплексних хвороб.

Таким чином, ми показали, що моделювання імунокомплексної патології за допомогою довготривалої імунізації мишей чужорідним білком БСА викликає генотоксичний стрес ІКК як первинного (тимус), так і периферичних органів (лімфовузли) імуноної системи. На тлі встановленого сильного ушкодження ДНК за умов введення БСА

погіршується життєздатність лімфоцитів із посиленням їх апоптозу та некрозу (в тому числі вторинного постапоптотичного). Сильний генотоксичний стрес ймовірно, є основною причиною збільшення загибелі ІКК за прозапальним та імуногенним некротичним шляхом. Інтенсифікація запалення та імуних реакцій в результаті некрозу в свою чергу буде провокувати ушкодження ДНК. Таке замкнене коло неконтрольованого посилення запальних та імуних процесів може бути важливим механізмом імунокомплексного патологічного процесу.

Нині впроваджуються підходи до моніторингу патологічних станів людини на основі того, що периферичні лімфоцити, які можна отримати за допомогою малоінвазивної процедури та дослідити імуноцитохімічними, біохімічними та іншими методами, можуть бути тест-системами інтегральної оцінки того чи іншого стану клітин в організмі загалом [16]. Це, зокрема, стосується генотоксичного стресу та схильності клітин до того чи іншого типу загибелі, оскільки шляхи загибелі лімфоцитів значною мірою віддзеркалюють загальний баланс проапоптотичних і пронекротичних чинників в організмі. Така оцінка є інформативна з точки зору патогенетичних механізмів та вибору стратегії лікування, спрямованої на модуляцію шляхів клітинної загибелі, в тому числі і за умов імуноопосередкованих захворювань. У наших дослідженнях виявлено суттєвий генотоксичний стрес та посилення некрозу ІКК поряд із такими ознаками імунокомплексного ушкодження, як збільшення циркулюючих імуних комплексів і фіксації їх у тканинах, мультиорганна патологія (як судин, так і паренхіми), активація та посилена інфільтрація клітин неспецифічної резистентності в ушкоджені тканини [13]. Тому ми вважаємо, що визначення генотоксичного стресу та шляхів загибелі периферичних лімфоцитів може бути перспективною тест-системою для оцінки тяжкості аутоімуних та імунокомплексних хвороб та ефективності їх лікування.

ВИСНОВКИ

1. Відкладання імуних комплексів у різних органах мишей, імунованих БСА, супроводжувалось дистрофічними змінами у печінці, селезінці, нирках та аорті, що свідчить про системне імунокомплексне ушкодження.

2. Встановлено наявність вираженого генотоксичного стресу клітин лімфовузлів і тимуса за умов інтенсивного впливу антигенного стимулу.

3. Імунізація БСА призводила до зменшення життєздатності ІКК, в тому числі внаслідок значного збільшення їх некрозу.

4. Генотоксичний стрес ІКК і посилення їх загибелі за прозапальним та імуногенним некротичним шляхом можуть відігравати значну роль у розвитку імунокомплексного патологічного процесу.

**Н.Г. Грушка, С.І. Павлович, Т.М. Брызгіна,
В.С. Сухина, Н.В. Макогон, Р.І. Янчій**

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС И ПУТИ ГИБЕЛИ КЛЕТОК ТИМУСА И ЛИМФОУЗЛОВ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ СИСТЕМНОЙ ИММУНОКОМПЛЕКСНОЙ ПАТОЛОГИИ

Изучали генотоксический стресс и пути гибели иммунокомпетентных клеток (ИКК) (апоптоз и некроз) при моделировании системного иммунокомплексного повреждения с помощью иммунизации мышей линии СВА бычьим сывороточным альбумином (БСА). Иммунофлюоресцентными исследованиями иммунизированных мышей установили фиксацию иммунных комплексов в тканях печени, селезенки, почек и аорты. Гистологический анализ этих органов показал поражения сосудистой системы и в меньшей степени паренхимы. Установлено, что при иммунизации БСА индекс ДНК-комет увеличивался в 1,4 раза в клетках лимфоузлов и в 1,5 раза в клетках тимуса. Увеличивалось количество клеток с максимальным повреждением ДНК в препаратах тимуса (в 3,4 раза) и лимфоузлов (в 3,3 раза), что свидетельствует о сильном генотоксическом стрессе. Снижалось количество живых ИКК и увеличивалась их гибель, в том числе провоспалительным и иммуногенным некротическими путями. Показано, что генерализованный иммунокомплексный патологический процесс приводит к повреждению ДНК и гибели ИКК как центрального, так и периферического органов иммунной системы. Генотоксический стресс ИКК и усиление их гибели некротическим путем может играть значительную роль в развитии иммунокомплексных заболеваний. Эти показатели количества лимфоцитов периферической крови могут быть перспективной тест-системой

для оценки тяжести аутоиммунных и иммунокомплексных болезней и эффективности их лечения.

Ключевые слова: повреждения ДНК; апоптоз; некроз; лимфоциты; иммунокомплексная патология.

**N.G. Grushka, S.I. Pavlovych, T.M. Bryzgina,
V.S. Sukhina, N.V. Makogon, R.I Yanchiy**

GENOTOXIC STRESS AND THE PATHWAYS OF THYMUS CELL DEATH AND LYMPH NODES OF MICE IN CONDITIONS OF IMMUNOCOMPLEX PATHOLOGY

There were performed the studies of genotoxic stress and the ways of immunocompetent cells death (apoptosis and necrosis) in the modeling of immune system damage by immunization of CBA mice with the bovine serum albumin. Immunofluorescence studies of immunized mice were established the fixation of immune complexes in liver tissue, spleen, kidney and the aorta. Histological studies of these organs showed vascular system affection and, to a lesser extent, parenchyma. It has been shown that DNA comets index increases in 1,4 time in the lymph node cells and in 1,5 time in the thymus cells in the presence of BSA immunization. We also observed an increase in the number of cells with maximum damage DNA thymus preparations (3.4 fold) and lymph nodes (3.3-fold), respectively, indicating strong genotoxic stress. There were shown the reduce of live ICC number and their death increase, including the pro-inflammatory and immunogenic necrotic way. In that way, data which were obtained on the experimental model is evidenced that generalized immunecomplex pathologic process leads to DNA damage and ICC death both central and peripheral organs of the immune system. ICC genotoxic stress and their death amplification by the necrotic way may play a significant role in the immunecomplex diseases development. These factors of peripheral blood lymphocytes can serve as a prospective test system for assessing the severity of autoimmune and immune complex diseases and their treatment effectiveness.

Key words: DNA damage; apoptosis; necrosis; lymphocytes; immunocomplex pathology.

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

REFERENCES

1. Vladimirskaya EB. Mechanisms apoptoticheskoy hybely cells. *Hematol. and transfuziologiya*. 2002; 42 (2): 35-40.
2. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Sep-Oct;1757(9-10):1371-87.

3. Chopyak V, Valchuk IV, Hayduchok IG. Hiperimuno-kompleksnyy syndrome in experiment and clinic. *Bulletin. sciences. research*. 2007; 1. 5-8.
4. Jancar S, Sánchez Crespo M. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. *Trends Immunol*. 2005 Jan;26(1):48-55.
5. Shmagel KV, Chereshnev VA. Molecular bases of immune complex pathology. *Biochemistry (Mosc)*. 2009 May;74(5):469-79.
6. Afanasieva K, Zazhytska M, Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments. *Electrophoresis*. 2010; 31: 512-19.
7. Heaton PR, Ransley R, Charlton CJ, Mann SJ, Stevenson J, Smith BH, Rawlings JM, Harper EJ. Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *J Nutr*. 2002 Jun;132(6 Suppl 2):1598-1603.
8. Kaminsky V O, Lutsik MD, Stoika RS. Comet assay of dna fragmentation: modification of silver staining for obtaining permanent preparations. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2005; 77(6): 105-7.
9. Sorochinska J, Mikhailenko V. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different inveroental agents. *Oncology*. 2008; 10 (3): 303-8.
10. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004 Mar;26(3):249-61.
11. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Akao Y, Kosaka H, Hasegawa J, Matsuda H, Tsujimoto Y. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes. *Am.J.Phisiol*. 1996; 271 (6). 949-58.
12. Bryzgina TM, Makogon NV, Alexyuk LI, Martynova TV, Pavlovych SI, Sukhina VS, Yanchiy RI, Alexeyeva IM. The pathways and mechanisms of immune cell death in the time course of experimental immune-mediated liver injury. *Pathologia*. 2011; 8(2): 108-10.
13. Pavlovych SI, Lytvynenko AP, Makogon NV, Martynova TV, Bryzgina TM, Yanchiy RI, Cukhina VS, Shepel OA, Voznesenska TYu, Blashkiv TV, Getmanets AV. Immunomorphological characterization of mouse model of a systemic immune complexes mediated pathology. *Reports of morphology*. 2014; 8 (2):496-500.
14. Eidus LKh. Extrapolation of dose-effect relationships for cytogenetic aberrations from high to low doses. *Radiats Biol Radioecol*. 1999 Jan-Feb;39(1):177-80.
15. Eidus LKh. On the mechanism of the nonspecific cell response to the action of damaging agents and the nature of hormesis. *Biofizika*. 2005 Jul-Aug;50(4):693-703.
16. Grecchi S, Mazzini G, Lisa A, Armentero MT, Bergamaschi R, Romani A, Blandini F, Di Perri C, Scovassi AI. Search for cellular stress biomarkers in lymphocytes from patients with multiple sclerosis: a pilot study. *PLoS One*. 2012; 7(11).

*Матеріал надійшов
до редакції 12.06.2014*

О.В. Вірченко¹, Т.М. Фалалєєва¹, Т.В. Берегова¹, М.Я. Співак², Л.М. Лазаренко²,
О.М. Демченко²

Вплив моно-, полі- та комбінованих пробіотиків на виразкоутворення, викликане іммобілізаційним стресом

¹Київський національний університет ім. Тараса Шевченка;

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ; ovirchenko@gmail.com

*Вивчали вплив пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280 та їх сумішей на ерозивно-виразкові ураження слизової оболонки шлунка щурів (СОШ), викликані водно-іммобілізаційним стресом. Встановлено, що досліджувані пробіотики не мали гастропротекторної дії за умов 1- та 7-добового профілактичного введення. Проте при застосуванні впродовж 14 діб мультикомпонентні пробіотики (поліпробіотика *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB та комбінованого пробіотика *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280) зменшували ерозивно-виразкові ураження та інтенсивність крововиливів у СОШ щурів. Показано, що одним з механізмів анти-виразкового профілактичного впливу пробіотичних ди- та триштамів є відновлення ними про-антиоксидантної рівноваги за умов дії стресу. Отримані результати свідчать про ефективність застосування комбінованих пробіотиків у профілактиці виразкової хвороби шлунка.*

Ключові слова: пробіотики; ерозивно-виразкові ураження; стрес.

ВСТУП

Порушення балансу між нормофлорою та патогенними мікроорганізмами – дисбіоз призводить до важких функціональних розладів травної системи. Є свідчення, що дисбактеріоз може стати причиною пригнічення емоційного стану людини та підвищення чутливості до стресу. З іншого боку, психоемоційні та фізичні напруження руйнують мікроекологічні угруповання людського організму [1, 2]. Отже, стрес і дисбактеріоз взаємно підсилюють один одного, що призводить до важких порушень гомеостазу організму. Зокрема в організмі діагностується надмірна імунореактивність, активація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах, порушення функціональної взаємодії імунної та гіпоталамо-гіпофізарно-наднирниковозалозної систем, проте небезпечнішим наслідком дії стресу

є поява ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлунка (СОШ) [3, 4]. Отже, дослідження участі пробіотичних штамів, які здатні відновлювати порушені мікробіоценози травного тракту, у підтриманні гомеостазу СОШ є без сумніву актуальним. Раніше нами був встановлений профілактичний вплив суміші пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL та *Bifidobacterium animalis* VKB на ерозивно-виразкові ураження в шлунку щурів, викликані стресом [5]. Проте є повідомлення, що пробіотичні бактерії, особливо роду *Lactobacillus*, швидко колонізують СОШ після утворення виразки [6, 7]. Тому важливим є дослідження ефектів моноштамних пробіотиків роду *Lactobacillus*, а також порівняння дії на стресіндуковані ураження моноштамних і комбінованих пробіотиків, що містять штами як *Bifidobacterium*, так і

© О.В. Вірченко, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова, М.Я. Співак, Л.М. Лазаренко, О.М. Демченко

Lactobacillus за умов різної тривалості профілактичного введення. Враховуючи зазначені наукові питання, а також дані щодо антиоксидантних властивостей симбіотичних бактерій [8], метою нашої роботи було провести комплексне порівняння ефективності моно- та комбінованих пробіотиків у профілактиці стресіндукованих уражень та порушення про-антиоксидантної рівноваги в СОШ щурів за умов різної тривалості введення.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 150 білих нелінійних щурах-самицях масою 200 – 250 г з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей та відповідно до Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Тварини були поділені на 7 груп. Інтактні тварини ввійшли до I групи. Щури груп II-VII до моделювання стресу отримували воду (2,5 мл/кг), монопробіотики *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB, *Lactobacillus casei* IMVB-7280, поліпробіотик (*Bifidobacterium animalis* VKL і VKB (1:1)) та комбінований пробіотик (*Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280 (1:1:2)) відповідно. Ліофілізовані пробіотичні штами вводили у дозі $3,2 \cdot 10^{10}$ КУО/кг. Експеримент повторювали тричі: пробіотики вводили одноразово за добу, а також впродовж 7 та 14 діб до стресу.

Для отримання ерозивно-виразкових уражень СОШ щурам II-V груп після харчової депривації застосовували модель 3-годинного водно-імобілізаційного стресу [9]. Для імобілізації щурів поміщали в металеві перфоровані камери, які опускали вертикально у воду (22-23°C) на 3 год так, щоб її рівень сягав яремної ямки щура. Після цього тварин виводили з експерименту за допомогою цервікальної дислокації. З черевної порож-

нини діставали шлунок, розрізали його по малій кривизні, вивертали слизовою назовні, ретельно промивали фізіологічним розчином, досліджували стан СОШ за допомогою гастроскопа і оцінювали характер гострих її уражень: обраховували площу виразок, довжину ерозивних уражень та інтенсивність крововиливів у балах (0 – відсутні крововиливи, 1 – 1-2 точкових крововиливи, 2 – 1 масивний або 3-5 точкових крововиливів, 3 – 2 масивних або більше ніж 5 точкових крововиливів, 4 – 3-5 масивних крововиливів, 5 – більше ніж 5 масивних крововиливів).

У тварин, яким вводили воду або пробіотики впродовж 14 діб, вилучали СОШ, у гомогенаті якої визначали вміст продуктів ПОЛ: спектрофотометричним методом – дієнових кон'югатів (ДК) [10], ТБК-активних продуктів [11], активність супероксиддисмутази (СОД) [12] та каталази [13]; флюорометричним методом – вміст шиффових основ (ШО) [14].

Статистичну обробку результатів здійснювали у пакеті програм “Statistica 8.0”. Для аналізу виду розподілу був використаний W критерій Шапіро-Уїлка. Отримані результати виявилися непараметричними, тому для їх порівняння застосовували U-критерій Манна-Уїтні для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M) та стандартну похибку середнього (m). Значущими вважали відмінності при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що при 1- та 7-добовому введенні досліджувані пробіотики не впливали на ерозивно-виразкові ураження у СОШ щурів (табл. 1).

Застосування монопробіотиків *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280 упродовж 14 діб не призводило до статистично значущих змін у розмірах ерозивно-виразкових уражень (рисунок). Проте суміш пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL та *Bifidobacterium animalis*

Таблиця 1. Площа виразкових уражень (мм²), викликаних стресом, за умов профілактичного введення пробіотичних штамів (M±m, n=6)

Групи щурів	Тривалість введення до стресу	
	1-добове	7-добове
Щури, піддані стресу, яким вводили воду	10,5±2,2	9,5±2,2
<i>Bifidobacterium animalis</i> VKL	9,9±2,6	8,5±1,3
<i>Bifidobacterium animalis</i> VKB	10,0±2,9	8,3±2,5
<i>Lactobacillus casei</i> IMVB-7280	9,4±2,2	9,4±1,5
суміш <i>Bifidobacterium animalis</i> VKL та VKB	7,4±2,8	9,2±1,9
суміш <i>Bifidobacterium animalis</i> VKL, VKB та <i>Lactobacillus casei</i> IMVB-	7,7±2,5	7,0±2,4

VKB (1:1) зменшувала площу виразкових уражень в СОШ на 31,3% (P<0,05) порівняно з контрольною групою тварин (див. рисунок). Також був виявлений профілактичний ефект пробіотиків на утворення крововиливів, інтенсивність яких знижувалася під впливом пробіотичних бактерій на 50% (P<0,05; див. рисунок). При застосуванні суміші пробіотичних триштамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280 (1:1:2) спостерігали зменшення площі виразок на 37,8% (P<0,05) та довжини ерозій на 45% (P<0,05) порівняно зі стрес-контролем (див. рисунок). Профілактичний ефект суміші пробіотиків на крововиливи під впли-

вом пробіотичних бактерій становив 54,2% (P<0,05; див. рисунок). Таким чином, полі- та комбінований пробіотик мали найбільш виражені гастропротекторні властивості.

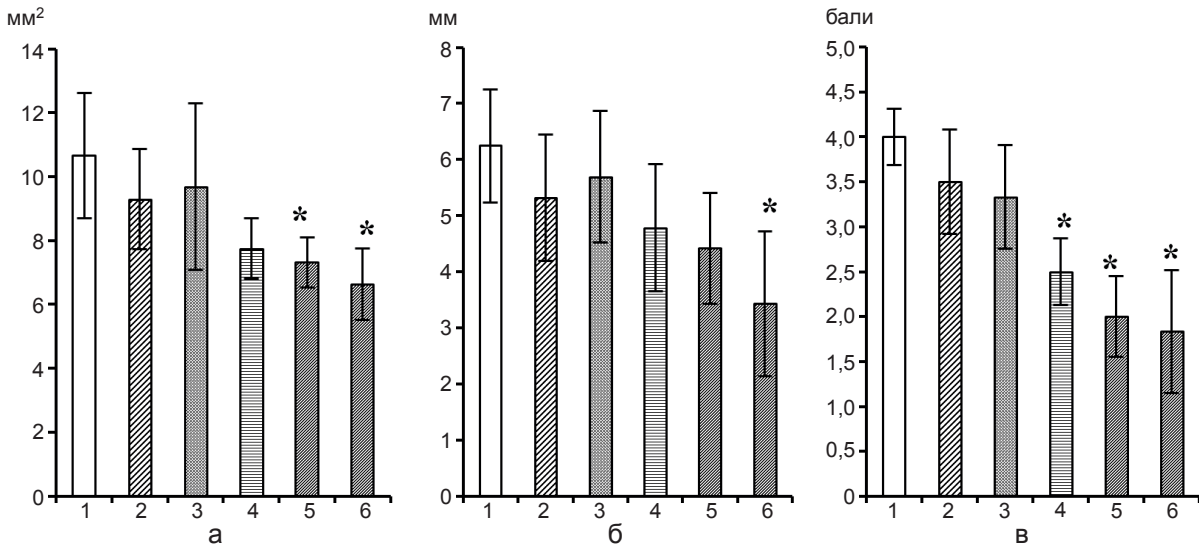
Відомо, що за умов дії стресу посилюються процеси ПОЛ в організмі, в тому числі у СОШ [15]. Враховуючи дані літератури щодо антиоксидантних властивостей пробіотиків [8, 16], ми перевірили гіпотезу про зменшення інтенсивності процесів ліпопероксидації в шлунку щурів при 14-добовому застосуванні пробіотиків.

Під дією стресу вміст ДК, первинних продуктів ПОЛ, у СОШ щурів перевищував значення інтактних щурів на 85% (P<0,001; табл. 2). У групах щурів, яким вводили про-

Таблиця 2. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в слизовій оболонці шлунка щурів за умов дії стресу та 14- добового профілактичного введення пробіотичних штамів (M±m, n=7)

Групи щурів	Дієнові кон'югати	ТБК-активні продукти	Шиффові основи
Інтактні щури	169,7±15,4	48,4±3,8	9,93±0,67
Щури, піддані стресу, яким вводили воду	314,3±20,4*	77,4±5,9*	14,57±1,05*
<i>Bifidobacterium animalis</i> VKL	285,8±19,3*	70,1±7,5*	13,70±0,31*
<i>Bifidobacterium animalis</i> VKB	272,0±24,6*	74,3±11,5*	13,92±0,44*
<i>Lactobacillus casei</i> IMVB-7280	298,8±24,3*	71,8±12,0*	13,69±0,50*
суміш <i>Bifidobacterium animalis</i> VKL та VKB	280,6±23,8*	64,0±6,7**,**	13,87±0,44*
суміш <i>Bifidobacterium animalis</i> VKL, VKB та <i>Lactobacillus casei</i> IMVB	255,8±23,8**,**	59,6±6,2**,**	13,13±0,37*

Примітка: *P<0,05 відносно групи інтактних щурів, **P<0,05 відносно групи стресованих щурів, яким вводили воду.



Площа (а), довжина (б) виразкових уражень та інтенсивність крововиливів (в), викликаних водно-імобілізаційним стресом, в слизовій оболонці шлунка щурів за умов 14-добового профілактичного введення пробіотичних штамів ($3,2 \cdot 10^{10}$ КУО/кг): 1 – щури, піддані стресу; 2-6 – щури, яких піддавали стресу, і вводили пробіотики *Bifidobacterium animalis* VKL; *Bifidobacterium animalis* VKB; *Lactobacillus casei* IMVB-7280; *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB (1:1); *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280 (1:1:2) відповідно. * $P < 0,05$, порівняно з групою 1.

біотичні штами *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB, *Lactobacillus casei* IMVB-7280, суміш двох біфідоштамів та суміш *Bifidobacterium animalis* VKL, VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280, вміст ДК був також вищим на 68,5, 60,3, 76, 65,4 і 59,2% ($P < 0,001$) відповідно порівняно з інтактними тваринами. Лише профілактичне введення триштамного пробіотика зменшило на 18,6% ($P < 0,05$) концентрацію ДК порівняно зі стресованими щурами (див. табл. 2).

Вміст ТБК-активних продуктів збільшився на 60% ($P < 0,001$) щодо значень інтактних тварин (табл. 2). Пробіотичні моноштами *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280 не здійснювали профілактичного впливу на цей показник після дії стресу. При цьому введення двох- та триштамного пробіотиків зумовило статистично значуще зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 17 та 23% ($P < 0,05$) відповідно порівняно з групою щурів, які отримували воду (див. табл. 2).

На тлі стресу концентрація ШО значущо зросла щодо значень інтактних щурів на 46,7% ($P < 0,001$) (див. табл. 2). За умов вве-

дення досліджуваних пробіотиків цей показник також перевищував значення у інтактних тварин, і не відрізнявся від стресованих щурів. Такі результати свідчать про відсутність профілактичного впливу пробіотиків на концентрацію ШО (див. табл. 2).

Активність СОД після стресу у СОШ щурів зменшилася на 51,9% ($P < 0,001$), а каталази зросла на 66,4% ($P < 0,001$) порівняно з інтактним контролем (табл. 3). Схожі відмінності спостерігали і в групах щурів, яким вводили пробіотики (див. табл. 3). Пробіотичні штами не впливали на активність СОД і лише комбінований пробіотик (*Bifidobacterium animalis* VKL, VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280) знижував активність каталази на 19% порівняно з групою стресованих щурів (див. табл. 3).

Слід відмітити, що найбільший протекторний вплив на стресіндуковані ураження здійснює комбінований пробіотик (*Bifidobacterium animalis* VKL, VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280) за умов 14-добового введення до стресу. Подібні результати кращого терапевтичного ефекту мультиштамних пробіотиків були отримані при використанні пробіотиків

Таблиця 3. Активність ферментів антиоксидантного захисту в слизовій оболонці шлунка щурів за умов дії стресу та 14-добового профілактичного введення пробіотичних штамів (M±m, n=7)

Групи щурів	Супероксиддисмутаза	Каталаза
Інтактні щури	0,210±0,009	6,22±0,61
Щури, піддані стресу, яким вводили воду	0,101±0,004*	10,35±0,59*
<i>Bifidobacterium animalis</i> VKL	0,120±0,011*	9,48±0,79*
<i>Bifidobacterium animalis</i> VKB	0,110±0,010*	9,63±0,81*
<i>Lactobacillus casei</i> IMVB-7280	0,112±0,013*	9,43±0,43*
суміш <i>Bifidobacterium animalis</i> VKL та VKB	0,114±0,010*	9,44±0,60*
суміш <i>Bifidobacterium animalis</i> VKL, VKB та <i>Lactobacillus casei</i> IMVB-	0,123±0,017*	8,38±0,43**

*P<0,05 відносно групи інтактних щурів, **P<0,05 відносно групи стресованих щурів, яким вводили воду.

у лікуванні запальних захворювань кишечника [17]. Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників, які зазначили, що 7-добове профілактичне введення щурам кефіру, який містив в основному лактозо-ферментуючі види родів *Lactobacillus* та *Leuconostoc*, не впливало на ураженість у СОШ, зумовлену дією індометацину [18]. У праці Senol та співавт. [19], які вводили мультиштамний пробіотик (4 штами *Lactobacillus fermentum*, 3 штами *Lactobacillus plantarum*, 6 штамів *Enterococcus faecium*) впродовж 14 діб, був продемонстрований профілактичний ефект на ураження в шлунку щурів, викликані аспірином. Автори пояснили виявлений ефект зниженням ПОЛ, посиленням утворення секреторного імуноглобуліну А та зменшенням дегрануляції тучних клітин під впливом пробіотиків. У нашому дослідженні було встановлено, що одним з механізмів антивиразкового профілактичного впливу пробіотичних штамів є відновлення ними про- та антиоксидантної рівноваги слизової шлунка за умов дії стресу.

ВИСНОВКИ

1. Досліджувані пробіотичні штами не впливають на ураженість у СОШ щурів, викликаних стресом, за умов 1- та 7-добового

профілактичного введення.

2. Профілактичне введення впродовж 14 діб мультикомпонентних пробіотиків (поліпробіотика *Bifidobacterium animalis* VKL та *Bifidobacterium animalis* VKB та комбінованого пробіотика *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280) зменшує ерозивно-виразкові ураження та інтенсивність крововиливів у СОШ щурів, зумовлених дією стресу.

3. Полі- та комбіновані пробіотики відновлюють порушену про- та антиоксидантну рівновагу в шлунку за умов дії стресу.

4. Результати роботи свідчать про найбільшу ефективність комбінованих пробіотиків у профілактиці стресіндукованих уражень СОШ.

Вірченко А.В., Фалалеева Т.М., Береговая Т.В., Співак Н.Я., Лазаренко Л.М., Демченко О. М.

ВЛИЯНИЕ МОНО-, ПОЛИ- И КОМБИНИРОВАННЫХ ПРОБИОТИКОВ НА ЯЗВООБРАЗОВАНИЕ, ВЫЗВАННОЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННЫМ СТРЕССОМ

Изучали влияние пробиотических штаммов *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB и *Lactobacillus casei* IMVB-7280 и их смесей на эрозивно-язвенные поражения слизистой оболочки желудка (СОЖ) крыс, вызванные водно-иммобилизационным стрессом. Уста-

новлено, що досліджувані пробіотики не мали гастропротекторного дії при 1- і 7-суточному профілактичному введенні. Однак при застосуванні протягом 14 днів мультикомпонентні пробіотики (поліпробіотик *Bifidobacterium animalis* VKL і *Bifidobacterium animalis* VKB і комбінований пробіотик *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB і *Lactobacillus casei* IMVB-7280) зменшували ерозивно-язвенні ураження і інтенсивність кровоизливів в СОЖ криси. Показано, що одним із механізмів антиязвенного профілактичного впливу пробіотических ді- і триштаммових є відновлення ними про/антиоксидантного балансу при дії стресу. Отримані результати свідчать про ефективність застосування комбінованих пробіотиків в профілактиці язвенної хвороби шлунка.

Ключові слова: пробіотики; ерозивно-язвенні ураження; стрес.

Virchenko O.V., Falalyeyeva T.M., Beregova T.V., Spivak M. Y., Lazarenko L.M., Demchenko O.M.

EFFECTS OF MONO-, POLY- AND COMPOSITE PROBIOTICS ON THE ULCERATION CAUSED BY RESTRAINT STRESS

Було досліджено вплив пробіотических штамів *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB і *Lactobacillus casei* IMVB-7280, а також їхніх сумішей на ерозивні та язвенні ураження шлункової слизової оболонки (СОЖ) криси. СОЖ було викликане водно-іммерсійним стресом. Було встановлено, що досліджувані пробіотики не мали гастропротекторних властивостей при одній та семи-денній профілактичній адміністрації. Однак, поліпробіотик (поліпробіотик *Bifidobacterium animalis* VKL і *Bifidobacterium animalis* VKB і комплексний пробіотик *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB і *Lactobacillus casei* IMVB-7280) зменшували ерозивні та язвенні ураження та інтенсивність кровотеч в СОЖ криси протягом 14 днів. Було показано, що одним із механізмів антиязвенної профілактичної дії поліпробіотиків є відновлення про/антиоксидантного балансу в СОЖ криси при дії стресу. Отримані результати свідчать про ефективність застосування полі- та комплексних пробіотиків в профілактиці язвенної хвороби шлунка.

Ключові слова: пробіотики; ерозивні та язвенні ураження; стрес.

*Kyiv Taras Shevchenko National University;
Institute of Microbiology and Virusology NAS of Ukraine,
Kyiv*

REFERENCES

1. Tsiotsias A, Voidarou C, Skoufos J, Simopoulos C, Konstandi M, Kostakis D, et al. Stress-Induced Alterations in Intestinal Microflora. *Microb Ecol Health Dis.* 2004(16):28-31.
2. Bowe WP, Logan AC. Acne vulgaris, probiotics and the

- gut-brain-skin axis - back to the future? *Gut Pathog.* 2011;3(1):1.
3. Newson MJ, Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM. Stress-dependent and gender-specific neuroregulatory roles of the apelin receptor in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute stress. *J Endocrinol.* 2013 Jan;216(1):99-109.
4. Neuman-Lee LA, French SS. Wound healing reduces stress-induced immune changes: evidence for immune prioritization in the side-blotched lizard. *J Comp Physiol B.* 2014 Jul;184(5):623-9.
5. Spivak M, Lazarenko LM, Falalieieva TM, Virchenko OV, Neporada KS. Prophylactic effect of probiotic strains *Bifidobacterium animalis* VKL and VKB on stress-induced lesions in the gastric mucosa of rats. *Fiziol Zh.* 2013;59(2):23-30. [Ukrainian].
6. Lam EK, Yu L, Wong HP, Wu WK, Shin VY, Tai EK, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jun 22;565(1-3):171-9.
7. Elliott SN, Buret A, McKnight W, Miller MJ, Wallace JL. Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats. *Am J Physiol.* 1998 Sep;275(3 Pt 1):G425-32.
8. Lutgendorff F, Nijmeijer RM, Sandstrom PA, Trulsson LM, Magnusson KE, Timmerman HM, et al. Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis. *PLoS One.* 2009;4(2):e4512.
9. Takagi K, Kasuya Y, Watanabe K. Studies on the Drugs for Peptic Ulcer. A Reliable Method for Producing Stress Ulcer in Rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1964 Apr;12:465-72.
10. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Hmara NF. Measurement of diene conjugates in plasma by UV absorbance of heptane and isopropanol extracts. *Laboratory work.* 1988(2):60-3. [Russian].
11. Timirbulatov RA, Seleznev EM. A method for increasing of the intensity of lipid peroxidation in blood and its diagnostic value. *Laboratory work.* 1981(4):209-11. [Russian].
12. Chevare C, Chaba I., Sekey Y. Role of superoxide dismutase in oxidative processes of cell and method for its measuring in biological materials. *Laboratory work.* 1985(11):678-81. [Russian].
13. Korolyuk MA, Ivanov LI, Mayorov IG. Method of measuring of catalase activity. *Laboratory work.* 1998(1):16-9. [Russian].
14. Kolesova OE, Markin AA, Fedorova TN. Lipid peroxidation and methods for determining lipid peroxidation products in biological fluids. *Laboratory work.* 1984(9):540-6. [Russian].
15. Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(1):8-18.
16. Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH, Pan TM. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus exopolysaccharides*. *Journal of the science of food and agriculture.* 2011 Sep;91(12):2284-91.

17. Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. Int J Food Microbiol. 2004 Nov 15;96(3):219-33.
18. Orhan YT, Karagozlu C, Sarioglu S, Yilmaz O, Murat N, Gidener S. A study on the protective activity of kefir against gastric ulcer. Turk J Gastroenterol. 2012 Aug;23(4):333-8.
19. Senol A, Isler M, Karahan AG, Kilic GB, Kuleasan H, Goren I, et al. Effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions. Turk J Gastroenterol. 2011 Feb;22(1):18-26.

*Матеріал надійшов
до редакції 27.01.2014*

І.С.Фоменко, О.П. Корнійчук, А.Р. Гураль, Р.Г. Шикуча, І.І. Ільків, О.Я. Складаров

Роль циклооксигенази у модифікації мікрофлори кишки при стресі

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького;
E-mail: biochemistry@meta.ua

Вивчали зміни NO-синтазної системи та стан макрофлори щурів за умов поєднаної дії водно-імобілізаційного стресу та блокування циклооксигенази. Показано, що на тлі стресу різко зростала активність індукбельної NO-синтази, підвищувалась інтенсивність ліпопероксидації у тонкій та товстій кишці та змінювалась мікрофлора: кількість ешерихій зростала, а ентерококів знижувалась у тонкій кишці та підвищувалась у товстій кишці. Блокування циклооксигенази напроксеном на тлі стресу супроводжувалося зниженням активності індукбельної NO-синтази у тонкій та товстій кишці, порівняно з одночасним активуванням конститутивної NO-синтази в товстій кишці. При цьому було виявлено неістотне зростання числа ентерококів у дванадцятипалій кишці, різке зменшення кількості ешерихій у клубовій кишці, помірне зниження їх у проксимальній частині товстої кишки та зростання у дистальній. Дисбіоз, активація процесів ліпопероксидації та зміни показників NO-синтазної системи за умов поєднаної дії стресу та блокування циклооксигенази можуть створювати передумови для розвитку деструктивних змін, що лежать у основі ентеропатій. Ключові слова: стрес, нестероїдні протизапальні препарати, оксид азоту, мікрофлора, тонка кишка, товста кишка.

ВСТУП

Стрес є одним з ключових чинників, що зумовлює розвиток виразкових ушкоджень органів травної системи, викликаючи зміни моторики, секреції, мікрогемодинаміки, вісцеральної чутливості, проникності мембран клітин. Механізм впливу стресу комплексний, проте його основна складова пов'язана з вивільненням так званих «стрес-гормонів» наднирковими залозами. Останні зумовлюють вазоконстрикцію, і, як наслідок, виникнення гіпоксії та розвиток нітрозно-оксидативного стресу, спричинюють модифікацію вмісту мікрофлори у кишці та індукують зміни рівня нейротрансмітерів і прозапальних цитокінів, що, в свою чергу, також може впливати на кількісний і видовий склад мікрофлори [1]. Зміни секреції та моторики шлунка, дванадцятипалої та товстої кишки викликають активацію факторів, за рахунок яких реалізується

потенціал вірулентності таких бактерій, як *Escherichia coli* та *Campylobacter jejuni* [2].

Іншим чинником, що призводить до розвитку виразкових ушкоджень у травній системі є використання нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП). Упродовж тривалого періоду основна увага дослідників була приділена гастропатіям, що виникають унаслідок інгібування синтезу простагландинів за умови дії НПЗП. Проте значний ушкоджувальний ефект спостерігається також у тонкій та товстій кишках [3].

У патогенезі НПЗП-індукованої ентеропатії важливу роль відіграють зміни у складі кишкової мікрофлори. Вплив останньої на розвиток виразкових процесів у різних відділах травного тракту має різнонаправлений характер. З одного боку, при підвищенні проникності кишкового бар'єру під дією НПЗП посилюються сенсibiliзуючі

© І.С.Фоменко, О.П. Корнійчук, А.Р. Гураль, Р.Г. Шикуча, І.І. Ільків, О.Я. Складаров

впливи бактерійних симбіонтів (в першу чергу – ліпополісахаридів грамнегативних бактерій), виявляється агресивна дія окремих біологічно активних речовин, які синтезуються мікроорганізмами. Так, доведено концентраційну залежність між активністю глюкуронідази *E. coli*, яка розщеплює кон'югати метаболітів НПЗП до більш токсичних речовин, та інтенсивністю ерозивних процесів слизової оболонки. Також показано, що НПЗП самостійно та опосередковано через вплив на синтез ліпополісахаридів грамнегативних бактерій активують Toll-подібні рецептори. Останні відіграють ключову роль у внутрішньоклітинних механізмах розвитку виказкових ушкоджень у кишці, стимулюючи прозапальні реакції [4]. Тоді як нормосимбіонти виявляють протективну дію на слизову оболонку тонкої кишки, обмежуючи проліферацію умовно-патогенної мікрофлори. Разом з тим при тривалому застосуванні НПЗП у кишкової мікрофлорі не спостерігають таких симбіонтів, як *Bifidobacterium adolescentis* та *Lactobacillus acidophilus* [5].

Як у разі норми, так і патології, система оксиду азоту (NO), що включає субстрат L-аргінін, ферменти NO-синтази (NOS) та безпосередньо продукт NO, відіграє важливу роль у регуляції нормального функціонування органів травної системи. За фізіологічних умов постійно здійснюється експресія ізоформ NOS нейрональної (nNOS) та ендотеліальної (eNOS), які об'єднують під назвою конститутивна NOS (cNOS). NO, що синтезується цими ізоформами бере участь у регуляції фізіологічних процесів: підтримання відповідного рівня кровотоку, процесів транспорту води та електролітів, бактерицидної дії у разі потрапляння мікроорганізмів у слизову оболонку – міжклітинної комунікації, нейротрансмісії у ентеральних нейронах та моторики [6]. При розвитку виразкових ушкоджень, зокрема зумовлених дією НПЗП чи стресових чинників, відзначається різке зростання експресії iNOS та, як наслідок, підвищення продукції NO [7 – 9].

Зміни мікрофлори кишки у зв'язку зі станом системи L-аргінін – NOS – NO у тонкій та товстій кишці за умов поєднання впливу стресу та НПЗП вивчено недостатньо, що і стало метою нашої роботи.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 30 білих щурах масою 180–250 г, згідно з вимогами етики, передбаченими положеннями Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Тварини перебували у віварії за відповідних умов освітлення, температурного режиму та стандартного раціону. Перед проведенням досліджень вони мали вільний доступ до води впродовж 20 год.

Тварин було розподілено на 3 групи по 10 у кожній. Інтактні тварини увійшли до 1-ї контрольної групи, до 2-ї – тварини, яким моделювали водно-імобілізаційний стрес знерухомленням тварин у пластиковому контейнері, із зануренням останнього вертикально у воду ($23 \pm 0,5^\circ\text{C}$) до рівня мечоподібного відростка тварини упродовж 5 год [10]; до 3-ї – яким вводили неселективний блокатор циклооксигенази (ЦОГ) напроксен у дозі 10 мг/кг *per os* за 30 хв до моделювання стресу.

На тлі знеболювання тіопенталом натрію (40 мг/кг) тварин декапітували, розрізали передню черевну стінку по білій лінії живота, виділяли тонку та товсту кишку і промивали її фізіологічним розчином. Для проведення мікробіологічних досліджень відбирали 4 ділянки (дванадцятипалапапа кишка, клубова кишка, проксимальний відрізок товстої кишки та її дистальний відділ). Механічно відділяли слизову оболонку тонкої кишки та товстої кишки і гомогенізували їх для дослідження біохімічних показників.

При проведенні мікробіологічних досліджень використовували класичний культуральний метод [11]. Використовували диференційно-діагностичні та спеціальні живильні середовища. У дванадцятипалій,

клубовій кишці, проксимальному і дистальному відділах товстої кишки виявляли наявність, а також кількість мікроорганізмів: ентерококів, ешерихій, мікроаерофільних бактерій – лактобацил і біфідобактерій; анаеробів клостридіальної групи.

Призначені для посіву фрагменти кишок розрізали, очищали порожнину від залишків вмісту і висівали посів через відбитки на щільній живильній середовища – Ендо та кров'яний агар, що дало змогу виявити досліджувальні мікроорганізми у відповідному відділі травного каналу щура. Для визначення мікробного числа зскрібок зі слизової кишки вносили у пластикові ємності і зважували (близько 1-2 мг), додавали до наважки 1мл стерильного ізотонічного розчину та проводили посів. Після інкубування в термостаті засіяних живильних середовищ при 37 °С впродовж 24 год підраховували кількість пророслих колоній бактерій (колонієутворюючих одиниць – КУО) і перераховували на 1 г матеріалу, отримуючи мікробне число. При дослідженні мікроаерофільної та анаеробної мікрофлори фрагменти кишок (близько 100 мг) розтирали у фарфоровій ступці з 1 мл фізіологічного розчину і після розведення від 1:10 до 1:1000000000 вносили у наступні середовища: для виявлення лактобацил – напіврідкий тіогліколевий агар, для дослідження біфідофлори – Блаурока, для виявлення клостридій – Кітта-Тароці [11]. Приналежність пророслих мікроорганізмів до відповідного таксону встановлювали за морфологічними (мікроскопуванням) і культуральними властивостями. Кількість лактобацил, біфідобактерій та клостридій визначали за найбільшим розведенням первинного матеріалу, при якому в засіяному середовищі спостерігався ріст, перераховували на 1 г матеріалу.

Для оцінки системи L-аргінін – NOS – NO у гомогенатах слизових оболонок тонкої та товстої кишки визначали активність NOS за методом Сумбаєва [12]; вміст нітрит-аніона за допомогою реактиву Грісса [13], актив-

ність аргінази за методом Geyer і Dabich [14]. Процеси ліпопероксидації досліджували за вмістом ТБК-активних продуктів [15].

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням прикладної програми ANOVA “Statistica”. Статистично достовірними вважали розбіжності при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин контрольної групи ентерококи виявлено у всіх досліджених відділах кишки (табл. 1). Їх кількість зростала від $(6,3 \pm 0,21) \times 10^4$ у дванадцятипалій кишці до $(1,6 \pm 0,55) \times 10^5$ КУО/г, у проксимальному відділі товстої кишки, у дистальному відділі вона була дещо меншою – $(7,9 \pm 0,32) \cdot 10^4$ КУО /г, що відповідало даним літератури [16]. Число ешерихій, лактобацил і спороутворюючих анаеробів підвищувалося і було найбільшою у дистальному відділі товстої кишки. Вміст біфідофлори також відрізнявся у відділах тонкої та товстої кишки і коливався від $(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^3$ до $(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^7$ КУО/г.

У тварин контрольної групи як у слизовій оболонці тонкої кишки, так і товстої кишки домінувала активність cNOS, що становила $0,58 \pm 0,1$ та $0,49 \pm 0,09$ нмоль/хв·г відповідно, тоді як активність iNOS була незначною. Активність аргінази та вміст нітрит-аніона суттєво не відрізнялися в слизових оболонках тонкої та товстої кишки. Вміст ТБК-активних продуктів не перевищував 240,7 мкмоль/г, що свідчить про низьку інтенсивність процесів ліпопероксидації у тварин контрольної групи (табл.2).

За умов п'ятигодинного стресу були відзначені наступні зміни мікрофлори: кількість ентерококів у тонкій кишці практично не змінювалась, тоді як у дистальній частині товстої кишки відзначали її зростання – від $(7,9 \pm 0,32) \cdot 10^4$ до $(3,2 \pm 0,32) \cdot 10^5$ КУО/г ($P < 0,05$); число ешерихій збільшувалося у клубовій та проксимальній частині, а в дистальній частині воно зменшувалося; кіль-

кісні показники лактобацил у різних відділах кишки за умов стресу суттєво не змінювалися. Кількість біфідобактерій збільшувалась у дванадцятипалій та клубовій кишках, вміст клостридіальної мікрофлори підвищувався у клубовій та зменшувався у дистальному відділі товстої кишки.

Зміни мікрофлори супроводжувалися значними коливаннями показників NO-синтазної системи. Так, стрес спричинював значну активацію iNOS у досліджуваних відділах кишки, зокрема в слизовій оболонці тонкої кишки вона зростала майже втричі, а товстої кишки – приблизно у 5 разів (P<0,01). Водночас знижувалась активність cNOS (на 51 та 65% в слизовій оболонці тонкої та товстої кишок відповідно) та активність аргінази (на 31 та 52% відповідно, P<0,05). Підвищувався вміст

ТБК-активних продуктів на 13-19% (P<0,05), що свідчить про активування процесів ліпопероксидації. Макроскопічно деструктивних змін у слизовій оболонці тонкої та товстої кишок при дії стресу не спостерігалось.

При дослідженні мікрофлори різних відділів кишки тварин, які на тлі стресу отримували блокатор ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксен, відзначили тенденцію до зростання числа ентерококів у тонкій кишці до $(6,3 \pm 0,44) \cdot 10^5$ КУО/г. Кількість ешерихій у клубовій та проксимальній частині товстої кишці зменшилась, а у дистальній частині – збільшилося. Число лактобактерій за вказаних умов зросло в дванадцятипалій кишці (P<0,05), а клостридій – у товстій кишці.

Введення НПЗП на тлі стресу зумовлювало суттєві зміни показників NO-синтазної

Таблиця 1. Розподіл основних груп бактерійних симбіонтів (КУО/г) у різних відділах кишки за умов стресу та інгібування циклооксигенази напроксомом (M±m, n=10)

Схема досліджу	Enterococcus spp.	Escherichia coli	Lactobacillus spp	Bifidobacterium spp.	Clostridium spp.
Контроль					
Дванадцятипала кишка	$(6,3 \pm 0,21) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,14) \cdot 10^2$	$(2,5 \pm 0,25) \cdot 10^3$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(5,0 \pm 0,19) \cdot 10^2$
Клубова кишка	$(6,3 \pm 0,25) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,23) \cdot 10^3$	$(2,5 \pm 0,21) \cdot 10^4$	$(6,3 \pm 0,19) \cdot 10^3$	$(6,3 \pm 0,20) \cdot 10^3$
Проксимальний відділ товстої кишки	$(1,6 \pm 0,35) \cdot 10^5$	$(5,0 \pm 0,26) \cdot 10^4$	$(3,2 \pm 0,50) \cdot 10^6$	$(1,0 \pm 0,35) \cdot 10^6$	$(1,0 \pm 0,27) \cdot 10^4$
Дистальний відділ товстої кишки	$(7,9 \pm 0,32) \cdot 10^4$	$(4,0 \pm 0,30) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,35) \cdot 10^8$	$(3,2 \pm 0,40) \cdot 10^7$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$
Стрес					
Дванадцятипала кишка	$(1,0 \pm 0,32) \cdot 10^4$	0	$(1,6 \pm 0,20) \cdot 10^3$	$(1,26 \pm 0,25) \cdot 10^{4*}$	$(6,3 \pm 0,16) \cdot 10^2$
Клубова кишка	$(3,2 \pm 0,32) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,29) \cdot 10^{4*}$	$3,2 \pm 0,40) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,33) \cdot 10^{5*}$	$(1,0 \pm 0,24) \cdot 10^{4*}$
Проксимальний відділ товстої кишки	$(6,3 \pm 0,30) \cdot 10^5$	$(2,0 \pm 0,4) \cdot 10^{5*}$	$(2,5 \pm 0,38) \cdot 10^6$	$(2,0 \pm 0,35) \cdot 10^6$	$(1,3 \pm 0,25) \cdot 10^4$
Дистальний відділ товстої кишки	$(3,16 \pm 0,34) \cdot 10^{5*}$	$(2,0 \pm 0,32) \cdot 10^{4*}$	$(3,2 \pm 0,52) \cdot 10^8$	$(6,3 \pm 0,42) \cdot 10^7$	$(1,6 \pm 0,25) \cdot 10^{4*}$
Стрес і введення напроксену					
Дванадцятипала кишка	$(4,0 \pm 0,33) \cdot 10^4$	0	$(1,0 \pm 0,22) \cdot 10^{4**}$	$(1,6 \pm 0,32) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,22) \cdot 10^3$
Клубова кишка	$(6,3 \pm 0,32) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,16) \cdot 10^{2\#}$	$(1,0 \pm 0,26) \cdot 10^4$	$(1,6 \pm 0,32) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,24) \cdot 10^4$
Проксимальний відділ товстої кишки	$(6,3 \pm 0,44) \cdot 10^5$	$(1,6 \pm 0,35) \cdot 10^{4**}$	$(1,0 \pm 0,35) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,43) \cdot 10^6$	$(1,0 \pm 0,40) \cdot 10^{5**}$
Дистальний відділ товстої кишки	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(1,6 \pm 0,40) \cdot 10^{6**}$	$(4,0 \pm 0,40) \cdot 10^8$	$(6,3 \pm 0,32) \cdot 10^7$	$(1,3 \pm 0,33) \cdot 10^{5**}$

*P<0,05, порівняно з інтактними тваринами;

**P < 0,05 порівняно зі значеннями у тварин, які підлягали стресу.

системи. Напроксен спричинював підвищення активності cNOS у слизовій оболонці тонкої та товстої кишок на 12,5 та 43% ($P < 0,05$) відповідно порівняно зі значеннями при стресі. При цьому активність iNOS у слизовій оболонці товстої кишки знижувалась практично вдвічі ($P < 0,05$). Активність аргінази за умов неселективного інгібування ЦОГ на тлі стресу залишалась значно нижчою, ніж у інтактних тварин.

Слід відзначити, що ульцерогенна дія стресу носить комплексний характер – у механізми її розвитку залучені чинники, які регулюють функціонування організму на рівні центральних відділів ЦНС, системи гіпоталамус-гіпофіз-кора надниркових залоз, осі «головний мозок – кишка», а також на клітинному та молекулярному рівнях [1]. Так, вплив стресу викликає порушення мікрогемодинаміки та посилення оксидативних процесів, зростання проникності епітеліального бар'єру, зниження моторики тонкої кишки, а також зміни мікробіоценозу. При цьому моторна функція товстої кишки активується [1, 17].

«Стрес-гормони», з одного боку, викликаючи ішемію слизової оболонки тонкої та товстої кишки, зумовлюють зростання рівня активності iNOS та продукцію NO, а з іншого боку глюкокортикоїди інгібують фосфоліпазу A_2 , що відповідає за вивільнення арахідонової кислоти, та знижують синтез простагландинів [18]. Враховуючи те, що стрес тривав 5 год, більш виражено змінювалась активність системи NOS–NO та процесів ліпопероксидації. Серед досліджуваних мікроорганізмів спостерігали перерозподіл кількості ентерококів та ешерихій у бік їх зростання у тонкій та проксимальному відділі товстої кишки. У дистальному відділі товстої кишки спостерігалась елімінація вказаних груп мікроорганізмів, що можливо пов'язано з активацією рухової активності кишки за умов стресу. Варто зазначити, що згідно з даними літератури стрес зумовлює зменшення кількості лактобактерій в травному тракті [19], проте у наших дослідженнях показано лише тенденцію до її зниження в дванадцятипалій кишці та проксимальному відділі товстої кишки.

Таблиця 2. Зміни активності NO-синтаз (NOS), аргінази, вмісту нітрит-аніону та ТБК-активних продуктів у гомогенатах слизових оболонок тонкої та товстої кишок ($M \pm m$, $n=10$)

Схема досліджу	ТБК-активні продукти, мкмоль/г	Нітрит-аніон, мкмоль/г	NOS, нмоль/хв•г		Аргіназа, мкмоль/хв•мг
			Індуцибельна	Конститутивна	
Контроль					
Тонка кишка	191,0±9,9	17,2±1,3	0,24±0,06	0,58±0,1	0,32±0,04
Товста кишка	240,7±5	17,6±1,3	0,23±0,08	0,49±0,09	0,38±0,08
Стрес					
Тонка кишка	237,0±6,8*	20±0,75*	0,69±0,10*	0,22±0,07*	0,22±0,022
Товста кишка	267,4±6,0	20,5±1,1*	1,1±0,2**	0,17±0,06*	0,18±0,03*
Стрес і введення напроксену					
Тонка кишка	221,0±7,8***	20±0,81	0,39±0,14***	0,32±0,12	0,22±0,03
Товста кишка	277,1±7,3	18,2±1,7	0,54±0,23***	0,30±0,09	0,22±0,04

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ порівняно з інтактними тваринами; ***- $P < 0,05$ порівняно зі значеннями у тварин, які підлягали стресу.

У наших попередніх дослідженнях також було відзначено, що адреналініндукований стрес призводив до різкого підвищення активності iNOS, та інтенсивності процесів ліпопероксидації при практично відсутніх макроскопічних змінах у слизовій оболонці тонкої та товстої кишки [20]. Подібні зміни спостерігалися за умов водно-імобілізаційного стресу. Порівнюючи ранні зміни активності різних прозапальних ензимів (iNOS, мієлопероксидаза, ЦОГ-2) було показано, що зростання активності та експресії iNOS може служити найчутливішим маркером, котрий відображає ініціацію біохімічних змін, які призводять до розвитку деструктивних ушкоджень [21].

Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном на тлі стресу виявило зниження рівня активності iNOS у слизовій оболонці тонкої та товстої кишки у порівнянні зі значеннями при самому стресі. Подібні зміни спостерігалися в слизовій оболонці шлунка [22]. Це зумовлено тим, що між системами ЦОГ – простагландини та NOS–NO існують тісні взаємозв'язки: NO може безпосередньо стимулювати експресію ЦОГ та біосинтез простагландинів через пряму його дію на гем протетичної групи [23]. З іншого боку, простагландини регулюють активність NOS. У зв'язку з цим блокування активності ЦОГ призводить до зниження активності NOS (у першу чергу, iNOS) та продукції NO [8].

Відомо, що при застосуванні таких НПЗП, як диклофенак, напроксен, індометацин тощо відбувається неселективне блокування активності ЦОГ і, як наслідок, суттєве зменшення продукції простагландинів, що за фізіологічних умов здійснюють цитопротекторні ефекти в органах травної системи. Слід відзначити, що селективне інгібування ЦОГ-1 не викликало ушкоджень слизової оболонки, однак призводило до зниження синтезу простагландинів. Ушкоджуюча дія НПЗП у тонкій кишці у разі їх тривалого введення пов'язана з рециркуляцією: після всмоктування НПЗП у тонкій кишці вони надходять у печінку і у

складі жовчі виділяються в дванадцятипалу кишку та викликають деструктивний вплив на епітеліальні клітини [24].

При введенні напроксену на тлі водно-імобілізаційного стресу зміни кількості основних симбіонтів пов'язані з пригніченням утворення NO, який має бактерицидну дію і може відігравати роль селективного фактора в мікробних асоціаціях та зниженням утворення простагландинів, що супроводжується змінами моторики кишки і, відповідно, сповільнює елімінацію окремих груп мікроорганізмів (ешерихій та ентерококів).

З літературних джерел відомо, що введення НПЗП гризунам викликає зміни у кількості та видовому складі кишкових бактерій, що також є одним із факторів розвитку деструктивних ушкоджень кишки. Це в першу чергу стосується суттєвого зростання числа грам-негативних бактерій [24]. Слід відзначити, що деякі мікроорганізми, зокрема лактобацили та біфідобактерії маючи нітрозоредуктазну активність, також беруть участь в утворенні NO [7].

Аналізуючи отримані результати, слід врахувати те, що у раніше проведених нами дослідженнях показано, що блокування ЦОГ на тлі водно-імобілізаційного стресу призводило до зростання деструктивних ушкоджень слизової оболонки шлунка на тлі зниженої активності iNOS [19]. Відсутність макроскопічних ушкоджень слизової оболонки кишки можливо зумовлено вищим її антиоксидантним рівнем захисту порівняно зі слизовою оболонкою шлунка.

Таким чином, блокування ЦОГ на тлі стресу є фактором розвитку дисбіозу, що відбувається одночасно зі змінами нітрово-оксидативного стану кишки щурів. Це може бути спричинено тим, що, інгібітори ЦОГ-1/ЦОГ-2, порушуючи стабільність мутуалістичної системи “організм господаря – мікроорганізм” обмежують позитивні функції нормосимбіонтів, зсуваючи їх активність у бік реалізації патогенних потенцій.

ВИСНОВКИ

1. Водно-імобілізаційний стрес упродовж 5 год викликав різке зростання активності iNOS у слизовій оболонці тонкої та товстої кишок та підвищення рівня ліпопероксидації, тоді як активність cNOS та аргінази знижувалася, що супроводжувалось змінами мікробіоценозу: зростанням кількості ешерихій (крім дванадцятипалої кишки), тенденцією до зниження числа ентерококів у тонкій кишці та їх зростання в дистальному відділі товстої кишки, підвищенням кількості біфідобактерій у дванадцятипалій та клубовій кишці та зниженням вмісту клостридій у дистальному відділі товстої кишки.

2. Блокування ЦОГ напроксеном на тлі стресу у порівнянні зі значеннями у разі самого стресу, призводило до зниження активності iNOS у слизовій оболонці товстої та тонкої кишок, підвищенні активності cNOS в слизовій товстої кишки. При цьому виявлено зниження числа ешерихій у клубовій та проксимальній частині товстої кишки та зростання в дистальній частині товстої кишки. Кількість лактобактерій підвищилась у дванадцятипалій кишці, а клостридій – у тонкій кишці.

3. Незважаючи на короткоривалість впливу стресу та блокування ЦОГ зміни мікробіоценозу в тонкій та товстій кишці та активності iNOS створюють умови для подальшого розвитку ентеропатій.

**И.С.Фоменко, А.П. Корнейчук, А.Р. Гураль,
Р.Г. Шикун, И.И. Ильков, А.Я. Складаров**

РОЛЬ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ В МОДИФИКАЦИИ МИКРОФЛОРЫ КИШКИ ПРИ СТРЕССЕ

Изучали изменения NO-синтазной системы и состояние микрофлоры у крыс в условиях совместного влияния водно-иммобилизационного стресса и блокирования циклооксигеназы. Показано, что стресс сопровождается резким возрастанием активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS), повышением интенсивности процессов липопероксидации в слизистой оболочке тонкой и толстой кишки, а также изменением микрофлоры: количество эшерихий увеличивалось, энтерококков уменьшалось в тонкой и воз-

растало в толстой кишке. Блокирование циклооксигеназы напроксеном на фоне стресса сопровождалось снижением активности iNOS в тонкой и толстой кишках сравнительно со значениями при стрессе, одновременно усиливалась активность конститутивной NOS в толстой кишке. При этом наблюдалось умеренное увеличение количества энтерококков в двенадцатиперстной кишке, резкое уменьшение эшерихий в подвздошной кишке, умеренное снижение содержания последних в проксимальной части толстой кишки, а увеличение – в дистальной ее части. Дисбиоз, активация процессов липопероксидации и изменения показателей системы NOS в условиях совместного действия стресса и блокирования циклооксигеназы могут создавать предпосылки для развития деструктивных изменений, лежащих в основе энтеропатий.

Ключевые слова: стресс; нестероидные противовоспалительные препараты; оксид азота; микрофлора; тонкая кишка; толстая кишка.

**I.S. Fomenko, O.P. Korniyuchuk, A.R. Hural',
R.G. Shykula, I.I. Ilkiv, A.Ya. Sklyarov**

ROLE OF CYCLOOXYGENASE IN MODIFICATION OF INTESTINAL MICROFLORA UNDER STRESS CONDITION

Stress and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, which act as nonselective inhibitors of cyclooxygenase, are the main factors of ulcerogenesis in digestive system. However, the peculiarities of their combined action upon the status of intestinal microflora and the parameters of NO-synthase system are still poorly understood. In experiments with rats we show that water-restrained stress was accompanied by a considerable increase of iNOS activity and intensity of lipoperoxidation processes. The increase of *Escherichia coli* content and the decrease in *Enterococcus spp.* concentration in the small intestine with their simultaneous rise in the large intestine were noticed under these conditions. Cyclooxygenase blockage with naproxen prior to induction of water-restrained stress was accompanied by the decrease of iNOS in small and large intestines, with the synchronous rise of cNOS activity in the large intestine as compared with indexes in stress. The moderate increase in *Enterococcus spp.* content in duodenum with the rise of *Escherichia coli* concentration in the ileum was shown. The *Escherichia coli* content decreased in the proximal part of the large intestine and decreased in its distal part. Disbiosis, intensification of lipoperoxidation processes and changes in NO-synthase system parameters under condition of simultaneous action of stress and cyclooxygenase blockage can create preconditions for the development of destructive changes and enteropathias.

Key words: stress; NSAIDs; nitric oxide; microflora; small intestine; large intestine.

D.Halytskyi National Medical University, Lviv, Ukraine

REFERENCES

- Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J Physiol Pharmacol*. 2011. 62(6): 591-599.
- Collins SM, Bercik P. The Relationship Between Intestinal Microbiota and the Central Nervous System in Normal Gastrointestinal Function and Disease. *Gastroenterology*. 2009. 136 (6): 2003–2014.
- Lim YJ, Chun HJ. Recent advances in NSAIDs-induced enteropathy therapeutics: new options, new challenges. *Gastroenterol Resd Pract*. 2013. 2013: 1-7.
- Watanabe T, Higuchi K, Kobata A, Nishio H, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Takeuchi K, Arakawa T. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut*. 2008. 57 (2): 181-187.
- Uejima M, Kinouchi T, Kataoka K, Hiraoka I, Ohnishi Y. Role of intestinal bacteria in ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug. *Microbiol Immunol*. 1996. 40 (8): 553-560.
- Vento P, Kiviluoto T, Jarvinen HJ, Soynila S. *Scand J Gastroenterol*. 2001. 36 (2): 180–189.
- Lundberg JO, Weitzberg E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut*. 2013. 62(4): 616-626.
- Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Res*. 2005. 57 (2): 217–252.
- Sklyarov AY, Panasyuk NB, Fomenko IS. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *J Physiol Pharmacol*. 2011. 62 (1): 65-73.
- Takagi KY, Kayuya Y, Watanabe K. Studies on drugs for peptic ulcer. A reliable method for producing stress ulcers in rats. *Chem Pharm Bull*. 1964. 12: 465-472.
- Klymnjuk SI, Sytnyk IO, Tvoriko MS, Shyrobokov VP. *Practical microbiology*. Ternopil: Ukrmedknyga; 2004: 438 p.
- Sumbajev VV, Jasinskaja IM. The influence of DDT on the activity of nitric oxide synthase in liver, lungs and brain of rats. *Modern problems of toxicology*. 2000. 3: 3-7.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982. 126(1): 131-138.
- Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem*. 1971. 39(2): 412-417.
- Timirbulatov RA, Seleznev EI. Method for increasing the intensity of free radical oxidation of lipid-containing components of the blood and its diagnostic significance. *Lab Delo*. 1981. 4: 209-117.
- Amanov AN. Quantitative relationships of distinct types of gastrointestinal microflora of experimental animals (rats) in norm and under condition of imuran immunosuppression. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 1983; 6: 77-81.
- Larauche M, Kiank C, Tache Y. Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. *J Physiol Pharmacol*. 2009. 60 (7): 33-46.
- Basso N, Materia A, Forlini A, Jaffe BM. Prostaglandin generation in the gastric mucosa of rats with stress ulcer. *Surgery*. 1983. 94 (1): 104-108.
- Galley JD, Bailey MT. Impact of stressor exposure on the interplay between commensal microbiota and host inflammation. *Gut Microbes*. 2014. 5(3): 390-396.
- Shamro NR, Panasyuk NB, Fomenko IS, Sklyarov O Ya. Influence of vitamin C on mechanisms of cytoprotection, lipid peroxidation and NO-synthases under stress and experimental colitis in rats. *Biology and medicine Issues Review*. 2011. 3 (86): 159-163.
- Jorge E, Vergata P, Martin MT. Ileal inducible nitric oxide synthase mRNA expression in response to stress modified in Sprague-Dawley rats exposed to a previous intestinal inflammation. *Stress*. 2012. 15(1): 62-73.
- Fomenko IS, Bondarchuk TI, Biletska LP, Panasyuk NB, Sklyarov AY. Peculiarities of influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on parameters NO-synthase system in gastric mucosa of rats under stress conditions. *Fiziol Zh*. 2014; 60(2): 51-56.
- Ling JJ, Sun YJ, Zhu DY, Chen Q, Han X. Potential role of NO in modulation of COX-2 expression and PGE2 production in pancreatic beta-cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 37 (2): 139-146.
- Wallace JL. NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies. *Br J Pharmacol*. 2012. 165 (1): 67-74.

Матеріал надійшов до редакції 17.03.2014.

Т.В. Вовкун¹, П.І. Янчук¹, Л.Я. Штанова¹, С.П. Весельський¹, А.С. Шаламай²

Участь парасимпатичної ланки нервової системи в реалізації дії біофлавоноїдів на шлункову секрецію у щурів

¹ Київський національний університет ім. Тараса Шевченка;² ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Київ; E-mail: shtanova@ukr.net

Ми дослідили ефекти корвітину, модифікованої форми кверцетину, на секреторну функцію шлунка щурів з перев'язаним пілорусом та фізіологічні механізми, залучені в їх забезпечення. У тварин, яким корвітин вводили в дозі 5 мг/кг, незалежно від шляху введення – в шлунок чи в дванадцятипалу кишку, порівняно з контрольною групою, не спостерігали змін ні об'єму соку, ні загальної продукції хлористоводневої кислоти (ХК). Кількість препарату 40 мг/кг викликала збільшення об'єму шлункового соку та продукції ХК як при внутрішньошлунковому, так і внутрішньодуоденальному введенні. Нами було також встановлено, що після застосування великої дози корвітину (40 мг/кг, внутрішньошлунково) в крові експериментальних тварин спостерігалось вірогідне зменшення вмісту глюкози, чого не було виявлено при використанні 5 мг/кг препарату. Неспецифічний антагоніст М-холінергічних рецепторів атропін майже повністю блокував посилення шлункової секреції, яка була викликана введенням у шлунок 40 мг/кг корвітину. Виходячи з одержаних результатів, можна зробити висновок про те, що надходження до шлунка щура корвітину в кількості 40 мг/кг викликає гіпоглікемію, яка може спричинити зростання активності блукаючого нерва з наступною стимуляцією шлункової секреції. Блокада атропіном секреторної відповіді шлунка щурів, яка спостерігалась після застосування корвітину в зазначеній дозі, підтверджує участь парасимпатичної нервової системи в її забезпеченні.

Ключові слова: шлунок; корвітин; гіпоглікемія; шлункова секреція; хлористоводнева кислота; парасимпатична нервова система; перев'язування пілоруса.

ВСТУП

Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагідроксифлавонон) – один із найбільш поширених у природі флавоноїдів, відомий насамперед як сильний антиоксидант. Біохімічні механізми його дії на клітину частково пов'язують з гальмуванням активності низки ферментів, зокрема редуктази, ксантинооксидази, фосфодіестерази, Ca²⁺-АТФази, ліпоксигенази, циклооксигенази [1]. Гальмуючи активність фермента Н⁺,К⁺-АТФази ізольованих парієтальних клітин, кверцетин пригнічує стимульовану гістаміном секрецію хлористоводневої кислоти (ХК) з цих клітин [2]. Дані інших авторів, одержані в дослідях in vivo

свідчать, що кверцетин жодним чином не впливає на продукцію ХК [3]. Загалом його дія, як і інших флавоноїдів, є складною і її часто навіть називають парадоксальною. Ця сполука цікава тим, що різні її дози можуть викликати протилежні ефекти. Так, у малих дозах він виступає як антиоксидант, а у великих – як прооксидантна сполука [4]. Більшість досліджень ефектів кверцетину проведено in vitro, тому фізіологічні механізми його впливу на органи цілісного організму в переважній більшості не вивчені. Кверцетин, який є превалюючим флавоноїдом у щоденному раціоні людини, потрапляє до організму через шлунок, проте, внаслідок низької біо-

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

доступності майже не всмоктується і тому не має значного впливу на цей орган [5]. Для кращого засвоєння та збільшення терапевтичної ефективності флавоноїдів наразі розроблено спеціальні системи доставки їх у клітину – це такі, як ліпосоми, мікросфери, наночастинки, трансферосоми, етосоми тощо [6]. Конкретно для кверцетину було розроблено нанокристали – значно ефективніші у впливі на клітину, ніж оригінальна субстанція [7]. Вітчизняний препарат корвітин має підвищену розчинність у воді та в інших рідинах. При цьому він демонструє всі біологічні ефекти, притаманні кверцетину, зокрема є потужним антиоксидантом і блокатором цілої низки клітинних ферментів. На відміну від оригінального кверцетину, корвітин швидко проникає в кров'яне русло, протягом тривалого часу діючи на тканини та клітини. Тут його зв'язок з білками плазми крові становить більше, ніж 98 % [8]. Раніше ми показали, що малі дози корвітину захищають слизову оболонку шлунка (СОШ) щура від ураження етанолом, а великі – навпаки, посилюють. Далі на щурах з перев'язаним пілорусом нами було встановлено, що при внутрішньошлунковому застосуванні малих доз корвітину об'єм шлункового соку та загальна продукція ЖК в шлунку не змінюються, тоді як великі дози досліджуваного препарату провокували істотне збільшення цих показників шлункової секреції [9, 10]. Причини зміни об'єму секреції загалом та кислотопродукції в шлунку щура з перев'язаним пілорусом зокрема при застосуванні підвищених доз корвітину лишаються нез'ясованими.

Метою нашої роботи було дослідження фізіологічних механізмів, на яких базується встановлений ефект корвітину.

МЕТОДИКА

Всі експерименти проводили з дотриманням існуючих Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, що використовуються в експериментах (Страсбург,

1986). Дослідження проведені в гострих дослідах на білих безпорідних щурах масою 210–270 г, яких утримували у віварії в умовах природного освітлення на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної водопровідної води. Щурів наркотизували тіопенталом натрію (35 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Шлункову секрецію стимулювали за Шеєм 4-годинним перев'язуванням пілоруса [11]. Досліди розпочинали натще: напередодні тварин утримували голодними протягом 24 год. Усіх щурів було поділено на 13 груп, по 6–8 тварин у кожній. Вплив корвітину на шлункову секрецію при введенні препарату в шлунок вивчали на 3 групах щурів: I – контрольна група (фізіологічний розчин, 5 мл/кг), II група – корвітин, 5 мг/кг, III група – корвітин, 40 мг/кг. Ще по стільки ж груп тварин знадобилося: а) для вивчення шлункової секреції після введення корвітину в дванадцятипалу кишку; б) для визначення вмісту глюкози в крові. При дослідженні впливу блокади М-холінорецепторів атропіном на зміни інтенсивності шлункової секреції, викликані введенням корвітину в дозі 40 мг/кг, було залучено 4 групи тварин: I – контрольна (фізіологічний розчин); II – із введенням в шлунок корвітину (40 мг/кг); III – з внутрішньовенними ін'єкціями атропіну (1 мг/кг); IV – атропіну (1 мг/кг) і корвітину (40 мг/кг). Після наркотизування у щурів відкривали черевну порожнину та діставали шлунок. Пілоричну частину шлунка перев'язували лігатурою. Корвітин розчиняли у фізіологічному розчині безпосередньо перед роботою. Для того щоб виявити, які саме механізми задіяні в ефектах корвітину на шлункову секрецію у щурів з перев'язаним пілорусом – локальні чи системні, ми використали два шляхи введення препарату – внутрішньошлунковий і внутрішньодуоденальний. Усі розчини вводили через металеву орогастральну трубку. В експериментах з блокадою М-холінорецепторів атропін вводили через 5 хв після перев'язування пілоруса, а корвітин – через 15 хв. Після 4 год

досліді шлунки видаляли, а їх вміст збирали в градуйовані пробірки. Щурів виводили з досліді, ввівши велику дозу наркозу. У зібраних пробах шлункового соку визначали: загальний об'єм (мілілітри) та загальну продукцію ХК в мікромоль за 1 год. Після вимірювання об'єму сік центрифугували протягом 10 хв при 3500 хв⁻¹, супернатант переносили в хімічні скляночки, додавали до нього 5 мл дистильованої води, вимірювали його рН (іономір "рН-150") і титрували 0,01 N розчином NaOH до рН 7,0 для визначення загальної продукції ХК.

Вміст глюкози в крові вимірювали в мілімолях на 1 л за допомогою глюкометра та спеціальних тестів. Кров для аналізу брали з хвостової вени. В кожній тварини протягом експерименту було 5 таких аналізів: першу пробу крові відбирали за 10 хв до перев'язування пілоруса і введення корвітину в шлунок (вихідний рівень), всі наступні – в кінці кожної години експерименту. Така схема досліді дає змогу визначити не лише різницю між вихідним та кінцевим вмістом глюкози в крові, а й динаміку процесу, якщо така існує.

Статистичний аналіз одержаних результатів здійснювали за стандартними методами варіаційної статистики з використанням W-тесту Шапіро-Уїлка та критерію t Стью-

дента. Відмінності між окремими групами вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин, які одержували 5 мг/кг корвітину, незалежно від способу введення, не спостерігали змін ні об'єму соку, ні загальної продукції ХК, порівняно з контрольною групою. Доза препарату 40 мг/кг викликала збільшення цих показників як при внутрішньошлунковому, так і внутрішньодуоденальному введенні корвітину (таблиця).

Вміст глюкози в крові щодо контролю не змінювався при дозі корвітину 5 мг/кг і зменшувався при введенні 40 мг/кг препарату (рис. 1). Вірогідне зменшення цього показника було виявлене в кінці другої години досліді і тривало до завершення експерименту, поступово повертаючись до вихідного рівня. Мінімальний вміст глюкози в крові відмічали після третьої години досліді.

Щоб підтвердити нашу думку про те, що індукована корвітином в дозі 40 мг/кг секреція шлункового соку та ХК опосередкована парасимпатичними шляхами, ми досліділи вплив на неї неселективного антагоніста мускаринових рецепторів – атропіну і порівняли його з ефектом самого атропіну

Ефекти різних доз корвітину на показники шлункової секреції щурів з перев'язаним пілорусом

Схема досліді	Об'єм шлункового соку, мл	Δ , %	Продукція хлористоводневої кислоти, мкмоль/год	Δ , %
Внутрішньошлункові введення (n=8)				
фізіологічного розчину 5 мл/кг	3,7±0,16	–	47,7±2,97	–
корвітину 5 мг/кг	3,7±0,16	–	48,7±3,0	–
40 мг/кг	8,1±0,32***	220	253,2±12,2***	421
Внутрішньодуоденальні введення (n=6)				
фізіологічного розчин 5 мл/кг	2,84±0,47	–	44,56±4,2	–
корвітину 5 мг/кг	3,01±0,4	–	45,2±4,8	–
40 мг/кг	6,3±0,65***	210	169,65±24,8***	275

*** $P < 0,001$ щодо контролю.

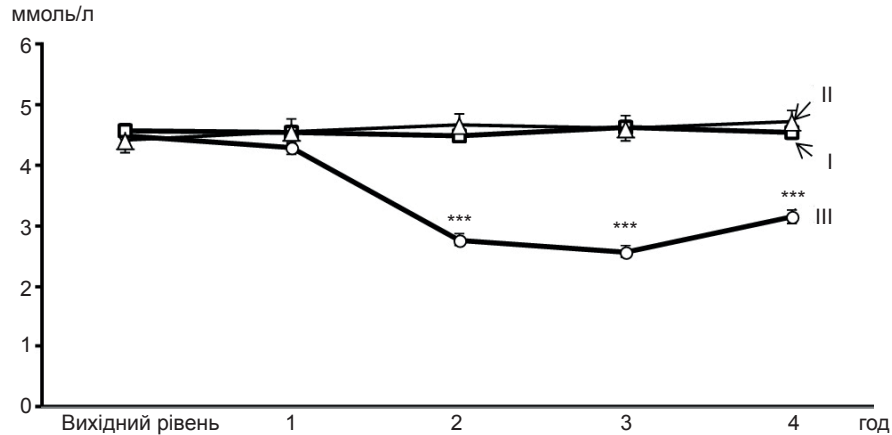


Рис.1. Зміни вмісту глюкози в крові щурів при внутрішньошлунковому введенні 40 мг/кг корвітину: I – контроль; II – після введення корвітину в дозі 5 мг/кг; III – після введення корвітину в дозі 40 мг/кг. *** $P < 0,001$ щодо вихідного рівня

на секрецію шлунку щура з перев'язаним пілорусом. Як показано в таблиці, одне лише перев'язування пілоруса стимулювало шлункову секрецію у щурів: об'єм соку становив $3,67 \pm 0,16$ мл, загальна продукція кислоти – $47,68 \pm 2,97$ мкмоль/год. Корвітин в дозі 40 мг/кг збільшував ці показники: об'єм соку до $8,1 \pm 0,32$ мл, дебіт кислоти – до $253,2 \pm 12,2$ мкмоль/год. Атропін зменшував об'єм соку інтактних щурів до $0,71 \pm 0,06$ мл, а в групі з

корвітином – до $0,63 \pm 0,07$ мл; загальна продукція ХК у цих самих групах знижувалася до $3,7 \pm 0,21$ та $3,9 \pm 0,32$ мкмоль/год відповідно (рис. 2).

Активність шлункових залоз регулюється як місцевими, так і центральними механізмами. Провідна роль у передачі центральних сигналів до шлунка належить блукаючим нервам. Перев'язування пілоруса збільшує шлункову секрецію внаслідок активації міс-

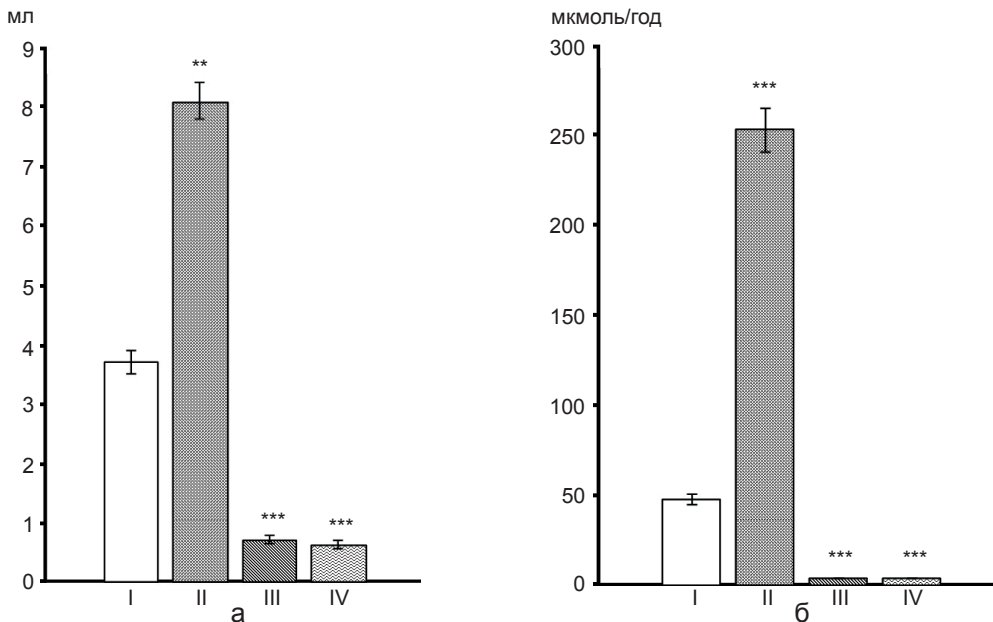


Рис. 2. Вплив блокади М-холінерецепторів атропіном на зміни інтенсивності шлункової секреції у щурів з перев'язаним пілорусом, викликані введенням корвітину в дозі 40 мг/кг: а – об'єм соку, б – продукція хлористоводневої кислоти; I – контроль (фізіологічний розчин); II – корвітин, 40 мг/кг; III – атропін, 1 мг/кг; IV – атропін і корвітин. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

цевих ваго-вагальних рефлексів, збуджених стимуляцією механорецепторів антральної зони СОШ [12]. Локальні механізми стимуляції шлункової секреції включають холін- та пептидергічні волокна шлункової стінки, а також гістамін і пептиди чи гормони (гастрин, соматостатин), що секретуються фундальними і антральними залозистими клітинами. Гастрин, гістамін та ацетилхолін стимулюють шлункову секрецію, збільшуючи як кількість соку, так і вміст ХК [13]. Згідно з даними літератури, у щура з перев'язаним пілорусом застосування гістаміну чи карбахоліну посилює секрецію шлункового соку в середньому в 1,5 раза, проте продукцію ХК збільшує лише гістамін (також в 1,5 раза) [14]. Результати нашої роботи свідчать, що корвітин в дозі 40 мг/кг посилює секрецію ХК у шлунку з перев'язаним пілорусом більше ніж у 4 рази. Така шлункова секреція можлива при центральній активації блукаючого нерва, зокрема через зниження вмісту глюкози в крові, яке можна спровокувати в експерименті введенням інсуліну. Гіпоглікемія є потужним подразником ядер блукаючих нервів. Через неї інсулін викликає значне і довготривале посилення роботи шлункових залоз, яке гальмується атропіном [15]. Вміст глюкози в крові знижується вже через 30 хв після введення інсуліну і для активації шлункової секреції він не повинен перевищувати 50 мг% [16]. У науковій літературі можна знайти підтвердження тому, що кверцетин може прямо стимулювати секрецію інсуліну β -клітинами підшлункової залози завдяки збільшенню надходження Ca^{2+} через L-тип кальцієвих каналів [17]. Оскільки корвітин добре розчиняється у воді та інших розчинниках і досить швидко потрапляє в кров'яне русло, то при введенні його у великих дозах у плазмі крові може швидко накопичуватися значна його кількість, провокуючи надходження інсуліну з підшлункової залози. В досліді на щурах було показано, що екстракти лікарських рослин з високим вмістом флавоноїдів, зокрема кверцетину, викликають до-

залежне зменшення вмісту глюкози в крові тварин як з експериментальним діабетом, так і з гікемією в межах норми [18].

Отже, попереднє застосування атропіну пригнічує шлункову секрецію у щурів, викликану корвітином, до того ж рівня, що й у тварин, яким вводили лише атропін. Цілком можливо, що стимуляція корвітином секреції шлункового соку і ХК здійснюється за участю парасимпатичної нервової системи, активація якої може бути викликана гіпоглікемією, зумовленою введенням великої дози препарату.

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

УЧАСТИЕ ПАРАСИМПАТИЧЕСКОГО ЗВЕНА НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В РЕАЛИЗАЦИИ ДЕЙСТВИЯ БИОФЛАВОНОИДОВ НА ЖЕЛУДОЧНУЮ СЕКРЕЦИЮ У КРЫС

Мы исследовали эффекты корвитина, модифицированной формы флавоноида кверцетина, на секреторную функцию желудка крысы с перевязанным пилорусом и физиологические механизмы, вовлеченные в их обеспечение. У животных, которые получали 5 мг/кг корвитина, независимо от способа введения – в желудок или в двенадцатиперстную кишку не наблюдали изменений ни объема желудочного сока, ни общей продукции хлористоводородной кислоты сравнительно с контрольной группой. Доза препарата 40 мг/кг вызывала увеличение объема сока и продукции хлористоводородной кислоты как при внутрижелудочном, так и внутридуоденальном введении. Нами также было установлено, что после применения большой дозы корвитина в крови экспериментальных животных наблюдалось достоверное уменьшение содержания глюкозы, чего не было обнаружено при использовании 5 мг/кг препарата. Неспецифический антагонист М-холинергических рецепторов атропин почти полностью блокировал усиление желудочной секреции, вызванное введением в желудок корвитина в большой дозе. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что поступление в желудок крысы с перевязанным пилорусом большой дозы корвитина провоцирует гипогликемическую реакцию крови, которая может стать причиной увеличения активности блуждающего нерва с последующей стимуляцией желудочной секреции. Блокада атропином секреторного ответа желудка, которая наблюдалась после применения 40 мг/кг корвитина, подтверждает участие парасимпатической нервной системы в этом процессе у крысы с перевязанным пилорусом.

Ключевые слова: желудок; корвитин; гипогликемия; желудочная секреция; хлористоводородная кислота; парасимпатическая нервная система; перевязка пилоруса.

T.V. Vovkun¹, P.I. Yanchuk¹, L.Y. Shtanova¹,
S.P. Veselsky¹, A.S. Shalamay²

PARTICIPATION OF PARASYMPATHETIC PART OF NERVOUS SYSTEM IN REALIZATION OF BIOFLAVONOIDS ACTION ON GASTRIC SECRETION IN RATS

In this study we investigated the effects of corvutin – modified form of flavonoid quercetin on the stomach secretory function and physiological mechanisms involved in the maintenance of such effects in rat's pylorus-ligated model. In animals which corvutin was injected at a dose of 5 mg/kg, regardless of the route of administration – in the stomach or duodenum, did not observe any changes in the volume of gastric juice or general production of hydrochloric acid, compared with the control data. Dose of 40 mg/kg caused an increase in the volume of gastric juice and hydrochloric acid output as when administered in the stomach and in the duodenum. We also found that after the application of a large dose of corvutin (intragastrically) in the blood of experimental animals showed reduction in glucose levels, which was not detected when using the drug in a dose of 5 mg/kg. Nonspecific antagonist of M-cholinergic receptors – atropine almost completely blocked the enhancement of gastric secretion, which was caused by the introduction into the stomach of corvutin in large dose. From the present data, it is reasonable to conclude that intragastric administration of a large dose of corvutin to pylorus-ligated rats induces hypoglycemic reaction of blood, which may cause an increase in vagus nerve activity with subsequent stimulation of gastric secretion. The increase in gastric juice volume and gastric acid output induced by corvutin was completely inhibited by atropine. These results suggested that the increase in gastric secretion induced by intragastrically administered corvutin could be mediated by the parasympathetic nervous system. Key words: stomach, corvutin, hypoglycemia, gastric secretion, hydrochloric acid, parasympathetic nervous system, pylorus ligation.

¹ Kyiv Taras Shevchenko National University;

² Closed Joint Stock Company «Borschagovsky Chemical-Pharmaceutical Plant», Kyiv, Ukraine

REFERENCES

- Ravichandran R, Rajendran M, Devapiriam D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. *Food Chem.* 2014;146:472–8.
- Beil W, Birkholz C, Sewing KF. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. *Arzneimittelforschung.* 1995;45(6):697–700.
- Min YS, Lee SE, Hong ST, Kim HS, Choi B-C, Sim SS, Whang WK, Sohn UD. The Inhibitory Effect of Quercetin-3-O-β-D-Glucuronopyranoside on Gastritis and Reflux Esophagitis in Rats. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2009;13:295–300.
- Choi EJ, Chee KM, Lee BH. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *Eur J Pharmacol.* 2003;482(1-3):281–85.
- Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys.* 2003;417:12–17.
- Kesarwani K, Gupta R, Mukerjee A. Bioavailability enhancers of herbal origin: an overview. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;4:253–66.
- Sahoo NG, Kakran M, Shaal LA, Li L, Muller RH, Pal M, Tan LP. Preparation and characterization of quercetin nanocrystals. *J Pharm Sci.* 2011;100(6):2379–90.
- Mokhort NA, Shalamay AS, Frantsuzova SB. Study of pharmacotherapeutic properties dosage forms of quercetin. In: Moibenko AA. *Bioflavonoids as organoprotectors (quercetin, corvutin, quertin).* Kiev: Naukova Dumka; 2012. – p. 74–117. [Ukrainian].
- Vovkun TV, Yanchuk PI, Shtanova LY, Veselskiy SP, Baranowskiy VA. Effect of Corvutin on secretory processes and blood flow in the gastric mucosa of rats. *Physiol Zh.* 2013;59(1): 40–7. [Ukrainian].
- Tetyana V. Vovkun, Petro I. Yanchuk, Lydiya Y. Shtanova, Stanislav P. Veselsky, Vasyl A. Baranowsky. Effect of Corvutin on Secretory Processes and Blood Flow in the Rat Gastric Mucosa. *Int J Physiol and Pathophysiol.* 2014;4.70(4):335-43.
- Shay H, Komarov S, Fels SS, Meranze D, Gruenshtein M, Siple H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterol.* 1945;5:43–61.
- Hakanson R, Hedenbro J, Liedberg G, Sundler F, Vallgren S. Mechanisms of gastric acid secretion after pylorus and oesophagus ligation in the rat. *J Physiol.* 1980;305:139–49.
- Furutani K, Aihara T, Nakamura E, Tanaka S, Ichikawa A, Ohtsu H, Okabe S. Crucial Role of Histamine for Regulation of Gastric Acid Secretion Ascertained by Histidine Decarboxylase-Knockout Mice. *The J of Pharm and Experim Ther.* 2003;307:331–38.
- Kurasawa T, Chikaraishi Y, Naito A, Toyoda Y, Notsu Y. Effect of *humulus lupulus* on gastric secretion in a rat pylorus-ligated model. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(2):353–57.
- Kovacs TO1, Lloyd KC, Walsh JH. Gastrin partially mediates insulin-induced acid secretion in dogs. *Peptides.* 1996;17(4):583–87.
- Polacek MA, Ellison EH. Insulin-Induced Stimulation of Gastric Acid Secretion. *JAMA.* 1963;183(12):1006–7.
- Bardy G, Virsolvy A, Quignard JF, Ravier MA, Bertrand G, Dalle S, Cros G, Magous R, Richard S, Oiry C. Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells. *Br J Pharmacol.* 2013;169(5):1102–13.
- Ojewole JA. Hypoglycemic effect of *Sclerocarya birrea* [(A. Rich.) Hochst.] [Anacardiaceae] stem-bark aqueous extract in rats. *Phytomedicine.* 2003;10(8):675–81.

Матеріал надійшов
до редакції 02.10.1014

Л.М. Плотнікова¹, В.Я. Березовський¹, С.П. Весельський²

Вплив зниженої концентрації кисню та сірководню на амінокислотний метаболізм і проліферацію мезенхімальних клітин

¹Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології», Науково-дослідний інститут фізіології імені академіка Петра Богача;
E-mail: lidiiianik@i.ua

Досліджено вплив донора сірководню (10^{-12} моль/л NaHS – I група) окремо та разом із зниженою концентрацією кисню (5% O_2 – II група, 3% O_2 – III група, 24 год) на життєдіяльність культури стовбурових клітин людини. Показано, що проліферація клітин знижувалася на 3-тю добу культивування у I, II і III групі в 1,7; 2,8 і 4,2 рази. На 4-ту добу цей показник був меншим у I, II і III групі на 29; 33 і 54% порівняно з контролем. Отже, несприятливий вплив NaHS підсилювався при зниженні концентрації кисню. Встановлено, що в усіх дослідних варіантах інтенсивно поглиналися із живильного середовища амінокислоти: цистеїн і цистин; серин і аспарагінова кислота; валін і триптофан; пролін і оксипролін, що беруть участь у синтезі білків, зокрема колагену. У культуральній рідині підвищувалася концентрація вільних амінокислот трьох фракцій: аргініну, гістидину і таурину; гліцину і метіоніну; аланіну і глутаміну. Вважаємо, що у застосованій концентрації донор сірководню за умов зниженого вмісту кисню у газовому середовищі інкубування гальмує проліферацію і змінює амінокислотний метаболізм клітин лінії 4BL людини.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини; сірководень; амінокислотний склад; проліферація.

ВСТУП

У регенеративній медицині широко використовують стовбурові клітини (СК) [1]. Це зумовлено їх здатністю до самовідновлення, високим проліферативним потенціалом і можливістю перетворюватися в різні клітини організму. Джерелами СК можуть бути: кістковий мозок, жирова тканина, пуповинна і периферична кров [2, 3]. Проте до цього часу питання вибору оптимальних умов їх культивування залишається не вирішеним. Не існує єдиної точки зору щодо впливу газових сумішей зі зниженим вмістом кисню (O_2) та газотрансмітерів, зокрема сірководню (H_2S), на процеси життєдіяльності клітин. Одні дослідники виявляли зростання проліферативної активності СК жирової тканини людини

© Л.М. Плотнікова, В.Я. Березовський, С.П. Весельський

при зниженні концентрації O_2 до 5% [4, 5], інші – гальмування проліферації СК пуповини через 72 год культивування при 1,5% O_2 [6]. Показано, що H_2S також здатен впливати на клітинну проліферацію: стимулювати [7] або гальмувати її [8]. Розбіжність даних, можливо, є наслідком використання різної концентрації O_2 та H_2S , тривалості впливу того чи іншого фактора, вибором клітинної культури.

Мета нашої роботи – дослідити сумісний вплив зниженої концентрації кисню та донора сірководню на амінокислотний метаболізм і проліферацію стовбурових клітин людини.

МЕТОДИКА

Клітинна лінія 4BL людини – це мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), одержані

з периферичної крові здорового донора і переведені в умови стандартної моношарової культури. Вона отримана у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України [9].

Живильне середовище культивування містило: DMEM («Sigma», США), 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби («Sigma», США), 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Донором сірководню у ньому був гідросульфід натрію (NaHS, «Sigma», США) у концентрації 10^{-12} моль/л. Контрольну групу клітин культивували при 37°C в стандартних умовах CO_2 -інкубатора: 5% CO_2 і 95% повітря (21% O_2). У дослідних варіантах використано дві газові суміші зі зниженою концентрацією кисню, яка відповідає фізіологічному напруженню O_2 у тканинах: 1) 5% O_2 + 5% CO_2 + 90% N_2 ; 2) 10% O_2 + 5% CO_2 + 85% N_2 .

Для визначення проліферативної активності культуру досліджуваної лінії розсівали по 50 тис клітин у скляні 35-ти мм чашки Петрі. Клітини інкубували протягом 24 год у газових сумішах, потім переносили у CO_2 -інкубатор без зміни живильного середовища. Проби культуральної рідини відбирали на третю (72 год) й четверту (96 год) добу. Клітини ферментативно знімали за допомогою суміші 0,25%-го розчину трипсину і 0,02%-го ЕДТА (1:1) та підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва [10].

Концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині визначали методом тонкошарової хроматографії. Для цього до 1 мл безклітинного живильного середовища додавали 2 мл суміші спирту та ацетону (1:3), перемішували і через 30 хв центрифугували (10 хв при $3\ 000\ \text{хв}^{-1}$). Супернатант випарювали до 1 мл і наносили на хроматографічний папір по 20 мкл. Амінокислоти розділяли на 13 фракцій: 1) цистеїн і цистин; 2) аргінін, гістидин і таурин; 3) лізин і аспарагін; 4) гліцин і метіонін; 5) серин і аспарагінова кислота; 6) аланін і глютамін; 7) валін і триптофан; 8) тирозин і глютамінова кислота; 9) ізовалін і

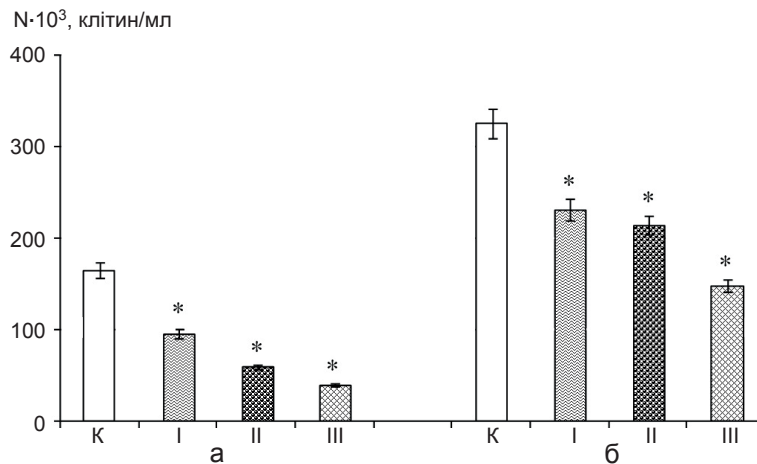
треонін; 10) пролін і оксипролін; 11) лейцин; 12) фенілаланін; 13) ізолейцин. Для розгонки використовували систему розчинників, яка включала ізоаміловий і бутиловий спирти, оцтову і мурашину кислоти та воду (9:7:4:2:5 за об'ємом) [11, 12].

Експериментальні результати обробляли математично з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel 2003 і OriginPro 7,5. Вірогідність різниці середніх значень визначали за критерієм t Стьюдента. Результати вважали статистично достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Культивування в умовах зниженої концентрації кисню (3 або 5% O_2 , 24 год) та за наявності донора сірководню (10^{-12} моль/л NaHS) призводило до змін проліферативної активності МСК периферичної крові людини. На третю добу у контролі кількість клітин в 1 мл була 165 тис, у I групі – 95,7 тис, у II – 59,4 тис, а у III – 39,6 тис (рисунок). На четверту добу цей показник вірогідно знизився у I, II і III групі на 29; 33 і 54% відповідно порівняно з контролем. Слід відмітити, що зниження концентрації кисню, при наявності у культуральній рідині NaHS, супроводжувалося додатковим зменшенням кількості клітин. Отже, ми зареєстрували посилення несприятливого впливу одного фактора (NaHS) дією іншого (3 або 5% O_2).

Відомо, що H_2S може зупиняти клітинне дихання [13]. Механізм його токсичної дії пов'язаний здебільшого з інгібуванням металовмісних ферментів. Таким чином, сірководень блокує передачу електронів із цитохромоксидази, ензима мітохондріального дихального ланцюга, на кисень. Внаслідок такої дії гальмується вивільнення енергії в клітинах. За іншими даними, донор H_2S (100 мкмоль/л NaHS) здійснював цитопротекторний вплив на первинну культуру ембріональних шурячих нейронів при використанні моделі окиснювального стресу, індукованого



Проліферація клітин лінії 4BL людини контрольних (К) і дослідних (I – 21% O₂ і 10⁻¹² моль/л NaHS; II – 5% O₂ і 10⁻¹² моль/л NaHS; III – 3% O₂ і 10⁻¹² моль/л NaHS) груп на третю (а) та четверту (б) добу культивування. *P<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

глутаматом (1 ммоль/л, 2 год). Газотрансмітер підвищував внутрішньоклітинну концентрацію антиоксиданта глутатіону через активацію експресії γ -глутамілцистеїнінази [14]. Показано, що сірководень сприяв проліферації і диференціації нейрональних стовбурових клітин гіпокампа миші C57BL/6 після гіпоксії. Однодобові тварини зазнавали впливу гіпоксичної газової суміші (5% кисню в азоті) протягом 2 год. Внутрішньоочередово вводили NaHS (56 мкмоль·кг⁻¹) протягом 30 днів. Було показано збільшення кількості проліферативних клітин у зубчастій звивині гіпокампа мишей після гіпоксії [7]. До захисних ефектів, які спостерігаються при дії сірководню на мітохондрії, ізольованих із тканини серця щурів, можуть бути частково залучені АТФ-залежні калієві канали. Низькі концентрації (10⁻¹²-10⁻⁸ моль/л) збільшували набрякання органел, а фізіологічні (10⁻⁶-5·10⁻⁵ моль/л) – здійснювали протекторний ефект щодо кальційіндукованого набрякання мітохондрій серця щурів [15].

Важливо також зазначити, що МСК кісткового мозку синтезують H₂S для регулювання їх самовідновлення і остеогенної диференціації. Нестача H₂S призводила до дефектів кісткової тканини (остеопороз)

миші [16]. Крім того було показано, що сірководень (0,1 нг/мл H₂S, 9 діб) стимулював диференціацію МСК кісткового мозку людини і пульпи зуба у гепатоцитарному напрямку. Накопичення глікогену і синтез сечовини вважали маркерними показниками перетворення МСК у гепатоцити [17]. Інші дослідження виявили зниження проліферації фібробластів серця людини на 33-58% через гальмування активності калієвих каналів при концентрації NaHS 100-500 мкмоль/л. Виявлено зменшення їх диференціювання у бік міофібробластів [8]. Використані нами умови культивування (10⁻¹² моль/л NaHS окремо та разом із 3; 5% O₂) пригнічували проліферативну активність МСК людини лінії 4BL у культурі.

Обмін речовин, або метаболізм – складає основу життєдіяльності клітини. Із зовнішнього середовища у клітину надходять вода, іони солей, неорганічні і органічні молекули. Через плазматичну мембрану із клітини виводяться продукти обміну, а також речовини, синтезовані у клітині (білки, вуглеводи, гормони). Амінокислоти є мономерними одиницями білків, тому ми дослідили зміни їх концентрацій у культуральній рідині МСК. На третю добу культивування був вірогідно знижений вміст наступних вільних амінокис-

лот: серину і аспарагінової кислоти – на 12%, а також треоніну і ізоваліну – на 12% порівняно з контролем (таблиця). На четверту добу зросла концентрація аланіну і глутаміну (на 14%); аргініну, гістидину і таурину (на 19%); гліцину і метіоніну (на 46%). Концентрація цистеїну і цистину була нижча на 22%; валіну і триптофану – на 27%; проліну і оксипроліну – на 30%; серину і аспарагінової кислоти – на 35%; фенілаланіну – на 16% і лейцину – на 20% щодо контролю.

Гідросульфід натрію у досліджуваній концентрації при 3 або 5% O₂ по-різному впливав на амінокислотний склад культуральної рідини МСК лінії 4BL людини. Ми наведемо тільки ті фракції амінокислот, що змінювалися вірогідно. Так, концентрація цистеїну і цистину, які зміцнюють сполучну

тканину, була нижчою відносно контрольних значень на 41-51%; серину і аспарагінової кислоти – на 38-54%; валіну і триптофану – на 40-53%; ізоваліну і треоніну – на 22-23%; а проліну і оксипроліну, які входять до складу колагену – на 35-50%. Збільшився вміст аргініну, гістидину і таурину на 33-46%; аланіну і глутаміну – на 21-35%, гліцину і метіоніну – на 24-72% порівняно з контролем.

Зниження концентрації вільних амінокислот у культуральній рідині може свідчити про їх більш інтенсивне поглинання клітиною. Незамінні амінокислоти, на відміну від замінних, не синтезуються у людському організмі і повинні обов'язково надходити з їжею. До них відносять валін, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, фенілаланін, гістидин (для дітей), аргінін

Таблиця. Вплив гідросульфиду натрію (10⁻¹² моль/л) на концентрацію вільних амінокислот (мг/мл) у культуральній рідині клітинної лінії 4BL людини (M±m, n = 6)

Показники	Контроль	Дослід	Δ, %	Контроль	Дослід	Δ, %
	3-тя доба			4-та доба		
Цистеїн, цистин	0,40±0,02	0,38±0,03	-5	0,37±0,02	0,29±0,02*	-22
Аргінін, гістидин, таурин	1,23±0,09	1,14±0,05	-7	1,40±0,05	1,67±0,06*	+19
Лізин, аспарагін	2,76±0,11	2,99±0,12	+8	2,92±0,13	3,19±0,14	+9
Гліцин, метіонін	3,26±0,08	3,08±0,17	-5	3,02±0,06	4,38±0,13*	+46
Серин, аспарагінова кислота	1,00±0,04	0,88±0,04*	-12	1,10±0,04	0,71±0,02*	-35
Аланін, глутамін	3,89±0,06	3,84±0,05	-1	4,29±0,14	4,88±0,15*	+14
Валін, триптофан	0,61±0,02	0,62±0,02	+2	0,60±0,03	0,44±0,02*	-27
Тирозин, глутамінова кислота	4,34±0,23	3,97±0,16	-9	4,79±0,12	5,13±0,23	+7
Треонін, ізовалін	2,01±0,06	1,77±0,04*	-12	1,66±0,05	1,58±0,04	-5
Пролін, оксипролін	0,94±0,02	0,91±0,04	-3	0,71±0,02	0,50±0,02*	-30
Лейцин	1,10±0,04	1,06±0,04	-4	1,06±0,04	0,85±0,03*	-20
Фенілаланін	0,61±0,02	0,62±0,02	+2	0,49±0,02	0,41±0,03*	-16
Ізолейцин	0,13±0,01	0,15±0,02	+15	0,12±0,02	0,10±0,01	-17

*P<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

(для дітей та осіб похилого віку) [18]. У наших досліджах, зниження концентрації фенілаланіну, лейцину, валіну і триптофану у живильному середовищі клітинної лінії 4BL людини можна пояснити їх незамінністю.

Цистеїн є складовою багатьох білків, тому активно поглинається клітиною. До його складу входить тиольна група -SH, завдяки чому дві молекули (чи їх залишки у складі пептидів) цієї речовини можуть з'єднуватися дисульфідним зв'язком, що формується окисненням -SH груп, утворюючи сполуку цистин. Такі зв'язки важливі для формування і підтримання третинної структури білків. Відомо, що ендогенний H_2S синтезується із L-цистеїну за допомогою цистатіонін- β -синтази, цистатіонін- γ -ліази і 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази [15].

У літературі ми не виявили даних щодо впливу донора сірководню на амінокислотний метаболізм стовбурових клітин в умовах зниженої концентрації кисню. Проте Аніскіна та співавт. дослідили вплив 20 амінокислот (0,05 нг/мл) на клітинну проліферацію і апоптоз в органотиповій культурі тканин (селезінка, печінка, нервова тканина) молодих (1-місячних) і старих (18-місячних) щурів. Виявлено стимуляцію зони росту при дії 4 амінокислот – лізину, аспарагіну, аргініну і глутамінової кислоти в культурі тканин селезінки і печінки. Інші амінокислоти пригнічували або не впливали на проліферацію клітин. Протилежні ефекти спостерігали в експлантатах кори головного мозку. Стимулювальну дію мали амінокислоти з високою гідрофобністю: аспарагінова кислота, тирозин, валін, треонін, метіонін, лейцин, а інгібувальну – гліцин, пролін, триптофан [19].

Будь-яка із замінних амінокислот може синтезуватися в організмі у необхідних кількостях. При цьому вуглецева частина амінокислоти утворюється з глюкози, а α -аміногрупа вводиться з інших амінокислот трансамінуванням [20]. Слід відмітити, що у всіх варіантах нашого експерименту у культуральній рідині зростала концентрація

аргініну, гліцину, аланіну і глутаміну, які є замінними амінокислотами, а серину і аспарагінової кислоти, навпаки, знижувалася. Таку закономірність можна пояснити тим, що гліцин синтезується з серину під дією сериноксиметилтрансферази за наявності тетрагідрофолієвої кислоти. Серин утворюється з гліколітичного проміжного продукту 3-фосфогліцерату. Аланін, аспартат (попередник аспарагіну), глутамат (попередник глутаміну, аргініну) утворюються із пірувату, оксалоацетату й α -кетоглутарату – відповідно. Аргінін у клітині є джерелом NO [21]. Під дією аргінази він перетворюється на амінокислоту орнітин, яка не входить до складу білків організму. З орнітину синтезуються поліаміни: путресцин, спермідин і спермін. Вони мають великий позитивний заряд, легко зв'язуються з негативно зарядженими молекулами ДНК і РНК, входять до складу хроматину і беруть участь у реплікації ДНК, стимулюють процеси транскрипції і трансляції. Їхня концентрація сильно зростає при інтенсивній проліферації тканин. Отримані нами результати подібні до даних досліджень Нігуєра та співавт., які за допомогою рідинної хроматографії встановили закономірності метаболізму амінокислот у МСК кісткового мозку людини при статичному (на пластику, 8 діб) та динамічному (у біореакторі, 5 діб) культивуванні. Клітини секретували у культуральну рідину аланін, гліцин, глутамат та орнітин, а поглинали – глутамін, гістидин, серин, тирозин, аспартат і 8 незамінних амінокислот [22].

Отримані нами результати свідчать, що поєднаний вплив гіпоксії (3 або 5% O_2) і сірководню знижує проліферативну активність клітин лінії 4BL людини. Зменшувалася концентрація вільних амінокислот у культуральній рідині, що беруть участь у синтезі колагену (проліну і оксипролін) та інших білків. Підвищувалася концентрація амінокислот (гліцину, аланіну, аргініну, глутаміну), які можуть включатися в енергетичний обмін.

ВИСНОВКИ

1. У культуральній рідині всіх дослідних груп клітин лінії 4BL людини під сумісним впливом зниженої концентрації кисню (5 або 3% O₂) та донора сірководню (10⁻¹² моль/л NaHS) вірогідно підвищувалася концентрація трьох фракцій амінокислот: аргініну, гістидину і таурину; гліцину і метіоніну; аланіну і глутаміну. Концентрація цистеїну і цистину, серину і аспарагінової кислоти, валіну і триптофану, проліну і оксипроліну знизилася відносно контрольних значень.

2. Додавання NaHS (10⁻¹² моль/л) у живильне середовище при 21% O₂ гальмувало проліферацію клітин лінії 4BL людини в 1,4-1,7 раза.

3. Донор сірководню, в умовах зниженої концентрації кисню (5 або 3% O₂), пригнічував проліферацію клітин на 4-ту добу культивування на 33 та 54% відповідно порівняно з контролем.

4. Знижений парціальний тиск кисню здатний посилювати негативний вплив H₂S на проліферацію стовбурових клітин людини, тому культивування при сумісній дії цих двох факторів не сприяє фізіологічному розмноженню клітин.

Л.Н. Плотнікова, В.А. Березовський,
С.П. Весельський

ВЛИЯНИЕ ПОНИЖЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КИСЛОРОДА И СЕРОВОДОРОДА НА АМИНОКИСЛОТНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Исследовано влияние донора сероводорода (10⁻¹² моль/л NaHS – I группа) отдельно и вместе с пониженной концентрацией кислорода (5% O₂ – II группа, 3% O₂ – III группа, 24 ч) на жизнедеятельность культуры стволовых клеток человека. Показано, что пролиферация клеток снижалась на 3-и сутки культивирования в I, II и III группе в 1,7; 2,8 и 4,2 раза. На 4-е сутки этот показатель был меньше в I, II и III группе на 29; 33 и 54% по сравнению с контролем. Итак, неблагоприятное воздействие NaHS усиливалось при снижении концентрации кислорода. Установлено, что во всех опытных вариантах интенсивно поглощались из питательной среды аминокислоты: цистеин и цистин,

серин и аспарагиновая кислота, валин и триптофан, пролин и оксипролин, которые участвуют в синтезе белков, в частности коллагена. В культуральной жидкости повышалась концентрация свободных аминокислот трех фракций: аргинина, гистидина и таурина; глицина и метионина; аланина и глутамина. Считаем, что в примененной концентрации донор сероводорода в условиях пониженного содержания кислорода в газовой среде инкубирования тормозит пролиферацию и изменяет аминокислотный метаболизм клеток линии 4BL человека.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; сероводород; аминокислотный состав; пролиферация.

L.N. Plotnikova, V.A. Berezovskii, S.P. Veselskii

EFFECT OF REDUCED OXYGEN CONCENTRATIONS AND HYDROGEN SULFIDE ON THE AMINO ACID METABOLISM AND MESENCHYMAL CELLS PROLIFERATION

We investigated the effect of hydrogen sulfide donor (10⁻¹² mol/l NaHS – I group) alone and together with the reduced oxygen concentrations (5% O₂ – II group, 3% O₂ – III group, 24 h) on the biological processes of human stem cells culture. It was shown that the cells proliferation by the third day of cultivation in I, II and III group decreased 1,7; 2,8 and 4,2 times. On the 4th day of culture proliferation inhibited in I, II and III group by 29; 33 and 54% compared to the control. Thus, adverse effects NaHS enhanced by reducing the oxygen concentration. It was established that in all experimental versions rapidly absorbed from the culture medium amino acids: cysteine and cystine, serine and aspartic acid, valine and tryptophan, proline and hydroxyproline, which are involved in the synthesis of proteins, in particular collagen. In the culture medium increased the concentration of free amino acids of the three factions: arginine, histidine and taurine; glycine and methionine; alanine and glutamine. We believe that in the applied concentration of hydrogen sulfide donor in conditions of low oxygen in a gaseous medium incubation inhibits the proliferation and alters the amino acid metabolism of human cells line 4BL.

Key words: mesenchymal stem cells; hydrogen sulphide; amino acid composition; proliferation.

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

Peter Bogach Institute of Physiology ESC «Institute of biology» T.Shevchenko Kyiv National University

REFERENCES

1. Lisiany NI. Mesenchymal stem cells and immunological properties. *Fiziol Zh.* 2013;59(3):126-34.
2. Margini C, Vukotic R, Brodosi L, Bernardi M, Andreone P. Bone marrow derived stem cells for the treatment

- of end-stage liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(27):9098-105.
3. Wang X, Zhang H, Nie L, Xu L, Chen M, Ding Z. Myogenic differentiation and reparative activity of stromal cells derived from pericardial adipose in comparison to subcutaneous origin. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(4):92.
 4. Buravkova LB, Grinakovskaya OS, Andreeva ER, Zhamalova AP, Kozionova MP. Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension. *Cytology.* 2009;51(1):5-11.
 5. Rylova YuV, Buravkova LB. Long-term expansion of multipotent mesenchymal stromal cells under reduced oxygen tension. *Cytology.* 2013;55(12):852-60.
 6. Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal.* 2010;8:18-27.
 7. Liu D, Wang Z, Zhan J, Zhang Q, Wang J, Zhang Q, Xian X, Luan Q, Hao A. Hydrogen sulfide promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells and protects hypoxia-induced decrease in hippocampal neurogenesis. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;116:55-63.
 8. Sheng J, Shim W, Wei H, Lim S, Liew R, Lim T, Ong B, Chua Y, Wong Ph. Hydrogen sulfide suppresses human atrial fibroblast proliferation and transformation to myofibroblasts. *J Cell Mol Med.* 2013;17(10):1345-54.
 9. Lukash L, Yatsishina A, Kushniruk V, Pidpala O. Reprogramming of somatic cells in the adult human in vitro. *Factors Exp Evol Organisms.* 2011;11:493-8.
 10. Adams R. *Methods of cell culture for biochemists.* Moscow: Mir. 1983:264p.
 11. Kaznacheeva A, Zlydnev N. The content of free amino acids in healthy blood plasma, erythrocytes and urine. *Lab Work.* 1976;8:479-80.
 12. Korobeinikova E, Meshcheriakova G. Determination of free amino acids in the serum and urine of healthy children. *Lab Work.* 1981;4:221-4.
 13. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino acids.* 2010;45:56-61.
 14. Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J.* 2004;18(10):1165-7.
 15. Strutynska N, Semenykhina S, Vavilova G, Sagach V. Hydrogen sulfide inhibits Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. *Fiziol Zh.* 2011;57(6):3-14.
 16. Liu Y, Yang R, Liu X, Zhou Y, Qu C, Kikui T, Wang S, Zandi E, Du J, Ambudkar IS, Shi S. Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca(2+) channel sulphydration. *Cell Stem Cell.* 2014;15(1):66-78.
 17. Okada M, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Fukuda M, Ono S, Haapasalo M. Hydrogen sulphide increases hepatic differentiation of human tooth pulp stem cells compared with human bone marrow stem cells. Article first published online: 20 MAR 2014. DOI: 10.1111/iej.12262.
 18. Chen G, Wang J. Threonine metabolism and embryonic stem cell self-renewal. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care.* 2014;17(1):80-5.
 19. Aniskina A, Chalisova N, Zakutskiy A, Komashnya A, Philippov S, Zezyulin P. Effect of amino acids on cell proliferation and apoptosis in organotypic tissue culture of rats of various age. *Adv Gerontol.* 2006;19:55-9.
 20. Gaspar JA, Doss MX, Hengstler JG, Cadenas C, Hescheler J, Sachinidis A. Unique metabolic features of stem cells, cardiomyocytes, and their progenitors. *Circulation Research.* 2014;114:1346-60.
 21. Guoyao WU, Sidney M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998;336:1-17.
 22. Higuera GA, Schop D, Spitters TW, van Dijkhuizen-Radersma R, Bracke M, de Bruijn JD, Martens D, Karperien M, van Boxtel A, van Blitterswijk CA. Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(5-6):654-64.

*Матеріал надійшов
до редакції 08.09.1014*

Ю.Д. Вінничук, Л.М. Гуніна

Фактор росту ендотелію судин при фізичних навантаженнях з різним механізмом енергозабезпечення м'язової діяльності

НДІ Національного університету фізичного виховання та спорту України, Київ;
E-mail: vinnichukju@gmail.com, gunina-sport@yandex.ru

Досліджено зміни вмісту фактора росту ендотелію судин (VEGF) у сироватці крові при окисному стресі та супутньої тканинної гіпоксії, викликаними фізичними навантаженнями. Найбільша концентрація VEGF відзначається у представників видів спорту з аеробним механізмом енергозабезпечення м'язової діяльності – від $122,8 \pm 3,4$ до $126,2 \pm 4,1$ пг·мл⁻¹; проміжні значення зафіксовані при змішаному механізмі енергозабезпечення – $102,4 \pm 4,91$ пг·мл⁻¹. При відсутності використання кисню для здійснення м'язової діяльності спостерігається найнижче значення ангіогенного фактора ($78,5 \pm 5,2$ пг·мл⁻¹) серед усіх обстежених спортсменів. В цілому значення VEGF у спортсменів, навіть до початку поточних навантажень, є вищим, ніж у здорових нетренованих осіб. Встановлена статистично значуща позитивна кореляційна залежність між ступенем антиоксидантного захисту і вмістом ангіогенного фактора. Підсумовується, що ангіогенез є одним з механізмів адаптації до тканинної гіпоксії при фізичних навантаженнях.

Ключові слова: фізичні навантаження, ангіогенез, окисний стрес, клітинні мембрани.

ВСТУП

При фізичних навантаженнях адекватне забезпечення тканин киснем залежить від того, наскільки механізми адаптації зможуть пом'якшити вплив несприятливих факторів, що погіршують кисень-транспортну функцію крові. Підтримання необхідного об'єму і швидкості кровообігу, в першу чергу в мікросудинах (артеріоли, капіляри), сприяє забезпеченню доставки в тканини кисню, пластичних та енергетичних субстратів, а також формуванню водно-електролітного балансу і температурного режиму [1, 2]. Тому достатня ємність мікроциркуляторного русла є надзвичайно важлива для скоротливої здатності скелетної мускулатури, а також міокарда [3], що обумовлює актуальність вивчення тих механізмів, які забезпечують достатню швидкість ангіогенезу – формування нових

© Ю.Д. Вінничук, Л.М. Гуніна

мільких кровоносних судин в процесі інтенсивних фізичних навантажень, притаманних сучасному спорту вищих досягнень. Ці навантаження призводять до хронічного окисного стресу (ОС) і супутньої тканинної гіпоксії [4–7]. Тому вивчення механізмів впливу ОС з властивою йому експресією генів, індукованих гіпоксією [2, 8–11] – один з аспектів пошуку критеріїв оцінки і прогнозування фізичної працездатності. Дослідження останніх років показали, що в процесах підтримки балансу між потребою клітини у кисні та його доставкою провідну роль відіграє киснечувливий протеїновий комплекс, що має транскрипційну активність – фактор, індукований гіпоксією (HIF-1 α) [12]. У ссавців він вважається провідним індуктором експресії транскрипційних генів, відповідальних за реакцію на нестачу кисню, та активується у фізіологічно важливих місцях регуляції

кисневих шляхів, забезпечуючи швидкі та адекватні відповіді на гіпоксичний стрес, і, в тому числі, експресію генів, що забезпечують утворення і ріст нових кровоносних судин [2, 5, 7, 13].

За інтенсивних фізичних навантажень ОС та тканинна гіпоксія навантаження, що виникає, є взаємопов'язаними та нерозривними чинниками [15]. У відповідь на гіпоксію через активацію HIF-1 α та подальшу індукцію внаслідок експресії відповідного гена основного ростового фактора – фактора росту ендотелію судин (VEGF) – запускається компенсаторний ангиогенез, тобто цей фактор є водночас не тільки гіпоксія-, але й стрес-індукованим білком [14, 15], хоча конкретний внесок кожного з цих активаторів в індукцію ангиогенного фактору виокремити доволі важко. До судинних ендотеліальних факторів росту належать VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C і VEGF-D, біологічна дія яких обумовлена впливом на три види рецепторів, функціонально пов'язаних з тирозинкіназою – VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3. З рецепторами першого типу VEGFR-1 зв'язуються виключно VEGF-A і VEGF-B, що приводить до мобілізації і міграції прозапальних клітин – попередників з кровотоку в судинну стінку, сприяючи розвитку локальної запальної реакції і утворенню нових мікросудин [16]. VEGF-A (основна активна форма фактора) безпосередньо відповідає за процес ангиогенезу, збільшує просвіт кровоносних судин, забезпечує хемотаксис макрофагів і гранулоцитів, а також бере участь у вазодилатації [14]. Відомо, що VEGF має здатність підвищувати проникність стінки кровоносних судин (ця здатність є в 1000 разів вищою, ніж у гістаміну), сприяючи пропотіванню білків плазми в екстрацелюлярний матрикс, індукує експресію ендотеліальної NO-синтази та утворення NO, що, в свою чергу, сприяє вазодилатації і стимулює експресію протеаз [14] з подальшим формуванням нових судин.

Індукція ангиогенезу відбувається тоді, коли метаболічні потреби перевищують перфузійну здатність існуючих судин. Швидше

за все, механізм такої адаптивної відповіді полягає в тому, що відносна нестача кисню приводить до активації ангиогенних стимулів [15]. Спорт і фізичні навантаження в цьому аспекті є надзвичайно цікавим предметом для дослідження [18].

Дані досліджень останніх років дають змогу визначити фізіологічний ангиогенез як одну з адаптаційних відповідей при гіпоксії або гострій гіпоглікемії [13, 15, 19, 20]. Враховуючи, що VEGF – це стресіндукований білок, його регуляція порівнюється з іншими кисне- і глюкозорегульованими білками, тому ангиогенез можна розглядати як адаптаційну відповідь на дефіцит кисню [5]. Більше того, оскільки вираженість експресії генів, що кодують процес ангиогенезу, визначається інтенсивністю фізичних навантажень [2], це підтверджує точку зору, висловлену раніше [4, 21] стосовно того, що ангиогенні фактори є маркерами фізичної працездатності. Ключовим її моментом є оптимальне енергозабезпечення м'язової діяльності, притаманне конкретному виду спорту: реакції без участі кисню – креатинфосфокіназний, гліколітичний, міокіназний (анаеробні механізми) або з його використанням (аеробний механізм). Кожен механізм енергозабезпечення має різні енергетичні можливості; так, анаеробні механізми є основними для енергозабезпечення короточасних вправ високої інтенсивності, а аеробні – при довготривалій роботі помірної інтенсивності [17, 18] і для кожного з цих механізмів характерний певний рівень тканинної гіпоксії, а, відповідно, і швидкість ангиогенних процесів. Отже, для забезпечення високого рівня фізичної працездатності спортсменів важливим є підтримання оптимального, властивого представникам того чи іншого виду спорту, рівня VEGF [7, 22, 23].

Мета нашої роботи полягала у визначенні динаміки вмісту VEGF при інтенсивних фізичних навантаженнях з різним (переважно аеробним, переважно анаеробним або змішаним) механізмом енергозабезпечення при фізичних навантаженнях.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені у динаміці обраного 21-добового мезоциклу в умовах тренувальних зборів у 224 висококваліфікованих спортсменів (середній вік – $23,5 \pm 3,8$ років) з різним механізмом енергозабезпечення фізичної роботи: 51 – з анаеробним (стрибки у воду, важка атлетика), 63 – зі змішаним (в тому числі, 35 – з переважанням аеробного – хокей з шайбою; 28 – з переважанням анаеробного – боротьба вільна, фрістайл); 110 – з аеробним (біг на середні дистанції, лижні перегони, гребля на байдарках і каное). За рівнем спортивної майстерності, віком і статтю вибірки були репрезентативні, тому основним фактором, що впливає на зміни рівня VEGF, є інтенсивність фізичного навантаження і механізм його енергозабезпечення. Для порівняння рівень VEGF досліджували у 14 практично здорових нетренованих осіб, подібних за статтю і віком (донори).

Обстеження були проведені до початку і по закінченні 21-денного мезоциклу в динаміці тренувального процесу. Кров для досліджень у кількості 5 мл брали з ліктьової вени натщесерце. Імуноферментне дослідження рівня VEGF у сироватці крові проводили за допомогою тест-систем, де головними компонентами були поліклональні антитіла до VEGF («Sigma», США) та кон'югати цих антитіл з пероксидазою хрому. Вимірювання вмісту VEGF проводили на фотометрі «Sunrise» («Tecan», Австрія) при довжині хвилі 492 нм, а концентрацію фактору визначали за калібрувальною кривою [23].

Для оцінки вираженості ОС розраховували про-антиоксидантний коефіцієнт ($K_{\text{па}}$), як співвідношення інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантного захисту в клітинних мембранах відповідно до змін рівня малнового діальдегіду (МДА) та відновленого глутатіону (GSH) [4]. Як модель клітинних мембран використовували відмиті «тіні» еритроцитів, які по суті є їх мембранною

фракцією і достатньо адекватною моделлю загального пулу клітинних мембран організму [24–26].

Визначення МДА визначали за різницею поглинання при довжинах хвиль 532 і 580 нм [27]. Вміст GSH досліджували після інкубації еритроцитарної суспензії з реактивом Елмана при вимірюванні оптичної густини утвореного продукту реакції (тіонітрофенільні аніони) при довжині хвилі 412 нм [28, 13]. Дослідження рівня вказаних субстратів проводили на спектрофотометрі «Beckton PU-65» («Beckton Dickinson», США) у односантиметровій кюветі.

Тіні еритроцитів отримували після триразової обробки зразка крові, стабілізованої 3,8 %-м розчином натрію цитрату, за допомогою ізотонічного розчину натрію хлориду з наступним центрифугуванням при 3000 хв^{-1} протягом 10 хв. Осад еритроцитів відмивали від залишків плазми в $155 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ розчині натрію хлориду та центрифугували ще раз за таких самих умов [29].

Статистичну обробку отриманих значень VEGF проводили з використанням методу Фішера [30] за допомогою пакетів прикладних програм «Sigma Plot 5.0» та «Origin 5.0», а результатів дослідження про-антиоксидантного балансу – за допомогою ліцензованої програми «GraphPadInStat» (США) на персональному комп'ютері. Визначали також коефіцієнт кореляції Пірсона [30] між вмістом VEGF і $K_{\text{па}}$. Вірогідність результатів оцінювали з урахуванням критерію t Стьюдента, оскільки вибірки відповідали нормальному закону розподілу за критерієм Шапіро-Уїлка [30].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені дослідження показали, що у сироватці крові здорових нетренованих осіб рівень VEGF коливається в межах від 27 до $63 \text{ пг} \cdot \text{мл}^{-1}$, складаючи в середньому $38,8 \pm 10,6 \text{ пг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (таблиця), що відповідає даним літератури [6]. Слід зазначити, що для

цього ангіогенного фактора характерними є суттєві індивідуальні коливання його вмісту, що і визначає значне середнє відхилення при статистичній обробці даних. Але вихідний вміст ангіогенного фактору та його приріст є неоднаковим для представників різних досліджених груп спортсменів. Так, максимальне вихідне абсолютне значення VEGF (від 85,2 до 100,3 пг·мл⁻¹) притаманне м'язовій діяльності зі споживанням кисню у представників циклічних видів спорту – легкоатлетів, лижників, веслувальників. При анаеробному креатинфосфатному забезпеченні м'язової діяльності тренувальних вправ, зокрема у стрибунів у воду, відмічено найнижче (від 46,3 до 54,8 пг·мл⁻¹) значення цього показника. Обидва змішані механізми енергозабезпечення скоротливої діяльності скелетних м'язів характеризуються проміжними значеннями вмісту VEGF (див. таблицю).

Слід також підкреслити, що вихідний вміст VEGF у цілому в спортсменів до початку поточних навантажень є вищим, ніж у здорових нетренованих осіб, що, з нашої точки зору, можна пояснити сформованими

адаптаційними механізмами, в тому числі хронічним ОС, у відповідь на тривалі фізичні навантаження. Дані експериментальних досліджень також свідчать, що у мишей з «mini muscle» фенотипом експресія VEGF і капілярність (співвідношення капіляри/волокно та щільність капілярів) скелетних м'язів – литкового та м'яза підшви – вищі, ніж у тварин контрольної групи [8].

Таким чином, переважання певного механізму енергозабезпечення м'язової діяльності у представників різних видів спорту [18], а відповідно, ступінь участі кисню в забезпеченні рухової активності, взаємопов'язані зі ступенем змін вмісту основного ангіогенного фактору, а, отже опосередковано – з інтенсивністю процесу утворення та росту кровоносних судин у спортсменів [5].

Варто зазначити, що вміст ангіогенного фактора у групі спортсменів з аеробним механізмом енергозабезпечення коливається у межах від 20 до 32,2 пг·мл⁻¹; при анаеробному механізмі енергозабезпечення приріст складає 24,0–37,5 пг·мл⁻¹, тобто видимої різниці між значеннями у групах не встановлено. При

Таблиця. Вміст фактора росту ендотелію судин (VEGF; пг·мл⁻¹) у представників різних видів спорту в динаміці тренувань (M±m)

Механізм енергозабезпечення м'язової роботи	Початок навантажень	Закінчення навантажень	Приріст вмісту VEGF
Анаеробне енергозабезпечення			
стрибки в воду (n = 30)	46,3±4,1	78,5±5,2**	32,2
важка атлетика (n = 21)	54,8±3,4*	74,8±3,4**	20,0
Змішане з переважанням анаеробного енергозабезпечення			
боротьба (n = 17)	89,0±7,3*	95,3±5,8	6,3
фрістайл (n = 11)	61,0±5,4*	67,0±4,1	6,0
Змішане з переважанням аеробного енергозабезпечення			
хокей (n = 35)	88,5±5,2*	102,4±4,9**	13,0
Аеробне енергозабезпечення			
легка атлетика (n = 35)	85,3±5,8*	122,8±3,4**	37,5
лижні перегони (n = 40)	100,4±4,9*	125,3±5,8**	24,9
веслування (n = 35)	102,2±3,4*	126,2±4,1**	24,0

*P<0,05 порівняно з даними у донорів (38,8±10,6); **P<0,05 порівняно з даними у спортсменів до початку навантажень.

змішаному механізмі енергозабезпечення приріст вмісту VEGF вкладається у межі 16,0–13,0 пг·мл⁻¹ (див. таблицю). Феномен майже однакового кількісного приросту вмісту VEGF у представників видів спорту з різним – аеробним та анаеробним – механізмом енергозабезпечення м'язової діяльності, що не залежить від початкових значень рівня фактора, потребує подальшого вивчення. Лише показником зростання ступеня ОС це явище пояснено бути не може. Можливо, за таких умов відбувається також активація антиангіогенних факторів, які гальмують темп приросту вмісту VEGF, для недопущення перетворення фізіологічного ангіогенезу в патологічний.

Одним з найбільш значущих метаболічних проявів ОС є саме переважання процесів ліпопероксидації над ступенем антиоксидантного захисту [4, 31, 32], що, в свою чергу, виражається збільшенням значення $K_{па}$. Отримані нами результати свідчать, що у здорових нетренованих осіб цей показник становить 2,0 ум.од. При інтенсивних навантаженнях $K_{па}$ зростає у представників усіх видів спорту, тільки різною мірою, що є відображенням вираженості активації окислювальних процесів в організмі і пропорційно співвідноситься з приростом VEGF порівняно з даними здорових нетренованих осіб (рис. 1).

В результаті проведення кореляційного аналізу встановлено, що існує статистич-

но значуща позитивна кореляція між досліджуваними показниками: чим вище у спортсменів $K_{па}$, тим більший у них рівень VEGF у сироватці крові ($r=0,85$, $P<0,05$). У зв'язку з різною інтенсивністю перебігу в організмі окислювально-відновних реакцій при різних механізмах енергозабезпечення м'язової роботи, для більш поглибленого аналізу значень величин VEGF дані, отримані у представників всіх досліджених видів спорту, було розподілено на 4 групи залежно від механізму енергозабезпечення м'язової діяльності. Встановлено, що значення $K_{па}$ у спортсменів цих груп суттєво розрізняються, але за змішаного механізму енергозабезпечення, незалежно від переважання аеробного чи анаеробного компонента, ця різниця не є значущою. Така сама залежність від механізмів енергозабезпечення існує й стосовно змін вмісту VEGF (рис. 2).

На нашу думку, це пов'язано з неможливістю виокремити аеробні або анаеробні складові у цілісному процесі так званого «рваного» енергозабезпечення. Проте між представниками видів спорту з аеробним та анаеробним енергозабезпеченням у вмісті показників, що досліджувались, існує достовірна різниця, що прямо зумовлено різницею у вираженості ОС. До того ж, у динаміці дослідженого відрізка тренувального процесу зростання вмісту ангіогенного фактору опосередковано специфікою окремих вправ під

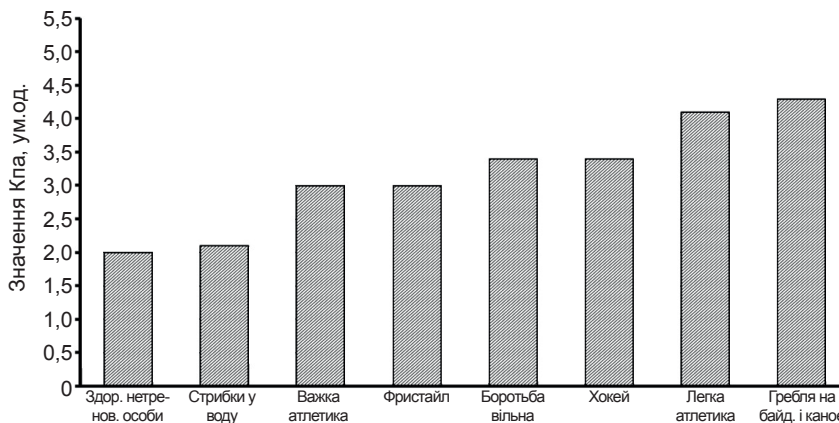


Рис. 1. Значення про- – антиоксидантного коефіцієнта у представників різних видів спорту

час тренувальних занять (центричні, ексцентричні) та спрямованістю всього тренувального процесу на етапі дослідження на розвиток конкретних рухових якостей (витривалість, сила, гнучкість, координованість тощо) залежно від виду спорту з відповідним переважанням того чи іншого механізму енергозабезпечення. Що ж стосується взаємозв'язку ступеня ОС та приросту вмісту VEGF у динаміці обраного періоду підготовки, то наші результати (рис. 2,б) свідчать, що позитивна кореляція між цими показниками зберігається на момент закінчення обстеження.

Як відомо, близько 95 % кисню, який надходить в організм, під час окисного фосфорилування відновлюється в мітохондріях до води. Решта в результаті, як правило, ферментативних реакцій перетворюється в активні форми кисню, які володіють високотоксичною дією на

клітини. Порушення обміну речовин на фоні накопичення пошкоджуючих агентів (вільні радикали, прооксиданти, активні форми кисню) визначає суть ОС, і, таким чином, є основним моментом в активації фізіологічного ангіогенезу в спортсменів [4, 21, 23]. Саме цим можна пояснити отримані нами найбільш високі показники рівня VEGF у представників видів спорту з переважно аеробним механізмом енергозабезпечення (див. рис. 2). Також є свідчення про те, що частота експресії С-алеля гена VEGF (G^{634C} поліморфізм) асоціюється з високим значенням аеробної витривалості (за даними максимальної потужності і максимального споживання кисню), енергозабезпеченням аеробного обміну речовин (залежно від значення максимального рівня лактату) та збільшується одночасно зі зростанням спортивної майстерності. Отже,

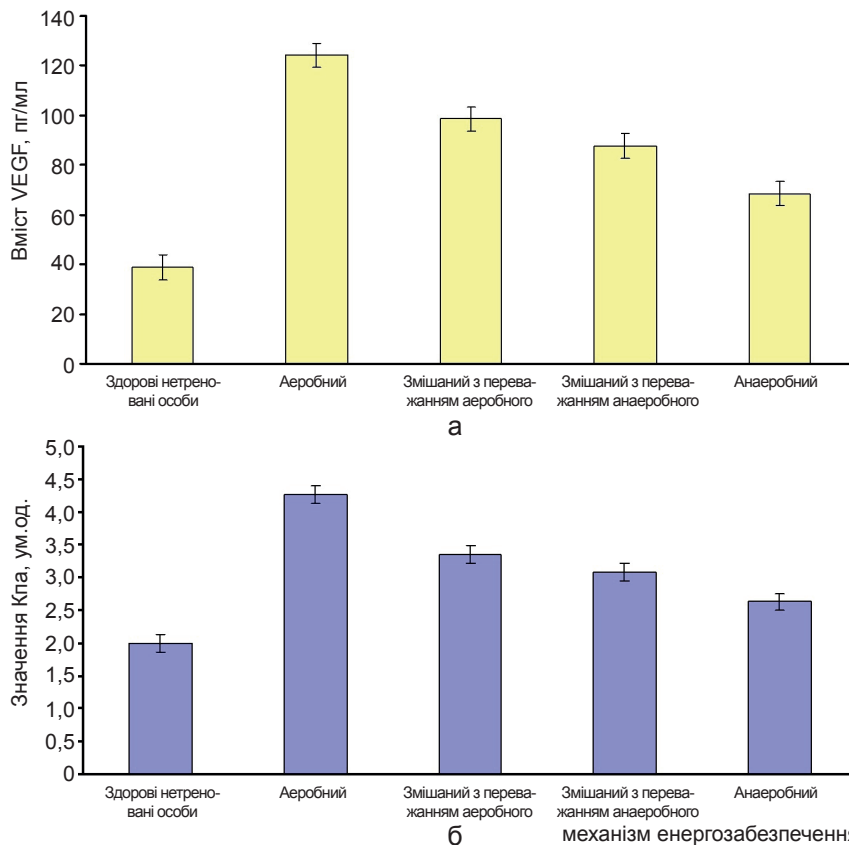


Рис. 2. Значення вмісту фактора росту ендотелію судин (а) і про – антиоксидантного коефіцієнта (б) при різних механізмах енергозабезпечення м'язової діяльності

G⁶³⁴C поліморфізм гену VEGF пов'язаний з фізичною працездатністю спортсмена [33].

У тих випадках, коли переважають анаеробні гліколітичні навантаження, крім уповільнення транспорту кисню в тканини, спостерігається також утворення великої кількості лактату, що надходить з міоцитів у кров. Це зрушує рН крові в кислий бік і запускає цілий каскад різноманітних метаболічних процесів (зокрема, активація ПОЛ, зміна агрегатного стану крові у бік гіперкоагуляції, активація через фактор Хагемана гуморальних систем регуляції судинного тону – калікреїн-кінінової і ренін-ангіотензинової), що призводять через різні механізми до порушення гомеостазу і розвитку гіпоксії [34]. Таким чином, тканинна гіпоксія, яка характерна для фізичних навантажень як з аеробним, так і з анаеробним механізмами енергозабезпечення, спричиняє виникнення метаболічних перебудов, що супроводжуються активацією ангиогенезу; при цьому відмінності полягають лише у ступені вираженості гіпоксичних явищ. Необхідно також зазначити, що встановлена нами активація процесу ангиогенезу у спортсменів з переважно анаеробним механізмом енергозабезпечення вказує на наявність у них окисного стресу, розвиток якого раніше вважався лише прерогативою рухової активності з переважанням аеробного і змішаного механізму енергозабезпечення.

Отже, ОС і супутня тканинна гіпоксія є одними з визначальних факторів для активації процесів фізіологічного ангиогенезу при фізичних навантаженнях, вираженість якого залежить від їхньої інтенсивності і спрямованості механізмів енергозабезпечення м'язової роботи, що дозволяє розцінювати ангиогенез як один із маркерів адаптації до м'язової роботи у представників різних видів спорту.

Роботу було підтримано грантом Міністерства освіти і науки України (№ 2.24 від 12.12. 2011 р.).

ВИСНОВКИ

Постійний вплив інтенсивних фізичних навантажень призводить до активації процесу ангиогенезу, тому вихідний рівень VEGF у спортсменів є вищим, ніж у здорових нетренованих осіб.

Переважання певного механізму енергозабезпечення м'язової діяльності та спрямованість і потужність навантажень у представників різних видів спорту впливають на інтенсивність ангиогенезу.

Найвищий вміст VEGF спостерігається при суто аеробному механізмі енергозабезпечення, а також у спортсменів з переважно аеробним механізмом енергозабезпечення м'язової діяльності. При анаеробному забезпеченні м'язової діяльності відмічається найнижче значення вмісту ангиогенного фактора.

Встановлена позитивна кореляція між вираженістю окисного стресу, зокрема у клітинних мембранах, і рівнем VEGF у сироватці крові спортсменів.

Залежність змін вмісту VEGF від інтенсивності та спрямованості механізмів енергозабезпечення скоротливої діяльності скелетних м'язів дозволяють розцінювати активність ангиогенезу як новий фактор оцінки адаптаційних перебудов в організмі спортсменів.

Ю.Д. Вінничук, Л.М. Гуніна

ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ПРИ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Исследованы изменения содержания фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови при окисном стрессе и сопутствующей тканевой гипоксии, вызванными физическими нагрузками. Наибольшая концентрация в сыворотке крови VEGF отмечается у представителей видов спорта с аэробным механизмом энергообеспечения мышечной деятельности – от 122,8±3,4 пг·мл⁻¹ до 126,2±4,1 пг·мл⁻¹; промежуточные значения уровня VEGF отмечены при смешанном механизме энергообеспечения – 102,4±4,91 пг·мл⁻¹. При анаэробном обеспечении мышечной деятельности наблюдается самое низкое значение ангиогенного фактора (78,5±5,2 пг·мл⁻¹) среди обследован-

ных спортсменов. Исходное содержание VEGF в целом у спортсменов, даже до начала текущих нагрузок, выше, чем у здоровых нетренированных людей. Установлена статистически значимая положительная корреляция между степенью антиоксидантной защиты и содержанием ангиогенного фактора. Резюмируется, что ангиогенез является одним из механизмов адаптации к тканевой гипоксии при физических нагрузках.

Ключевые слова: физические нагрузки, ангиогенез, окисный стресс, клеточные мембраны.

Ju.D. Vinnichuck, L.M. Gunina

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR DURING PHYSICAL LOADS WITH DIFFERENT MECHANISM OF ENERGY'S PROVIDING OF MUSCULAR WORK

In the article the results of investigation of vascular endothelial growth factor's (VEGF) maintenance changes at the oxidative stress caused by physical activities and associated tissue hypoxia, for the representatives of types of sport with the different mechanisms of energy providing of muscular work are presented. The highest VEGF concentration of serum was marked in sports with representatives of aerobic energy supply mechanism of muscle activity – from 122.8 ± 3.4 to 126.2 ± 4.1 pg·ml⁻¹, intermediate values in VEGF marked in a mixed mechanism energy - 102.4 ± 4.91 pg·ml⁻¹. Anaerobic muscle activity observed providing the lowest of VEGF value (78.5 ± 5.2 pg·ml⁻¹). Initial VEGF concentration in athletes even before the current load is higher than in the healthy untrained people. A statistically significant positive correlation between the degree of antioxidant protection and the VEGF concentration has been found. It is concluded, that angiogenesis is one of the mechanisms of adaptation to tissue hypoxia during physical activities.

Scientific Institute of the National University of Physical Education and Sport of Ukraine, Kiev

Keywords: physical activities, angiogenesis, oxidative stress, cellular membranes.

Scientific Institute of the National University of Physical Education and Sport of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Blix AS, Walloe L, Folkow LP. Regulation of brain temperature in winter-acclimatization reider under heat stress. *J Exp Biol.* 2011;214(Pt 22):3850-6.
2. Döring S, Onur A, Fischer M, Boulay L, Pérusse T, Rankinen R, et al. A common haplotype and the Pro582Ser polymorphism of the hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF1A) gene in elite endurance athletes. *J Appl Physiol.* 2010;108(6):1497-1500.
3. Holtzclaw JD, Grimm PR, Sansom SC. Role of BK channels in hypertension and potassium secretion. *Curr Opin. Nephrol. Hypertens* 2011;20(5):512-7.

4. Gunina LM, Olynyk SA, Ivanov SV. Changes in blood and prooxidant-oxidant balance in erythrocyte membranes during intense physical exertion. *Medicinal chemistry* 2007;9(1):91-9. Ukrainian.
5. Gunga HC, Kirsh K, Rocker L. Vascular endothelial growth factor in exercising humans under different environmental conditions. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999;79(6):484-90.
6. Laufs U, Urhausen A, Werner N. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005;12(4):407-14.
7. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine* 2003;9(6):677-84.
8. Audet GN, Meek TH, Garland T, Olfert IM. Expression of angiogenic regulators and skeletal muscle capillarity in selectively bred high aerobic capacity mice. *Exp Physiol.* 2011;96(11):1138-50.
9. Eynon N, Ruiz J, Oliveira J, Duarte J, Birk R, Lucia A. Genes and elite athletes: a roadmap for future research. *J Physiol.* 2011;589(Pt 13):3063-70.
10. Hoppeler H, Vogt M. Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol.* 2001;204(Pt 18):3133-9.
11. Mason S, Johnson R. The role of HIF-1 in hypoxic response in the skeletal muscle. *Adv Exp Med Biol.* 2007;618:229-44.
12. Serebrovskaya TV. Hypoxia-inducible factor: role in the pathophysiology of respiration (review). *Ukrainian Journal of Pulmonology* 2005;(3):77-81. [Russian].
13. Shvets NI, Davydov VV. Age features of changes in glutathione system in rat heart during immobilization stress. *Ukr Biochem J.* 2008;80(6):74-8. [Russian].
14. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* 1997;8(1):1-25.
15. Hansen AH, Nielsen JJ, Saltin B, Helsten Y. Exercise training normalizes skeletal muscle vascular endothelial growth factor levels in patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 2010;28(6):1176-85.
16. Mihailichenko VY. The role of VEGF in angiogenesis in normal and pathologica. *Neoplasms* 2010;(5):174-81. Russian.
17. Volkov NI, Nesen EN, Osipenko AA, Korsun SN. Biochemistry of muscle activity. Kiev: Olympic Literature; 2000. [Russian].
18. Platonov VN. System of training athletes in Olympic sports. General theory and its practical application. - K.: Olympic literature; 2004. [Russian].
19. Laurent G, Solari F, Mateescu B, Karaca M, Castel J, Bourachot B, et al. Oxidative stress contributes to aging by enhancing pancreatic angiogenesis and insulin signalling. *Cell Metab.* 2008;7(2):113-24.
20. Wahl P, Schmidt A, Demarees M, Achtzehn S, Bloch W, Mester J. Responses of angiogenic growth factors to exercise, to hypoxia and to exercise under hypoxic conditions. *Int J Sports Med.* 2013;34(2):95-100.
21. Gunina Larissa, Lisnyak Ivan. Vascular endothelial growth

- factor in representatives of different sports: association with oxidative stress. *Science in Olympic sports 2008*; (1):46-50. [Russian].
22. Gunina LM, Burmak VO. Content of vascular endothelial growth factor and severity of oxidative stress in representatives of different sports. *Proceeding of the Ith All-Russian Congress of Sports Medicine*; 2011; Moscow; p. 146-9. [Russian].
 23. Gunina LM, Lisnyak IA. The role of angiogenesis in improving physical performance of athletes. *Proceeding of the XIIth International Congress of Modern Olympic and Paralympic sport and sport for all*; 2008; M: Physical Culture ; p. 213-14. [Russian].
 24. Zawadzki LA, Prazonin PE. Erythrocyte membranes as displaying the total pool of membrane body. *Pathol Physiol and Exper Therapy* 1982;(4):48-5. [Russian].
 25. Krylov VN, Deriugina AV. Typical changes in electrophoretic mobility of erythrocytes under stress. *Bull. Exp Biol and Medicine* 2005;(4):364-6. [Russian].
 26. Storozhok SA, Sannikov AG, Zakharov YM. Molecular structure of erythrocyte membranes and their mechanical properties. Tyumen: TGU Publisher; 1997. [Russian].
 27. Bankova VV, Prishchepova NF, Avratinsky OI. Evaluation of pathological changes of the plasma membrane in children with various diseases. *Pathol Physiol and Exper Therapy* 1987;3:78-81. [Russian].
 28. Zaitsev VG, Zakrevsky VI, Davydov VV. Level of hyperglycemia in patients with diabetes mellitus. *Clin Lab Diagnostics* 1999;(11):32-3. Russian.
 29. Semko GA. Structural and functional changes in the external membranes and membranous layers of erythrocytes at hyperepidermopoez. *Ukr Biochem J.* 1998;70(3):113-8. [Russian].
 30. Glantz S. *Biomedical statistics*. Moscow: Practice; 1998. [Russian].
 31. Magalhães J, Rebelo A, Oliveira E, Silva JR, Marques F, Ascensão A. Impact of loughborough intermittent shuttle test versus soccer match on physiological, biochemical and neuromuscular parameters. *Eur J Appl Physiol.* 2010;108(1):39-48.
 32. Tian Y, Nie J, Tong T, Baker J, Thomas N, Shi Q. Serum oxidant and antioxidant status during early and late recovery periods following an all-out 21-km run in trained adolescent runners. *Eur J Appl Physiol.* 2010;110(5):971-6.
 33. Ahmetov I, Khakimullina A, Popov D, Missina S, Vinogradova O, Rogozkin V. Polymorphism of the vascular endothelial growth factor gene (VEGF) and aerobic performance in athletes. *Human Physiology* 2008;34(Issue 4):477-81.
 34. Saas C, Govers-Riemslog JWP, Bouma B, Schiks B, Hazenberg BPC, Henk ML, et al. Misfolded proteins activate Factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest.* 2008;118(9):3208-18.

Матеріал надійшов до редакції 01.04.2014

О.Г. Родинський, О.Г. Зінов'єва, О.С. Трушенко, М.Я. Качан

Викликана активність аферентних волокон дорсального корінця спинного мозку білих щурів за умов експериментального цукрового діабету

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», E-mail: zinovevael@mail.ru

Аналізували функціональний стан дорсальних корінців спинного мозку в умовах експериментального цукрового діабету (ЦД), а саме показники потенціалу дії (ПД): поріг, хронаксію та динаміку збудливості та рефрактерності дорсального корінця. Виявлено вірогідне підвищення порогу збудження у 1,5 раза у порівнянні з контрольною групою тварин та зниження амплітуди ПД на 21,7 %. Спостерігали підвищення відповіді на 2-й стимул при нанесенні парних стимулів на сідничний нерв у тварин з експериментальним ЦД. При нанесенні стимулів зростаючої інтенсивності вірогідно знижувалась амплітуда ПД у тварин експериментальної групи. Було зроблено висновок про те, що гіперглікемія вносить корективи у процеси збудливості та рефрактерності у аферентних волокнах спинного мозку.

Ключові слова: цукровий діабет; діабетична невропатія; дорсальний корінець спинного мозку.

ВСТУП

Підвищення захворюваності на цукровий діабет (ЦД), яке спостерігається у багатьох країнах світу, закономірно викликає збільшення його ускладнень, одним з найпоширеніших серед яких є діабетична невропатія. Ушкодження різних ділянок нервової системи за умов ЦД залишається дискусійним питанням, оскільки існує багато протиріч серед наукових даних, що вказують на специфічне пошкодження тієї чи іншої ланки нервової системи за умов гіперглікемії – одні дослідники вважають найбільш вираженими ураження периферичних нервових волокон [1, 2], інші – спинного мозку [3, 4], а дехто – взагалі центральних структур, наприклад таламуса [5].

У наших попередніх дослідженнях [6] було встановлено, що в умовах експериментального ЦД суттєво знижується поріг виникнення потенціалу дорсальної поверхні спинного мозку та збільшується його тривалість. Але нез'ясованими залишаються питання щодо змін аферентних входів при ЦД, стан яких значною

© О.Г. Родинський, О.Г. Зінов'єва, О.С. Трушенко, М.Я. Качан

мірою може впливати на вищевказані показники та модулювати їх активність. Це ланка відіграє чи не найбільшу роль у формуванні патологічної імпульсації [7, 8], яка призводить до виникнення комплексу симптомів діабетичної невропатії, таких, як алодінія, спонтанний біль, парестезії тощо. Це спонукало нас більш детально проаналізувати стан аферентної ланки рефлекторної дуги спинного мозку за допомогою вивчення потенціалу дії (ПД), який реєстрували з дорсального корінця.

Метою нашої роботи було дослідження показників збудливості аферентних волокон дорсального корінця у відповідь на стимуляцію сідничного нерва, що виникають у проксимальних відділах дорсальних корінців за умов експериментального ЦД через один місяць від початку його моделювання.

МЕТОДИКА

Експерименти були проведені на 28 білих статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар

масою 200–250 г, яких було розділено на 2 групи: контрольну і дослідну – тварини з експериментальним ЦД.

ЦД моделювали одноразовим інтраперитонеальним введенням алоксану моногідрату («Sigma», США) у дозі 170 мг/кг після добової депривації їжі при збереженому доступі до води [6]. Контроль вмісту глюкози крові проводили на 10-ту добу за допомогою глюкометра One Touch Ultra. У гострий експеримент тварин брали на 30-ту добу відтворення ЦД зі вмістом глюкози крові вищим за 15 ммоль/л.

Під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг) проводили розтин м'язів тканин та ламінектомію, скляними гачками розтинали тверду мозкову оболонку та виділяли дорсальний корінець сегменту L₅ спинного мозку. Сідничний нерв відпрепарували на стегні та перев'язували біля входу в м'яз. Викликану активність дорсального корінця відводили від його пересічених проксимальних відрізків при стимуляції сідничного нерва на іпсилатеральному боці імпульсами тривалістю 0,3 мс та силою від 1 до 5 порогів (П), за потреби використовували плавне підвищення сили стимулу на 0,1 П. Аналізували показники ПД дорсального корінця, а саме поріг, хронаксію, латентний період, амплітуду та тривалість ПД, динаміку збудливості, а також явище рефрактерності при нанесенні на сідничний нерв парних стимулів з інтервалом від 2 до 20 мс [9].

Усі дослідні з тваринами проводилися відповідно до норм біомедичної етики, евтаназію здійснювали за допомогою введення летальної дози тіопенталу натрію.

Обробку отриманих результатів проводили за допомогою стандартних методів варіаційної статистики. Для оцінки вірогідності використовували *t* критерій Стьюдента та критерій Манна-Уїтні. Зміни визнавали статистично вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз порогу виникнення сумарного ПД волокон дорсального корінця показав, що у

тварин з експериментальним ЦД спостерігається його підвищення у 1,5 раза у порівнянні з контролем ($P < 0,001$, таблиця). Показники контрольної групи в цьому та наступних дослідках прийняті за 100 %. Хронаксія ПД дорсального корінця у порівнянні з контролем зменшилася на 12,4% ($P \geq 0,056$).

Підвищення порогу виникнення ПД дорсального корінця в умовах гіперглікемії вказує на порушення адекватного функціонування нервової системи в результаті неферментативного глікозилювання білків, активації поліолового шляху окиснення глюкози до сорбітолу і фруктози, які накопичуються у нервових клітинах та викликають їх пошкодження через осмотичний стрес [10–12]. Це, в першу чергу, стосується периферичних відділів нервової системи та призводить до виникнення дистальної форми сенсорної діабетичної невропатії [13].

Слід відмітити, що у наших попередніх дослідженнях було підтверджено наявність ознак невропатії у периферичному нерво-м'язовому апараті вже наприкінці першого місяця від початку захворювання [14], які проявлялись у вигляді зниження збудливості і проведення нервового імпульсу у цій структурі. У наступних дослідженнях [6] нами було виявлене підвищення активності нейронів задніх рогів спинного мозку. Таким чином ці дані являють собою особливий інтерес з точки зору виявлення локалізації послідовності переходу пригнічення активності нервових провідників у стан їх підвищеної збудливості. Тож ланкою, яка відповідає за цей процес, ймовірно, є самі аферентні нерви та їх спінальні ганглії.

За умов ЦД латентний період і загальна тривалість ПД дорсального корінця при застосуванні супрамаксимальної стимуляції (5 П) практично не змінювалися ($P > 0,05$). При цьому спостерігалось зниження амплітуди на 21,7 % ($P < 0,05$, рис. 1).

При аналізі збудливості дорсального корінця у динаміці ми спостерігали повільне наростання амплітуди ПД, як і в контрольній групі, але відповідь на таку стимуляцію у

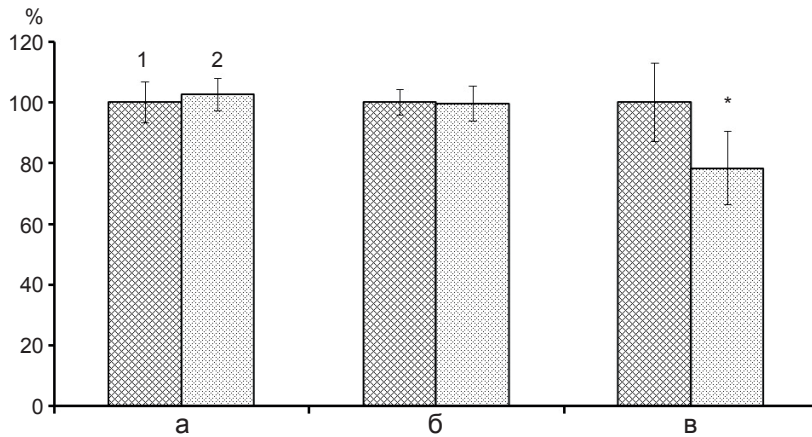


Рис. 1. Параметри потенціалу дії дорсальних корінців спинного мозку (L_5) спинного мозку: середні показники латентного періоду (а), тривалості (б) та амплітуди (в); 1 — інтактні тварини, 2 — тварини з експериментальним цукровим діабетом. * $P < 0,05$ — вірогідність порівняно з контролем

тварин з експериментальним ЦД була менш виражена та проявлялася у вигляді її достовірного зменшення (рис. 2).

Зниження амплітуди ПД дорсального корінця при супермаксимальній стимуляції та при застосуванні подразників зростаючої інтенсивності свідчать про зниження збудливості на цьому відрізку рефлекторної дуги. В основі можуть лежати пригнічення роботи Na^+K^+ -помпи та інтрааксональне накопичення Na^+ [10, 15], за рахунок чого знижується концентраційний градієнт іонів і, як наслідок, зменшення амплітуди вхідного натрієвого струму, від якого залежить амплітуда генерованого ПД.

При аналізі динаміки фаз рефрактерності

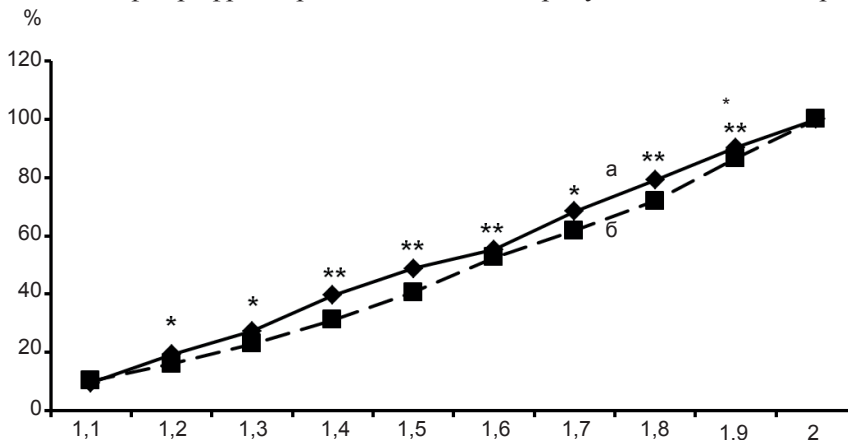


Рис. 2. Динаміка збудливості дорсальних корінців (L_5) спинного мозку при нанесенні на сідничний нерв стимулів зростаючої інтенсивності у інтактних тварин (а) і тварин з цукровим діабетом (б).

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

абсолютної рефрактерності. Останнє може свідчити про те, що нейрони задніх корінців спинного мозку в умовах гіперглікемії мають підвищену базальну активність, що сприяє підсилению передачі нервових імпульсів [5].

На думку деяких дослідників можливі кілька механізмів розвитку діабетичної невропатії. Наразі підкреслюється роль Ca^{2+} як основного предиктора виникнення її больових форм [16]. У цих дослідженнях

було виявлено, що за умов гіперглікемії знижується активність Ca^{2+} -АТФази, внаслідок чого порушується кінетика відновлення внутрішньоклітинного Ca^{2+} з тривалим залишковим підвищенням його концентрації у сенсорних нейронах. У зв'язку з цим було висунуте припущення, що такі механізми причетні до розвитку невропатії при ЦД. Ці дані знаходять підтвердження у інших дослідженнях, в яких відводиться провідна роль

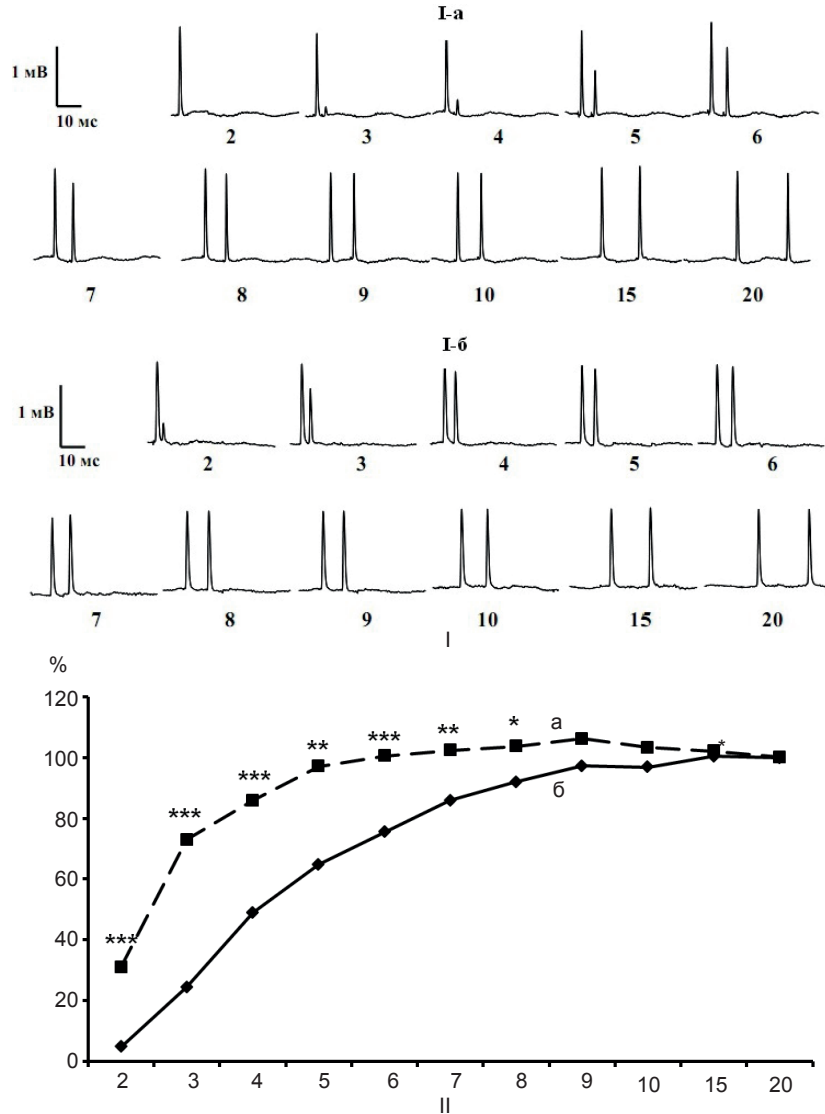


Рис. 3. Осцилограми викликаних відповідей дорсальних корінців спинного мозку (I) (I-a — інтактні тварини, I-б — тварини з експериментальним цукровим діабетом) та динаміка фаз рефрактерності при нанесенні парних стимулів на сідничний нерв (II)

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ — вірогідність порівняно з контролем

Зміни основних показників потенціалу дії дорсальних корінців спинного мозку тварин з експериментальним цукровим діабетом

Показник	Контроль	Цукровий діабет
Поріг, мкА	10,95 ± 1,30 (n = 12)	17,20 ± 1,60 (n = 13) **
Хронаксія, мс	64,28 ± 3,24 (n = 14)	56,31 ± 3,22 (n = 13)
Латентний період, мс	0,74 ± 0,05 (n = 12)	0,76 ± 0,04 (n = 13)
Тривалість потенціалу дії дорсального корінця, мс	2,65 ± 0,11 (n = 12)	2,64 ± 0,15 (n = 13)
Амплітуда, мВ	1,80 ± 0,23 (n = 12)	1,41 ± 0,17 (n = 13) *

*P<0,05, **P<0,01 — вірогідність порівняно з контролем.

T-типу низькопорогових кальцієвих каналів, які і є важливими підсилювачами сигналів у сенсорних нейронах та сприяють розвитку клітинної гіперчутливості, а також виступають модуляторами хронічних і гострих больових сигналів [17].

Іншими вченими встановлено підвищення частоти ПД у нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв [18, 19], які генеруються у відповідь на тривалу надпорогову механічну стимуляцію, що призводить до підвищення спонтанної активності цих нейронів. Такі зміни пов'язують з підвищенням експресії потенціалзалежних тетродотоксинчутливих і тетродотоксинрезистентних натрієвих каналів, а також підвищенням входу Na⁺ через них. Тож припускають, що саме ці процеси можуть лежати в основі больової форми діабетичної невропатії. Саме ці канали вважають структурами, які визначають збудливість сенсорних нейронів і відіграють ключову роль у виникненні больових відчуттів, оскільки керують розрядами аферентних імпульсів через їх підсилення в умовах гіперглікемії та викликають тактильну алодінію чи спонтанний біль [7].

Таким чином можна підсумувати, що за умов тривалої гіперглікемії знижується збудливість аферентних провідників спинного мозку, які є сполучною ланкою між пригніченим периферичним апаратом і підвищено активним центральним. В умовах ЦД створюється основа для виникнення симптомів діабетичної невропатії через підсилення вхідного сигналу

до нейронів дорсальних рогів спинного мозку, що може лежати в основі виникнення алодінії, парестезій чи спонтанного болю.

А.Г. Родинский, Е.Г. Зиновьева, А.С. Трушенко, М.Я. Качан

ВЫЗВАННАЯ АКТИВНОСТЬ АФФЕРЕНТНЫХ ВОЛОКОН СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Анализировали функциональное состояние дорсальных корешков спинного мозга в условиях экспериментального сахарного диабета (СД), а именно показатели потенциала действия (ПД): порог, хронаксию и динамику возбудимости дорсального корешка. Выявлено достоверное повышение порога возбуждения в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой животных, снижение амплитуды ПД на 21,7 %. Наблюдали также достоверное повышение ответа на 2-й стимул при нанесении парных стимулов на седалищный нерв у животных с экспериментальным СД. При нанесении стимулов возрастающей интенсивности у этой группы животных было обнаружено достоверное снижение амплитуды ПД. Был сделан вывод о том, что гипергликемия вносит коррективы в процессы возбудимости и рефрактерности в афферентных волокнах спинного мозга. Ключевые слова: сахарный диабет; диабетическая невропатия; дорсальный корешок спинного мозга.

A.G. Rodinsky, E.G. Zinov'eva, A.S. Trushenko, M.J. Kachan

THE EVOKED ACTIVITY OF THE DORSAL ROOT AFFERENT FIBRES OF THE SPINAL CORD OF WHITE RATS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

We analyzed the functional status of the dorsal root of spinal cord in experimental diabetes mellitus (DM), for instance the

parameters of the action potential (AP): threshold, chronaxy and the dynamics of the dorsal root excitability. It was revealed the 1,5 times increase in threshold of excitation when compared to the control animals ($P < 0,001$), the amplitude of AP decreased by 21,7% ($P < 0,05$). It was also revealed a significant increase in response to the 2nd stimulus under applying the paired stimuli on the sciatic nerve in animals with experimental DM. Under applying the stimuli of increasing intensity there was found significant decrease in the amplitude of the AP in animals of the experimental group. It was concluded that hyperglycemia made changes to the processes of excitability and refractoriness in the afferent fibers of the spinal cord.

Key words: diabetes mellitus, diabetic neuropathy, dorsal root of the spinal cord.

SE «Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine»

REFERENCES

- Fahim MA, Hasan MY, Alshuaib WB. Early morphological remodeling of neuromuscular junction in a murine model of diabetes. *J Appl Physiol* 2000;89(6):2235-40.
- Matsuka Y, Spigelman I. Hyperosmolar solutions selectively block action potentials in rat myelinated sensory fibers: implications for diabetic neuropathy. *J Neurophysiol.* 2004;91(1):48-56.
- Spruce MC, Potter J, Coppini DV. The pathogenesis and management of painful diabetic neuropathy: a review. *Diabet Med.* 2003;20(2):88-98.
- Voitenko NV, Kruglikov IA, Kostyuk EP, Kostyuk PG. Effect of streptozotocin-induced diabetes on the activity of calcium channels in rat dorsal horn neurons. *Neuroscience.* 2000;95(2):519-24.
- Khan GM, Li DP, Chen SR, Pan HL. Role of Spinal Nitric Oxide in the Inhibitory Effect of [D-Pen2, D-Pen5]-Enkephalin on Ascending Dorsal Horn Neurons in Normal and Diabetic Rats. *J Pharmacol and Experim Therap.* 2002;303(3):1021-8.
- Rodyns'kyj OG, Zinov'jeva OG, Mozgunov OV, Trushenko OS. Activity of the interneuron pools of the spinal cord in experimental diabetes mellitus. *Fiziol Zh.* 2013;59(5):50-5. [Ukrainian].
- Devor M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain.* 2006;7(1):3-12.
- D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth.* 2008;101(1):8-16.
- Makij EA, Nerush PA, Rodinskij AG, Mjakushko VA. Evoked activity of the afferent and efferent fibers of the rat sciatic nerve in experimental hyperthyroidism. *Neurophysiology.* 2002;34(1):51-9. [Russian].
- Kalinin AP, Rudakova IG, Kotov SV. [Diabetic neuropathy]. *Al'manah klinicheskoy mediciny.* 2001;4:95-107. [Russian].
- Cameron NE. The aetiology of neuropathy in experimental diabetes. *Br J Diab and Vascular Disease.* 2003;3(2):98-105.
- Goh SY, Cooper ME. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1143-52.
- Sivous G. Clinical characteristics of diabetic peripheral polyneuropathy in children and adolescents. *Vrach.* 2004;2:43-5. [Russian].
- Rodyns'kyj OG, Zinov'eva OG, Mozgunov OV. Electrophysiological analysis of the excitability of the neuromuscular unit in experimental diabetes mellitus. *Eksperynta klin fiziol and biohim.* 2012;59(3):7-12. [Ukrainian].
- Vague P, Coste TC, Jannot MF, Raccach D, Tsimaratos M. C-peptide, Na⁺, K⁺-ATPase, and diabetes. *Experime Diab Res.* 2004;5(1):37-50.
- Shmigol' AV, Kostjuk EP. Mechanisms of formation of the calcium signals in primary sensory neurons of mice and their violations in experimental diabetes mellitus. *Neurophysiology.* 1995;27(5/6):331-41. [Russian].
- Messinger RB, Naik AK, Jagodic MM, Nelson MT, Lee WY, Choe WJ, et al. In-vivo silencing of the Cav3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. *Pain.* 2009;145(1-2):184-95.
- Chattopadhyay M, Mata M, Fink DJ. Continuous δ -Opioid Receptor Activation Reduces Neuronal Voltage-Gated Sodium Channel (NaV1.7) Levels through Activation of Protein Kinase C in Painful Diabetic Neuropathy. *J Neurosci.* 2008;28(26):6652-8.
- Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, Isom LL, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Biol Chem.* – 2004. – 279, № 28. – P. 29341-50.

Матеріал надійшов до редакції 17.03.2014

О.В. Сторчило

Радіопротекторний ефект їжі в асиміляції вуглеводних субстратів різного ступеня полімерності у двох поколінь нащадків опромінених щурів

Одеський національний медичний університет, E-mail: alena-61@mail.ru

Досліджували вплив їжі в кишково-опромінених самців-попередників на функціональну активність тонкої кишки їх нащадків двох поколінь. Встановлено, що ситість тварин під час опромінення визначає радіопротекторний ефект на транспорт вуглеводних субстратів різної міри полімерності лише в нащадків першого покоління – у другого покоління показники функціональної активності нижче за такі навіть в інтактній групі, переважно за рахунок ферментативної ланки, проте при цьому вони не виходять за межі активної компоненти транспорту. Отже, для захисту наступних поколінь від опромінених попередників необхідні потужніші, ніж просто їжа, радіопротектори.

Ключові слова: опромінення; тонка кишка; асиміляція вуглеводів; нащадки щурів.

ВСТУП

Іонізуючі випромінювання є природним компонентом довкілля, проте завдяки антропогенному радіоактивному забрудненню радіаційний фон Землі підвищився, в основному в результаті викидів підприємств атомної енергетики і випробувань ядерної зброї. Тому залишається актуальною проблема впливу іонізуючих випромінювань на живі організми. Функціональні порушення внаслідок великих доз опромінення зазвичай проявляються впродовж декількох годин або днів, натомість вади розвитку і інші спадкові хвороби, спричинені ушкодженням генетичного апарату – тільки в наступних поколіннях. Повна ж елімінація негативних наслідків опромінення попередників у популяції відбувається до 7-10-го покоління, причому близько 56% генетичних хвороб від 1-го покоління проявляються в 2-му [1 - 6]. Проте відомості про трансгенераційний феномен радіаційноіндукованої нестабільності генома у нащадків опромінених у малих дозах

батьків нечисленні, суперечливі і вимагають подальшого вивчення [7]. Раніше нами була досліджена активність систем травлення і всмоктування вуглеводних субстратів у тонкій кишці нащадків двох поколінь опромінених голодними самців щурів [8] – була показана стабільність транспорту вільної глюкози у обох поколінь і достовірне зниження активності транспорту М-глюкози, що утворилася при гідролізі мальтози, у нащадків 2-го покоління. Постало питання про те, яку роль у захисті функціональних систем кишки нащадків опромінених тварин може відігравати наявність їжі в кишково-опромінених батьків на момент опромінення. Тому метою цієї роботи стало дослідження показників травлення і всмоктування вуглеводних субстратів різної міри полімерності у нащадків двох поколінь опромінених ситими самців щурів.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на двомісячних щурятах-самцях лінії Вістар масою 50-65 г, яких

утримували на стандартному раціоні віварію і які були позбавлені їжі впродовж 18-24 год перед експериментом. Загалом було використано 3 групи по 5 шурят в кожній: 1-ша - інтактні; 2-га – нащадки 1-го покоління від самців, яких було одноразово опромінені ситими (комбікорм) і інтактних самиць [8]; 3-тя – нащадки 2-го покоління. Опромінення самців проводили на телегаммаустановці «Агат-Р-1», потужність дози становила 120 рад/хв, поле - 20 x 20, відстань від джерела до поля - 75 см, доза - 0,5 Гр, час експозиції - 32 с. Акумуляуючий препарат слизової оболонки тонкої кишки (АПС) виготовляли за методом Уголева і співав. [9]. Інкубували АПС впродовж 1 год при 37 ° С в оксигенованому середовищі. Як інкубаційне середовище використовували розчини 10 ммоль/л глюкози і 5 ммоль/л мальтози, які готували на розчині Рінгера (рН 7,4). В усі інкубаційні середовища додавали кролячу жовч. Визначали концентрацію вільної глюкози і М-глюкози, утвореної при гідролізі мальтози [10], колориметрично на КФК-2МП ($\lambda=625$ нм). Після перевірки отриманих результатів на нормальність розподілу за допомогою теста Шапіро-Уїлка для статистичної обробки використовували критерій t Стьюдента для незв'язаних вибірок за програмою «Primer Biostatistics».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У попередніх дослідженнях нами було визначено [8], що активність транспортної системи для вільної глюкози у нащадків 1-го покоління опромінених ситими самців шурів була майже на 20 % вище, ніж в групі нащадків опромінених голодними самців ($P = 0,013$; таблиця), при цьому стабільність її роботи була в 4,5 рази більш високою. Отже, дійсно, наявність їжі в кишечнику самців на момент їх опромінення сприяє підвищенню активності системи транспорту вільної глюкози і стабільності її роботи у їх нащадків – можливо, через певну механічну захисну дію нутрієнтів

і клітковини їжі на мембрани ентероцитів у момент опромінення. Проте це стосується тільки транспортної системи для вільної глюкози, оскільки наявність їжі в кишечнику опромінених самців не впливає на активність мальтози – показники транспорту утвореної М-глюкози в цій групі майже не відрізнялися від таких як у групі нащадків 1-го покоління опромінених голодними самців, так і в інтактній групі. Це справедливо також і для нащадків 2-го покоління опромінених голодними попередників [11]: транспорт вільної глюкози у них майже не відрізнявся від значень у нащадків 1-го покоління, зате транспорт М-глюкози виявився істотно нижчим (на 25 %; $P=0,044$) і менш стабільним (на 56 %). Ймовірно, це є проявом накопичених попередниками ушкоджень генома – таке припущення узгоджується з даними літератури [3, 6, 7]. При дослідженні впливу ситості самців-попередників на момент опромінення на функціональну активність тонкої кишки їх нащадків 2-го покоління виявилось, що транспортна активність у них відносно вільної глюкози була значно нижча, ніж у нащадків 1-го покоління (на 35%) і у інтактних шурят (на 30%). При цьому якщо активність транспорту вільної глюкози у нащадків 1-го покоління була навіть дещо вищою, ніж в інтактній групі (на 8%), то у нащадків 2-го покоління вона була нижчою в 1,5 рази, ніж в попередній групі, і в 1,4 рази щодо значень у інтактних шурят. Розкиди від середнього в цій групі також були удвічі вищими, ніж у групі нащадків 1-го покоління, але все ж таки на 39% нижчими порівняно з інтактними щурами. Отже, радіопротекторний ефект їжі є дійсним тільки для нащадків 1-го, але не 2-го покоління. Швидше за все, в 2-му поколінні проявляються порушення стабільності генома внаслідок опромінення батьків, що були придбані в рецесивній формі 1-м поколінням, не проявилися в ньому і були передані його нащадкам – це підтверджується даними літератури [2, 4, 5, 7]. Це припущення також знаходить підтвердження при аналізі показників

транспорту М-глюкози: в групі нащадків 2-го покоління вони майже в 1,5 раза (на 32%) є нижчими, ніж у нащадків 1-го покоління або у інтактних тварин, на фоні удвічі вищих показників розкидів від середнього. Слід також зауважити, що транспорт М-глюкози в групі інтактних щурят був нижчим, ніж такий вільної глюкози в цій групі на 11%, порівняно з нащадками 2-го покоління – на 13%, а з нащадками 1-го покоління – на 18%. Отже, наслідки опромінення батьків реалізуються у їх нащадків 2-го покоління дійсно через зниження вмісту мальтози, тобто вражається гідролітична ланка ферментативно-транспортного конвеєру для мальтози, або ж до

його складу входить не той транспортер, який відповідає за перенесення вільної глюкози.

Таким чином, ситість батьків на момент опромінення визначає радіопротекторний ефект насамперед для системи транспорту мономерного вуглеводного субстрату в тонку кишку їх нащадків 1-го покоління – значно стабілізується і підвищується транспорту вільної глюкози ($P = 0,013$) і зберігається транспорт М-глюкози на рівні, визначеному для інтактних тварин. Цього не відбувається у нащадків 2-го покоління – у них виявляється значне зниження показників транспорту обох вуглеводних субстратів у порівнянні з такими для інтактною групи ($P = 0,0001$ в

Асиміляція субстратів (ммоль/(л·мг) препаратами слизової оболонки тонкої кишки двомісячних щурят - нащадків 1-го і 2-го поколінь від опромінених натще (I) та ситими (II) дозою 0,5 Гр самців та інтактних самиць (M±m).

Група тварин	Глюкоза	Мальтоза
	I	
Інтактна	47,85±5,59*	42,71±2,31*
	11,7%	5,4%
Нашадки 1-го покоління	^x 42,25±6,22*	42,67±1,95*
	14,7%	4,6%
Нашадки 2-го покоління	^{xx} 40,35±4,58**	31,77±3,95**
	11,4%	12,4%
	$P_{1-3} = 0,032$	$P_{1-3} = 0,0001$ $P_{2-3} = 0,0001$
	II	
Інтактна	47,85±5,59*	42,71±2,31*
	11,7%	5,4%
Нашадки 1-го покоління	^x 51,97±1,50*	42,62±1,94*
	3%	4,5%
	$P_x = 0,013$	
Нашадки 2-го покоління	^{xx} 33,47±2,38	28,99±2,66
	7,1%	9,2%
	$P_{1-3} = 0,0001$	$P_{1-3} = 0,0001$
	$P_{2-3} = 0,0001$	$P_{2-3} = 0,0001$
	$P_{xx} = 0,018$	

*дані отримано раніше [8], використано для зіставлення;

** дані отримано раніше [11], використано для зіставлення;

^x відмінність значень у групах нащадків 1-го покоління від опромінених голодними і ситими щурів;

^{xx} відмінність значень у групах нащадків 2-го покоління від опромінених голодними і ситими щурів; В усі інкубаційні середовища додано кролячу жовч. Під показниками асиміляції наведено відсотки розкидів від середнього.

обох випадках) і для нащадків 1-го покоління ($P = 0,0001$ в обох випадках), проте показники не опускаються нижче від значень активного транспорту. Отже, дійсно, у 1-му поколінні нащадків опромінених батьків не виявляються отримані від них порушення, незалежно від наявності їжі в кишечнику батьків на момент опромінення, натомість у 2-му поколінні ці порушення є досить яскравими і, всупереч очікуваному, навіть більш вираженими у нащадків опромінених ситими щурів. Вочевидь, наявність їжі у кишечнику батьків при опроміненні здатна захистити їх нащадків тільки не далі 1-го покоління – для захисту наступних поколінь слід використати більш потужні радіопротектори.

Таким чином, ситість на час опромінення самців-попередників визначає радіопротекторний ефект для систем транспорту вуглеводних субстратів різної полімерності тільки у нащадків 1-го покоління – виявлено стимуляцію і значну стабілізацію транспорту вільної глюкози, а також збереження транспорту М-глюкози на рівні, визначеному для інтактних тварин. У нащадків 2-го покоління цей ефект не спостерігається – показники функціональної активності знижуються відносно таких навіть у інтактній групі, проте знаходяться в межах активної компоненти транспорту.

О. В. Сторчило

РАДИОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ПИЩИ В АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕВОДНЫХ СУБСТРАТОВ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ПОЛИМЕРНОСТИ У ДВУХ ПОКОЛЕНИЙ ПОТОМСТВА ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС

Исследовали влияние пищи в кишечнике облученных самцов-предшественников на функциональную активность тонкой кишки их потомства двух поколений. Установлено, что сытость этих животных во время облучения определяет радиопротекторный эффект на транспорт углеводных субстратов разной степени полимерности только у их потомства 1-го поколения – у 2-го поколения показатели функциональной активности ниже таковой даже в интактной группе, преимущественно за счет ферментативного звена, однако при этом они не выходят за

границы активной компоненты транспорта. Следовательно, для защиты дальнейших поколений от облученных предшественников необходимы более мощные, чем просто пища, радиопротекторы.

Ключевые слова: облучение; тонкая кишка; ассимиляция углеводов; потомство крыс.

O.V. Storchilo

RADIOPROTECTIVE EFFECT OF FOOD IN THE ASSIMILATION OF CARBOHYDRATE SUBSTRATES BY TWO GENERATIONS OF POSTERITY FROM THE RADIATION-EXPOSED MALE RATS

The influence of food in the intestine of the radiation-exposed males-predecessors on the functional activity of the small intestine of two generations of their posterity was investigated. It is shown that satiety of these animals during an irradiation determines a radioprotective effect on the systems of transport of carbohydrate substrates of different degree of polymerization only at their posterity of first generation. The second generation had the indexes of functional activity below than that observed in intact group, thus mainly due to a fermentative link. However, here they do not exceed the borders of active component of transport. Consequently, for protection of further generations from the radiation-exposed precursors the more powerful radioprotectors are needed, than simply food. Key words: irradiation, small intestine, assimilation of carbohydrates, rats' posterity.

Odessa National Medical University

REFERENCES

1. Guryeva VA, Dudareva YuA. The modern estimation of the state of health of descendants of persons being in the zone of radiation-damage (on the example of the Semipalatinsk ground) : Proceeding of the 2nd International scientific-practical conference "Academic science - problems and achievements", Moscow, September 5-6, 2013, P.273 . [Russian].
2. Dergylev AA, Chibisova OF, Palyga GF, Ivanov VL, Zhavoronkov LP. Influence of ionizing radiation in unsterilizing doses on the embryogenesis and post-natal development of posterity of two generations of rats males, the gametes of that were radiation-exposed on the premeiotic stages of spermatogenesis. *Rad. and risk*, 2012, 21 (2) 39-45 [Russian].
3. Liberman A. Radiation and reproductive health. *Sanct-Petersburg*, 2003 225 p [Russian].
4. Palyga GF, Chibisova OF, Ivanov VL, Dergylev A A, Zhavoronkov LP. Realization of radial effects in the ontogenesis of posterity of two generations of males, whose gametes were radiation-exposed in the non-sterilize dosage on the stage of mature spermatozoa.

- Rad. and risk 2010 19 (4) 58-62 [Russian].
5. Palyga GF, Chibisova OF, Ivanov VL, Dergylev A A, Zhavoronkov LP, Panfilova VV, Kolganova OI Realization of radial effects is the ontogenesis of posterity of two generations of males the gametes of which were radiation-exposed singly in unsterilizing doses on the stage of spermatid. Rad. and risk 2011 20 (1) 19-23 [Russian].
 6. Reproductive health of new generation: collection of scientific works of Ivanov Scientifically research institute of maternity and childhood the name of V N Gorodkov of Ministry of health and social development of Russian Federation. 2010. Ivanovo: 382 p. [Russian].
 7. Agadganyan AV Investigation of the transgenerational phenomenon of genome instability in the the children-descendants of the radiation-exposed parents as a result of accident on Chernobyl nuclear power station. Moscow 2008 20 p. [Russian].
 8. Storchilo OV Peculiarities of the irradiated rats posterity the small intestine functional activity under the parents life-time different conditions. Odessa Med. Mag. 2009 115(5) 21-27 [Ukrainian].
 9. Ugolev AM, Zhigure DR, Nurks EE,. Accumulating preparation of mucous membrane is a new method of research of the initial stages of transfer of substances through an intestinal wall. Physiol. Mag. of the USSR 1970 56 (11) 1638-1641 [Russian].
 10. Scott TA, Melvin EH The determination of hexoses with antrone. Analyt. Chem. 1953 №25, 1656–58.
 11. Storchilo OV Functional activity of the small intestine of two generations of the posterity of the hungry irradiated male rats. Odessa Med. Mag. 2013 140(6) 13 -17 [Ukrainian].

*Матеріал надійшов
до редакції 06.06.2014*

Л.П.Войтенко, О.Г.Ніконенко

Модифікація експериментальної ротенонової моделі хвороби Паркінсона

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, E-mail: agn@biph.kiev.ua

Запропоновано модифікацію експериментальної моделі хвороби Паркінсона, що передбачає стереотаксичну інфузію розчину ротенону за допомогою оригінального пристрою у центральну зону компактної частини чорної субстанції (ЧС) дорослих щурів лінії Вістар. Встановлено, що через 10 діб щільність дофамінергічних (ДА) нейронів у ділянці інфузії нейротоксину зменшується майже в 6 разів, до $20,2 \pm 3,2$ нейронів/мм² порівняно з відповідним показником у неушкодженій контралатеральній ЧС, $119,0 \pm 3,3$ нейронів/мм². Електронна мікроскопія виявила порушення ультраструктури мітохондрій нейронів ЧС у зоні інфузії, що переважно обмежувалися дезорганізацією крист у цих органелах. Відсутність загальної токсичності та селективність ураження тканини мозку свідчать про те, що запропонована модифікація моделі є адекватною та придатною для досліджень ефектів дегенерації ДА-нейронів, притаманної хвороби Паркінсона у людини.

Ключові слова: ротенон; модель *in vivo*; хвороба Паркінсона

ВСТУП

Дофамінергічні (ДА) нейрони середнього мозку беруть безпосередню участь у контролі моторних і когнітивних функцій головного мозку, які забезпечують довільні рухи та робочу пам'ять. Найбільш численні популяції ДА-нейронів локалізовані у чорній субстанції (ЧС) та вентральній тегментальній ділянці середнього мозку. Незважаючи на те, що проєкції ДА-нейронів дуже різноманітні, ці клітини мають подібні молекулярні та електрофізіологічні характеристики [1]. Їх ураження у ЧС, що є типовою рисою хвороби Паркінсона, та його наслідки можна вивчати на тваринах в умовах експериментальних моделей. Такі моделі передбачають використання тварин генетично-модифікованих ліній [2], а також тварин, що були піддані дії таких нейротоксинів, як 6-оксидофамін [3, 4], 1-метил-4-фенілтетрагідропіридин [5], паракват [6] або ротенон [7, 8].

Ротенон – це флавоноїд, що пригнічує пе-

ренесення електронів з Fe/S-центрів НАДН-дегідрогенази на убіхінон, чим перешкоджає виробленню АТФ внаслідок окисного фосфорилування. Водночас він не впливає на продукцію АТФ у процесах гліколізу [9]. При його дії ДА-нейрони гинуть через виникнення дефіциту енергетичного метаболізму. Цю речовину застосовували у попередніх дослідженнях для моделювання хвороби Паркінсона *in vivo* [7, 10] та *in vitro* [11, 12].

Більшість ротенонових моделей *in vivo* передбачає тривале системне введення цього нейротоксину у щурів [7, 8, 10, 13]. Основні недоліки такого підходу – недостатня селективність ураження структур головного мозку [7, 13] та небажана токсичність ротенону, наприклад, щодо кардіоваскулярної системи [10]. У таких умовах досить важко отримати групу дослідних тварин з однотиповими ураженнями головного мозку [7]. Зокрема, відомі випадки, коли токсичний ефект ротенону, при його системному введенні, не призводив до дегенерації ДА-нейронів ЧС [13].

Мета нашої роботи – спроба розробити експериментальну модель, яка б дала змогу отримувати прогнозовані ураження ДА-нейронів ЧС, не мала ефектів загальної токсичності та була зручною для досліджень морфологічних змін тканини головного мозку, характерних для хвороби Паркінсона. За основу було взято модель, запропоновану Ксіонгом та співавт. [14], яка була модифікована для посилення ефекту дегенерації ДА-нейронів у ЧС.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на 39 дорослих щурах-самцях лінії Вістар масою 270–300 г. Зокрема, для імуногістохімічного аналізу використано 27 і для ультраструктурного – 12 тварин. Усі експерименти було виконано згідно з вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986). Ротенон („Sigma”, США) розчиняли у диметилсульфоксиді та вводили у дозах 6 або 12 мкг. Інфузію розчину

здійснювали стереотаксично, в ліву половину головного мозку, у ділянку компактної частини ЧС. Для введення ротенону було застосовано пристрій на основі мікропіпетки Pipetman („Gilson”, Франція), що детально описаний у наступному розділі (рис. 1).

Перед операцією щурів наркотизували ін’єкцією суміші кетаміну – 50 мг/кг („Pfizer”, США) та ксилазіну гідрохлориду – 2 мг/кг („Interchemie”, Нідерланди). Після цього тварин фіксували у стереотаксичному апараті (див. рис. 1, а). Через розріз поверхневих тканин відкривали доступ до поверхні склепіння їх черепа. Орієнтуючись на позначки брегми та лямбди (див. рис. 1, б), на поверхні черепа знаходили точку, що відповідала координатам AP 5,0 мм та L 2,0 мм за атласом [15], де робили отвір у кістці черепа. Голку інфузійного пристрою опускали через цей отвір, занурюючи її у тканину мозку на відповідну глибину (DV 7,0 мм за атласом [15]) і повільно виштовхували з наконечника розчин ротенону у загальному об’ємі 1 мкл.

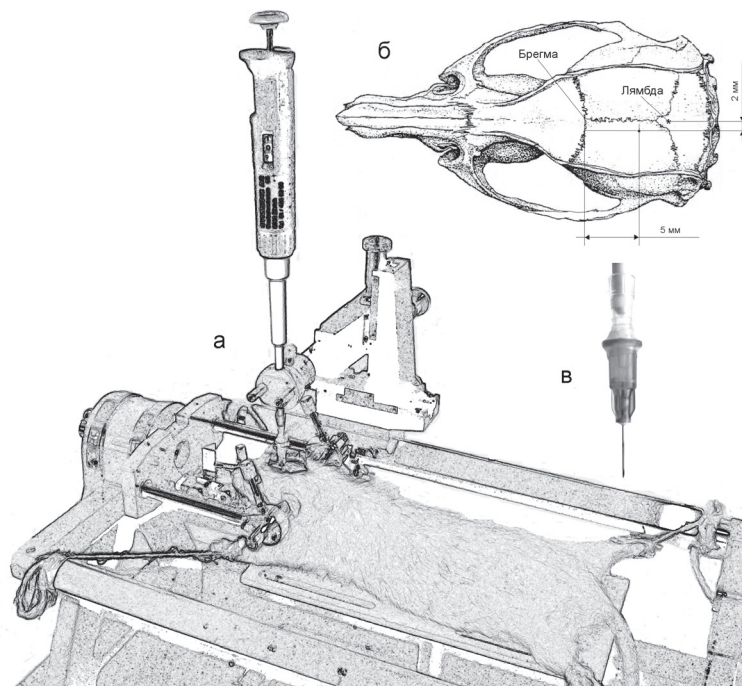


Рис. 1. Процедура проведення внутримозкової інфузії нейротоксину ротенону: а – загальний вигляд установки для внутримозкової інфузії ротенону; б – схема визначення стереотаксичних координат на поверхні черепа щура; в – наконечник мікропіпетки, що скомбінований зі стандартною голкою шприца

Через 5, 10, 15 діб, або у віддалені періоди – 6, 10, 14 тиж після внутришньомозкової інфузії ротенону, під глибоким наркозом щурів транскардіально перфузували 4%-м формальдегідом на 0,1 моль/л фосфатному буфері (ФБ) (рН 7,4). Головний мозок кожної тварини додатково фіксували у 4%-ному формальдегіді на 0,1 моль/л ФБ (рН 7,4) протягом однієї доби. Фронтальні зрізи головного мозку товщиною 50 мкм робили на вібраторі VT 1000 A („Leica”, Німеччина). Для ідентифікації нейронів і гліальних клітин використовували подвійне імуногістохімічне пофарбування специфічними антитілами проти маркера нейронів NeuN (мишачі моноклональні, 1:1000, „Chemicon”, Великобританія), ключового ферменту ДА-нейронів тирозингидроксилази (ТГ) (мишачі моноклональні, 1:1000, „Sigma”, США) та маркера астроцитів GFAP (курячі поліклональні, 1:1500, „Dako”, Данія). Після промивання у 0,1 моль/л ФБ, зрізи обробляли вторинними антимишачими Alexa Fluor-555 (1:1000, „Invitrogen”, США), або антикурячими Alexa Fluor-647 (1:1000, „Invitrogen”, США) антитілами. Готові препарати аналізували у конфокальному мікроскопі FV 1000-BX 61 WI („Olympus”, США) з цифровою фотокамерою.

Для потреб електронної мікроскопії відповідну кількість щурів, через 6, 10 або 14 тиж після інфузії ротенону у ЧС, піддавали транскардіальній перфузії 4%-м формальдегідом та 2,5%-м глютаральдегідом, розчиненими у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,4). Фронтальні зрізи головного мозку (товщиною 200 мкм) були зроблені на вібраторі та дофіксовані 1%-м розчином OsO_4 на 0,1 моль/л ФБ (рН 7,4). Далі зрізи зневоднювали та заключали у епоксидну смолу (Епон 812, „Sigma”, США). Тонкі зрізи тканини мозку товщиною 70 нм контрастували цитратом свинцю й уранілацетатом та аналізували у електронному мікроскопі JEM 100-CX („JEOL”, Японія).

Кількість життєздатних ДА-нейронів оцінювали як щільність ТГ-позитивних перикаріонів у зоні компактної частини ЧС. Як

контроль використовували тканину відповідних контралатеральних ділянок мозку тих самих тварин, а також тканину несправжньо оперованих тварин, тобто таких, що отримували ін'єкцію 1 мкл розчинника без ротенону.

Ефективність операції контролювали за критерієм асиметричної поведінки тварин у Т-подібному лабіринті, що мав стінки з непрозорого матеріалу, через 2 тиж після операції. Реєстрували напрямок руху тварини в той чи іншій бік. Тест для кожної тварини повторювали 10 разів. Як контроль використовували несправжньо оперованих тварин.

Цифрові результати обробляли методами варіаційної статистики. Для порівняння вибірок використовували двобічний непараметричний критерій Колмогорова–Смирнова. Вірогідними вважали розбіжності при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імуногістохімічне забарвлення проти ТГ дало змогу точно ідентифікувати ДА-нейрони. Ці клітини ми виявляли як перикаріони овоїдної, полігональної або веретеноподібної форми, з яких виходило 3–5 первинних дендритів (див. рис. 2, а). Незважаючи на деякі варіації у діаметрі дендритів, більшість з них не були явно варикозними. На електронограмах нейрони компактної частини ЧС мали світлу цитоплазму з помірною кількістю мітохондрій еліпсоїдної форми. Ядро цих клітин було овальної форми, а ядерна оболонка мала інвагінації (див. рис. 2, б).

Відомо, що в середньому мозку знаходяться три з восьми груп ДА-нейронів, які ідентифіковані у межах головного мозку. Ці групи представлені взаємопов'язаними смугами, межі яких визначити важко. Група А8 вважається частиною ретикулярної формації середнього мозку та відома також як латеральна частина ЧС, в той час як група А9 повністю відповідає компактній частині ЧС. Еферентні проєкції від клітин А8 та А9 груп завершуються у хвостатому ядрі та блідій кулі.

Селективна втрата ДА-нейронів ЧС є характерною для хвороби Паркінсона у людини. Для відтворення цієї ситуації у щурів ми застосовували внутришньомозкову інфузію ротеину. Пристрій для цього був розроблений на основі механо-пневматичної мікропіпетки Pipetman („Gilson”, Франція) з регульованим об’ємом 1–20 мкл, змінний наконечник якої був зкомбінований з голкою шприца G27 (0,4 мм × 13 мм) (див. рис.1, в). Принцип дії мікропіпетки базується на всмоктуванні/витисканні відповідної порції рідини, що здійснюється завдяки рухам плунжера у циліндрі. Мікропіпетка має вузол обмеження руху плунжера, який визначає робочий об’єм циліндра та, відповідно, кількість рідини, що всмоктується/витискається. Зменшення робочого об’єму за умови наявності рідини у наконечнику призводить до контрольованого (з ціною поділки у 0,1 мкл) витискання рідини з нього. У попередніх дослідженнях нами було обрано режим введення розчину роте-

нону у загальному об’ємі 1 мкл зі швидкістю 0,2 мкл/хв. Перед проведенням серії інфузій наконечник заповнювали розчином ротеину у об’ємі близько 20 мкл.

Для попередньої оцінки ефективності інфузії ротеину ми використали тест руху експериментальної тварини у Т-подібному лабіринті. Оскільки інфузія здійснювалась унілатерально, у ліву ЧС, вона могла вплинути на симетрію рухових реакцій у оперованих тварин. Тест проводили через 14 діб після операції у щурів, які отримували 6 мкг ротеину. Показано, що оперовані щури у 62,7±3,1 % випадків повертали у лабіринті в напрямку, контролатеральному до боку інфузії, тобто праворуч (рис. 3). Контрольні тварини робили аналогічний вибір лише у 53,0±2,5 %. Іншими словами, між двома групами щурів спостерігалися достовірні відмінності у ступені просторово-моторної симетрії.

В окремій серії дослідів вивчали динаміку ротеинозалежної унілатеральної дегенерації

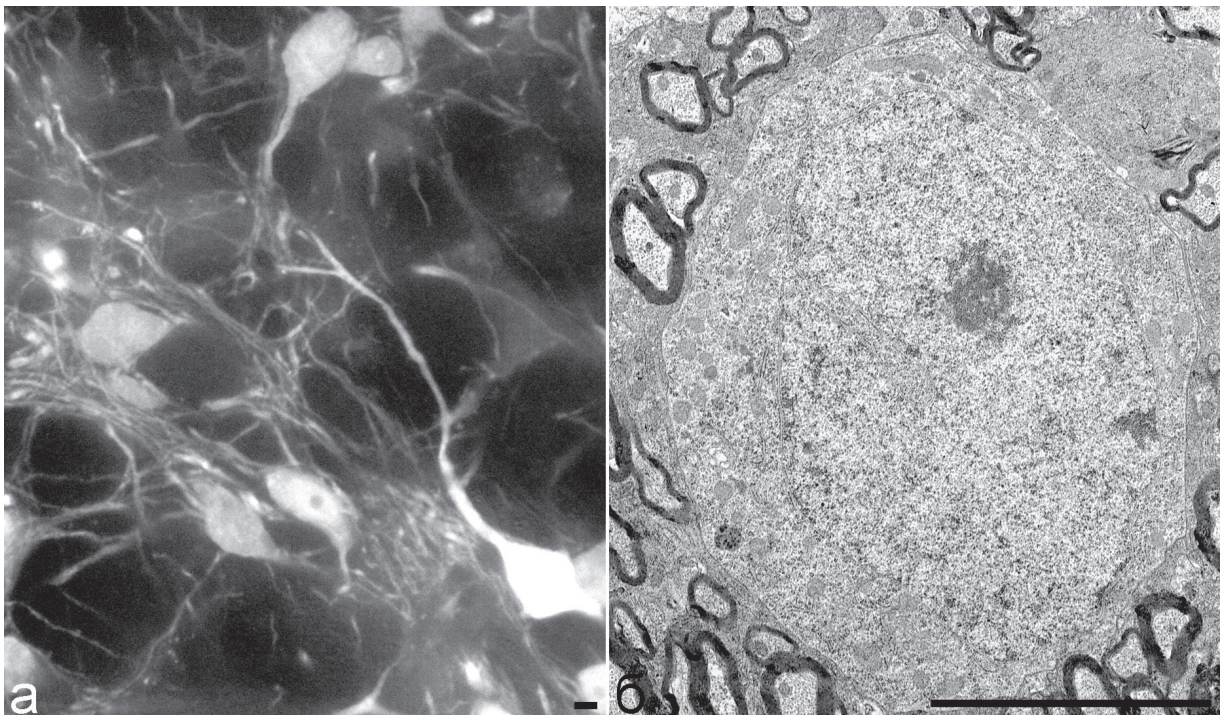


Рис. 2. Дофамінергічні нейрони чорної субстанції головного мозку щура: а – імуногістохімічне пофарбування на тирозингідроксилазу; б – електронорама тіла нейрона чорної субстанції. Масштабні лінії 5 мкм

ДА-нейронів у ЧС. Оскільки ротенон є специфічним інгібітором окиснення субстратів ферментом НАДН-дегідрогеназою, він спроможний блокувати роботу електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. Цей ефект ротенону є особливо цікавим у контексті моделювання геміпаркінсонізму у тварин тому, що порушення мітохондрій вважають спільною рисою широкого спектру нейродегенеративних захворювань, у тому числі і хвороби Паркінсона [16]. Дефіцит енергетичного обміну, викликаний нейротоксином ротеноном, має призводити до загибелі ДА-нейронів. Однак невідомою залишалася часова динаміка такої загибелі. Для з'ясування цього питання було досліджено тканину мозку відповідної кількості тварин через 5, 10 або 15 діб після внутрішньомозкової інфузії 6 мкг ротенону. На зрізах тканини мозку ДА-нейрони ідентифікували за ознакою імунопозитивності до ТГ – ключового ферменту обміну дофаміну. Відомо, що цей фермент каталізує реакцію перетворення амінокислоти тирозину у діоксифенілаланін, який і є в свою чергу попередником дофаміну. Встановлено, що значна частка ДА-нейронів у зоні інфузії гине вже

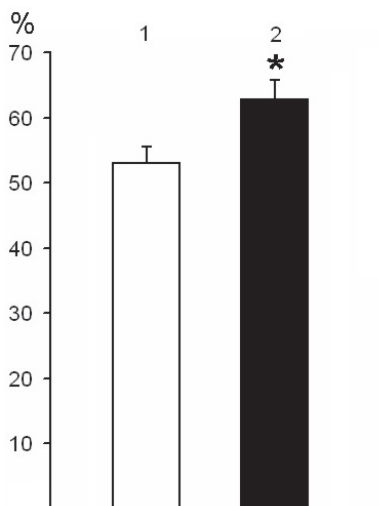


Рис. 3. Частота вибору напрямку руху (контралатерального щодо боку інфузії нейротоксину) у Т-подібному лабіринті через 14 діб після стереотаксичної інфузії 6 мкг ротенону. 1 – контроль, 2 – унілатеральна інфузія нейротоксину ротенону у чорну субстанцію. *P < 0,05

через 10 діб після внутрішньомозкової інфузії ротенону (рис. 4). Щільність ДА-нейронів у компактній частині ЧС зменшувалася майже в шість разів, до $20,2 \pm 3,2$ клітин/ мм^2 порівняно з відповідним показником у нешкодженій контралатеральній зоні, $119,0 \pm 3,3$ клітин/ мм^2 (P < 0,05). Порівняння мікрофотографій, наведених на рис. 4, а та б, дає змогу зробити попередній висновок про те, що внаслідок дії ротенону насамперед гинуть ДА-нейрони з перикаріонами великого розміру.

Слід зазначити, що морфологічний фенотип GFAP-позитивних клітин (астроцитів) у зоні інфузії ротенону через 10 діб після операції свідчить про їх підвищену активність. Астроцити мають більшу кількість відростків, які довші за такі у відповідних гліальних клітин у контролі. Зміни морфології астроцитів і посилення експресії ними GFAP вказують на активну участь цих клітин у процесах реорганізації тканини мозку після інфузії нейротоксину ротенону.

Середньострокову динаміку загибелі ДА-нейронів вивчали у щурів, які отримували ротенон у дозах 6 або 12 мкг та були перфузовані через 6, 10 та 14 тиж після операції. Нами встановлено, що значне зниження кількості ТГ-позитивних клітин у ЧС було обмежено зоною інфузії, розмір якої варіював. Не було виявлено прогресивної динаміки загибелі цих клітин у більш віддалені строки після операції. Так, відмінності в кількості ТГ-позитивних перикаріонів у зоні інфузії нейротоксину через 10 діб, 6, 10 та 14 тиж після операції були незначними. Крім того, не було виявлено дозозалежного ефекту ротенону. Таким чином, зона загибелі ДА-нейронів під впливом ротенону не розширюється з часом, а доза нейротоксину у 6 мкг є достатньою для загибелі більшості ДА-нейронів та активації глії у ділянці інфузії.

У тварин, які отримували 12 мкг ротенону, вищезгадані зміни астроцитів у зоні інфузії нейротоксину через 6 тиж після операції були подібними до таких і через 10 діб. Але через 10 або 14 тиж після операції, морфологія

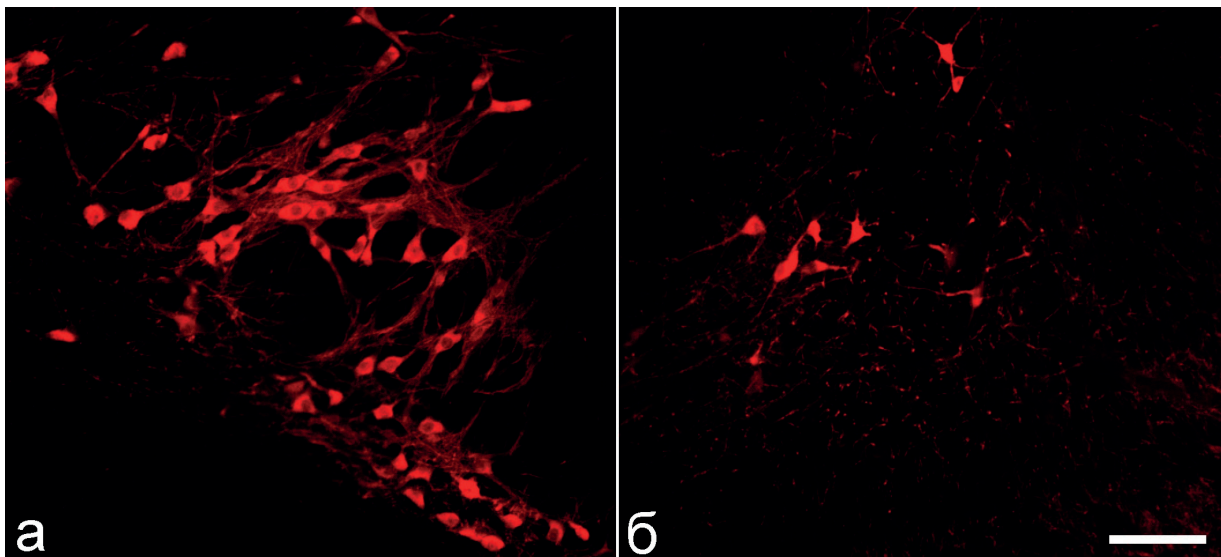


Рис. 4. Тирозингідроксилаза-позитивні нейрони чорної субстанції через 10 діб після унілатеральної інфузії 6 мкг нейротоксину ротеїну: **а** – нейрони контрольної зони, що є контралатеральною до зони інфузії; **б** – нейрони у зоні інфузії ротеїну. Масштабна лінія 100 мкм

астроцитів та рівень експресії ними GFAP у ділянці інфузії нейротоксину не відрізнялися від відповідних контрольних показників.

Гістологічне дослідження виявило ознаки дегенерації нейронів у ЧС та вентральній тегментальній ділянці після внутрішньомозкової інфузії ротеїну, які були помітні вже через 6 тиж після операції. Дегенерація ДА-нейронів

посилювалась у більш віддалені строки (рис. 5). Однак у ділянці гіпокампа ознаки нейродегенерації не спостерігалися.

Слід зазначити, що проведений електронно-мікроскопічний аналіз виявив порушення ультраструктури мітохондрій нейронів ЧС, що переважно обмежувалися дезорганізацією крист у цих органелах.

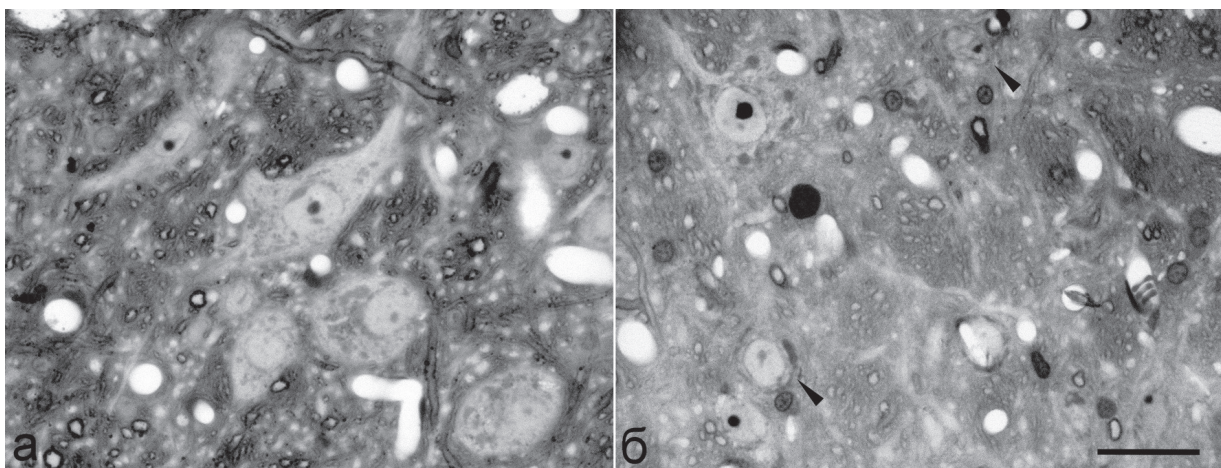


Рис. 5. Тканина чорної субстанції через 10 тиж після унілатеральної інфузії 6 мкг ротеїну: **а** – нейрони у зоні, що є контралатеральною до зони інфузії; **б** – нейрони у зоні інфузії ротеїну (стрілки вказують на нервові клітини з ознаками дегенерації). Масштабна лінія 25 мкм

Переважає більшість ротенонових *in vivo* моделей хвороби Паркінсона передбачає тривале (від одного до декількох тижнів) системне введення токсину або за допомогою осмотичного мікронасоса, вживленого під шкіру [10], або через канюлю, під'єднану до шийної вени [13]. Технічно простіший варіант моделі використовує інтраперитонеальні ін'єкції ротенону (раз на добу) у дозі 2,5–3,0 мг/кг і протягом тривалого періоду [7, 8]. У разі використання осмотичного мікронасоса добову дозу нейротоксину підвищували до 12 мг/кг [10] або навіть до 18 мг/кг [13].

Незважаючи на те, що ці експериментальні моделі дали змогу отримати цікаві результати щодо розвитку дегенерації ДА-нейронів у головному мозку, було продемонстровано, що вони мають цілу низку обмежень. По-перше, системне введення ротенону не гарантує прогнозованого розподілу зон ураження у головному мозку. Так, втрати ДА-нейронів і гліозис можуть бути значними у строкатому тілі та блідій кулі, але не у ЧС [13]. Крім того, системне введення нейротоксина ротенону у великих дозах може призводити до небажаної токсичності [10].

У спостереженнях за оперованими тваринами не виявлено таких порушень поведінки, типових для ХП або для системного введення ротенону, як гіпокінезія та акінезія, ригідність, нестабільність пози [7, 8, 10]. Можливе пояснення базується на тому, що в умовах конкретної ротенонової моделі гинуть ДА-нейрони компактною частини ЧС лише з одного боку, в той час як клітини парної контралатеральної структури залишаються неушкодженими.

Відомо, що розвиток хвороби Паркінсона починається з появи агрегатів α -синуклеїну у відростках нейронів кишечника та мотонейронів блукаючого нерва. Крім ЧС, тільця Леві також знаходять у блакитній плямі, ядрах шва, корі та інших структурах головного мозку [17]. Ми не змогли виявити відкладення α -синуклеїну, що є характерними для хвороби Паркінсона. Однак слід зазначити, що такі відкладення у формі тілець та/або нейритів Леві з'являються на розвинутих

стадіях хвороби, коли загибель значної кількості ДА-нейронів стає очевидним фактом. Аналіз літератури вказує на те, що при системному введенні ротенону внутрішньоклітинні α -синуклеїнові депозити виявляють не завжди [8, 10].

Отже, використана модель геміпаркінсонізму дає змогу відтворювати у щурів суттєві нейродегенеративні зміни, притаманні хворобі Паркінсона. Модель, яка передбачає стереотаксичні інфузії невеликих доз ротенону у зону ЧС, демонструє відсутність периферичної токсичності. Вона дає змогу відтворити повільну та специфічну втрату ДА-нейронів в обмеженій ділянці ЧС (*pars compacta*) та уможливорює імітацію окремих характеристик ідіопатичної ХП. Цей варіант ротенонової моделі відтворює такі зміни лише на боці інфузії нейротоксину ротенону. Електронна мікроскопія виявила також порушення ультраструктури мітохондрій нейронів ЧС у зоні інфузії ротенону, які переважно обмежувалися дезорганізацією крист у цих органелах.

Л.П. Войтенко, А.Г. Ніконенко

МОДИФИКАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РОТЕНОНОВОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Предложена модификация экспериментальной модели болезни Паркинсона, которая предполагает стереотаксическую инфузию раствора ротенона с помощью оригинального устройства в центральную зону компактной части черной субстанции (ЧС) взрослых крыс линии Вистар. Установлено, что через 10 сут после такой инфузии плотность дофаминергических (ДА) нейронов в области инфузии нейротоксина уменьшается почти в 6 раз, до $20,2 \pm 3,2$ нейронов/ мм^2 , в сравнении с соответствующим показателем в неповрежденной контралатеральной ЧС, $119,0 \pm 3,3$ нейронов/ мм^2 . Электронная микроскопия выявила нарушения ультраструктуры митохондрий нейронов ЧС в зоне инфузии, которые ограничивались главным образом дезорганизацией крист в этих органеллах. Отсутствие общей токсичности и селективность нарушений ткани мозга свидетельствуют о том, что предложенная модель адекватна и может применяться в исследованиях эффектов дегенерации ДА-нейронов, присущей болезни Паркинсона у человека.

Ключевые слова: ротенон; модель *in vivo*; болезнь Паркинсона.

L.P. Voitenko, A.G. Nikonenko

MODIFICATION OF EXPERIMENTAL ROTENONE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

A modification of experimental model of Parkinson's disease is proposed presuming the stereotaxic infusion of rotenone solution using a special device into the central part of substantia nigra (SN) pars compacta of adult Wistar rats. It was shown that 10 days after infusion of the neurotoxin the density of dopaminergic (DA) neurons in the infusion area drops nearly six-fold, to 20.2 ± 3.2 neurons/mm², with respect to the corresponding value in non-affected controlateral SN, 119.0 ± 3.3 neurons/mm². Electron microscopy has shown ultrastructural impairments in mitochondria of SN neurons in the infusion area displayed mainly as a cristae disarray. The absence of overall toxicity and selectivity of the brain tissue impairments provide an evidence that the proposed rotenone model modification is adequate and can be used to study the effects of DA neuronal degeneration typical of Parkinson's disease.

Keywords: rotenone; in vivo model; Parkinson's disease.

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

REFERENCES

1. Roeper J. Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci.* 2013; 36(6): 336-42.
2. Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron.* 2000; 25(1): 239-52.
3. Tkachenko MN, Zozulya IS, Shapoval MV, Sagach VF. Parkinsonism: current concepts of pathogenesis and the possible ways to correct. *Ukr Med J.* 2000; 3: 9-14.
4. Ungerstedt U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1971; 367: 49-68.
5. Bloem BR, Irwin I, Buruma OJ, Haan J, Roos RA, Tetrad JW, Langston JW. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 1990; 97(2-3): 273-93.
6. Bove J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2012; 211: 51-76.
7. Alam M, Schmidt WJ. L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. *Behav Brain Res.* 2004; 153(2): 439-46.
8. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009; 34(2): 279-90.
9. Dickman KG, Mandel LJ. Differential effects of respiratory inhibitors on glycolysis in proximal tubules. *Am J Physiol.* 1990; 258(6): 1608-15.
10. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000; 3(12): 1301-06.
11. Borland MK, Trimmer PA, Rubinstein JD, Keeney PM, Mohanakumar K, Liu L, Bennett JP Jr. Chronic, low-dose rotenone reproduces Lewy neurites found in early stages of Parkinson's disease, reduces mitochondrial movement and slowly kills differentiated SH-SY5Y neural cells. *Mol Neurodegener.* 2008; 3: 21.
12. Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci.* 2006; 26(19): 5256-64.
13. Ferrante RJ, Schulz JB, Kowall NW, Beal MF. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. *Brain Res.* 1997; 753(1): 157-62.
14. Xiong N, Huang J, Zhang Z, Zhang Z, Xiong J, Liu X, Jia M, Wang F, Chen C, Cao X, Liang Z, Sun S, Lin Z, Wang T. Stereotaxical infusion of rotenone: a reliable rodent model for Parkinson's disease. *PLoS One.* 2009; 4(11): e7878.
15. Paxinos G, Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press. 2006: 456 p.
16. Itoh K, Nakamura K, Iijima M, Sesaki H. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol.* 2013; 23(2): 64-71.
17. Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG. Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy as α -synucleinopathies. *Methods Mol Med.* 2001; 62: 33-59.

*Матеріал надійшов
до редакції 02.09.2014*

Гошовська Ю.В.

Участь мітохондріальних роз'єднувальних білків в механізмах захисту міокарда від окисного стресу

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; pokutt@gmail.com

Роз'єднувальні білки (від англ. uncoupling proteins, UCP), що містяться у внутрішній мембрані мітохондрій і є конкурентами АТФ-синтази для протонів, важливі не лише у зв'язку з процесом термогенезу у тканинах бурого жиру. Виявлення гомологів UCP у мітохондріях кардіоміоцитів і демонстрація їх протонпровідних властивостей дають змогу говорити про регуляторне значення цих білків для мембранного потенціалу і, відповідно, для синтезу АТФ. Однак вміст UCP у кардіоміоцитах на два порядки менший, ніж у бурому жирі. Тому так зване „м'яке” роз'єднання окисного фосфорилування, що спостерігається при активації серцевих ізоформ UCP може запобігати надмірній продукції активних форм кисню дихальним ланцюгом. В огляді наведені власні і літературні дані, що підтверджують захисну роль активації UCP в попередженні надмірної продукції активних форм кисню за умов окисного стресу при ішемії міокарда. Обговорюється участь UCP в ендогенних механізмах кардіопротекції, що викликаються ішемічним прекодиціюванням.

Ключові слова: роз'єднувальні білки, окисний стрес, міокард, ішемія, мітохондрій, прекодиціювання.

ВСТУП

Мітохондрії – це основні органели, які продукують АТФ через процес, що спряжений із споживанням кисню і відомий як окисне фосфорилування. Створений під час дихання протонний градієнт може бути „розсіяний” завдяки активності роз'єднувальних білків (від англ. uncoupling proteins, UCP), які локалізовані у внутрішній мембрані мітохондрій і регулюють функціонування електронно-транспортного ланцюга [1]. Необхідність у роз'єднанні окисного фосфорилування виникає зокрема у разі відсутності субстрату для роботи АТФ-синтази, а також кисню як акцептора електронів. За таких умов є ймовірність утворення гідроксильного та супероксидного радикалів у комплексах I і III мітохондрій [2]. Велика кількість активних форм кисню (АФК) разом зі збільшенням вмісту внутрішньоміто-

хондріального Ca^{2+} створюють умови для відкриття мітохондріальних пор із наступною активацією апоптозу/некрозу [3]. Саме з функцією запобігання надмірній продукції АФК і пов'язують важливе значення UCP в умовах розвитку окисного стресу [1,4,5].

Активні форми кисню як індуктори окисного стресу при старінні та ішемії–реперфузії. Інтенсифікація окисного метаболізму внаслідок надмірної продукції в клітині АФК лежить в основі багатьох патологій та процесу старіння. Термін «активні форми кисню» об'єднує всю різноманітність продуктів метаболізму молекулярного кисню. Попередником більшості АФК є супероксиданіон ($\cdot\text{O}_2^-$), який відіграє роль медіатора в оксидативних ланцюгових реакціях. Дисмутація $\cdot\text{O}_2^-$ (спонтанна або за допомогою ферменту дисмутази) супроводжується утворенням пероксиду водню (H_2O_2), який у свою

чергу може повністю відновитися до води або вступити в реакцію Фентона і за наявності іонів заліза чи міді утворювати реактивні гідроксильні радикали ($\cdot\text{OH}$) [6].

У клітині $\cdot\text{O}_2^-$ може утворюватися ферментативним шляхом внаслідок активності НАДФН-оксидази [7], цитохром-Р450-залежних оксигеназ [8] і ксантинооксидази [9]. Основним неферментативним джерелом вільних радикалів кисню в клітинах є дихальний ланцюг мітохондрій, який містить кілька редокс-центрів (флавін, FeS-кластери тощо), які здатні переносити один електрон до кисню з утворенням $\cdot\text{O}_2^-$. У мітохондріях вільні радикали синтезуються зокрема в комплексі I та III [2]. Вважається, що на продукцію АФК мітохондріями в нормі використовується близько 2 % спожитого кисню, однак ця цифра може значно збільшуватися за патологічних умов [10].

Надмірна кількість АФК в клітині викликає пошкодження таких клітинних структур, як білки, ліпіди, ДНК тощо, окиснюючи їх і змінюючи таким чином їхні фізичні властивості та функції. Поряд з цим сьогодні ні в кого не викликає сумніву постулат про сигнальне значення АФК [11], оскільки їх продукція відбувається в нормі. Так, вони виступають внутрішньо- та міжклітинними медіаторами передачі сигналів [12,13], активуючи тирозинкінази, мітогенактивовані протейнінази. Супероксидний радикал, перекис водню та пероксинітрит, який може утворитися при одночасній інтенсивній генерації супероксид-аніона і оксиду азоту (NO), регулюють транспорт кальцію в мітохондріях і збільшують його накопичення мітохондріями [14] тощо. Крім того, АФК опосередковують активацію певних транскрипційних факторів, зокрема AP-1 і NF- κB , що запускають експресію певних генів [15]. Відомо також, що АФК є одними з медіаторів ішемічного прекодиціювання [16,17]. Однак розбалансування роботи про- та антиоксидантних систем призводить до того що, велика кількість АФК індукує пошкодження клітини і є підґрунтям

численних захворювань, включаючи серцеву недостатність, діабет, неопластичні процеси, хворобу Альцгеймера, Паркінсона тощо. Саме окисний стрес лежить в основі розвитку ішемічної хвороби серця, гіпертензії, атеросклерозу, а також порушень насосної функції серця з віком.

Збільшення продукції АФК супроводжується дисфункцією мітохондрій при старінні. Вважається, що при цьому порушується функція мітохондрій серця інтерфібрилярної популяції (ІФ) [18], які, на відміну від мітохондрій субсарколемальної популяції (СС), локалізовані безпосередньо між міофібрилами скоротливого апарату кардіоміоцитів. З'ясовано, що з віком у щурів знижується чисельність популяції ІФ, знижується швидкість окисного фосфорилування та активність комплексів III і IV, збільшується продукція супероксидного аніона комплексом III, а також знижуються процеси окиснення жирних кислот порівняно з СС мітохондрій. Таким чином, дефекти окисного метаболізму інтерфібрилярних мітохондрій погіршують роботу серця при старінні.

Ішемія міокарда є відомим пошкоджувальним агентом мітохондрій не лише у дорослих, а й у старих тварин. Однак, на відміну від селективного ураження ІФ популяції, при старінні ішемія індукує пошкодження і в мітохондріях СС фракції, а також посилює продукцію АФК в комплексі III мітохондрій і, як наслідок, інтенсифікується вільнорадикальне ушкодження комплексу IV [19]. АФК вважаються причиною інтенсивнішого пошкодження кардіоміоцитів при ішемії старіючого серця, тобто втрати толерантності до ішемії [18,20]. Внаслідок активації перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) змінюються властивості мітохондріальних мембран: порушується їх цілісність, збільшується проникність для іонів кальцію, що призводить до накопичення цих іонів у матриксі мітохондрій і активації неселективних мегаканалів, відомих як мітохондріальні пори (МП). Ця подія може

мати наслідком активацію апоптозу/некрозу. Тому зниження продукції АФК є важливою мішенню запобігання розвитку окисного стресу та дисфункції серцево-судинної системи як при старінні, так і при ішемії міокарда.

Роз'єднувальні білки опосередковують механізми протонного витоку.

З цілої низки роз'єднувальних білків найкраще вивчений UCP1 або білок бурого жиру термогенін, амінокислотна послідовність якого була повністю розшифрована у 1986 р. [21]. Вивільнення тепла, як протонофорна функція термогеніну, запобігає накопиченню енергії у вигляді жирів [22], завдяки чому його фізіологічне значення пов'язують з регуляцією обміну речовин. Перетворення енергії електрохімічного протонного градієнта у тепло, яке відбувається за умов активації UCP1, лежить в основі реакцій адаптивного термогенезу. Особливого значення цей процес набуває у тварин, що впадають у сплячку, оскільки вміст білка UCP1 становить 10 % від усіх білків мітохондріальних мембран [23].

У 1997 р. дві групи дослідників на чолі з Fleury [24] та Gimeno [25] незалежно одна від одної виявили та описали UCP2 – білок з дуже високою гомологією амінокислотної послідовності до UCP1. Важливою характеристикою UCP2 було те, що він має значне тканинне поширення й експресується в нирках, печінці, підшлунковій залозі, в серці [4,26,27] тощо. Згодом у ссавців було виявлено UCP3 в скелетних м'язах [28,29] і у серці [30,31].

На молекулярному рівні функція UCP полягає в транспорті протонів з міжмембранного простору в матрикс мітохондрій. Вважається, що UCP1 може каталізувати протонний витік двома способами: а) безпосередньо через білкову молекулу; б) транспортувати жирні кислоти за допомогою механізму «фліп-флоп» [32–34]. Згідно з загальнопринятою моделлю, UCP виступають посередником, який здійснює трансмембранне перенесення аніонів жирних кислот. Це має принципове

значення для їх роз'єднувальної дії, оскільки аніонні форми жирних кислот затримуються на поверхні розділення мембрана/вода, орієнтуючись карбоксильною групою в бік води, а «жирним» хвостом – в бік ліпідів. Саме тому мембрани погано проникні для аніонів жирних кислот і легко проникні для їх нейтральних (протонованих) форм. На зовнішній ділянці внутрішньої мембрани мітохондрій аніони жирних кислот стають протонованими та повертаються в матрикс у нейтральній формі, переносячи при цьому йони водню. Цей етап супроводжується зменшенням градієнта протонів, роз'єднанням окисного фосфорилування і виділенням тепла [35]. Таким чином, згідно з гіпотезою «циклічного оберту жирних кислот» або «фліп-флопу», жирні кислоти відіграють роль циклічних протонофорів. Іншою важливою характеристикою роз'єднання за допомогою жирних кислот є відсутність спеціального механізму для припинення роз'єднувального ефекту. Роз'єднання припиняється одразу ж, як тільки швидкість надходження жирних кислот в мітохондрію стане меншою за швидкість їх окиснення.

Здатність індукувати протонний витік була продемонстрована для обох гомологів UCP1 [36]. Виявлено, що UCP2 і UCP3 транспортують аніони жирних кислот в нуклеотидчутливих реакціях [33,37]. Однак вони наявні у досить низьких концентраціях (близько 0,1% від усіх білків мітохондріальних мембран) і переносять протони, коли вони активовані [38], тому їхній внесок у термогенез, на відміну від UCP1, функціонування якого відбувається постійно, не буде вагомим. Більше того, значне тканинне поширення UCP2 і UCP3, зокрема наявність їх у серці, вказує на функції, не пов'язані з утворенням тепла [1,34,39]. Одним з найкращих пояснень існування явища протонного витоку є гіпотеза академіка Скулачова [40] про зменшення продукції АФК електронно-транспортним ланцюгом мітохондрій і запобігання таким чином швидкому старінню.

UCP запобігають надмірній продукції АФК. Гіпотеза про те, що UCP2 та UCP3 беруть участь у послабленні продукції вільних радикалів, дискутується, однак знаходить все більше експериментальних підтверджень. Вона базується на тому, що UCP здатні активуватися АФК або продуктами ПОЛ. Так, позитивним регулятором активності UCP є супероксидний аніон [35,41–43], а також продукти ПОЛ, наприклад 4-гідрокси-транс-2-ноненал [41,43], які стимулюють протонний витік. Супероксид вивільняє іони заліза з фермента аконітази, що призводить до каскаду ПОЛ і утворення гідроксиноненалу, який ковалентно зв'язується з UCP, активуючи їх протонну провідність. Таким чином, UCP здійснюють помірне роз'єднання у відповідь на збільшення продукції супероксиду та інших окисдантів, що спричинює зменшення протонрушійної сили і зниження генерації супероксиду за принципом зворотного зв'язку. Такий захист може бути актуальним за умов надмірної продукції АФК при старінні, але ціною тому є незначне посилення дихання, тобто інтенсифікація окиснення речовин і, як результат, збільшення споживання кисню мітохондріями. І дійсно, було виявлено підвищення експресії генів UCP2 і UCP3 в серці старих щурів [44]. Це дає підстави вважати, що UCP залучені в механізм інтенсивнішої протонної провідності мітохондріальних мембран при старінні. На користь цього свідчить загальновідомий факт про підвищення з віком концентрації жирних кислот у плазмі [45] і наявність даних про кореляцію між рівнем UCP2 і UCP3 у серці та вмістом жирних кислот у плазмі [46]. Активація UCP з віком може пояснити зростання кількості спожитого кисню міокардом старих тварин і знижений мембранний потенціал мітохондрій серця [44,47,48].

Участь UCP у запобіганні надмірної продукції АФК доведена експериментами з нокаутними тваринами. Так, вміст вільних радикалів кисню збільшується в мітохондрі-

ях м'язів UCP3^{-/-} [49], первинних міоцитах UCP3^{-/-} [50] і мітохондріях печінки UCP2^{-/-} тварин [51]. У нокаутних за геном UCP3 м'язових мітохондріях [42] та ниркових мітохондріях UCP2^{-/-} мишей [52] відсутня активація протонної провідності UCP супероксидом. З іншого боку, надекспресія UCP2 в ракових клітинах кишечника лінії НСТ116 та клітинах аденокарцином кишечника попереджає утворення АФК, пригнічує апоптоз і збільшує хіміорезистентність цих клітин [53,54], що підтверджує їх участь у синтезі вільних радикалів кисню мітохондріями.

Важливість активації UCP2 для серцево-судинної системи за умов окисного стресу була показана на культурі судинних гладеньком'язових, ендотеліальних клітин і моноцитів [55], де надекспресія UCP2 за допомогою трансфекції аденовірусними векторами запобігала надмірній продукції АФК, активації NF-κB, експресії інтегринів і адгезивних молекул за дії проатеросклеротичних агентів (високі концентрації глюкози, ангіотензин II, ліолева кислота). Крім того, зниження експресії UCP2 і UCP3 у серці мишей при серцевій недостатності, індукованій доксорубіцином, супроводжується інтенсивною генерацією АФК [56], що вказує на участь UCP у регуляції окисного метаболізму кардіоміоцитів.

Активація UCP при ішемії–реперфузії міокарда. При ішемії першими страждають такі киснезалежні елементи клітини, як мітохондрії, тому велике значення під час реперфузії має швидке відновлення продукції енергії цими органелами. Реалізація цього завдання здійснюється через активацію ендогенних механізмів захисту клітини. Існують дані про кардіопротекторні ефекти часткового роз'єднання окисного фосфорилування. Зокрема, було показано, що СССР (карбоніл цианід m-хлорофенілгідразон), FCCP (карбоніл цианід 4-(трифлуорометокси)фенілгідразон), 2,4-динітрофенол – класичні протоннофори, що широко використовуються

в експериментах для роз'єднання окисного фосфорилування, в певних, низьких концентраціях здійснюють протекторні ефекти на кардіоміоцити [57–59]. Важливо, що помірне або так зване „м'яке” роз'єднання полягає в незначному збільшенні протонного витоку, при якому швидкість дихання зростає, однак протонрушійна сила знижується не критично, і синтез АТФ залишається можливим. Це основна відмінність помірного роз'єднання від „повного”, при якому синтез АТФ відсутній, а швидкість дихання максимальна. Саме на цих міркуваннях і базуються уявлення про протекторні властивості UCP [1,4,5,32,60,51]. Велика кількість АФК разом з збільшенням внутрімітохондріального Ca^{2+} створюють умови для відкриття мітохондріальних пор із наступною активацією апоптозу/некрозу [3]. Тому доцільним за цих умов вважається роз'єднання мітохондрій [88].

Відомо, що після нетривалого ішемічного епізоду стимулюється захисна генетична програма, яка включає активацію так званих протекторних генів, а саме білків теплового шоку (від англ. heat shock proteins, HSP 27, 40, 70, 86, 105), факторів росту (фактор росту судин, нейротрофний фактор), інгібітор серинових протеїназ з антиапоптотичним властивостями (інгібітор 1 активатора плазміногену) тощо [61]. Після тривалої коронарооклюзії у серці щурів підвищується експресія ремодельовальних протеїнів (натрійуретичного пептиду, фібронектину, ламініну, фібриліну, колагенів I і III типу) та білків, асоційованих з пошкодженням (білки комплементу, адгезивні протеїни тощо) [62] і, ймовірно, інших ще не з'ясованих генів.

У відповідь на посилену продукцію АФК активуються такі ферменти системи антиоксидантного захисту як супероксиддисмутаза (СОД), каталаза. Було виявлено, що активність СОД, зокрема за умов дії гіпобаричної гіпоксії, збільшується тільки через 6 годин, коли АФК вже активно генеруються, тоді як збільшення мРНК та білка UCP3, відбувається вже через 1–2 год гіпобаричної гіпоксії

[63]. Ці дані вказують на те, що первинною стратегією мітохондрії в боротьбі з окисним стресом є інгібування продукції супероксидного радикала за допомогою активації протонного витоку надекспресією UCP3, в той час як активація СОД та інших ферментів може бути віддаленою подією антиоксидантного захисту.

На моделі ішемії ізольованого за методом Лангендорфа серця щурів нами було виявлено посилення експресії генів UCP2 і UCP3 протягом усієї реперфузії [64]. Ці результати корелюють з даними, отриманими Safari та співавт. [65] про підвищення вмісту білків UCP2 і UCP3 у тканинах ішемізованого серця. Однак у старих тварин ішемія не викликала стимуляцію експресії генів UCP, вихідний рівень яких підвищується порівняно з дорослими тваринами [64]. Застосування блокатора активності UCP геніпіну [66] значно посилювало реперфузійні порушення функції серця старих щурів [67], що нашо вухе на думку про необхідність активації UCP безпосередньо під час реперфузії.

Окремо слід розглянути питання про посилення експресії UCP за умов недостатчі кисню. Було показано, що генетична відсутність UCP3 в первинних міоцитах супроводжується генерацією значно більшої кількості вільних радикалів кисню, індукованих гіпоксією [68]. Це вказує на адаптаційну роль UCP3 у антиоксидантному захисті клітин скелетних м'язів. Виявлено, що киснечутливий транскрипційний фактор ATF-1 (від англ. activating transcriptional factor 1), який фосфорилується при гіпоксії, відіграє роль у індукованій гіпоксією експресії UCP3, доказом чого є зниження індукції UCP3 у відповідь на гіпоксію при генетичному «замовчуванні» ATF-1 [68]. Про один зі споріднених білків до ATF-1 – ATF-3 (від англ. activating transcription factor 3 або liver regeneration factor) – відомо, що він має важливе значення для регуляції росту, контролюючи експресію «пізніх» генів, тих, що беруть участь в синтезі ДНК. ATF-3 пригнічує апоптоз, індукований доксорубі-

цином [69], що є важливим для пом'якшення ішемічного ушкодження і має терапевтичний аспект у лікуванні серцевої недостатності [70]. Можливо, ATF-1 виконує аналогічну антиапоптотичну функцію через активацію експресії UCP3.

Основним механізмом, який опосередковує підвищення експресії UCP при гіпоксії, може виступати пероксид водню, який має здатність посилювати зв'язування транскрипційного фактора NFκB з відповідними ділянками ДНК [71], що посилює експресію UCP2 [72] та, можливо, UCP3 [63]. Було показано, що пероксид водню індукує експресію UCP2 в моноцитах – попередниках макрофагів [73].

Таким чином, фактори, що регулюють експресію генів UCP, дещо різні для UCP2 та UCP3. Спільними регуляторами для обох генів виступають жирні кислоти та стимули гіпоксичного характеру, що, ймовірно, пов'язано з адаптацією клітини до дефіциту кисню та її антиоксидантним захистом.

Якщо гіпоксія індукує експресію UCP, то можна припустити, що в цьому процесі бере участь інший відомий транскрипційний фактор HIF-1α (від англ. hypoxia induced factor), який опосередковує адаптивну відповідь на гіпоксію, впливаючи на транскрипцію численних індукованих гіпоксією генів. Є дані, які заперечують це припущення: стимуляція експресії HIF-1α хлоридом кобальту не призводила до індукції експресії UCP3 [68], незважаючи на те, що ATF-1 взаємодіє з HIF-1α і зв'язується з ним [74]. Однак автори не вивчали, як змінюється експресія ATF-1 під дією хлориду кобальту. Найімовірніше, вона не змінюється, а для збільшення експресії UCP3 потрібне одночасне підвищення як HIF-1α, так і ATF-1, що спостерігається за умов гіпоксії, тому зроблені авторами висновки варто перевірити експериментально.

Важливою є не лише активація UCP на рівні експресії генів, але й як структурно-функціонального компонента мембрани. Вивчення ендогенних адаптивних і кардіопротективних механізмів, які б допомагали серцю витри-

мати потужну пошкоджувальну дію ішемії, є предметом багатьох сучасних досліджень. За умов нестачі кисню в міокарді змінюється динаміка окисно-відновних процесів: на початковій стадії спостерігається універсальна первинна реакція мітохондрій – ефект „м'якого” роз'єднання окисного фосфорилування [75]. Очевидно, що в цей процес окрім інших механізмів задіяні й UCP. Власне, причиною гіршої реакції серця на ішемію – реперфузію на тлі введення геніпіну [67], може бути вимкнення механізму „м'якого” роз'єднання. Стає зрозумілим, що ініціація активності UCP за умов ішемії має протективне значення для функціонування серця. Підтверджують ці висновки результати, отримані Ozcan та співавт. [76], які виявили, що оклюзія лівої коронарної артерії у UCP3^{-/-} мишей супроводжувалась збільшенням зони інфаркту та частоти аритмій удвічі, зниженням вмісту АТФ і збільшенням продукції АФК порівняно з контрольними тваринами. Аналогічні результати було отримано в дослідженні Haines та співавт. [77], де за ішемії мозку у нокаутних за геном UCP2 мишей збільшується зона інфаркту та продукція запальних цитокінів. Таким чином, UCP відіграють роль своєрідних оптимізаторів енергетичного метаболізму і протекторів від пошкоджувальної дії ішемії – реперфузії.

UCP як ефектори ішемічного прекодиціювання. Програма виживання клітини, ініційована ішемічним прекодиціюванням (ІП), запускається короткими епізодами нелетальних ішемії і реалізується в більшості тканин та органів різних видів тварин, а також у людини [78]. Невід'ємною ознакою прекодиційованих тканин є здатність мітохондрій ефективно відновлювати свою АТФ-синтезувальну функцію після тривалої ішемії, а також значне зниження продукції АФК під час реоксигенації порівняно з непрекодиційованими мітохондріями [79].

Регуляторна програма клітини, яка запускає мітохондріальну адаптацію під час пре-

кондиціонування, окрім активації K^+ -АТФ-чутливих каналів, протеїнкіназ, запобігання перевантаження мітохондрій кальцієм, попередження утворення мітохондріальних пор тощо, включає також модуляцію експресії ядерних генів, що в свою чергу впливають на мітохондріальні функції. Показано, що у прекодиційованому серці індукується експресія активатора PPAR γ (PPAR γ co-activator 1 α), який стимулює експресію UCP [80]. Відповідно, UCP можуть бути однією з ланок механізму прекодиціонування. І, дійсно, було показано, що транскрипти генів UCP2 і UCP3, а також вміст білка UCP2 збільшувалися більш ніж удвічі під дією ІП серця *in vivo* [81]. Цей ефект відміннявся попереднім введенням антиоксиданта та антагоніста ІП – 2-меркаптопропіонілгліцину. З'ясувалося, що трьох циклів ішемій (5 хв) і реперфузій (5 хв) – класичної схеми ІП для моделі ізольованого серця – достатньо, щоб ініціювати збільшення експресії генів UCP2 і UCP3 у тканинах серця дорослих шурів [82]. Крім того кардіопротекторний ефект ішемічного прекодиціонування не спостерігається у нокаутних за геном UCP3 мишей [76]. Наразі, лише в кількох дослідженнях показано збільшення експресії генів UCP за умов ішемічного прекодиціонування і зв'язку цієї події з протекцією, а саме було виявлено збільшення вмісту мРНК UCP2 в мозку після ІП [83]. Liu та співав. [84] показали одночасне збільшення експресії гена і білка UCP2 в серцях дослідів з ішемією–реперфузією, ІП і ІП+ішемією–реперфузією. Отримані нами результати про стимуляцію експресії генів UCP2 і UCP3 за умов ІП [82] є практично ідентичними до даних Liu та співав. [84], з тією різницею, що вони стосуються тканин серця, а не мозку. Можливо, цей механізм має місце і в інших тканинах, для яких описано ефективність реалізації протекторної дії ішемічного прекодиціонування.

На важливість активації UCP під час аноксії вказує той факт, що виживання клітин у культурі H9c2 повністю нівелювалося при

заглушенні експресії гена UCP2 і частково UCP3 за допомогою інтерферуючих РНК, що було асоційоване зі збільшенням продукції АФК при реоксигенації. Ці дані підтверджуються й іншими дослідженнями, що свідчать на користь участі UCP у реалізації зокрема нейропротекторної дії ІП [84,85]. Більше того, з посиленням експресії білка UCP2 *in vivo* пов'язують не тільки нейропротекторний ефект ІП, але й захисний вплив греліну – ендогенного пептиду, який має антиапоптотичні властивості [84].

Про безпосередню участь UCP у механізмах ІП повідомляють Nadochiy та співав. [86]. Дослідження протонної провідності мітохондріальних мембран показали, що при реалізації кардіопротекторної дії ІП на моделі ізольованого серця двократно збільшується протонний витік, а ішемія – реперфузія підвищувала цей показник у чотири рази [87]. При цьому за умов ІП протонний витік повністю блокувався гуанідиндифосфатом (інгібітором UCP), а за умов ішемії – реперфузії – карбоксиатрактилозидом (інгібітором аденіннуклеотидтранслокази), циклоспорином А або сангліфегрином (класичними інгібіторами мітохондріальних пор).

Таким чином, дані літератури доводять важливу роль UCP в кардіопротекторних ефектах ІП і вказують на те, що ці білки можуть бути одними з кінцевих ефektorів програми виживання клітини та адаптації до ішемії.

Отже, UCP – одна з ланок ендогенних механізмів адаптації міокарда до ішемії, що активуються в клітині для запобігання руйнівних наслідків окисного стресу. Помірне роз'єднання окисного фосфорилування, що опосередковується UCP, може знизити продукцію АФК дихальним ланцюгом, забезпечити швидке відновлення енергопродукуючої функції мітохондрій уже в ранній постішемічний період і значно збільшити відсоток кардіоміоцитів, що вижили, і, відповідно, сприяти швидкому відновленню функції міокарда. При цьому показано захисну роль

UCP в умовах окисного стресу, зокрема в експериментах з використанням нокаутних тварин. Про належність UCP до протекторної програми клітини свідчить їх участь у реалізації ефектів ішемічного прекодиціювання. Однак наявність у серці двох ізоформ UCP вказує на певну дивергентність їх функціонального навантаження, що потребує подальших досліджень в галузі регуляції дихання мітохондрій, жирового обміну і кальцієвого гомеостазу клітини.

Ю.В. Гошовская

УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ РОЗОБЩАЮЩИХ БЕЛКОВ (UCP) В МЕХАНИЗМАХ ЗАЩИТЫ МИОКАРДА ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕСА

Разобщающие белки (от англ. uncoupling proteins, UCP), содержащиеся во внутренней мембране митохондрий и являющиеся конкурентами АТФ-синтазы для протонов, привлекают к себе внимание не только в связи с процессом термогенеза в тканях бурого жира. Выявление гомологов UCP в митохондриях кардиомиоцитов и демонстрация их протонпроводящих свойств позволяют говорить о регуляторном значении этих белков для мембранного потенциала и, соответственно, для синтеза АТФ. Однако, содержание UCP в кардиомиоцитах на два порядка меньше, чем в буром жире. Поэтому так называемое «мягкое» разобщение окислительного фосфорилирования, что наблюдается при активации сердечных изоформ UCP, может предотвращать чрезмерную продукцию активных форм кислорода в митохондриях. В обзоре приведены собственные и литературные данные, подтверждающие защитную роль активации UCP в предупреждении избыточной продукции активных форм кислорода в условиях окислительного стресса при ишемии миокарда. Обсуждается участие UCP в эндогенных механизмах кардиопротекции, вызываемых ишемическим прекодицированием.

Ключевые слова: разобщающие белки; окислительный стресс; миокард; ишемия; митохондрий; прекодицирование.

Iu.V. Hoshovs'ka

THE ROLE OF UNCOUPLING PROTEINS IN MECHANISMS OF PROTECTION FROM OXIDATIVE STRESS

Uncoupling proteins, UCPs, are located in the inner mitochondrial membrane and catalyze proton leak across the inner mitochondrial membrane. While UCP1 from brown adipose tissue (BAT) dissipates energy of proton gradient

as heat mediating process of thermogenesis, the function of cardiac isoforms of UCPs is still debated. Since the content of UCPs in heart tissue is much lesser than in BAT mild uncoupling of respiratory chain by UCPs might regulate membrane potential of cardiac mitochondria, preventing excessive production of reactive oxygen species. The review is focused on own and literature evidences suggesting the protective role of UCPs activation from oxidative stress under ischemia-reperfusion conditions and aging. Participation of UCPs in endogenous mechanisms of cardioprotection induced by ischemic preconditioning is discussed.

Key words: uncoupling proteins; oxidative stress; ischemia; mitochondria; preconditioning

REFERENCES

1. Echtay K. Mitochondrial uncoupling proteins – What is their physiological role? *Free Rad Biol Med.* 2007;43:1351–71.
2. Chen Y-R, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res.* 2014;114(3):524–37.
3. Halestrap A. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(2):232–7.
4. McLeod CJ, Aziz A, Hoyt RF, McCoy JP, Sack MN. Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J Biol Chem.* 2005;280(39):33470–6.
5. Mehta SL, Li PA. Neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cerebral stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(6):1069–78.
6. Thomas C, Mackey MM, Diaz AA, Cox DP. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep.* 2009;14(3):102–8.
7. Arora S, Vaishya R, Dabla P, Singh B. NAD (P) H oxidases in coronary artery disease. *Adv Clin Chem.* 2010;50:65–86.
8. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Do Yoo Y. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells.* 2011;32(6):491–509.
9. Robert A, Robert L. Xanthine oxidoreductase, free radicals and cardiovascular disease. *Crit Rev Pathol Oncol Res* 2014 20 1 1. 2013;10.
10. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(2):335–44.
11. Mikhailov V, Mazurik V, Burlakova E. [Signal function of the reactive oxygen species in regulatory networks of the cell reaction to damaging effects: contribution of radiosensitivity and genome instability]. *Radiatsionnaia Biol Radioecol Akad Nauk.* 2002;43(1):5–18.
12. Das D, Maulik N. Conversion of death signal into survival signal by redox signaling. *Biochem Mosc.* 2004;69(1):10–7.
13. Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: The emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res.* 2006;99(9):924–32.

14. Guidarelli A, Sciorati C, Clementi E, Cantoni O. Peroxynitrite mobilizes calcium ions from ryanodine-sensitive stores, a process associated with the mitochondrial accumulation of the cation and the enforced formation of species mediating cleavage of genomic DNA. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(1):154–64.
15. Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem.* 1996;271(23):13422–9.
16. Petrishchev N, Shliakhto E, Tsyrlin V, Vlasov T, Syrenskii A, Galagudza M. [The role of oxygen free radicals in the mechanisms of local and distant ischemic myocardial preconditioning]. *Vestn Ross Akad Meditsinskikh Nauk Akad Meditsinskikh Nauk.* 2005;(8):10–5.
17. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1998 Jul 17;273(29):18092–8.
18. Lesnfsky EJ, Hoppel CL. Ischemia–reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 2003;420(2):287–97.
19. Lesnfsky EJ, Gudz TI, Migita CT, Ikeda-Saito M, Hassan MO, Turkaly PJ, et al. Ischemic injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: damage to the iron–sulfur protein subunit of electron transport complex III. *Arch Biochem Biophys.* 2001;385(1):117–28.
20. Lesnfsky EJ, Gallo DS, Ye J, Whittingham TS, Lust WD. Aging increases ischemia-reperfusion injury in the isolated, buffer-perfused heart. *J Lab Clin Med.* 1994;124(6):843–51.
21. Bouillaud F, Weissenbach J, Ricquier D. Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein. *J Biol Chem.* 1986;261(4):1487–90.
22. Krauss S, Zhang C-Y, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(3):248–61.
23. Cannon B, Shabalina IG, Kramarova TV, Petrovic N, Nedergaard J. Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species—or not? *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg.* 2006;1757(5):449–58.
24. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyreus C, et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 1997;15(3):269–72.
25. Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, et al. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes.* 1997;46(5):900–6.
26. Murray AJ, Anderson RE, Watson GC, Radda GK, Clarke K. Uncoupling proteins in human heart. *The Lancet.* 2004;364(9447):1786–8.
27. Roshon MJ, Kline JA, Thornton LR, Watts JA. Cardiac UCP2 expression and myocardial oxidative metabolism during acute septic shock in the rat. *Shock Augusta Ga.* 2003 Jun;19(6):570–6.
28. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, et al. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 1997;408(1):39–42.
29. Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jun 9;235(1).
30. Hidaka S, Kakuma T, Yoshimatsu H, Sakino H, Fukuchi S, Sakata T. Streptozotocin treatment upregulates uncoupling protein 3 expression in the rat heart. *Diabetes.* 1999;48(2):430–5.
31. Ježek P, Žáčková M, Řeháková Z, Růžicka M, Borecký J, Škobisová E, et al. Existence of uncoupling protein-2 antigen in isolated mitochondria from various tissues. *FEBS Lett.* 1999;455(1):79–82.
32. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277–359.
33. Schrauwen P, Hoeks J, Schaart G, Kornips E, Binas B, Van De Vusse GJ, et al. Uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2003 Dec;17(15):2272–4.
34. Stuart JA, Brindle KM, Harper JA, Brand MD. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *J Bioenerg Biomembr.* 1999;31(5):517–24.
35. Lombardi A, Grasso P, Moreno M, de Lange P, Silvestri E, Lanni A, et al. Interrelated influence of superoxides and free fatty acids over mitochondrial uncoupling in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg.* 2008;1777(7):826–33.
36. Jabůrek M, Vařecha M, Gimeno RE, Dembski M, Ježek P, Zhang M, et al. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem.* 1999;274(37):26003–7.
37. Himms-Hagen J, Harper M-E. Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med.* 2001;226(2):78–84.
38. Esteves TC, Brand MD. The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg.* 2005;1709(1):35–44.
39. Simonyan RA, Skulachev VP. Thermoregulatory uncoupling in heart muscle mitochondria: involvement of the ATP/ADP antiporter and uncoupling protein. *FEBS Lett.* 1998;436(1):81–4.
40. Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Feb 25;1363(2):100–24.
41. Brand MD, Buckingham JA, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, et al. Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. London; Portland on behalf of The Biochemical Society; 1999; 2004. p. 203–14.
42. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, et al. Superoxide activates mitochondrial

- uncoupling proteins. *Nature*. 2002;415(6867):96–9.
43. Murphy MP, Echtay KS, Blaikie FH, Asin-Cayuela J, Cochemé HM, Green K, et al. Superoxide Activates Uncoupling Proteins by Generating Carbon-centered Radicals and Initiating Lipid Peroxidation Studies Using A Mitochondria-Targeted Spin Trap Derived From A-Phenyl-N-Tert-Butylnitron. *J Biol Chem*. 2003;278(49):48534–45.
 44. Hoshovs'ka IV, Lisovyi OO, Shymans'ka TV, Sahach VF. [UCP2 and UCP3 gene expression, heart function and oxygen cost of myocardial work changes during aging and ischemia-reperfusion]. *Fiziolohichniy Zhurnal Kiev Ukr* 1994. 2009;55(3).
 45. Tereshin EV. [A role of fatty acids in the development of oxidative stress in aging. A hypothesis]. *Adv Gerontol Uspekhi Gerontol Ross Akad Nauk Gerontol Obschestvo*. 2007;20(1).
 46. Murray AJ, Cole MA, Lygate CA, Carr CA, Stuckey DJ, Little SE, et al. Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44(4):694–700.
 47. Rolfe DF, Hulbert AJ, Brand MD. Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Dec 30;1188(3):405–16.
 48. Serviddio G, Bellanti F, Romano AD, Tamborra R, Rollo T, Altomare E, et al. Bioenergetics in aging: mitochondrial proton leak in aging rat liver, kidney and heart. *Redox Rep Commun Free Radic Res*. 2007;12(1):91–5.
 49. Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem*. 2000 May 26;275(21):16258–66.
 50. Lu Z, Sack MN. ATF-1 is a hypoxia-responsive transcriptional activator of skeletal muscle mitochondrial-uncoupling protein 3. *J Biol Chem*. 2008;283(34):23410–8.
 51. Horimoto M, Fülöp P, Derdák Z, Wands JR, Baffy G. Uncoupling protein - 2 deficiency promotes oxidant stress and delays liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2004;39(2):386–92.
 52. Krauss S, Zhang C-Y, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST, et al. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic β cell dysfunction. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1831–42.
 53. Derdak Z, Mark NM, Beldi G, Robson SC, Wands JR, Baffy G. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68(8):2813–9.
 54. Horimoto M, Resnick MB, Konkin TA, Routhier J, Wands JR, Baffy G. Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(18):6203–7.
 55. Kim H-S, Park K-G, Koo TB, Huh S, Lee I-K. The modulating effects of the overexpression of uncoupling protein 2 on the formation of reactive oxygen species in vascular cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(3):S46–S48.
 56. Bugger H, Guzman C, Zechner C, Palmeri M, Russell KS, Russell III RR. Uncoupling protein downregulation in doxorubicin-induced heart failure improves mitochondrial coupling but increases reactive oxygen species generation. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67(6):1381–8.
 57. Brennan JP, Berry RG, Baghai M, Duchon MR, Shattock MJ. FCCP is cardioprotective at concentrations that cause mitochondrial oxidation without detectable depolarisation. *Cardiovasc Res*. 2006;72(2):322–30.
 58. Ganote CE, Armstrong SC. Effects of CCCP-induced mitochondrial uncoupling and cyclosporin A on cell volume, cell injury and preconditioning protection of isolated rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35(7):749–59.
 59. Sedlic F, Sepac A, Pravdic D, Camara AK, Bienengraeber M, Brzezinska AK, et al. Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca²⁺. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2010;299(2):C506–C515.
 60. Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*. 2005;2(2):85–93.
 61. Simkhovich BZ, Marjoram P, Poizat C, Kedes L, Kloner RA. Brief episode of ischemia activates protective genetic program in rat heart: a gene chip study. *Cardiovasc Res*. 2003 Aug 1;59(2):450–9.
 62. Stanton LW, Garrard LJ, Damm D, Garrick BL, Lam A, Kapoun AM, et al. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ Res*. 2000 May 12;86(9):939–45.
 63. Bo H, Wang Y, Li H, Zhao J, Zhang H, Tong C. Endurance training attenuates the bioenergetics alterations of rat skeletal muscle mitochondria submitted to acute hypoxia: role of ROS and UCP3. *Sheng Li Xue Bao Acta Physiol Sin*. 2008;60(6):767–76.
 64. Hoshovs'ka IV, Lisovyi OO, Shymans'ka TV, Sahach VF. [UCP2 and UCP3 gene expression, heart function and oxygen cost of myocardial work changes during aging and ischemia-reperfusion]. *Fiziolohichniy Zhurnal Kiev Ukr* 1994. 2009;55(3).
 65. Safari F, Anvari Z, Moshtaghioun S, Javan M, Bayat G, Forosh SS, et al. Differential expression of cardiac uncoupling proteins 2 and 3 in response to myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Life Sci*. 2014;98(2):68–74.
 66. Zhang C-Y, Parton LE, Ye CP, Krauss S, Shen R, Lin C-T, et al. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity-and high glucose-induced β cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metab*. 2006;3(6):417–27.
 67. Hoshovs'ka IV, Shymans'ka TV, Sahach VF. [Effect of UCP2 activity inhibitor genipin on heart function of aging rats]. *Fiziolohichniy Zhurnal Kiev Ukr* 1994. 2009;55(5).
 68. Lu Z, Sack MN. ATF-1 is a hypoxia-responsive transcriptional activator of skeletal muscle mitochondrial-uncoupling protein 3. *J Biol Chem*. 2008;283(34):23410–8.
 69. Nobori K, Ito H, Tamamori-Adachi M, Adachi S, Ono Y, Kawachi J, et al. ATF3 inhibits doxorubicin-induced apoptosis in cardiac myocytes: a novel cardioprotective role of ATF3. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(10):1387–97.

70. Nordlie MA, Wold LE, Simkhovich BZ, Sesti C, Kloner RA. Molecular aspects of ischemic heart disease: ischemia/reperfusion-induced genetic changes and potential applications of gene and RNA interference therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2006;11(1):17–30.
71. Zhang C, Xie Y, Chen P, Hong X, Xiao Z, Ma Y, et al. [Nuclear factor kappa B signal transduction in macrophages during hypoxia: reactive oxygen species generation]. *Sheng Li Xue Bao Acta Physiol Sin.* 2004;56(4):515–20.
72. Cortez-Pinto H, Lin HZ, Yang SQ, da Costa SO, Diehl AM. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology.* 1999;116(5):1184–93.
73. Kim H-S, Park K-G, Koo TB, Huh S, Lee I-K. The modulating effects of the overexpression of uncoupling protein 2 on the formation of reactive oxygen species in vascular cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77(3):S46–S48.
74. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol.* 1998;18(7):4089–96.
75. Takeo S, Nasa Y. Role of energy metabolism in the preconditioned heart—a possible contribution of mitochondria. *Cardiovasc Res.* 1999;43(1):32–43.
76. Ozcan C, Palmeri M, Horvath TL, Russell KS, Russell III RR. Role of uncoupling protein 3 in ischemia-reperfusion injury, arrhythmias, and preconditioning. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2013;304(9):H1192–H1200.
77. Haines BA, Mehta SL, Pratt SM, Warden CH, Li PA. Deletion of mitochondrial uncoupling protein-2 increases ischemic brain damage after transient focal ischemia by altering gene expression patterns and enhancing inflammatory cytokines. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(11):1825–33.
78. Yellon D, Alkhulaifi A, Pugsley W. Preconditioning the human myocardium. *The Lancet.* 1993;342(8866):276–7.
79. Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, et al. STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc Res.* 2005;65(2):428–35.
80. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem.* 2003 Jul 18;278(29):26597–603.
81. McLeod CJ, Aziz A, Hoyt RF, McCoy JP, Sack MN. Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J Biol Chem.* 2005;280(39):33470–6.
82. Hoshovs'ka IV, Shymans'ka TV, Sahach VF. [Genipin--uncoupling protein inhibitor--reduces the protective effect of ischemic preconditioning]. *Fiziolohichnyi Zhurnal Kiev Ukr.* 1994. 2011;57(6).
83. Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, et al. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med.* 2003;9(8):1062–8.
84. Liu Y, Chen L, Xu X, Vicaut E, Sercombe R. Both ischemic preconditioning and ghrelin administration protect hippocampus from ischemia/reperfusion and upregulate uncoupling protein-2. *BMC Physiol.* 2009;9(1):17.
85. Mehta SL, Li PA. Neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cerebral stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(6):1069–78.
86. Nadochiy S, Tompkins A, Brookes P. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection. *Biochem J.* 2006;395:611–8.
87. Nadochiy S, Tompkins A, Brookes P. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection. *Biochem J.* 2006;395:611–8.
88. Criscuolo F, Mozo J, Hurtaud C, Nübel T, Bouillaud F. UCP2, UCP3, avUCP, what do they do when proton transport is not stimulated? Possible relevance to pyruvate and glutamine metabolism. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg.* 2006;1757(9):1284–91.

Матеріал надійшов до редакції 04.06.2014

Л.А.Могильницька

Ендотеліальний моноцитаактивуєчий поліпептид-II: властивості, функції та патогенетичне значення

Хмельницька обласна лікарня, E-mail: mogylnytska@mail.ua

Ендотеліальний моноцитаактивуєчий поліпептид-II (EMAP-II) – це мультифункціональний поліпептид з прозапальною та антиангіогенезною активністю. EMAP-II викликає прокоагулянтні зміни на поверхні ендотеліальних клітин, посилює експресію E-, P-селектину та туморнекротичного фактора α , впливає на міграцію моноцитів і нейтрофілів, а також індукує апоптоз в ендотеліальних клітинах. У цьому огляді представлені історія відкриття, структурні модулі, функціональні домени, біологічні властивості та функції цього поліпептиду. Описані механізми прозапальної дії та впливу на ендотеліальні клітини, протипухлинні властивості, патогенетичне значення при захворюваннях ЦНС, участь у розвитку легень під час ембріогенезу та патогенетичне значення при захворюваннях легень, у розвитку серцево-судинних уражень.

Ключові слова: ендотеліальний моноцитаактивуєчий поліпептид-II; ендотеліальна дисфункція.

Ендотеліальний моноцитаактивуєчий поліпептид-II (EMAP-II) був виділений у 1992 р. як пухлинний медіатор, що здатен опосередковано, через туморнекротичний фактор (TNF- α), посилювати вплив тканинного фактора (TF) на ендотеліальні клітини, модулювати коагуляцію, хемотаксис моноцитів і гранулоцитів, викликати запалення в місці ін'єкції [1].

Структурні модулі та функціональні домени. Попередник цього поліпептиду – проEMAP [2]. Ген EMAP-II людини знаходиться на хромосомі 4q24 і охоплює близько 31,2 кб.

У 1997 р. виявлено, що p43 – це додатковий компонент мультиферментного комплексу РНК-синтаз, гомологічний попереднику EMAP-II – проEMAP [3]. На основі цього відкриття попередник EMAP-II був названий проEMAP/p43. Те, що p43 та проEMAP фактично є одним і тим самим протеїном, дало змогу пояснити яким чином EMAP-II поєднує властивості цитокіну та здатність впливати на трансляцію білка. Структурний

аналіз встановив, що проEMAP/p43 займає центральну позицію в структурі мультиферментного комплексу РНК-синтаз [4]. Тирозил-тРНК-синтаза людини (HsTyrRS) складається з двох структурних модулів: каталітичний N-кінцевий модуль відповідає за індукцію міграції моноцитів та лейкоцитів, запальну відповідь і зв'язування з білками, що виділяють моноцити, та EMAP-II-подібний C-кінцевий домен [5]. Відсутність активності цитокінового компонента в HsTyrRS пояснюється взаємодією N- та C-модулів, які формують водневі зв'язки [6]. Етіологія конкретних захворювань (рак, нейрональна й аутоімунна патологія, метаболічні порушення) пов'язана з конкретними аміноацил-тРНК-синтазами. Використання моноклональних антитіл, специфічних для каталітичного N-кінцевого модуля і EMAP-II-подібного C-кінцевого домену HsTyrRS, може бути корисним інструментом у вивченні різних аспектів функції і клітинної локалізації HsTyrRS [7].

EMAP-II-подібний C-кінцевий фрагмент

аміноацил-тРНК-синтази, який має властивості прозапального цитокіну не здатен зв'язуватися з CD23 і активувати ERK1/2 на відміну від аміноацил-т-РНК-синтаза взаємодіючого мультифункціонального протеїну 1 (AIMP1/p43). Тому виявлення CD23 не тільки пояснює запальну функцію AIMP1/p43, але й дає змогу відрізнити механізм дії AIMP1/43 від його С-кінцевого домену ЕМАР-II [8]. ПроЕМАР/p43 експресується практично в усіх тканинах і може розглядатися як маркер для синтезу білка [9]. Рівень експресії проЕМАР/p43 підвищується в ділянках апоптозу та ремоделювання тканин.

Описані домени в структурі ЕМАР-II: ділянка, що впливає на проліферацію фібробластів відповідає 6-46 амінокислоті, а зона, що регулює апоптоз ендотеліальних клітин – 101-114 амінокислоті [3, 10]. Широкий регіон протеїну впливає на міграцію ендотеліальних клітин (114-192 амінокислоти). ЕМАР-II також містить два осередки, що зв'язують гепарин, які розташовані в готовому протеїні (217-268 амінокислоти). Ці осередки, як було продемонстровано в дослідженнях, і зумовлюють антиангіогенезну активність ЕМАР-II в кислому середовищі [11].

Вплив на ендотеліальні клітини. В ендотеліальних клітинах під прямим впливом ЕМАР-II підвищується вміст кальцію за рахунок перерозподілу з внутрішньоклітинних депо. Паралельно з цим посилюються виділення антигена фактора Вілебранта та експресія Р-селектину на поверхні клітин [12]. Таким чином, ЕМАР-II може швидко активувати ендотеліальні клітини, сприяючи адгезії лейкоцитів через посилення експресії Р-селектину.

Залежно від дози, рекомбінантний ЕМАР-II активує тканинний фактор в ендотеліальних клітинах. Такі стимулятори тканинного фактора, як інтерлейкін-1, TNF- α , ліпополісахарид також викликають адгезію лейкоцитів

через експресію молекули Е-селектину [13]. Посилення експресії антигенів Е-селектину в ендотеліальних клітинах було продемонстровано і під прямим впливом ЕМАР-II. Результати цих досліджень показують два механізми, що пересікаються, через які ЕМАР-II потенційно модулює адгезію лейкоцитів та ендотеліальних клітин: швидка транслокація Р-селектину на поверхні клітини з наступною індукцією Е-селектину.

Механізми прозапальної дії. Інкубація лейкоцитів з рекомбінантною ЕМАР-II викликає їх міграцію шляхом хемотаксису, тобто руху під впливом градієнта концентрації. При взаємодії ЕМАР-II з периферичною кров'ю людини, збагаченою моноцитами, виділяються антигени TNF- α та інтерлейкіну-8 через посилення транскрипції [14]. Ці дослідження *in vitro* підтверджуються прозапальним впливом ін'єкцій ЕМАР-II *in vivo* [1]. Вплив на моноцити та ендотеліальні клітини було проаналізовано більш детально для виявлення всіх молекулярних чинників цього процесу.

Як вже згадувалось раніше, ЕМАР-II може викликати хемотаксис лейкоцитів та макрофагів. У ділянках апоптозу в нирках, що виникли внаслідок ішемії, разом із запальною лейкоцитарною інфільтрацією спостерігався високий рівень експресії ЕМАР-II. З пригніченням апоптозу, інтенсивність запалення також зменшується [15]. В іншому дослідженні показано, що при первинній увеальній меланомі акумуляція макрофагів спостерігається в ділянках високої експресії ЕМАР-II [16].

Також продемонстровано, що ЕМАР-II, який синтезується в солідних пухлинах, що ростуть, викликає апоптоз лімфоцитів, тим самим проявляє імуносупресивну дію [17].

Прозапальна дія проЕМАР/p43 здійснюється через вплив на TNF- α [10]. В основі впливу ЕМАР-II на чутливість до TNF- α лежить регуляція експресії м-РНК рецептора 1 R-1 TNF- α [18].

Противухлинні властивості. Підсилення терапевтичного ефекту TNF- α за допомогою ЕМАР-II дало змогу розширити можливості протипухлинного лікування [19]. Внутрішньопухлинні ін'єкції ЕМАР-II при фібросаркомі (Meth A) у мишей викликають тромбогеморагічні зміни, що зумовлені TNF- α , а при карциномі молочної залози (МС-2) – підвищують чутливість до системного лікування TNF- α [13]. Такі самі явища спостерігаються і при меланомі (В16) у мишей, і при фібросаркомі (HT-1080) у людей [20]. За умов підвищеної експресії проЕМАР/p43 та ЕМАР-II стійка до TNF- α людська меланома (Pmel), ставала чутливою до його системних ін'єкцій [21]. Високі дози ЕМАР-II можуть сенсibiliзувати судинну сітку пухлини до руйнівного впливу високих доз TNF- α [22]. TNF- α використовується у пацієнтів з саркомою та меланою [23]. В недавніх дослідженнях встановлена кореляція між чутливістю до ізольованих локальних інфузій TNF- α та експресією ЕМАР-II [24].

В інших дослідженнях не було кореляції між експресією м-РНК ЕМАР-II та результатом лікування TNF- α та хіміотерапії пацієнтів з гліомами. Хоча у пацієнтів з високим рівнем експресії ЕМАР-II спостерігалось більш повільне прогресування пухлини та довша тривалість життя [25]. ЕМАР-II здатний впливати на ріст первинних і метастатичних карцином молочної залози у мишей [5] та гліом у щурів [26]. ЕМАР-II є ефективним протираковим засобом у терапії гліобластоми, що може викликати пряме пригнічення росту гліобластомних стовбурових клітинах через дефект аутофагії [27].

Комбінована терапія ЕМАР-II та флутамідом пригнічує ріст андрогензалежного раку простати на 85% і більш ефективна порівняно з монотерапією [28-30]. ЕМАР-II здатний підсилити комбіноване лікування аденокарциноми панкреатичних протоків [31, 32]. Антиметастатичний вплив кісептину може бути опосередкований його дією на експресію ЕМАР-II в тканинах раку

товстої кишки [33]. ЕМАР-II-індуковане посилення проникності бар'єра кров/пухлина та ослаблення щільності зв'язків між ендотеліальними клітинами головного мозку пов'язане зі зв'язуванням α -АТФ-синтази, активацією протеїнкінази С та кавеолін опосередкованими механізмами [34-36]. Вміст ЕМАР-II достовірно вищий у хворих з немілоклітинним раком легень, що потенційно матиме прогностичне значення [37].

ЕМАР-II сприяє підвищенню чутливості ендотеліальних клітин до апоптозу шляхом полегшення сприйняття сигналу через R-1 TNF- α та мобілізацію R-1 TNF- α асоційованого домену [38]. Вважають, що протипухлинна дія ЕМАР-II зумовлена впливом на ангиогенез та здатністю викликати апоптоз ендотеліальних клітин, що ростуть [18]. Антиангиогенезні властивості ЕМАР-II вивчались в численних дослідженнях. При карциномах молочної залози попереднє застосування ЕМАР-II підвищувало чутливість до фотодинамічної терапії, що пов'язано з пригніченням експресії васкуло-ендотеліального фактора росту (VEGF) [39]. Інгібування VEGF-сигналіngu є одним з можливих антиангиогенезних механізмів ЕМАР-II, що може пояснити *in vivo* його протипухлинну активність та окреслити терапевтичні стратегії для підвищення анти-VEGF-терапії для пригнічення росту пухлини [40].

Досліджували інший молекулярний механізм антиангиогенезного впливу ЕМАР-II на ендотеліальні клітини. Показано, що ЕМАР-II зв'язується з α -5- β -1-рецептором інтегрину. Під дією гіпоксії в результаті цієї взаємодії посилюється деградація індукованого гіпоксією фактора 1- α (HIF-1), який опосередковує проростання ендотеліальних клітин. В свою чергу, HIF-1 відіграє важливу роль в ангиогенезі через активацію численних факторів росту. Таким чином, антиангиогенезна активність ЕМАР-II зумовлена здатністю пригнічувати HIF-1 [41].

Антиангиогенезні властивості описані також і для проЕМАР/p43. Вони двофазні

та додозалежні: низькі концентрації мають проангіогенезні якості, тоді як високі концентрації – антиангіогенезні [42]. Це властиво і для інших цитокінів, таких як TNF- α [43].

Патогенетичне значення при захворюваннях ЦНС. Поряд з протипухлинними властивостями ЕМАР-II, повідомляють про його участь у багатьох захворюваннях та ураженнях головного мозку. Найбільш специфічною є взаємодія ЕМАР-II з макрофагами при багатьох аутоімунних запальних захворюваннях, ушкодженнях спінальної хорди, гіпокампа, вірусних та травматичних ушкодженнях нервової системи [44]. На основі цих спостережень було зроблено висновок, що ЕМАР-II – маркер мікрогліальних клітин при даній патології [45]. ЕМАР-II асоціюється з активацією мікроглія/макрофаги при враженні ЦНС та може запускати каскад запалення та вторинного пошкодження мозку [46].

Дослідження вказують на значне підвищення вмісту р43/про-ЕМАР-II в тканинах головного мозку, спинно-мозковій рідині та плазмі при гострій черепно-мозковій травмі та зниження при ішемічному ураженні в результаті оклюзії середньо-мозкової артерії в порівнянні з контрольними зразками, що може мати значення в диференціальній діагностиці та лікуванні різних захворювань головного мозку [46]. Вивчали також ранню просторово-часову експресію ЕМАР-II при ушкодженні головного мозку типу ішемія-реперфузія. Накопичення ЕМАР-II-позитивних клітин спостерігалось вже в першу добу після реперфузії та постійно збільшувалося в зоні ураження та сусідніх ділянках. Таким чином, значне внутрішньоклітинне накопичення ЕМАР-II в ділянках ішемічного ушкодження головного мозку може сприяти патофізіологічним наслідкам церебральної ішемії [47].

Участь у розвитку легень під час ембріогенезу та патогенетичне значення при

захворюваннях легень. Виявлено також, що проЕМАР/p43 та ЕМАР-II бере участь у розвитку легень. Ця пов'язано зі впливом ЕМАР-II на неоваскуляризацію під час ембріогенезу [48]. Його експресія підвищується при експериментальному гострому запаленні легень, що викликане ліпополісахаридом, а інтратрахеальна інсталяція ЕМАР-II призводить до міграції моноцитів, лейкоцитів і макрофагів без стимуляції експресії інтерлейкіну-1 β та моноцит-активуючого протеїну-2 [49]. Надмірна експресія ЕМАР-II в легенях спричиняє спрощення альвеолярних структур, апоптоз альвеолярних клітин, накопичення макрофагів. Крім того, вміст ЕМАР-II значно підвищений при емфіземі, що індукована тютюновим димом, а нейтралізація ЕМАР-II антитілами призводить до зменшення запалення, апоптозу альвеолярних клітин, структурних змін в альвеолах, нижніх дихальних шляхах, покращення функції легень. Механізми, що лежать в основі, пов'язані з каспазою-3 [50, 51]. Ці результати можуть мати клінічне значення, оскільки вміст ЕМАР-II підвищений як у екс-курців, так і у хворих з хронічними неспецифічними захворюваннями легень, які можуть бути мішенню для терапії нейтралізуючими антитілами. Інше дослідження вказує на можливу роль ЕМАР-II у розвитку альвеолярної дисплазії, блокуючи диференціацію альвеолярних клітин типу I в тип II, через посилення клітинного апоптозу та пригнічення експресії маркерів альвеолярних клітин типу I [14, 52]. ВІЛ-інфекція призводить до втрати ендотеліальних клітин, що сприяє формуванню легеневої емфіземи, незалежно, але синергістично з курінням через вплив ЕМАР-II на апоптоз альвеолярних клітин [53]. Саме по собі тютюнопаління здатне активувати прозапальний ЕМАР-II, IP-10 та CXCR3, провокувати каскад клітинних смертей, що викликає пошкодження альвеолярної тканини та розвиток емфіземи [51].

Антиангіогенезні властивості ЕМАР-II також проявляються при стромальному

кератиті. Через антиангіогенезну активність, а саме здатність викликати апоптоз ендотеліальних клітин, пригнічувати запальний процес та інфікування ЕМАР-II призводить до зменшення проявів кератиту [54].

Участь у розвитку інших захворювань. Дослідження вказують на підвищення вмісту ЕМАР-II та експресії м-РНК у сироватці крові пацієнтів після пересадки рогівки, що може свідчити про можливий вплив ЕМАР-II на апоптоз ендотеліальних клітин рогівки та її відторгнення після трансплантації [55]. Цей пептид відіграє важливу роль у дисфункції ендотеліальних клітин, що розвивається при реакції трансплантат проти хазяїна після аlogenної трансплантації стовбурових клітин [56].

Слід зазначити, що вміст ЕМАР-II та проЕМАР/p43 підвищується під час вагітності, хоча це не пов'язано з ендотеліальною активацією під час прееклампсії [57]. Після вагітності та під час менструального циклу спостерігалось періодичне підвищення експресії ЕМАР-II, при цьому простагландин E2 пригнічує експресію гена, що кодує білок проЕМАР/p43 [58].

Вміст ЕМАР-II значно знижений при дифузному та розповсюдженому перитоніті [59]. Його експресія посилена *in vivo* при стоматологічному періодонтиті, викликає міграцію лейкоцитів і моноцитів, а також посилює експресію таких молекул, як колоній-стимулювальний фактор-1 та моноцитаривуючий протеїн-1, що може мати негативний вплив та призводити до видалення зуба [60].

Патогенетичне значення у розвитку серцево-судинних уражень. Як відомо, апоптоз – ключова ознака сформованої атеросклеротичної бляшки, а цитокіни, що виділяють апоптотичні клітини відіграють ключову роль у міграції фагоцитів та видаленні продуктів апоптозу. Тому досліджувалася роль p43 в розвитку апоптозу, запалення та прогресуванні атеро-

склеротичної бляшки. Виявлене підвищення виділення p43 в атеросклеротичній бляшці було пов'язано з підвищеною експресією білка. Він викликає активацію TNF- α , інтерлейкіну-1 β , інтерлейкіну-8, запальних білків макрофагів, а також ендотеліальних клітин з посиленням синтезу E-селектину, ICAM, VCAM, TF[61].

Показано, що ЕМАР-II опосередковує протизапальну та антипроліферативну дію рапаміцину при ушкодженні ендотелію судин та при утворенні неоінтимальних формацій після васкулярних уражень *in vivo* [62-64].

У дослідженнях з використанням інгібіторів ангіогенезу було виявлено можливі мішені для ЕМАР-II в ендотеліальних клітинах – це протеїни, що беруть участь у перетвореннях актину [65]. В основі здатності цього пептиду викликати апоптоз ендотеліальних клітин лежить пригнічення їх адгезії та розповсюдження фібронектину через прямий вплив на зв'язок ЕМАР-II та інтегрину [66]. Встановлено, що наявність ЕМАР II в безсироватковому середовищі для зростання збільшує рівень експресії ферменту об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази в клітинах людини *in vitro* [67]. Висока внутрішньоклітинна концентрація ЕМАР II пригнічує проліферацію клітин епітелію та фібробластів. Крім того, він зв'язує і фосфорилує Cdk1. Позаклітинний ЕМАР II індукуює апоптоз ендотеліальних клітин, а надлишок його внутрішньоклітинного вмісту полегшує міграцію епітеліальних клітин та фібробластів. Таким чином, ЕМАР II має специфічні внутрішньоклітинні ефекти, що протилежні до позаклітинних впливів, які проявляються під час ембріонального розвитку і прогресування захворювань легень[68].

Індуковане гіпоксією підвищення вмісту ЕМАР-II проявляє дозозалежний вплив на міграцію ендотеліальних прогеніторних клітин і поповнення ними зон ішемії [69]. Так, він впливає на процес ревазуляризації та відновлення тканини міокарда при інфаркті

міокарда. Вихідна експресія ЕМАР-II в неушкодженому міокарді мінімальна та переважно локалізується в периваскулярній стромі. Через 6 год після розвитку інфаркту міокарда його експресія послідовно підвищується в ділянці запальної клітинної інфільтрації та зберігається протягом одного тижня. Через 6 тиж експресія ЕМАР-II підвищується в фібробластах, що локалізуються в аваскулярному сполучнотканинному рубці та сприяє реваскуляризації зони ушкодження [70].

Вважають, що вазодилатація, яка відбувається під час ЕМАР-II-індукованого запалення, пов'язана з оксидом азоту. Це було продемонстровано на легневих артеріях. Поліпептид викликає дилатацію легеневої артерії. ЕМАР-II-опосередкована вазодилатація ендотеліязалежна. ЕМАР II активує експресію INOS мРНК у легеневій артерії. При блокаді оксиду азоту L-NAME – інгібітором NO-синтази, ЕМАР-II-індукована вазодилатація послаблювалася [71].

Враховуючи патогенетичне значення ЕМАР-II при деяких захворюваннях, були розроблені моноклональні антитіла, здатні як виявляти різні форми цього пептиду, так і нейтралізувати його дію, спрямовану на міграцію моноцитів у периферичній крові людини, ЕМАР-II-індукований апоптоз клітин [72, 73].

Таким чином, різноманітність функцій, властивостей та патогенетичних механізмів, в яких задіяний ЕМАР-II, а саме механізми впливу на ендотеліальні клітини, прозапальна дія, протипухлинні властивості, патогенетичне значення при захворюваннях ЦНС, захворюваннях легень, участь у розвитку легень під час ембріогенезу, у формуванні серцево-судинних уражень дають можливість його широкого використання в майбутньому.

Отже, різноманітність властивостей ЕМАР-II вказує на те, що цей поліпептид відіграє важливу роль у функціонуванні клітин. Насамперед це протипухлинні влас-

тивості ЕМАР-II, що пов'язані з туморнекротичним фактором α , які використовуються при лікуванні солідних та метастатичних пухлин.

Визначення ЕМАР-II при захворюваннях головного мозку та інших ураженнях ЦНС може бути діагностичним маркером для диференційної діагностики та прогнозування перебігу хвороби. Привертає увагу участь ЕМАР-II у ембріогенезі легень та патогенетичне значення у розвитку легеневої патології

Цікаві також відомості про молекулярні механізми можливої участі ЕМАР-II у атерогенезі та розвитку ендотеліальної дисфункції через вплив ЕМАР-II на ендотеліальні клітини, прозапальну дію, підвищення експресії Р- та Е-селектину, фібронектину, адгезивних молекул, посилення ендотеліязалежної дилатації.

Таким чином, описані властивості ЕМАР-II мають клінічне значення та дають можливість розробки нових механізмів впливу при вказаній патології, а саме можуть бути мішенню для терапії нейтралізуючими антитілами.

Л.А.Могильницькая

ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ МОНОЦИТАКТИВИРУЮЩИЙ ПОЛИПЕПТИД-II: СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ, ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Эндотелиальный моноцитактивирующий полипептид-II – это мультифункциональный полипептид с провоспалительной и антиангиогенезной активностью. ЕМАР-II вызывает прокоагулянтные изменения на поверхности эндотелиальных клеток, усиливает экспрессию Е, Р-селектина и туморнекротического фактора α , влияет на миграцию моноцитов и нейтрофилов. Этот полипептид индуцирует апоптоз в эндотелиальных клетках. В данном обзоре представлены история открытия, структурные модули, функциональные домены, биологические свойства и функции ЕМАР-II. Описаны механизмы воздействия на эндотелиальные клетки, провоспалительного действия, противоопухолевые свойства, патогенетическое значение при заболеваниях ЦНС, участие в развитии легких при эмбриогенезе и патогенетическое значение при заболеваниях легких, в развитии сердечнососудистых поражений.

Ключевые слова: эндотелиальный моноцитактивирующий полипептид-II, эндотелиальная дисфункция.

L.A.Mogylnytska

ENDOTHELIAL MONOCYTE-ACTIVATING POLYPEPTIDE-II: PROPERTIES, FUNCTIONS, AND PATHOGENETIC SIGNIFICANCE

Endothelial dysfunction is implicated in the pathogenesis of diabetes and atherosclerosis. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II (EMAP-II) is a multifunctional polypeptide with proinflammatory and antiangiogenic activity. EMAP-II induces procoagulant activity on the surface of endothelial cells, increases expression of E- and P-selectins and tumor necrosis factor-1, directs migration of monocytes and neutrophils, induces apoptosis in endothelial cells. The mechanisms of effects on endothelial cells, inflammatory action, anti-tumor properties, pathogenic role in diseases of the central nervous system involved in the development of the lungs during embryogenesis and pathogenic role in diseases of the lungs, in the development of cardiovascular disease.

Key words: EMAP-II, endothelial dysfunction.

REFERENCES

1. Kao J, Ryan J, Brett G, Chen J, Shen H, Fan YG, Godman G, Familletti PC, Wang F, Pan YC. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem.* 1992 Oct 5;267(28):20239-47.
2. Shalak V, Kaminska M, Mitnacht-Kraus R, Vandenabeele P, Clauss M, Mirande M. The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. *J Biol Chem.* 2001 Jun 29;276(26):23769-76.
3. Han JM, Park SG, Lee Y, Kim S. Structural separation of different extracellular activities in aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multi-functional protein, p43/AIMP1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 31;342(1):113-8.
4. Norcum MT, Warrington JA. The cytokine portion of p43 occupies a central position within the eukaryotic multisynthetase complex. *J Biol Chem.* 2000 Jun 16;275(24):17921-4.
5. Kao J, Houck K, Fan Y, Haehnel I, Libutti SK, Kayton ML, Grikscheit T, Chabot J, Nowygrod R, Greenberg S. Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial monocyte activating polypeptide II. *J Biol Chem.* 1994 Oct 7;269(40):25106-19.
6. Savytskyi OV, Yesylevskyy SO, Kornelyuk AI. Asymmetric structure and domain binding interfaces of human tyrosyl-tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations. *J Mol Recognit.* 2013 Feb;26(2):113-20.
7. Kondratiuk I, Khoruzenko A, Cherednyk O, Filonenko V, Kornelyuk A. Monoclonal antibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its isolated cytokine-like domain. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2013 Jun;32(3):200-4.
8. Kwon HS, Park MC, Kim DG, Cho K, Park YW, Han JM, Kim S. Identification of CD23 as a functional receptor for the proinflammatory cytokine AIMP1/p43. *J Cell Sci.* 2012 Oct 1;125(Pt 19):4620-9.
9. Lee SW, Cho BH, Park SG, Kim S. Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J Cell Sci.* 2004 Aug 1;117(Pt 17):3725-34.
10. Ko YG, Park H, Kim T, Lee JW, Park SG, Seol W, Kim JE, Lee WH, Kim SH, Park JE, Kim S. A cofactor of tRNA synthetase, p43, is secreted to upregulate proinflammatory genes. *J Biol Chem.* 2001 Jun 22;276(25):23028-33.
11. Chang SY, Ko HJ, Heo TH, Kang CY. Heparan sulfate regulates the antiangiogenic activity of endothelial monocyte-activating polypeptide-II at acidic pH. *Mol Pharmacol.* 2005 May;67(5):1534-43.
12. Yao C, Williams AJ, Ottens AK, Lu XC, Liu MC, Hayes RL, Wang KK, Tortella FC, Dave JR. P43/pro-EMAPII: a potential biomarker for discriminating traumatic versus ischemic brain injury. *J Neurotrauma.* 2009 Aug;26(8):1295-305.
13. Kao J, Fan YG, Haehnel I, Brett J, Greenberg S, Clauss M, Kayton M, Houck K, Kisiel W, Seljelid R. A peptide derived from the amino terminus of endothelial-monocyte-activating polypeptide II modulates mononuclear and polymorphonuclear leukocyte functions, defines an apparently novel cellular interaction site, and induces an acute inflammatory response. *J Biol Chem.* 1994 Apr 1;269(13):9774-82.
14. Chen Y, Legan SK, Mahan A, Thornton J, Xu H, Schwarz MA. Endothelial-monocyte activating polypeptide II disrupts alveolar epithelial type II to type I cell transdifferentiation. *Respir Res.* 2012 Jan 3;13:1.
15. Daemen MA, van 't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest.* 1999 Sep;104(5):541-9.
16. Clarijs R, Schalkwijk L, Ruiten DJ, deWaal RM. EMAP-II expression is associated with macrophage accumulation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 May;44(5):1801-6.
17. Murray JC, Heng YM, Symonds P, Rice K, Ward W, Huggins M, Todd I, Robins RA. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II (EMAP-II): a novel inducer of lymphocyte apoptosis. *J Leukoc Biol.* 2004 May;75(5): 772-6.
18. Berger AC, Alexander HR, Wu PC, Tang G, Gnant MF, Mixon A, Turner ES, Libutti SK. Tumour necrosis factor receptor I (p55) is upregulated on endothelial cells by exposure to the tumour-derived cytokine endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP-II). *Cytokine.* 2000 Jul;12(7): 992-1000.
19. Van Horssen R, ten Hagen TLM, Eggermont AMM. TNF

- in cancer treatment: Molecular insights, antitumor effects and clinical utility. *Oncologist*. 2006 Apr;11(4):397-408.
20. Marvin MR1, Libutti SK, Kayton M, Kao J, Hayward J, Grikscheit T, Fan Y, Brett J, Weinberg A, Nowygrod R, LoGerfo P, Feind C, Hansen KS, Schwartz M, Stern D, Chabot J. A novel tumor-derived mediator that sensitizes cytokineresistant tumors to tumor necrosis factor. *J Surg Res*. 1996 Jun;63(1):248-55.
 21. Wu PC, Alexander HR, Huang J, Hwu P, Gnant M, Berger AC, Turner E, Wilson O, Libutti SK. In vivo sensitivity of human melanoma to tumor necrosis factor (TNF)-alpha is determined by tumor production of the novel cytokine endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAPII). *Cancer Res*. 1999 Jan 1;59(1):205-12.
 22. Crippa L, Gasparri A, Sacchi A, Ferrero E, Curmis F, Corti A. Synergistic damage of tumor vessels with ultra low-dose endothelial-monocyte activating polypeptide-II and neovasculture-targeted tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Res*. 2008 Feb 15;68(4):1154-61.
 23. Grünhagen DJ, Brunstein F, Graveland WJ, van Geel AN, de Wilt JH, Eggermont AM. One hundred consecutive isolated limb perfusions with TNF-alpha and melphalan in melanoma patients with multiple intransit metastases. *Ann Surg*. 2004 Dec;240(6):939-47.
 24. van Horssen R, Rens JA, Brunstein F, Guns V, van Gils M, Hagen TL, Eggermont AM. Intratumoural expression of TNF-R1 and EMAP-II in relation to response of patients treated with TNF-based isolated limb perfusion. *Int J Cancer*. 2006 Sep 15;119(6):1481-90.
 25. Yamamoto M, Fukushima T, Ueno Y, Hayashi S, Kimura H, Soma G, Tomonaga M. Clinical significance of the expression of endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAPII) in the treatment of glioblastoma with recombinant mutant human tumor necrosis factor-alpha (TNFSAM2). *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6A):4081-6.
 26. Schwarz RE, Schwarz MA. In vivo therapy of local tumor progression by targeting vascular endothelium with EMAP-II. *J Surg Res*. 2004 Jul;120(1): 64-72.
 27. Liu J, Liu L, Xue Y, Meng F, Li S, Wang P, Liu Y. Anti-neoplastic activity of low-dose endothelial-monocyte activating polypeptide-II results from defective autophagy and G2/M arrest mediated by PI3K/Akt/FoxO1 axis in human glioblastoma stem cells. *Biochem Pharmacol*. 2014 Jun 15;89(4):477-89.
 28. Reznikov OH, Chaikovsk'ka LV, Poliakova LI, Sachyns'ka OV. Effects of cytokine-like polypeptide EMAP II and flutamide on the testosterone-stimulated prostate of castrated rats. *Fiziol Zh*. 2011;57(4):12-20.
 29. Reznikov AG, Chaykovskaya LV, Polyakova LI, Kornelyuk AI, Grygorenko VN. Cooperative antitumor effect of endothelial-monocyte activating polypeptide II and flutamide on human prostate cancer xenografts. *Exp Oncol*. 2011 Dec;33(4):231-4.
 30. Reznikov AG, Chaykovskaya LV, Polyakova LI, Kornelyuk AI. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model. *Exp Oncol*. 2007 Dec;29(4):267-71.
 31. Awasthi N, Zhang C, Hinz S, Schwarz MA, Schwarz RE. Enhancing sorafenib-mediated sensitization to gemcitabine in experimental pancreatic cancer through EMAP II. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013 Mar 6;32:12.
 32. Awasthi N, Zhang C, Ruan W, Schwarz MA, Schwarz RE. Evaluation of poly-mechanistic antiangiogenic combinations to enhance cytotoxic therapy response in pancreatic cancer. *PLoS One*. 2012;7(6):e38477.
 33. Stathaki M, Armakolas A, Dimakakos A, Kaklamanis L, Vlachos I, Konstantoulakis MM, Zografos G, Koutsilieris M. Kisspeptin effect on endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP-II)-associated lymphocyte cell death and metastases in colorectal cancer patients. *Mol Med*. 2014 Mar 18;20:80-92.
 34. Li Z, Liu YH, Xue YX, Liu LB, Xie H. Mechanisms for endothelial monocyte-activating polypeptide-II-induced opening of the blood-tumor barrier. *J Mol Neurosci*. 2012 Jun;47(2):408-17.
 35. Li Z, Liu YH, Xue YX, Liu LB, Wang P. Signal mechanisms underlying low-dose endothelial monocyte-activating polypeptide-II-induced opening of the blood-tumor barrier. *J Mol Neurosci*. 2012 Sep;48(1):291-301.
 36. Li Z, Liu YH, Xue YX, Liu LB, Wang P. Low-dose endothelial monocyte-activating polypeptide-II increases permeability of blood-tumor barrier by caveolae-mediated transcellular pathway. *J Mol Neurosci*. 2014 Mar;52(3):313-22.
 37. Sen E, Ulger F, Kaya A, Akar N, Gonullu U. Serum endothelial monocyte-activating polypeptide-II: a novel biomarker in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2008 May;9(3):166-70.
 38. van Horssen R, Rens JA, Schipper D, Eggermont AM, ten Hagen TL. EMAP-II facilitates TNF-R1 apoptotic signalling in endothelial cells and induces TRADD mobilization. *Apoptosis*. 2006 Dec;11(12):2137-45.
 39. Ferrario A, von Tiehl KF, Rucker N, Schwarz MA, Gill PS, Gomer CJ. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res*. 2000 Aug 1;60(15):4066-9.
 40. Awasthi N, Schwarz MA, Verma V, Cappiello C, Schwarz RE. Endothelial monocyte activating polypeptide II interferes with VEGF-induced proangiogenic signaling. *Lab Invest*. 2009 Jan;89(1):38-46.
 41. Tandle AT, Calvani M, Uranchimeg B, Zahavi D, Melillo G, Libutti SK. Endothelial monocyte activating polypeptide-II modulates endothelial cell responses by degrading hypoxia-inducible factor-1alpha through interaction with PSMA7, a component of the proteasome. *Exp Cell Res*. 2009 Jul 1;315(11):1850-9.
 42. Park SG, Kang YS, Ahn YH, Lee SH, Kim KR, Kim KW, Koh GY, Ko YG, Kim S. Dose-dependent biphasic activity of tRNA synthetase-associating factor, p43, in angiogenesis. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22; 277(47): 45243-8.

43. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1992 Mar;140(3): 539-44.
44. Mueller CA, Schluesener HJ, Conrad S, Meyermann R, Schwab JM. Spinal cord injury induces lesional expression of the proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II. *J Neurotrauma.* 2003 Oct;20(10):1007-15.
45. Mueller CA, Richt JA, Meyermann R, Deininger M, Schluesener H. Accumulation of the proinflammatory cytokine endothelial-monocyte-activating polypeptide II in ramified microglial cells in brains of Borna virus infected Lewis rats. *Neurosci Lett.* 2003 Mar 27;339(3):215-8.
46. Zhang Z, Zhang Z, Artelt M, Burnet M, Schluesener HJ. Dexamethasone attenuates early expression of three molecules associated with microglia/macrophages activation following rat traumatic brain injury. *Acta Neuropathol.* 2007 Jun;113(6): 675-82.
47. Liao Y, Zhang Z., Liu J., Schluesener H.J., Zhang Z., Wu Y. Lesional expression of EMAPII in macrophages/microglia following cerebral ischemia in rats. *Int J Neurosci.* 2011 Feb;121(2):58-64.
48. Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev.* 2000 Mar 15;92(1): 55-81.
49. Journeay WS, Janardhan KS, Singh B. Expression and function of endothelial monocyte-activating polypeptide-II in acute lung inflammation. *Inflamm Res.* 2007 May;56(5):175-81.
50. Clauss M, Voswinckel R, Rajashekhar G, Sigua NL, Fehrenbach H, Rush NI, Schweitzer KS, Yildirim AO, Kamocki K, Fisher AJ, Gu Y, Safadi B, Nikam S, Hubbard WC, Tuder RM, Twigg HL, Presson RG, Sethi S, Petrache I. Lung endothelial monocyte-activating protein 2 is a mediator of cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest.* 2011 Jun;121(6): 2470-9.
51. Green LA, Petrusca D, Rajashekhar G, Gianaris T, Schweitzer KS, Wang L, Justice MJ, Petrache I, Clauss M. Cigarette smoke-induced CXCR3 receptor up-regulation mediates endothelial apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 Dec;47(6):807-14.
52. Lal CV, Schwarz MA. Vascular mediators in chronic lung disease of infancy: role of endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP II). *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014 Mar;100(3):180-8.
53. Green LA, YiR, Petrusca D, Wang T, Elghouche A, Gupta SK, Petrache I, Clauss M. HIV envelope protein gp120-induced apoptosis in lung microvascular endothelial cells by concerted upregulation of EMAP II and its receptor, CXCR3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014 Feb 15;306(4):L372-82.
54. Zheng M, Schwarz MA, Lee S, Kumaraguru U, Rouse BT. Control of stromal keratitis by inhibition of neovascularization. *Am J Pathol.* 2001 Sep;159(3):1021-9.
55. Liu SH, Gottsch JD. Apoptosis induced by a corneal-endothelium-derived cytokine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Dec;40(13):3152-9.
56. Nomura S, Ishii K, Shimizu M, Inami N, Uoshima N, Urase F, Maeda Y, Hayashi K. The significance of EMAP-II after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Immunol.* 2009 May;21(1):23-6.
57. Wellings RP, Lash GE, Murray JC, Tas M, Ward W, Trew AJ, Baker PN. Endothelial monocyte-activating polypeptide-2 is increased in pregnancy but is not further increased in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 1999 May-Jun;6(3):142-6.
58. Battersby S, Boddy SC, Critchley HO, Jabbour HN. Expression and localization of endothelial monocyte-activating polypeptide II in the human endometrium across the menstrual cycle: regulation of expression by prostaglandin E(2). *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Aug;87(8):3928-35.
59. Mishchuk VV, Pyptiuk OV. Diagnostic significance of some indices of systemic inflammation in peritonitis. *Klin Khir.* 2010 Jan;(1):36-9.
60. Liu D, Wise GE. Expression of endothelial monocyte-activating polypeptide II in the rat dental follicle and its potential role in tooth eruption. *Eur J Oral Sci.* 2008 Aug;116(4):334-40.
61. Martinet W, De Meyer I, Cools N, Timmerman V, Bult H, Bosmans J, De Meyer GR. Cell death-mediated cleavage of the attraction signal p43 in human atherosclerosis: implications for plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jul;30(7):1415-22.
62. Nührenberg TG, Voisard R, Fahlisch F, Rudelius M, Braun J, Gschwend J, Kountides M, Herter T, Baur R, Hombach V, Baeuerle PA, Zohlhüfer D. Rapamycin attenuates vascular wall inflammation and progenitor cell promoters after angioplasty. *FASEB J.* 2005 Feb;19(2):246-8.
63. Zohlhüfer D, Nührenberg TG, Neumann FJ, Richter T, May AE, Schmidt R, Denker K, Clauss MA, Schömig A, Baeuerle PA. Rapamycin effects transcriptional programs in smooth muscle cells controlling proliferative and inflammatory properties. *Mol Pharmacol.* 2004 Apr;65(4):880-9.
64. Nührenberg TG, Langwieser N, Schwarz JB, Hou Y, Frank P, Sorge F, Matschurat S, Seidl S, Kastrati A, Schömig A, Clauss MA, Zohlhüfer D. EMAP-II downregulation contributes to the beneficial effects of rapamycin after vascular injury. *Cardiovasc Res.* 2008 Feb 1;77(3):580-9.
65. Keezer SM, Ivie SE, Krutzsch HC, Tandle A, Libutti SK, Roberts DD. Angiogenesis inhibitors target the endothelial cell cytoskeleton through altered regulation of heat shock protein 27 and cofilin. *Cancer Res.* 2003 Oct 1;63(19):6405-12.
66. Schwarz MA, Zheng H., Liu J, Corbett S, Schwarz RE. Endothelial monocyte activating polypeptide II alters fibronectin based endothelial cell adhesion and matrix assembly via alpha5 beta1 integrin. *Exp Cell Res.* 2005 Dec 10;311(2):229-39.
67. Lylo VV, Matsevich LL, Kotsarenko EV, Babenko LA, Korneliuk AI, Sukhorada EM, Lukash LL. Induction of repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression under the influence of

- cytokine EMAP II in human cells in vitro. *Tsitol Genet.* 2011 Nov-Dec;45(6):53-60.
68. Schwarz MA, Thornton J, Xu H, Awasthi N, Schwarz RE. Cell proliferation and migration are modulated by Cdk-1-phosphorylated endothelial-monocyte activating polypeptide II. *PLoS One.* 2012;7(3): e33101.
69. Hou Y, Plett PA, Ingram DA, Orschell CM, Yoder MC. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II induces migration of endothelial progenitor cells via the chemokine receptor CXCR3. *Exp Hematol.* 2006 Aug;34(8):1125-32.
70. Thompson JL, Ryan JA, Barr ML, Franc B, Starnes VA, Schwarz MA. Potential role for antiangiogenic proteins in the myocardial infarction repair process. *J Surg Res.* 2004 Jan;116(1):156-64.
71. Tsai BM, Wang M, Clauss M, Sun P, Meldrum DR. Endothelial monocyte-activating polypeptide II causes NOS-dependent pulmonary artery vasodilation: a novel effect for a proinflammatory cytokine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Oct;287(4):R767-71.
72. Rajashekhar G, Mitnacht-Kraus R, Ispe U, Garrison J, Hou Y, Taylor B, Petrache I, Vestweber D, Clauss M. A monoclonal rat anti-mouse EMAP II antibody that functionally neutralizes pro- and mature-EMAP II in vitro. *J Immunol Methods.* 2009 Oct 31;350(1-2):22-8.
73. Journeay S, Singh B. EMAP-II antibody detects both proEMAP/p43 and mature EMAP-II molecules. *Acta Neuropathol.* 2007 Oct;114(4):435.

*Матеріал надійшов
до редакції 07.10.2014*

CONTENTS

A.V. Kotsuruba, B.S. Kopjak, V.F. Sagach, N.Ja.Spivak. Nanocerium restores the erythrocytes stability to acid hemolysis by inhibition of oxygen and nitrogen reactive species in old rats	3
D.O. Minchenko, V.V. Davydov, O.A. Budreiko, O.S. Moliavko, D.K. Kulieshova, O.V. Tiazhka, O.H. Minchenko. The expression of <i>CCN2</i> , <i>IQSEC</i> , <i>RSPO1</i> , <i>DNAJC15</i> , <i>RIPK2</i> , <i>IL13RA2</i> , <i>IRS1</i> , and <i>IRS2</i> genes in blood of obese boys with insulin resistance	10
V.Yu. Garbuzova, D.A. Stroy, V.E. Dosenko, Ye.I. Dubovyk, A.O. Borodenko, K.A. Shimko, O.A. Obukhova, O.V. Ataman. Association of allelic polymorphisms of genes matrix gla-protein system with ischemic atherothrombotic stroke	19
N.G. Grushka, S.I. Pavlovykh, T.M. Bryzgina, V.S. Sukhina, N.V. Makogon, R.I Yanchiy. Genotoxic stress and the pathways of thymus cell death and lymph nodes of mice in conditions of immunocomplex pathology	28
O.V. Virchenko, T.M. Falalyeyeva, T.V. Beregova, M. Y. Spivak, L.M. Lazarenko, O.M. Demchenko. Effects of mono-, poly- and composite probiotics on the ulceration caused by restraint stress	35
I.S. Fomenko, O.P. Korniychuk, A.R. Hural', R.G. Shykula, I.I. Ilkiv, A. Ya. Sklyarov. Role of cyclooxygenase in modification of intestinal microflora under stress condition	42
T.V. Vovkun, P.I. Yanchuk, L.Y. Shtanova, S.P. Veselsky, A.S. Shalamay. Participation of parasympathetic nervous system in realization of the bioflavonoids action on gastric secretion in rats	50
L.N. Plotnikova, V.A. Berezovskii, S.P. Veselskii. Effect of reduced oxygen concentrations and hydrogen sulfide on the amino acid metabolism and mesenchymal cells proliferation	56
Ju.D. Vinnichuck, L.M. Gunina. Vascular endothelial growth factor during physical loads with different mechanism of energy's providing of muscular work	63
A.G. Rodinsky, E.G. Zinov'eva, A.S. Trushenko, M.J. Kachan. The evoked activity of the dorsal root afferent fibres of the spinal cord of white rats in experimental diabetes mellitus	72
O.V. Storchilo. Radioprotective effect of food in the assimilation of carbohydrate substrates by two generations of posterity from the radiation-exposed male rats	78
L.P. Voitenko, A.G. Nikonenko. Modification of experimental rotenone model of parkinson's disease	83
REVIEWS	
Iu.V. Hoshovs'ka. The role of uncoupling proteins in mechanisms of protection from oxidative stress	91
L.A.Mogylnytska. Endothelial monocyte-activating polypeptide-ii: properties, functions, and pathogenetic significance	102