

# Фізіологічний журнал

ТОМ 62 № 5 2016

---

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

---

Виходить 1 раз на 2 місяці

---

## Зміст

<i>Goltsev A.N., Rassokha I.V., Dubrava T.G., Ostankova L.V., Ostankov M.V.; Safonov V.I., Zyкова A.V.</i> Experimental therapy of graft-versus-host disease by mesenchymal stromal cells grown on oxide nanocoatings . . . . .	3
<i>Колесник О. П., Федулова С. А., Веселовський М. С.</i> Аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при короткотривалій депресії та полегшенні синаптичної передачі . . . . .	12
<i>Малєєва Г.В., Булдакова С. І., Скибо Г.Г., Брежестовський П.Д.</i> Амінокислотні залишки відповідальні за взаємодію $\alpha 1$ - гліцинових рецепторів із гінкголевою кислотою . . . . .	19
<i>Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Родік Р.В., Кальченко В.І., Чуніхін О.Ю.</i> Калікс[4]арени як модулятори енергозалежної акумуляції $Ca^{2+}$ та функціонування електронно-транспортного ланцюга в мітохондріях гладенького м'яза . . . . .	27
<i>Ziablitshev S.V., Korobova A.V., Petrenko O.V., Serduk V.N., Mogilevsky S.U.</i> Role of matrix metalloproteinase 9 and its tissue inhibitor 1 in development and prognosis of diabetic retinopathy . . . . .	37
<i>Семененко С.Б., Ткачук С.С., Ткачук О.В., Каратєєва С.Ю., Аниупова В.В.</i> Особливості структури хроноритмів іонорегулювальної функції нирок за умов гіпофункції шишкоподібної залози . . . . .	45
<i>Zabenko Y.Y., Pivneva T.A.</i> Flavonoid quercetin reduces gliosis after repetitive mild traumatic brain injury in mice . . . . .	50
<i>Михейцева І.М., Сіроштаненко Т.І.</i> Вплив донора сірководню на внутрішньоочний тиск у щурів . . . . .	57
<i>Колотілов С.В., Мельник В.О., Литвиненко А.С., Сотнік С.О., Гуржій О.О.</i> Порівняння спектроскопічних властивостей внутрішньоочної рідини у хворих з катарактою і первинною відкритокутовою глаукомою . . . . .	62

<i>Конопельнюк В.В., Кот Л.І., Коваль Т.В., Хілько Т.Д., Якуцова І.В., Преображенська Т.Д., Остапченко Л.І.</i> Стан глутатіонзалежної ланки антиоксидантної системи крові при застосуванні порошку насіння фенугреку тварин з експериментальним ожирінням . .	69
<i>Белкіна І.О., Смоленко Н.П., Клочков В.К., Малюкін Ю.В., Чистякова Е.Є., Карпенко Н.О., Караченцев Ю.І.</i> Оцінка ефективності наночастинок ортованадату гадолінію для коригування неонатально індукованої репродуктопатії у самців щурів . . . . .	76
<i>Фафула Р.В., Онуфрович О.К., Єфремова У.П., Воробець Д.З., Воробець З.Д.</i> Особливості аргіназного шляху метаболізму L-аргініну в сперматозоїдах чоловіків при різних формах патоспермії . . . . .	83

# Experimental therapy of graft-versus-host disease by mesenchymal stromal cells grown on oxide nanocoatings

A.N. Goltsev<sup>1</sup>, I.V. Rassokha<sup>1</sup>, T.G. Dubrava<sup>1</sup>, L.V. Ostankova<sup>1</sup>,  
M.V. Ostankov<sup>1</sup>, V.I. Safonov<sup>2</sup>, A.V. Zykova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Kharkiv;

<sup>2</sup>National Science Center 'Kharkov Institute of Physics and Technology' of the National Academy of Sciences, Kharkiv; e-mail: cryopato@gmail.com

*Immune aggression to transplanted allogeneic bone marrow, i.e. the graft-versus-host disease (GVHD), could be decreased by the suppression of effector and/or activation of T-regulatory cells (Treg). This task could be solved by co-transplantation of allogeneic bone marrow and mesenchymal stromal cells (MSCs). This study demonstrated the elevated immune modulating activity of MSCs by their culturing in vitro on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oxide nanocoatings. Introduction of the cells to the animals with GVHD resulted in an increased content of Treg in the spleen of bone marrow recipients, reduced severity of the pathology, and higher survival of animals. The findings could be the basis for developing the new approaches to optimize the GVHD treatment methods involving the oxide nanocoating cultured MSCs.*

*Key words: nanocoatings; mesenchymal stromal cells; graft-versus-host disease.*

## INTRODUCTION

Rapidly developing research in cell and tissue engineering requires the introduction of the new techniques and methods, including the use of different nanomaterials [1, 2]. It has been shown recently that the functional state of cells could be controlled by modifying the surface of nanocomposite coatings whereon they are cultured [3], but the data on mesenchymal stromal cells (MSCs) are quite scanty. The use of MSCs cultured on nanocoatings in clinical practice, in particular in treatment of the graft-versus-host disease (GVHD), could be very prospective.

Studies on decoding the mechanisms of GVHD and its treatment have remained relevant till now. One of the methodological approaches to solve this task is co-transplantation of bone marrow and MSCs [4]. The MSCs are known to have a high potential of self-renewal and the ability to multilineage differentiation [5]. This functional status of MSCs is implemented both *in vitro* and *in vivo* during their migration

and subsequent regeneration of the recipient damaged sites.

The results of experimental [6,7] and clinical investigations [8] have shown that MSCs have a pronounced immune modulatory potential, which is associated with production of 2,3-dioxygenase indolamine (IDO). The main function of this enzyme is to trigger kynurenine pathway of tryptophan catabolism, resulting in the formation of its decay products in the form of kynurenine, quinoline, picolinic and 3-hydroxyanthranilic acids [9]. These tryptophan catabolites are able of activating the immune suppressive link, particularly, regulatory T cells [10]. The IDO-dependent immunosuppression is known to be is more inherent to human MSCs. However, there are the reports including our own, indicating the absence of immunosuppression of MSCs when using 1-methyl tryptophan as an inhibitor of IDO in the model of GVHD in mice [11,12].

Within the frames of the STCU project # 4974 we have studied the mechanisms of action of oxide nanocomposite coatings (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,

© A.N. Goltsev, I.V. Rassokha, T.G. Dubrava, L.V. Ostankova, M.V. Ostankov, V.I. Safonov, A.V. Zykova

Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ZrO<sub>2</sub>) with different micro-architecture on regulation of functional status MSCs [13]. Goltsev AN. et al. [7] have found that the coating of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> contributed to the maximum cell adhesion and selective enrichment of bone marrow culture with the cells expressing markers of MSCs (CD44, CD73, CD105, CD106) and increase in the expression rate of *ido* gene, responsible for the synthesis of the IDO enzyme even at the second passage.

The established fact of the increased *ido* gene expression in MSCs after culturing on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> coating suggests the possibility of more effective treatment of the GVHD. Based on the above, the purpose of this study was to investigate the immunocorrecting effect in therapy of experimental GVHD rendered by MSCs with a functional potential altered during culturing on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocoating.

## METHODS

The studies were carried out in 20-week-old CBA/H and (CBA/HxC57Bl)F1 mice weighing 24-26 g in accordance with the General Principles of Experiments in Animals approved by the 5<sup>th</sup> National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) compliant with the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

### *Deriving cell suspensions of bone marrow and lymph nodes*

Bone marrow donors, i.e. the CBA/H mice were decapitated under light ether anesthesia. The bone marrow cells were washed out from the femur bones, and the inguinal lymph nodes were disintegrated in a Potter homogenizer in a handling medium (consisted of the medium 199 (Chumakov Institute of Poliomyelitis & Viral Encephalites, Russia), 10% fetal bovine serum (FBS) (BioloT, Russia) and 2% sodium citrate (Weifang Ensign, China)); the resulted suspensions were passed then through a multi-layer nylon filter. The number of nucleated cells in

the suspensions was counted in the Goryaev's chamber.

### *GVHD induction*

GVHD was induced as follows. The (CBA/HxC57Bl)F1 mice were irradiated using RUM-17 device (Mosrentgen, Russia) at a dose of 850 R. The irradiation conditions were 38.6 R/min dose rate; 220 kV voltage; 10 mA current; 0.5 mm Cu + 1 mm Al filters; 50 cm focus-dorsal distance. One hour later the irradiation the animals were injected into the tail vein with 0.2 ml of handling medium containing 5·10<sup>6</sup> bone marrow cells together with the cells of lymph nodes of CBA/H mice in 3:1 ratio [14].

As the control there were used intact mice (CBA/HxC57Bl)F1, which were not irradiated and nothing was injected (intact control), and the irradiated mice (CBA/HxC57Bl)F1, which were administered with syngeneic bone marrow with the cells of inguinal lymph nodes (3:1) at the concentration of 5×10<sup>6</sup> cells/mouse (syngeneic control).

### *Isolation, culturing, and introduction of MSCs to the recipients with GVHD*

To obtain MSCs the bone marrow cells of CBA/H mice were isolated as described above and cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 IU/ml Penicillin, 50 IU/ml Streptomycin (growth medium); explantation density was 0.5-1×10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup>; culture was performed in a CO<sub>2</sub> - incubator (Barnstead International, USA) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>; 3 cm glass Petri dish (Anumbra, Czech Republic) coated or non-coated with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> were used. The coatings were applied by magnetron sputtering method in a high vacuum pumping system [15]. After 24 hrs the non-adhered cells were removed and an adhesive fraction was cultured till the subconfluent layer appearance; the growth medium was changed every 3 days. The cells were then detached with 0.25% Trypsin (Sigma-Aldrich, USA) and 0.02% EDTA (ICN, USA) solution according to the standard

procedure [5]; enzyme was inactivated with a culture medium containing 10% FBS; cells were then washed and counted. Thereafter the MSCs were passaged with an explantation density of  $0.5-1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Cell cultures were visually assessed using Axiovert 40C inverted microscope (Carl Zeiss, Germany).

After two passages the mesenchymal stem cells cultured either on a glass substrate (MSCg), or on a glass coated with an oxide nanocomposite, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (MSCa) were detached, centrifuged for 10 min at 200g/min, re-suspended in handling medium and intravenously injected at a dose of  $2 \times 10^5$ /cells mouse 2 hrs after pathology induction.

#### *Assessment of clinical and laboratory parameters before and after administration of MSCs to animals with GVHD*

Body weight of the animals and their survival were assessed for 14 days after the induction of disease and administration of MSCs. There were 3 assessments, each group made from 7 to 11 animals. To day 14 the animals were decapitated under light ether anesthesia, and the spleen index and Treg content were evaluated as generally accepted.

Spleen index (SI) was calculated by the ratio of spleen to body weights of the animals. In intact animals the SI was assumed as equal to 1; the value higher than 1.3 indicated the GVHD development [14].

Treg content was analyzed in spleens of experimental and control animals. For this aim the spleens were disintegrated in a Potter homogenizer in a handling medium 199, then the suspensions were passed through a nylon filter. The content of cells with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> phenotypes was assessed to day 14 after the administration of MSCs by FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) using a panel of monoclonal anti-mouse antibodies: FOXP3 (PE) Nr. ab45122 (Abcam, England); CD4 (FITC) Nr. 553729 and CD25 (PE) Nr. 553075 (Becton Dickinson) according to the manufacturers' instructions. The control

samples contained non-immune FITC or PE labelled monoclonal antibodies of the same antigen isotypes. Obtained cytofluorimetric data were statistically processed using the WinMDI 2.8 software (J. Trotter, The Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA).

#### *Statistical analysis*

The obtained results were evaluated using the nonparametric Mann-Whitney test. . Statistical processing was performed using the Excel software (Microsoft, USA).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

One of important criteria of GVHD is splenomegaly, which intensity could be characterized with the splenic index (SI), referred also as the GVHD index [14]. As Fig. 1 shows, the SI was not significantly changed in the recipients of syngeneic bone marrow (syngeneic control) and was 1.4 times increased in animals with allomyelograft, that confirmed the GVHD development. Administering the MSCs to the animals with the induced pathology regardless of the substrate whereon they were cultured, resulted in a statistically significant reduction of SI value if compared to untreated animals. This reduction was mostly expressed in animals treated with MSCs grown on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (MSCa). The index in these animals decreased to the level of the intact and syngeneic controls. This fact indicated that Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> grown MSCs gained an additional immune modulating activity compared to those grown on non-coated glass (MSCg).

Treg lymphocytes, in particular firstly described by S. Sakaguchi et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, play an important role in suppression of any form of immune aggression [16]. However, there is still no consensus about the concurrence of Treg pool and the cells with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> phenotypes as well as manifestation of immune suppressive activity [17]. It is widely accepted that intracellular protein Foxp3 is the most specific Treg marker, determining their suppressor function. Nevertheless there is still

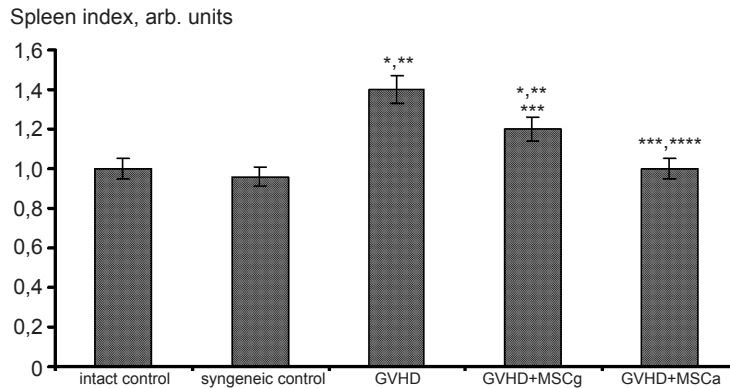


Fig. 1. Spleen index in recipients with GVHD before and after the injection of MSC grown on different substrates. The data are mean  $\pm$  SD. The differences are statistically significant relative to intact control (\*); syngeneic control (\*\*); group with GVHD (\*\*\*), between groups with injection of MSC (\*\*\*\*),  $P < 0.05$

the question if this marker is unique, and the screening for other marker molecules is ongoing.

Fig. 2 demonstrates that the indices of FOXP3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in spleens of intact animals were close. In the recipients of syngeneic bone marrow the content of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells did not statistically and significantly differ from intact control and that of FOXP3<sup>+</sup> cells reduced in 1.2 times. This fact can testify about higher sensitivity of FOXP3<sup>+</sup> cells to irradiation and bone marrow transplantation even if no immune conflict developed.

In the animals with developed GVHD the contents of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> cells

were correspondingly 1.5 and 2.1 times lower versus syngeneic control (Fig. 2). This was in accordance with the data of other scholars [10], demonstrated also the reducing Treg during GVHD development.

Application of MSCs cultured on non-coated glass significantly increased the content of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> cells in the GVHD recipient spleens if compared with the indices of untreated animals ( $P < 0.05$ ). Moreover, the content of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells even reached the control level. There was other situation after administering the MSCs cultured on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nano-coating. In that case the MSCs demonstrated

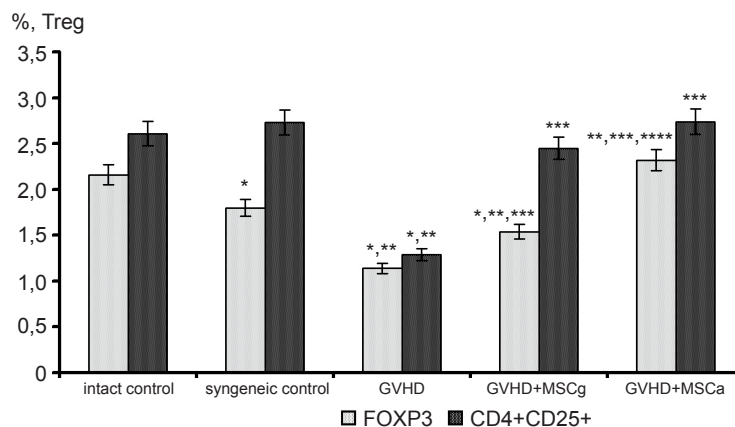


Fig. 2. Content of FOXP3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in spleens of recipients with GVHD before and after injection of MSC grown on different substrates. The data are mean  $\pm$  SD. The differences are statistically significant relative to intact control (\*); syngeneic control (\*\*); group with GVHD (\*\*\*), between groups with injection of MSC (\*\*\*\*),  $P < 0.05$



more profound stimulating effect for both Treg subpopulations: a significant increase was found in the content of both CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> cells (by 2.02 and 2.12 times, respectively, if compared with untreated animals). There was no significant differences in both indices from intact control, and the content of FOXP3<sup>+</sup> cells even exceeded the value of syngeneic control group ( $P < 0.05$ ). The concentration of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells was 1.2 times higher than for FOXP3<sup>+</sup> in this group of animals as well as in intact control. These results highlight the fact that although the two subpopulations with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> phenotypes are considered as Treg their origin could be slightly different. The culture of MSCs on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nano-coating provided their higher immune modulatory activity, including the activation of both studied Treg subpopulations.

One of the clinical signs of GVHD development in animals is a body weight reducing. In our case, this index in untreated animals was reduced by almost 30% by the end of the observation period (Fig. 3). Body weight in recipients of other groups decreased till day 7 and then increased. The most pronounced restoration of the index was found after introducing MSCa to the GVHD recipients: the intact control level was reached to the end of second week of observation.

Integral index of the GVHD severity is the survival of recipients (Fig. 4). The mass death of untreated animals began from day 4 after GVHD induction. Less than 25% of the animals survived to day 14 in the untreated group.

The severity of the immune conflict and consequent death of the animals in other groups depended on the type of MSCs used for treatment. Introduced MSCs grown on glass with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> coating showed an advantage over the non-coated-glass-grown MSCs: the survival rate of recipients with GVHD to day 14 following introduction was higher by 52 and 41.7% than in non-treated animals, respectively. Moreover, the first deaths in the animals which were transplanted with MSCa were observed only after day 11, while in animals treated with MSCg these were after day 7. The survival rate in the group of animals with the introduced MSCa had no significant difference from the syngeneic control, that could show the minimization of immune conflict in this case. Indeed, the survival of the animals with GVHD after administration of both types of MSCs is in a line with the data characterizing the features of the Treg cell content (see Fig. 2). In particular, their more intensive formation in the MSCa treated group was accompanied by less pronounced loss of animals. To day 14 in the animals with MSCa higher percentage of Treg and evidently their activity

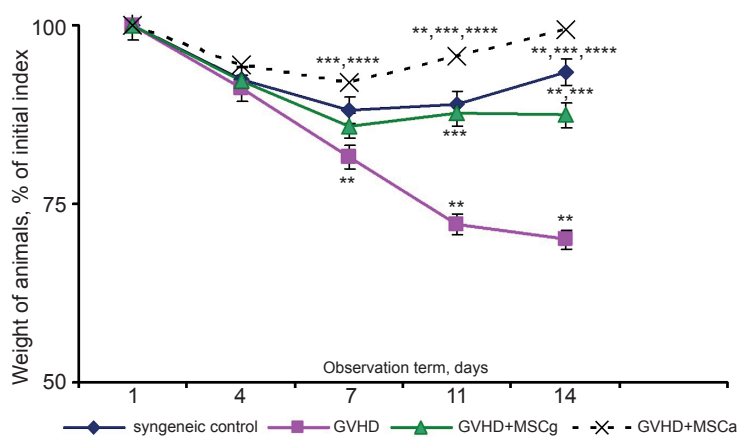


Fig. 3. Weight of animals with GVHD before and after injection of MSC, grown on different substrates. The data are mean  $\pm$  SD. The differences are statistically significant relative to intact control (\*); syngeneic control (\*\*); group with GVHD (\*\*\*), between groups with injection of MSC (\*\*\*\*),  $P < 0.05$

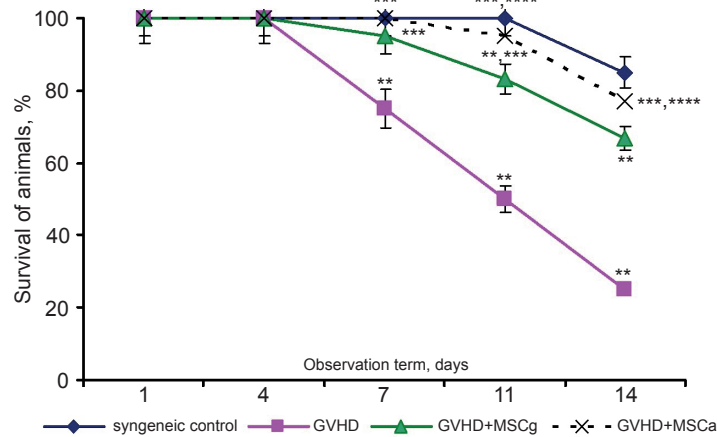


Fig. 4. Survival of animals with GVHD before and after treatment with MSC, grown on different substrates. The differences are statistically significant relative to intact control (\*); syngeneic control (\*\*); GVHD with groups after MSC injection (\*\*\*), between groups with injection of MSC (\*\*\*\*),  $P < 0,05$

in a greater extent suppress the effect of donor's immune competent cells while minimizing the animals' death in this group.

Disbalance in the content of regulatory cells during GVHD [17] in addition to the immune system dysregulation causes hematopoietic disorders [18]. In this regard, it is important to search methodological approaches to minimize this pathology development. Previously we have experimentally confirmed the possibility of reducing the immune reactivity of allogeneic bone marrow by means of cryopreservation using certain protocols [19], which selectively altered the composition of the immune competent cell subpopulations and the whole state of myelotransplant. However, cryopreservation is known to reduce the hematopoietic potential of the transplant. An alternative to minimize the GVHD symptoms is co-transplantation of allogeneic bone marrow with cells possessing an immune modulating effect. Well-known is the immune modulating activity of MSCs [4,8]. In addition, fetal tissues were shown to have an immune regulatory activity. The ability of cryopreserved and non-frozen fetal liver and placenta cells to modulate the immune state of the animals with various types of experimental autoimmune diseases was demonstrated [20]. MSCs occurred to be the main part of these cells

exhibiting such an activity. The adult MSCs are increasingly being used in clinical trials too [4]. Adult BM stroma contains a small amount of MSCs, which could be expanded in culture *in vitro* and reveal the ability to differentiate into osteo-, adipo- and chondrogenic directions [5]. About 10 years ago the MSCs grown *in vitro* were used for treatment of immune conflicts, particularly GVHD [5]. It was shown that the long-term *in vitro* culturing significantly reduced the multilinear differentiation and homing potential of MSCs [6].

To date, the scholars showed the possibility to control the functional state of cells by modifying the nanocomposite coated surfaces used for their culture [21,22]. Experiments in fibroblasts and macrophages grown on the matrix carriers (titanium and its alloys, niobium, stainless steel, polymers) showed an important role of material surface peculiarities (relief, hydrophobic and hydrophilic characteristics, chemical composition) which determine structural and functional characteristics of the cells [23]. Some researches were focused on the effect of a surface energy of different coatings, its dispersion and polar features rendered on cell cultures [24]. For example, high surface energy and coatings' fractional polarity were demonstrated to stimulate a fibroblast proliferation. Modification of



the substrate surface ultrastructure entailed the development of the cascade of reactions leading to re-programming the intracellular signaling systems. The surface properties of biomaterials could influence gene expression [21]. The changes in expression of many genes involved into implementation of focal adhesion were found in osteoblasts, cultured on the titanium polymers with different surface; in particular, the genes encoding the growth factors, cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6); cell cycle and apoptotic processes were also affected. Kato S. et al. [25] reported the altered gene expression of oncosuppressor p53 and protooncogenes c-fos, c-myc, depending on the various hydrophobicity of biocoating surface.

Our preliminary studies for MSCs culturing involved the Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oxide coatings. Their application enabled to enrich during two passages the total bone marrow pool with the cells possessing MSCs markers, and the expression rate of *ido* gene transcripts in the cells as well [13,26]. These findings have confirmed the effect of the culture surface coating on MSCs' functional potential, in particular, the IDO production, determining an immune suppressive activity of these cells.

This research assessed an immune suppressive potential of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oxide coating-grown MSCs using the GVHD model. Collectively, the application of the oxide nanocoating resulted in a rise of stimulating activity of MSCs in respect of T-regulatory immunity link of the recipient mice and reduced GVHD activity of allogeneic bone marrow.

The formation of Treg cells and manifestation of their suppressor function actively involve the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [27]. An important role here is played by the stromal stem elements, primarily by MSCs. Our previous findings showed a decrease in the expression rate of *tgfb* gene in the cells of recipient lymphohemopoietic complex during the local GVHD development [28]. This could be one of pathogenetically significant factors of this pathology development and the validate using

of MSCs with determined functional potential in the therapy.

It is important to note that Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocoating-cultured MSCs had not only quantitative immune modulating features but gained also qualitative ones. Treatment of GVHD animals with the MSCs cultured on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocoating unlike the non-coated glass had the effect of "harmonized" rise in the content of Treg subpopulations: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> cells. Exactly after introducing MSCs cultured on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> the GVHD severity decreased and the survival rate of animals significantly increased.

The obtained results could be the basis to develop the new approaches for improving the GVHD treatment using the nanocoating-cultured MSCs, purposefully altering their structural and functional properties.

## CONCLUSIONS

Culturing of mesenchymal stromal cells in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocoating contributes to an increase of their immune modulating activity.

Application of MSCs grown on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocoating when treating the graft-versus-host disease (GVHD) in a greater extent than those grown on glass provide the rise of Treg cells in the recipients. In this case the severity of GVHD course has been shown to reduce that was manifested in an increased survival of the animals.

## Acknowledgments

This work was supported by the STCU grant Nr. 4974.

**А.Н. Гольцев<sup>1</sup>, И.В. Рассоха<sup>1</sup>, Т.Г. Дубрава<sup>1</sup>,  
Л.В. Останкова<sup>1</sup>, М.В. Останков<sup>1</sup>,  
В.И. Сафонов<sup>2</sup>, А.В. Зыкова<sup>2</sup>**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЕЗНИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ, ВЫРАЩЕННЫМИ НА ОКСИДНЫХ НАНОПОКРЫТИЯХ**

Снижение иммуноагрессии аллогенного костного мозга в виде болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ)

предусматривает необходимость подавления эффекторных и/или активации Т-регуляторных клеток (Treg). Экспериментально подтверждена возможность решения такой задачи путем совместной трансплантации с аллогенным костным мозгом мезенхимальных стромальных клеток (МСК). В нашей работе продемонстрировано повышение иммунокорригирующего эффекта МСК путем их культивирования *in vitro* на оксидном нанопокрывании  $Al_2O_3$ . При их введении животным с БТПХ наблюдалось увеличение содержания Treg в селезенке реципиентов костного мозга, снижение тяжести течения патологии, следствием чего было повышение выживаемости животных. Полученные результаты являются основанием для разработки новых подходов к оптимизации методов лечения БТПХ с помощью МСК, культивированных на оксидных нанопокрованиях.

Ключевые слова: нанопокрования; мезенхимальные стромальные клетки; болезнь «трансплантат против хозяина».

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ, Харьков, e-mail: cryopato@gmail.com;

<sup>2</sup>Национальный научный центр «Харьковский физико-технический институт» НАНУ, Харьков.

**А.М. Гольцев<sup>1</sup>, І.В. Рассоха<sup>1</sup>, Т.Г. Дубрава<sup>1</sup>,  
Л.В. Останкова<sup>1</sup>, М.В. Останков<sup>1</sup>,  
В.І. Сафонов<sup>2</sup>, А.В. Зикова<sup>2</sup>**

## **ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТЕРАПІЯ ХВОРОБИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИ ХАЗЯЇНА» МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СТРОМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ, ВИРОЩЕНИМИ НА ОКСИДНИХ НАНОПОКРИТТЯХ**

Зниження імунореакції алогенного кісткового мозку у вигляді хвороби «трансплантат проти хазяїна» (ХТПХ) передбачає необхідність пригнічення ефекторних і / або активації Т-регуляторних клітин (Treg). Експериментально підтверджена можливість вирішення такого завдання за допомогою сумісної трансплантації з алогенним кістковим мозком мезенхімальних стромальних клітин (МСК). У нашій роботі продемонстровано підвищення імунорегулюючого потенціалу МСК їх культивуванням *in vitro* на оксидному нанопокритті  $Al_2O_3$ . При їх введенні тваринам з ХТПХ спостерігалось збільшення вмісту Treg у селезінці реципієнтів кісткового мозку, зниження важкості перебігу патології, наслідком чого було підвищення виживання тварин. Отримані результати є підставою для розробки нових підходів до оптимізації методів лікування ХТПХ за допомогою МСК, культивованих на оксидних нанопокриттях. Ключові слова: нанопокриття; мезенхімальні стромальні клітини; хвороба «трансплантат проти хазяїна»

## **REFERENCES**

1. Shchepkina E A, Kruglyakov P V, Solomin L N, Zaritskiy Yu A, Nazarov V A, Viyde, et.al. Clinical experience with

transplantation of autologous mesenchymal stem cells in the treatment of false joints of long bones. *Trauma*. 2007; 8 (3):22-30. [Russian].

- Sullivan M P, McHale K L, Parvizi J, Mehta S. Nanotechnology: current concepts in orthopaedic surgery and future directions. *Bone Joint J* 2014; 96 (5): 569-73.
- Webster T J. Nanomedicine: what's in a definition? *Nanomedicine*. *Int J Nanomedicine*. 2006; 1(2):169-76.
- Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J. et.al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2006; 21(8):1733-38.
- Sergeev N S, Sviridov I K, Kirsanov V A, Akhmedova S A, Marshutina N V, Sergeev. In vitro study of parameters of the growth and differentiation of mesenchymal stromal cells of rat bone marrow in experiments in vitro. *Cell Techn Biol Med*. 2006;2: 102-7. [Russian].
- Lee RH, Hsu SC, Munoz J, Jung JS, Lee NR. A subset of human rapidly-self renewing marrow stromal cells (MSCs) preferentially engraft in mice. *Blood*. 2006;107(5):2153-61.
- Goltsev AN, Rassokha IV, Dubrava TG, Ostankova LV, Ostankov MV, Gordienko EA. et.al. Application of nanocomposite coatings for multipotent mesenchymal stromal cells cultivation technologies. *Cell Transplantol Tis Engin*. 2013;8(1):46-50. [Ukrainian].
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et.al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-86. PubMed PMID: 18468541.
- Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath B.C, Cavener DR, Vacca C. et.al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor z-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol*. 2006;176(11):6752-61.
- Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Phelps ML, Shin T, Matsui EC. et.al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood*. 2004;104(7):2187-93.
- Sándor S, Tamás K, Katalin M, Tibor T.G, Zoltán S, John V. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan catabolism accelerates collagen-induced arthritis in mice. *Arthr Res Ther*. 2007 9:R50.
- IDO-dependent immune modulating activity of cryopreserved fetal liver mesenchymal stem cells of mice in GVHR model Goltsev A., Dubrava T., Dimitrov A. Збірник Тез 4-го з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (17-20 вересня 2014, м. Ужгород), с. 83. [Ukrainian].
- Safonov V, Zykova A, Smolik J, Rogovska R, Donkov N, Goltsev A et.al. Nanoscale biomaterial interface modifications for advanced tissue engineering applications. *J Phys*. 2012; Conf. Ser. 356:012046 doi: 10.1088/1742-6596/356/1/012046.
- Shevelev, A.S. (1976) Graft versus host disease and transplantation disease. Moscow: "Meditsina". [Russian].

15. Donkov N, Zykova A, Safonov V, Smolik J, Rogowska R, Luk'yanchenko V. Formation of modern bearing surfaces by ceramic coating deposition for micro-bearing and biomedical applications. *Rom Rep Phys*. 2014;66(4):1180-8.
16. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005;(6): 345-52.
17. Yarin AA. Natural regulatory T-cells and the factor FOXP3. *Immunologiya*. 2006;(3):176-88.
18. Hirohata S. Role of bone marrow in pathogenesis rheumatoid arthritis. *Cur Rheum Rev*. 2006;(12):47-54.
19. Goltsev AN, Lutsenko ED, Ostankova LV, Dubrava TG, Opanasenko EV. Application of cryobiology in solving immune-conflict problems when grafting a histocompatible bone marrow. *Probl Cryobiol*. 1996; (2):3-10. [Ukrainian].
20. Goltsev AN. Experimental research as substantiation of the possibility of stem cell therapy in clinical practice. Col. of papers "Survival strategy in the context of bioethics, philosophy and medicine". Moldova, Kishinev: "Medit-sina". 2014; 20(4):224-7. [Ukrainian].
21. Ku CH, Browne M, Gregson PJ, Pioletti DP. Large-scale gene expression analysis of osteoblasts cultured on three different Ti-6AL-4V surface treatments. *Biomaterials*. 2002;23(21):4193-202.
22. Diener A, Nebe B, Uthen F, Becker P, Beck U, Neumann G. et.al. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials*. 2005;26(4):383-92.
23. Deligaianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation, and detachment strength. *Biomaterials*. 2001; 22 (1):87-96.
24. Zykova A, Safonov V, Virva O, Luk'yanchenko V, Walkowich J, Rogowska R. et.al. Surface parameters modification by multilayer coatings deposition for biomedical applications. *J Phys Conf Ser*. 2008; IOP Publishing. (113):15-9.
25. Kato S, Akagi T, Sugimura K, Kishida A, Akashi M. Evaluation of biological responses to polymeric by RT-PCR analysis IV: study of cmyc, c-fos and p53 mRNA expression. *Biomaterials*. 2000;(21):521 -7.
26. Goltsev AN, Rassokha IV, Dubrava TG, Ostankova LV, Ostankov MV, Gordienko. et.al. Application of nanocomposite coatings with different structural physical and chemical characteristics in tissue engineering. *J Nan Electr Phys*. 2013;5(1): 01008 (5pp).
27. Sugita S, Futagami Y, Hori S, Mochizuki M. Transforming growth factor producing FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells by iris pigment epithelial cells display regulatory phenotype and acquire regulatory functions. *Exp res*. 2007;85(5):626-36.
28. Goltsev AN, Dubrava TG, Lutsenko ED, Ostankova LV, Matsevitaya IYu, Ostankov V. et.al. Manifestation of immune correcting effect of cryopreserved cells of fetal liver of different gestation terms under development conditions of experimental model of graft versus host reaction. *Cel transplant tis engineer*. 2010;5(3):82-6. [Ukrainian].

*Received 18.04.2016*

# Аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при короткотривалій депресії та полегшенні синаптичної передачі

О.П. Колесник, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця, НАН України, Київ; e-mail: mizerna\_oksana@ukr.net

*У культивованих нейронах гіпокампа щурів вимірювали зміни амплітуди викликаних парних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) методикою фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» та позаклітинної локальної електричної стимуляції аксона пресинаптичного нейрона. У досліджених 43 нейронах спостерігалися депресія або полегшення синаптичної передачі. Згідно з аналізом коефіцієнта варіації (CV) вГПСС було розраховано, що при депресії синаптичної передачі CV другої відповіді у парі більше за CV першої на 57 % (n = 26), а при полегшенні – менше на 27 % (n = 17). Таким чином, короткотривала депресія та полегшення, що ми спостерігали, зумовлені тільки пресинаптичними механізмами. Використовуючи біноміальний розподіл з'ясували, що в умовах нашого експерименту ймовірність вивільнення ГАМК при першому і другому стимулах є 100% і незмінною як при депресії, так і при полегшенні. Для першої відповіді у парі середнє значення квантового вмісту та число місць вивільнення везикул збігалися і, відповідно, дорівнювали 9,7 при депресії та 5 при полегшенні синаптичної передачі. Для другого стимулу вони зменшилися на 28 і 26% порівняно з початковими значеннями при депресії та збільшилися на 14 і 11% при полегшенні відповідно. Отже, існує вірогідна різниця квантових показників, що характеризують вивільнення ГАМК при короткотривалій депресії та полегшенні синаптичної передачі.*

*Ключові слова: депресія та полегшення ГАМК-ергічної синаптичної передачі; міжстимульний інтервал; коефіцієнт варіації.*

## ВСТУП

Пластичність, зумовлена попередньою активацією синапсів, проявляється в зміні ефективності цієї передачі. Однією з її форм є короткотривала пластичність при парній стимуляції. Повторна стимуляція пресинаптичного нейрона призводить до зміни певних квантових показників вивільнення медіатора, що відображається на амплітуді наступного викликаного постсинаптичного струму, тобто призводить до депресії або полегшенні синаптичної передачі. Вважають, що ці явища є результатом численних клітинних механізмів, які можуть включати як пресинаптичні, так і постсинаптичні події. Найбільш поширеним пресинаптичним механізмом депресії вважають зменшення

кількості вивільненого нейромедіатора, що може відображати спустошення пулу готових до вивільнення везикул [1–3] та зменшення ймовірності вивільнення медіатора [4, 5]. Полегшення при парній стимуляції традиційно пов'язують з гіпотезою про залишковий кальцій, згідно з якою невелика його кількість, що потрапила до терміналі внаслідок першого потенціалу дії збільшує ймовірність вивільнення медіатора під час другого потенціалу дії [3]. Ці властивості синаптичної передачі можуть бути описані з використанням стандартної квантової моделі. Відповідно до теорії квантового викиду, вивільнення медіатора відбувається квантами і має ймовірнісний характер. Таким чином, амплітуда постсинаптичної відповіді відображає суму квантів медіатора з усіх місць вивільнення в

© О.П. Колесник, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

синапсі. Отже, найважливішими показниками викликаної синаптичної події є: ймовірність вивільнення квантів медіатора, число місць вивільнення везикул і їх квантовий вміст. У гіпокампі екзоцитоз ГАМК підпорядковується біноміальній статистиці [6].

Метою цієї роботи було з'ясувати локалізацію механізмів, які лежать в основі короткотривалої ГАМК-ергічної пластичності між культивованими нейронами гіпокампа та провести порівняльний аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при депресії та при полегшенні синаптичної передачі.

## МЕТОДИКА

Експерименти проводили при кімнатній температурі на культивованих протягом 14–30 діб нейронах гіпокампа, який виділяли з головного мозку новонароджених щурів лінії Вістар. Відведення викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) від клітин проводили в режимі фіксації потенціалу в конфігурації „ціла клітина” при підтримуваному потенціалі  $-50$  мВ. Потенціал спокою всіх клітин знаходився у межах від  $-50$  до  $-60$  мВ. Розчин для заповнення відвідної скляної піпетки вміщував (ммоль/л): глюконат калію – 155,  $MgCl_2$  – 2, EGTA – 10, NEPES – 20; рН 7,4 (KOH). До зовнішньоклітинного розчину входили (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3,  $CaCl_2$  – 2,  $MgCl_2$  – 2, глюкоза – 30, NEPES – 20; рН 7,4 (NaOH); до цього розчину додавали також блокатори збуджувальної нейрореддачі  $D_L$ -AP5 (20 мкмоль/л) і DNQX (20 мкмоль/л). Установка для реєстрації іонних струмів була зібрана на базі інвертованого мікроскопа. Піпетки для відведення струмів і стимуляції (діаметр отвору 1 мкм, опір 6–9 МОм) витягували із боросилікатного скла („WPI”, США). Сигнали попередньо пропускали через високочастотний фільтр Бесселя (2 кГц) і були оцифровані з частотою  $10^4$  с<sup>-1</sup>. Локальну електричну стимуляцію проводили за допомогою приладу з ізольованим виходом ISO-Flex („AMPI”, Ізраїль). Для цього вико-

ристовували піпетки, заповненні зовнішньоклітинним розчином та підведені під візуальним контролем у безпосередню близькість до аксона, що утворював гальмівні синаптичні контакти на досліджуваній постсинаптичній клітині. Амплітуду сили струму підбирали таким чином, що після кожної стимуляції ми реєстрували відповідь у вигляді постсинаптичного струму. Період між першою парою стимулів і наступною був 3 с. Для аплікації фармакологічних речовин застосовували методику швидкої локальної перфузії [7]. Обробку і аналіз результатів виконували за допомогою програмних пакетів „Clampfit 9.0” („Axon Instruments” США) та „OriginPro 8.5”. Для знаходження квантових показників вивільнення медіатора використовували біноміальним розподіл:  $I \cdot CV_{вГПСС}^2 = q \cdot (1 + CV_q^2 - P)$ , де  $I$  – середня амплітуда вГПСС,  $CV_{вГПСС}$  – коефіцієнт варіації вГПСС,  $q$  – розмір кванта,  $CV_q$  – коефіцієнт варіації мініатюрних вГПСС (мГПСС),  $P$  – ймовірність вивільнення ГАМК з пресинаптичного закінчення.

Усі результати наведені як середні значення  $\pm$  середньоквадратична похибка середнього; у дужках зазначено розмір вибірки у межах якої проводили усереднення. Для визначення статистичної вірогідності різниці між середніми значеннями двох груп даних було використано критерій  $t$  Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Першочергово була досліджена іонна природа вГПСС. Аплікація селективного антагоніста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів бікукуліну метоброміду в концентрації 20 мкмоль/л майже повністю (на  $91 \pm 1\%$ ,  $n = 3$ ) пригнічувала амплітуду вГПСС. Ефект зменшення був вірогідним і оборотним. Значення амплітуд вГПСС лінійно залежали від підтримуваного потенціалу на мембранах постсинаптичних нейронів ( $R^2 \geq 0,99$ ) [8]. Розрахований за вольт-амперними характеристиками потенціал реверсії для цих струмів дорівнював  $-90,36 \pm 3$  мВ ( $n = 4$ ) і відповідав рівноважному потенціалу



для хлору, розрахованому за рівнянням Нернста. Такі характеристики вказували на те, що зареєстровані струми опосередковували ГАМК<sub>A</sub>-рецептори.

Для дослідження пластичності ГАМК-ергічних вГПСС аксон пресинаптичної клітини стимулювали парними імпульсами, що наносили з інтервалом 150 мс. Під час цього спостерігалось накладання другої відповіді на пізні компоненти першої. Тому амплітуда другого вГПСС у парі визначалася за допомогою процедури віднімання пізніх компонентів першого струму від запису другого. Період між першою парою стимулів і наступною був 3 с. Цей час вважають достатнім для повного відновлення першого вГПСС.

Як кількісну міру синаптичної пластичності було обрано коефіцієнт парної стимуляції (КПС), котрий обчислювали як відношення амплітуди другого вГПСС ( $A_2$ ) у парі до першого ( $A_1$ ). Для виключення впливу

постсинаптичних механізмів на короткочасну зміну ефективності синаптичної передачі ми змінювали електрохімічний градієнт для іонів хлору та одночасно реєстрували вГПСС. Отримані результати з 12 клітин дають можливість зробити висновок, що значення КПС не залежали від підтримуваного потенціалу на мембрані постсинаптичного нейрона (рис. 1, а, б).

Тому були проведені експерименти для встановлення пресинаптичних факторів, якими може бути зумовлена ефективність ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Досліджені нами нейрони при подразненні пресинаптичного аксона парою стимулів з інтервалом 150 мс демонстрували як явище депресії (КПС <1), так і полегшення (КПС >1; рис. 2, а, б).

Відповідно до біноміальної моделі синаптичної передачі, непрямим методом визначення пре- або постсинаптичних факторів є

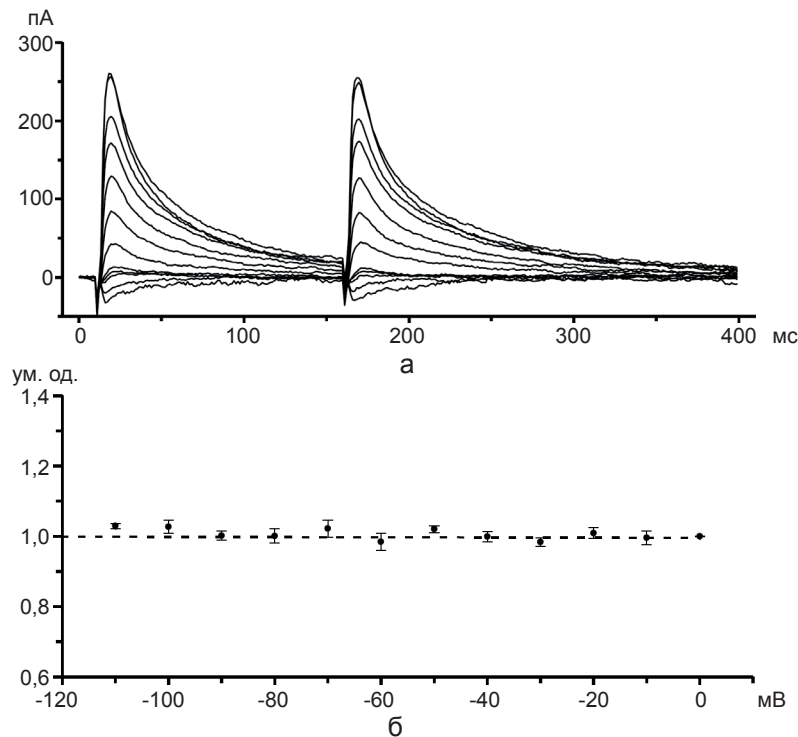


Рис. 1. Залежність коефіцієнта парної стимуляції (КПС) від підтримуваного потенціалу на мембрані постсинаптичної клітини: а – приклади реєстрації усереднених парних викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) при різному підтримуваному потенціалі. Усереднення проводили за 10 послідовними вГПСС; б – залежність КПС від підтримуваного потенціалу на мембрані постсинаптичної клітини. За 1 прийнято значення КПС при підтримуваному потенціалі 0 мВ



вивчення зміни коефіцієнта варіації амплітуд постсинаптичних струмів (CV). Він визначається як відношення стандартного відхилення амплітуд до усередненого їх значення. При пластичності синаптичної передачі, залежно від пре- або постсинаптичних механізмів, що беруть у цьому участь, може спостерігатися два випадки: квадрат відношення коефіцієнтів варіації першої відповіді ( $CV_1$ ) у парі до другої ( $CV_2$ ) може збільшуватися або зменшуватися так само, як і коефіцієнт парної стимуляції [9–11]. Для парних вГПСС, при

яких спостерігалось явище короткотривалої пластичності синаптичної передачі, були побудовані відношення  $(CV_1/CV_2)^2$  до КПС (див. рис. 2, в, г). Нами було розраховано усереднене значення, що відображається у вигляді точки. При явищі депресії вона лежить нижче від діагоналі і має координати  $(0,7 \pm 0,02; 0,52 \pm 0,04; n = 26)$ , а при полегшенні – вище від діагоналі і має координати  $(1,15 \pm 0,03; 1,56 \pm 0,19; n = 17)$ . Для цих же нейронів було розраховано, що при депресії  $CV_2$  вірогідно більше за  $CV_1$  на  $57 \pm 16 \%$ ,

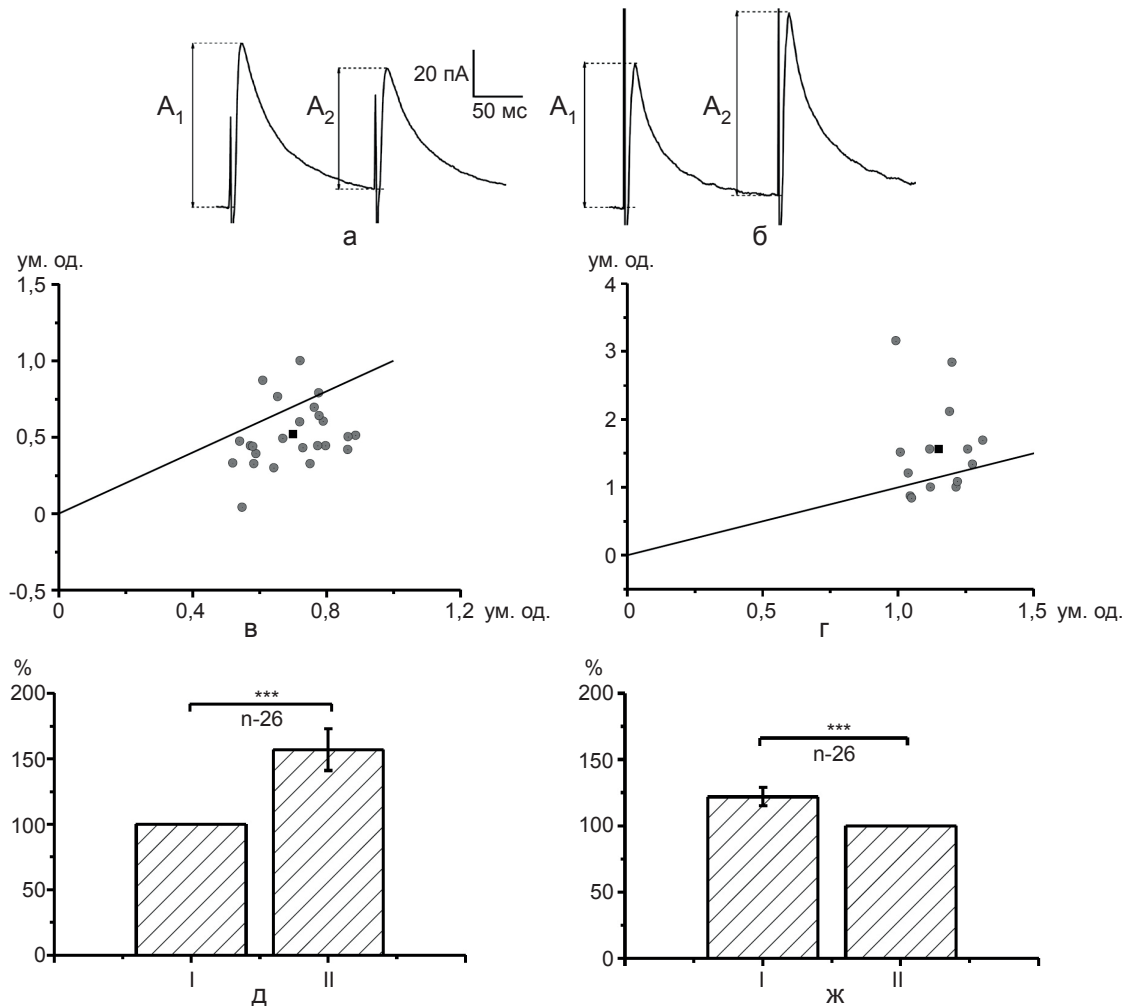


Рис. 2. Аналіз коефіцієнта варіації струмів (CV) при депресії та полегшенні синаптичної передачі: а, б – приклад реєстрації депресії та полегшення синаптичної передачі.  $A_1$  та  $A_2$  - амплітуди першого та другого викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) у парі; в, г – залежність квадрата відношення коефіцієнтів варіації першої відповіді у парі до другої від коефіцієнта парної стимуляції при депресії та полегшенні синаптичної передачі відповідно; д, ж – гістограма, що показує нормовані усередненні значення CV при депресії та полегшенні синаптичної передачі відповідно. I - CV першого вГПСС, II - CV другого вГПСС. За 100 % прийнято значення CV першого вГПСС. \*\*\* $P < 0,001$

а при полегшенні - менше на  $22 \pm 7 \%$  (рис. 2, д, ж). Згідно з цією теорією, короткотривала депресія та полегшення, що ми спостерігали, зумовлені пресинаптичними механізмами.

мГПСС та спонтанні ГПСС (сГПСС) відводили від нейронів гіпокампа при підтримуваному потенціалі - 50 мВ за наявності в зовнішньоклітинному розчині блокаторів збуджувальної нейропередачі. Перші реєстрували у зовнішньоклітинному розчині, що містив 0,5 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , 10 ммоль/л  $\text{Mg}^{2+}$  та 0,25 мкмоль/л тетродотоксину. Такі умови реєстрації сприяли зниженню ймовірності викиду ГАМК. Амплітудні розподіли мГПСС, як правило, були унімодальними і задовільно апроксимувалися однією кривою Гауса з модою на  $13,92 \pm 0,29$  пА ( $n = 3$ ; рис. 3,а).

Амплітудні розподіли сГПСС, зареєстрованих у різних клітинах гіпокампа, демонстрували наявність 2–3, візуально ідентифікованих, піків на гістограмах, які добре апроксимувалися сумою кривих Гауса (див. рис. 3, б). В усіх випадках середня відстань між піками суміжних гаусових (нормальних) розподілів не відрізнялася від значень першої моди полімодальних амплітудних гістограм і становили у середньому  $14,22 \pm 1,7$  пА ( $n = 6$ ). Отже, згідно з аналізом сГПСС та мГПСС,

ефект вивільнення кванта ГАМК в наших експериментах дорівнює у середньому 14 пА.

Для знаходження квантових показників вивільнення медіатора використовували біноміальним розподіл. Як вже було зазначено вище, розмір кванта в наших експериментах дорівнював 14 пА ( $q$ ). Розрахований коефіцієнт варіації мГПСС становив  $0,34 \pm 0,07$  ( $\text{CV}_q$ ). Квантовий вміст (середня кількість квантів медіатора, що вивільняється на один пресинаптичний потенціал дії) розраховується як  $m = I/q$ . Ймовірність вивільнення медіатора знаходили як  $P = 1 + \text{CV}_q^2 - m \cdot \text{CV}_{\text{вГПСС}}^2$ . Біноміальний показник (число місць вивільнення везикул з медіатором) розраховується як  $N = m/P$ .

Для першої відповіді у парі середнє значення квантового вмісту було  $9,7 \pm 1,3$  і  $5,0 \pm 0,6$  відповідно при депресії ( $n = 26$ ) та полегшенні ( $n = 17$ ) синаптичної передачі. Біноміальний показник також відрізнявся при депресії та полегшенні і становив  $9,3 \pm 1,2$  та  $4,9 \pm 0,6$  відповідно. Тобто, якщо початковий квантовий вміст та число місць вивільнення везикул з ГАМК маленькі, то буде спостерігатися полегшення синаптичної передачі, якщо навпаки – то депресія. Наші результати підтверджують раніше отримані дані при дослідженні збуджувальної синаптичної пе-

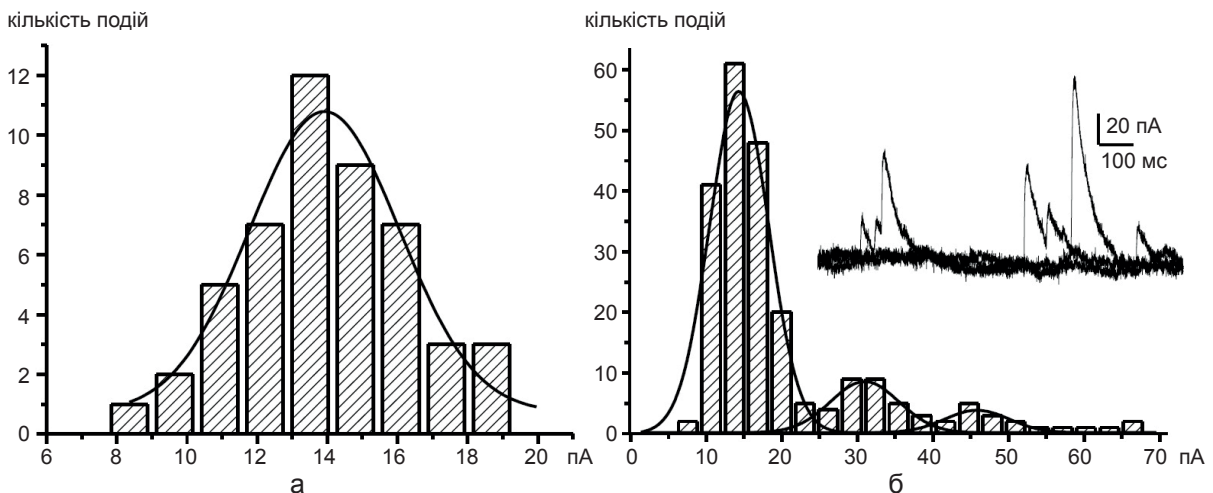


Рис. 3. Типові амплітудні розподіли мініатюрних (мГПСС) та спонтанних (сГПСС) ГАМК-ергічних струмів: а – розподіл амплітуд мГПСС та апроксимація його однією гаусіаною з максимумом на 13,9 пА; б – гістограма амплітуд сГПСС та апроксимація її трьома розподілами Гауса із модами на 14, 31 і 45 пА; на верхньому фрагменті – суперпозиція записів сГПСС. а, б : за віссю абсцис – амплітуда мГПСС та сГПСС відповідно, за віссю ординат – кількість подій

редачі між нейронами гіпокампа, що депресія синаптичної передачі при стимулюванні парою поштовхів струму, спостерігається переважно, якщо початкова амплітуда струму велика, а полегшення – коли маленька [12].

Ймовірність вивільнення медіатора була однаковою для двох цих явищ (приблизно 100%) і значення  $m$  і  $N$  збігаються, отже, в наших експериментальних умовах, на кожний стимул з усіх місць вивільнення в активній зоні вивільнюється одна везикула з ГАМК. Відомо, що при високій ймовірності вивільнення медіатора коефіцієнт варіації амплітуди струму має бути низьким [13]. Наші результати це підтверджують: у зареєстрованих струмах коефіцієнт варіації був у межах від 0,02 до 0,20.

Для парних вГПСС, при яких спостерігалось явище короточасної пластичності синаптичної передачі, був проведений порівняльний аналіз квантових показників синаптичної передачі для першого і другого стимулу (рис. 4). Очевидно, що ймовірність вивільнення ГАМК при обох стимулах є майже незмінною як при депресії, так і при полегшенні. Проте для другого стимулу зміни квантового вмісту та

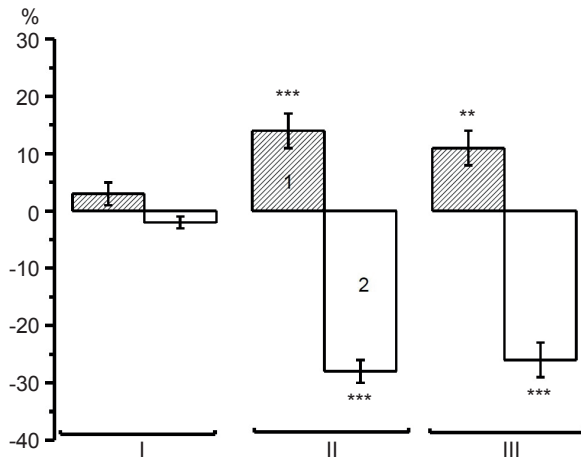


Рис. 4. Порівняльний аналіз нормованих квантових показників вивільнення ГАМК при депресії та полегшенні синаптичної передачі після першого стимулу: За 0 % прийнято нормовані значення квантових показників для першого викликаного гальмінового постсинаптичного струму у парі: 1 – полегшення, 2 – депресія: I - ймовірність вивільнення ГАМК, II - відносний квантовий вміст, III - відносний біноміальний показник. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$

числа місць вивільнення везикул є неоднаковими при явищах депресії та полегшенні. Для другого стимулу вони вірогідно зменшуються порівняно з початковими значеннями на 28 і 26% при депресії та збільшуються на 14 і 11% при полегшенні відповідно.

З наших результатів можна зробити висновок, що в культурі нейронів гіпокампа, за умов високої ймовірності вивільнення ГАМК, короткотривалу пластичність синаптичної передачі можна пояснити одночасним збільшенням (полегшення) або зменшенням (депресія) числа місць вивільнення везикул та квантового вмісту їх. Постсинаптичні фактори у цих процесах не задіяні.

О.П. Колесник, С.А. Федулова,  
Н.С. Веселовський

#### АНАЛИЗ КВАНТОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОСВОБОЖДЕНИЯ ГАМК ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ДЕПРЕССИИ И ОБЛЕГЧЕНИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

В культивированных нейронах гиппокампа крысы измеряли изменения амплитуды вызванных тормозных постсинаптических токов (вГПСТ) методикой фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» и внеклеточной локальной электрической стимуляции аксона пресинаптического нейрона. В исследованных 43 нейронах наблюдали депрессию или облегчение синаптической передачи. Согласно с анализом коэффициента вариации (CV) вГПСТ было рассчитано, что при депрессии синаптической передачи CV второго ответа в паре достоверно больше, чем CV первого на 57 % ( $n = 26$ ), а при облегчении – меньше на 27 % ( $n = 17$ ). Следовательно, кратковременная депрессия и облегчение, которые мы наблюдали, обусловлены только пресинаптическими механизмами. Используя биномиальное распределение, определили, что в условиях нашего эксперимента вероятность освобождения ГАМК при первом и втором стимулах является 100% и неизменной как при депрессии, так и при облегчении. Для первого ответа в паре среднее значение квантового содержания и число мест освобождения везикул совпали и, соответственно, были равны 9,7 при депрессии и 5 при облегчении синаптической передачи. Для второго стимула они уменьшились на 28 и на 26% при депрессии и увеличились на 14 и на 11% при облегчении соответственно. Таким образом, существует достоверная разница в квантовых показателях, которые характеризуют освобождение ГАМК при кратковременной депрессии и облегчении синаптической передачи.

Ключевые слова: депрессия и облегчение ГАМК-эргиче-

ской синаптической передачи; межстимульный интервал; коэффициент вариации.

**O.P. Kolesnyk, S.A.Fedulova, N.S. Veselovsky**

### **ANALYSIS OF QUANTAL PARAMETERS OF GABA RELEASE DURING SHORT-TERM DEPRESSION AND FACILITATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION**

Changes in amplitudes of evoked inhibitory postsynaptic currents (eIPSCs) from rat cultured hippocampal neurons were studied using whole-cell patch-clamp technique in postsynaptic neuron and local extracellular electrical paired pulse stimulation of single presynaptic axon. Paired pulse depression (PPD) and paired pulse facilitation (PPF) were observed in studied 43 neurons. According to coefficient of variance (CV) analysis was found that CV of second respond was significantly larger than CV first by 57 % (n = 26) during depression and significantly smaller by 27 % (n = 17) during facilitation. Thus, only presynaptic mechanism underlies short-term depression and facilitation. We also estimated quantal parameters assuming that transmitter release is reasonably described by a binomial distribution. We found that under our experimental conditions there were no significant changes in GABA release probability during PPD and PPF. The values of mean quantal content and mean number of sites of transmitter release were the same for first stimulus in pair and were equal 9.7 in depression and 5 in facilitation of synaptic transmission. The values both of them for second stimulus were significant decreased by 28 and 26% during PPD and were significant increased by 14 and 11% during PPF, respectively. Thus, there is significant difference in quantal parameters characterizing GABA release during short-term depression and facilitation of synaptic transmission.

Key words: PPD and PPF of GABAergic synaptic transmission; interstimulus interval; coefficient of variation.

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: mizerna\_oksana@ukr.net*

### **REFERENCES**

1. Jensen K, Lambert JD, Jensen MS. Activity-dependent depression of GABAergic IPSCs in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 1999; 82: 42-9.
2. Wu LG, Borst JG. The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron.* 1999; 23: 821-32.
3. Zucker RS., Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *An Rev Physiol.* 2002; 64: 355-405.
4. Dobrunz LE and Stevens CF. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron.* 1997; 6: 995-1008.
5. Wilcox KS, Dichter MA. Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA<sub>B</sub> autoreceptor activation. *J Neurosci.* 1994; 14: 1775-88.
6. Fedulova SA, Veselovsky NS. Quantal GABA release in hippocampal synapses: role of local Ca<sup>2+</sup> dynamics within the single terminals. *Eur J Pharmacol.* 2002; 2/3: 163-71.
7. Veselovsky N S, Engert F, Lux H D. Fast local superfusion technique. *Pflug Arch.* 1996; 432: 351-4.
8. Mizerna OP, Fedulova SA, Veselovsky MS. Effect of thapsigargin on inhibitory synaptic transmission between cultured neurons of the rat hippocampus. *Neurophysiology.* 2007; 39(4-5): 374-6.
9. Faber DS, Korn H. Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys. J.* 1991; 60: 1288-94.
10. Larkman A, Hannay T, Stratford K, Jack J. Presynaptic release probability influences the locus of long-term potentiation. *Nature.* 1992; 360: 70-3.
11. Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. Multiple forms of long-term plasticity at unitary neocortical layer 5 synapses. *Neuropharmacology.* 2007; 52: 176-84.
12. Debanne D, Guerineau NC, Gahwiler BH, Thompson SM. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol.* 1996; 491: 163-76.
13. Oleskevich S, Clements J, Walmsley B. Release probability modulates short-term plasticity at a rat giant terminal. *J Physiol.* 2000; 524: 513-23.

*Матеріал надійшов до редакції 18.04.2016*

# Амінокислотні залишки відповідальні за взаємодію $\alpha 1$ - гліцинових рецепторів із гінкголевою кислотою

Г.В. Малєєва<sup>1,2</sup>, С.І. Булдакова<sup>1</sup>, Г.Г. Скибо<sup>2</sup>, П.Д. Брежестовський<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут системних нейронаук, Університет Екс-Марсель, Франція,

<sup>2</sup>Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: galina\_maleeva@ukr.net

*Раніше нами було показано, що гінкголева кислота здатна вибірково потенціювати струми, опосередковані  $\alpha 1$ -субодиницями гліцинового рецептора. Наступним кроком стало проведення порівняльного аналізу амінокислотних послідовностей  $\alpha 1$ - та  $\alpha 2$ -субодиниць для встановлення амінокислотних залишків, що можуть бути відповідальні за різницю в дії гінкголевої кислоти на ці рецептори. Із використанням методу patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» нами було продемонстровано, що мутація трьох амінокислотних залишків T59/A261/A303 у  $\alpha 2$ -субодиниці, на відповідні їм з  $\alpha 1$ -субодиниці, робить  $\alpha 2$ -рецептори чутливими до потенціюючого впливу гінкголевої кислоти. Амплітуда струмів, опосередкованих  $\alpha 2$ -мутантними рецепторами, після аплікації гінкголевої кислоти збільшувалася на  $89 \pm 14\%$ . Так само, як і для  $\alpha 1$ -рецепторів, для  $\alpha 2$ -мутантних рецепторів було характерним зниження напівефективної дози для гліцину під дією гінкголевої кислоти. Таким чином, субодинична вибірковість гінкголевої кислоти пов'язана із трьома амінокислотними залишками, що є відмінними у  $\alpha 1$ - та  $\alpha 2$ -субодиницях гліцинового рецептора.*

*Ключові слова: гліциновий рецептор; гінкголева кислота; іонні струми; patch-clamp; точкові мутації.*

## ВСТУП

Гліцинові рецептори забезпечують швидку передачу гальмівного сигналу у центральній нервовій системі хребетних. Відомо, що переважно вони локалізовані у спинному мозку, сітківці, мозочку, ядрах стовбура мозку та залучені у контроль рухової діяльності, формування больових відчуттів, зорове та слухове сприйняття [1, 2].

Гліциновий рецептор належить до родини цис-петельних, що характеризуються наявністю консервативного бі-сульфідного зв'язку у зовнішньоклітинному домені. Окрім гліцинового до цієї родини також належать: нікотинівий ацетилхоліновий,  $\gamma$ -аміномасляний (ГАМК) та серотоніновий (3-го типу) рецептори. Було клоновано п'ять субодиниць гліцинового рецептора:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  та  $\beta$ , що відрізняються між собою за амінокислотним складом, локалізацією та часовим патерном експресії [3].

Функціональний гліциновий рецептор складається з п'яти субодиниць, що утворюють центральну пору каналу [4, 5]. Залежно від субодиничного складу гліцинові рецептори поділяють на дві групи: гомомерні (сформовані лише  $\alpha$ -субодиницями) та гетеромерні (сформовані  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиницями) [6, 7]. Кожна субодиниця рецептора складається із зовнішньоклітинного, чотирьох трансмембранних доменів, а також лінкерних ділянок, що їх поєднують. Другий трансмембранний домен (TM2) повернений до іонної пори каналу, решта контактують із біліпідним оточенням [8].

Гіперплексія – спадкове неврологічне захворювання, зумовлене мутаціями генів, що кодують субодиниці гліцинового рецептора. Характерним її симптомом є довготривале неконтрольоване скорочення м'язів тіла у відповідь на неочікуваний тактильний чи акустичний стимули, що може супроводжуватися мимовільним падінням

© Г.В. Малєєва, С.І. Булдакова, Г.Г. Скибо, П.Д. Брежестовський



[9]. Причиною появи симптомів гіперплексії є нездатність мутантних гліцинових рецепторів забезпечувати ефективну швидку гальмівну нейропередачу в центральній нервовій системі [10]. Значна частина гіперплексичних мутацій локалізовані у ТМ2-домені або у лінкерних ділянках, що поєднують його з іншими трансмембранними доменами (найпоширеніші гіперплексичні мутації позначено на рис.1). Амінокислотні заміни в ТМ2-домені, що визначає іонну провідність та вибірковість, порушують процес відкривання каналу. Це призводить до зменшення його провідності та амплітуди струмів, опосередкованих гліциновими рецепторами [11]. Відповідно актуальним є пошук позитивних модуляторів гліцинового рецептора, які могли б корегувати роботу мутантних рецепторів, сприяючи підвищенню ефективності гліцинергічної передачі.

Гінкголева кислота, котра входить до складу екстракту *Ginkgo biloba*, має здатність підвищувати амплітуду струму, опосередкованого  $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами, та знижувати напівнефективну дозу ( $ED_{50}$ ) для гліцину [12]. Характерною особливістю гінкголевої кислоти є субодиночна вибірковість – відсутність потенціуючої дії на  $\alpha 2$ -гліцинові рецептори.

Метою нашої роботи було, використовуючи метод *patch-clamp*, визначити амінокислотні залишки, що є ключовими для позитивної модуляції  $\alpha 1$ -субодиноць гліцинового рецептора гінкголевою кислотою.

## МЕТОДИКА

Для проведення електрофізіологічного дослідження кДНК (комплементарна ДНК)  $\alpha 2$ - та  $\alpha 2$ -мутантного гліцинових рецепторів було експресовано у СНО-К1 (*Chinese hamster ovary cells*) клітинах. Клітини висівали на покривні скельця (12-14 мм), що були розміщені всередині чашок для культивування (35 мм) із додаванням 2 мл живильного середовища. Їх трансфекували

кДНК рецептора за протоколом Lipofectamine 2000 («LifeTechnology», США) із додаванням кДНК зеленого флуоресцентного білка GFP (для полегшення ідентифікації клітин, що експресували гліцинові рецептори). Середовище для культивування замінювали через 3 год після початку трансфекції. Посттрансфекційне середовище містило 1 мкмоль/л стрихніну – для запобігання спонтанній активації гліцинових рецепторів. Електрофізіологічні дослідження проводили через 24-72 год після трансфекції.

«Patch-clamp» - реєстрації у конфігурації «ціла клітина» здійснювали за кімнатної температури (20-25°C) із використанням підсилювача ЕРС9 («НЕКА Electronic», Німеччина). Під час експерименту клітини знаходились у зовнішньоклітинному розчині, що містив (ммоль/л): NaCl – 140, CaCl<sub>2</sub> – 2, KCl – 2.8, MgCl<sub>2</sub> – 4, HEPES – 20, глюкоза – 10; рН 7,4; 320-330 мОсм. Розчин, яким було заповнено піпетки для реєстрацій, містив (ммоль/л): глюконат калію – 120, KCl – 20, CaCl<sub>2</sub> – 6, MgCl<sub>2</sub> – 2, HEPES – 10, ВАРТА/КОН – 2; рН 7,3; 290 мОсм. Для всіх реєстрацій фіксований потенціал становив 0 мВ. Піпетки для реєстрацій виготовлені з боросилікатних скляних капілярів («HarvardApparatusLtd», США), їх опір був 5-10 МОм. Для зміни розчинів використовували систему швидкої аплікації (SF 77A Perfusion Fast-Step, «Warner», США), що розміщували на відстані 40-50 мкм від досліджуваної клітини. Ця система дає змогу змінювати 10-90% розчину протягом 3-5 мс. В усіх експериментах тривалість аплікації агоніста становила 2 с, а гінкголевої кислоти варіювала від 0,5 до 2 хв.

Результати електрофізіологічних досліджень аналізували з використанням програмного забезпечення «НЕКА Electronic» (Німеччина) та «Origin 7.5» («OriginLabs», США). Для статистичної обробки результатів було використано тест ANOVA, виражали їх у середніх значеннях та стандартних похибках середнього.



## РЕЗУЛЬТАТИ

Раніше нами було показано, що гінголева кислота має здатність по-різному впливати на  $\alpha 1$ - та  $\alpha 2$ -субодиниці гліцинового рецептора [12]. Амплітуда струмів, опосередкованих  $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами, збільшувалася з  $364 \pm 49$  до  $846 \pm 135$  пА ( $n=34$ ,  $P < 0,01$ ) протягом 30 с аплікації 25 мкмоль/л гінголевої кислоти. На противагу цьому, при аплікації гінголевої кислоти на  $\alpha 2$ -гліцинові рецептори потенціалізації не спостерігалось, а висока концентрація навіть спричинила зниження амплітуди струмів на  $20 \pm 5\%$  ( $n=11$ ).

Для з'ясування механізму субодинично-вибіркової потенціюючої дії гінголевої кислоти на гліцинові рецептори ми сконцентрували свою увагу на встановленні відмінностей амінокислотних послідовностей  $\alpha 1$ - та

$\alpha 2$ -субодиниць рецептора. Провідну роль у алостеричній модуляції лігандкерованих іонотропних рецепторів відіграють зовнішньоклітинний, а також ТМ2- та ТМ3-домени [2, 13]. Аналіз амінокислотних послідовностей ТМ2- та ТМ3-доменив  $\alpha 1$ - та  $\alpha 2$ -субодиниць гліцинового рецептора, здійснений із використанням електронного каталога протеїнових сиквенсів UniProt, показав, що вони відрізняються між собою лише за двома позиціями. Амінокислотним залишкам G254, S296  $\alpha 1$ -субодиниці відповідають A261 та A303  $\alpha 2$ -субодиниці (див. рис. 1). Низкою досліджень було продемонстровано важливе значення цих залишків для формування різної чутливості  $\alpha 1$ - та  $\alpha 2$ -рецепторів до модулюючих речовин [14-16]. Зовнішньоклітинний домен характеризується високою міжсубодиничною варіабельністю, однак, раніше було показано, що залишок

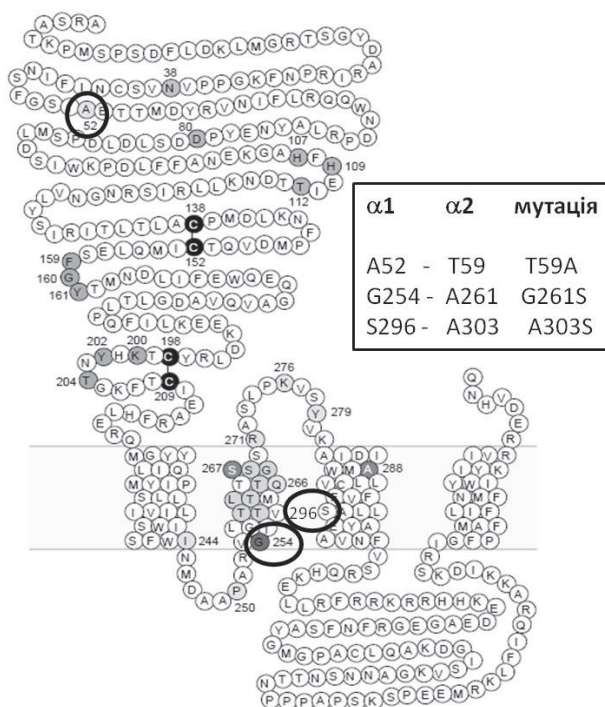


Рис. 1. Амінокислотна послідовність  $\alpha 1$ -субодиниці гліцинового рецептора. Колами виділено амінокислотні залишки, мутацію яких вивчали. Вони також представлені у вкладці справа. Амінокислотні залишки, мутація яких найчастіше стає причиною гіперплексії: I244N, P250T, Q266H, R271Q/L, K276E, Y279C; залишки, що беруть участь у зв'язуванні агоніста: F159, Y161, T204 та конкурентного блокатора (стрихніну): G160, K200, Y202; амінокислоти, що взаємодіють з іонами цинку: D80, H107, H109, T112; амінокислотні залишки що, формуючи бі-сульфідні зв'язки, утворюють дис-петлі: C138 – C152 та C198 – C209 (модифіковано з Betz and Luabe, 2006)

A52 є ключовим для позитивної модуляції  $\alpha 1$ -субодиниці гліцинового рецептора етанолом [17]. При встановленні сайтів алостеричної модуляції гліцинових рецепторів N-арахідоноіл-гліцином продемонстровано, що  $\alpha 2$ -субодиниці, в яких три згадані вище залишки були замінені відповідними з  $\alpha 1$ , набули здатності потенціюватися під дією N-арахідоноіл-гліцину; в той час як  $\alpha 2$ -рецептори дикого типу інгібувалися цією речовиною [18].

Зважаючи на подібність впливу N-арахідоноіл-гліцину та гінкголевої кислоти на гліцинові рецептори ми припустили, що вони взаємодіють із одними і тими ж амінокислотними залишками  $\alpha 1$ -субодиниці. Для перевірки нами здійснено мутацію трьох амінокислотних залишків у  $\alpha 2$ -субодиниці гліцинового рецептора на відповідні з  $\alpha 1$ : T59A у зовнішньоклітинному домені, A261G у TM2 та A303S у TM3.

Наші експерименти показали, що на противагу  $\alpha 2$ -рецепторам дикого типу, мутантні  $\alpha 2$  T59A/A261G/A303S потенціювалися гінкголевою кислотою, подібно до того, як це спостерігалось для  $\alpha 1$ -рецепторів

(рис. 2). Преаплікація гінкголевої кислоти (3 мкмоль/л) протягом 30 с призводила до підвищення гліциніндукованих струмів на  $105 \pm 18\%$  (n=5). При цьому ступінь потенціації варіював від 58 до 153% (див. рис. 2,б).

Кінетика дії гінкголевої кислоти на  $\alpha 2$ -мутантні рецептори також була подібною до розвитку потенціації  $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів [12]: значне підвищення амплітуди струму після 30 с аплікації гінкголевої кислоти та поступове зростання протягом наступних реестрацій. Після 30 с преаплікації гінкголевої кислоти було зафіксовано підвищення амплітуди струмів з  $97 \pm 10$  до  $203 \pm 58$  пА (P<0,01; n=5), через 2 хв вона збільшилася до  $327 \pm 47$  пА (P<0,01; див. рис. 2,в). На рис. 2,а представлено репрезентативні реестрації, що ілюструють поступове збільшення амплітуди струму під дією гінкголевої кислоти. Водночас аплікація гінкголевої кислоти (10 мкмоль/л) на клітини, що експресували  $\alpha 2$ -гліцинові рецептори дикого типу, призводила до зниження амплітуди іонного струму на  $10 \pm 3\%$  (n=8).

Для більш детального дослідження особливостей дії гінкголевої кислоти на му-

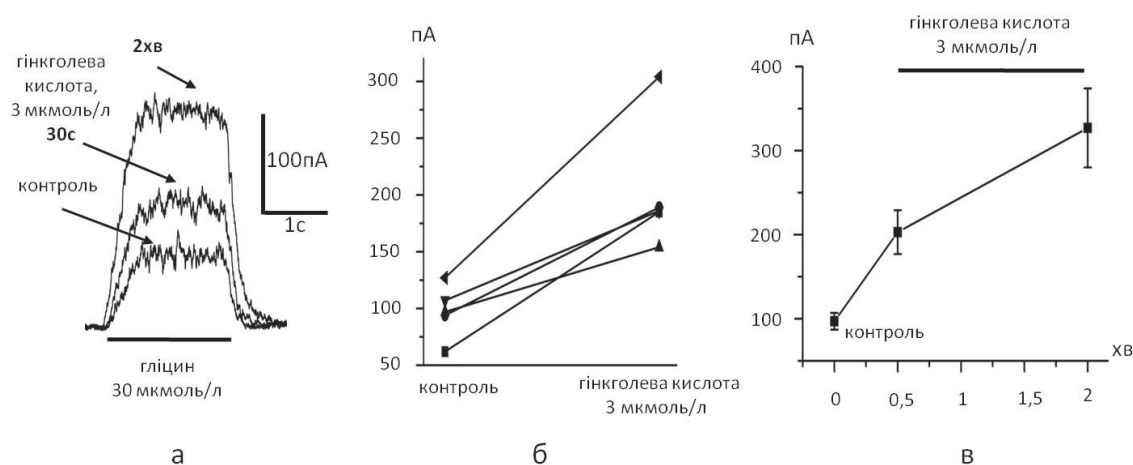


Рис. 2. Потенціація рецепторів  $\alpha 2$  T59A/A261G/A303S під дією гінкголевої кислоти:

а – приклади реестрації струмів у відповідь на аплікацію 30 мкмоль/л гліцину на клітини, що експресували  $\alpha 2$ -мутантні рецептори в контролі та після 30 с та 2 хв аплікації 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти. Тривалість аплікації показано над реестраціями. Конфігурація «цїла клітина». Фіксований потенціал = 0мВ.

б – амплітуди струмів у контролі та після аплікації 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти.

в – розвиток потенціації струмів, опосередкованих мутантними  $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами, під дією 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти. Тривалість аплікації гінкголевої кислоти показано у верхній частині графіка

танті  $\alpha 2$ -рецептори ми побудували криві залежності амплітуди струму від концентрації аплікованого гліцину (рис. 3). Раніше було показано, що  $ED_{50}$  для  $\alpha 2$ -рецепторів становить  $42 \pm 2$  мкмоль/л ( $n=10$ ) [12]. Аналіз кривих концентраційної залежності продемонстрував, що чутливість мутантних  $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів до гліцину в 3 рази нижча, ніж  $\alpha 2$ -рецепторів дикого типу і становить  $119 \pm 16$  мкмоль/л ( $n=12$ ). В умовах контролю  $ED_{50}$  для мутантного  $\alpha 2$ -рецептора коливалася від 56 до 238 мкмоль/л. За наявності 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти спостерігався значний зсув кривих концентраційних залежностей вліво: значення  $ED_{50}$  варіювали від 31 до 118 мкмоль/л ( $n=12$ ;  $P < 0,05$ ). На рис. 3,а представлено репрезентативні реєстрації струмів індукованих 30, 100 та 1000 мкмоль/л гліцину до (зліва) та після (справа) аплікації гінкголевої кислоти. При побудові кумулятивних кривих концентраційної залежності в контролі та за умов дії гінкголевої кислоти було встановлено, що  $ED_{50}$  для гліцину змінюється зі 104 до 67 мкмоль/л ( $n=12$ ) під її впливом (див. рис. 3,б). Таким чином, подібно до  $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів для мутантних  $\alpha 2$ -рецепторів був характерним зсув кривих концентраційної

залежності вліво під дією гінкголевої кислоти.

Отримані нами результати демонструють, що мутація трьох амінокислотних залишків у  $\alpha 2$ -субодиниці гліцинового рецептора на відповідні з  $\alpha 1$ -субодиниці призводить до проявлення потенціюючого ефекту гінкголевої кислоти. При цьому характер дії останньої на мутантні  $\alpha 2$ -рецептори подібний до того, що спостерігається при її впливі на  $\alpha 1$ -субодиниці. Це дає змогу припустити, що амінокислоти A52, G254 та S296 залучені у процес взаємодії  $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів із гінкголевою кислотою.

## ОБГОВОРЕННЯ

Проблема модуляції гліцинового рецептора привертає увагу дослідників протягом десятиліть. Вони є мішенями для таких фармакологічних агентів, як м'язові релаксанти, знеболювальні та протизапальні ліки [13, 19]. Однак нині відомо лише декілька речовин, що ефективно субодинично-вибірково модулюють роботу гліцинових рецепторів [13].

Окремої уваги заслуговує вивчення механізмів дії модулювальних препаратів на гліцинові рецептори та встановлення

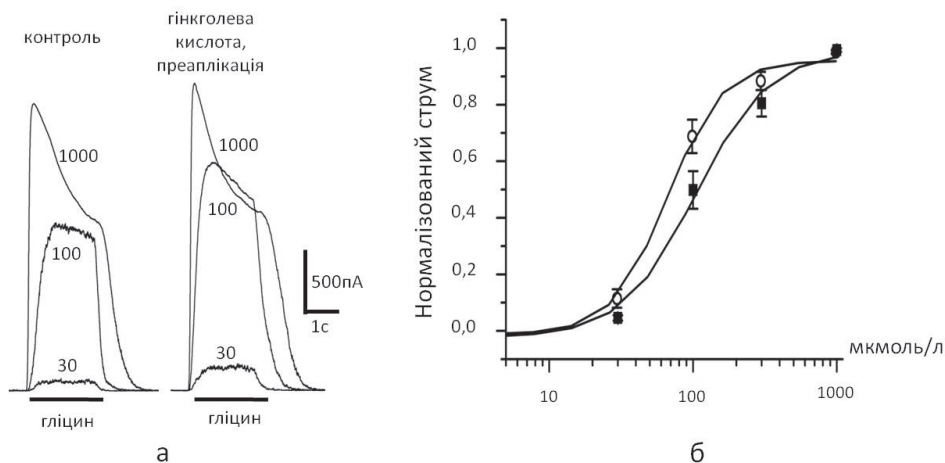


Рис. 3. Аплікація гінкголевої кислоти спричинює зсув кривих концентраційної залежності для гліцину вліво: а – репрезентативні струми, індуковані аплікацією 30, 100 та 1000 мкмоль/л гліцину в контролі (зліва) та після аплікації 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти (справа); б – кумулятивні криві залежності амплітуди струму від концентрації аплікованого гліцину в контролі (чорні квадрати) та після аплікації 3 мкмоль/л гінкголевої кислоти (пусті кружечки)

амінокислотних залишків, що є ключовими для взаємодії рецептора із тією чи іншою речовиною. По-перше, це дасть змогу встановити принцип дії фармакологічних агентів та передбачити їх можливий вплив на різні субодиниці гліцинового рецептора; по-друге – краще зрозуміти молекулярну фізіологію гліцинового рецептора, роль окремих регіонів та амінокислотних залишків у його функціонуванні.

Амінокислотний залишок A52<sup>1</sup>, розміщений у зовнішньоклітинному домені, бере участь у взаємодії  $\alpha 1$ -гліцинового рецептора з етанолом [17]. Було показано, що при здійсненні амінокислотної заміни в  $\alpha 1$ -субодиниці (коли аланін 52 замінено на характерний для  $\alpha 2$  серин) ефективність дії етанолу на  $\alpha 1$ -рецептори знижувалась [17]. Це дає можливість припустити, що A52 задіяна у формуванні одного з сайтів зв'язування етанолу. Пізніше стало відомо, що залишки S267 та A288, розміщені в доменах TM2 та TM3 відповідно, також впливають на взаємодію етанолу з гліциновим рецептором, імовірно, формуючи інший сайт зв'язування [20].

Для TM2- та TM3-доменів гліцинового рецептора характерна висока консервативність. Амінокислотні послідовності  $\alpha 1$ - та  $\alpha 2$ -субодиниць відрізняються лише за двома позиціями: одним амінокислотним залишком у TM2 та одним у TM3. Однак ці дві відмінності є причиною того, що  $\alpha 1$ - та  $\alpha 2$ -субодиниці по-різному відповідають на дію декількох біоактивних речовин [14, 16, 17, 21].

TM2-домен кожної субодиниці бере участь у формуванні іонного каналу рецептора [22]. Було показано, що амінокислотний залишок, котрий знаходиться у позиції 254 та є відмінним для  $\alpha 1$ - та  $\alpha 2$ -субодиниць визначає основний стан провідності каналу. Заміна гліцину в  $\alpha 1$  на аланін (характерний для  $\alpha 2$ )

<sup>1</sup> тут і далі амінокислотні залишки пронумеровано згідно з амінокислотою послідовністю  $\alpha 1$ -гліцинового рецептора.

спричинює появу нової провідності, що зазвичай властива лише каналам, сформованим  $\alpha 2$ -субодиницями [23]. Аналогічна заміна призводить до нечутливості  $\alpha 1$ -рецепторів до блокатора цианотрифенілборату. [14].

Фітоканабіноїд  $\Delta^9$ -тетрагідроканабінол, що є головним психоактивним компонентом марихуани, здатен безпосередньо взаємодіяти з гліциновими рецепторами, сприяючи підвищенню амплітуди струму, опосередкованого  $\alpha 1$ - та  $\alpha 3$ -субодиницями [16]. Потенціація  $\alpha 2$ -субодиниці була менш яскраво виражена. Xiong та співробітники у 2011 р. показали, що важливу роль у субодиничній вибірковості потенціуючої дії  $\Delta^9$ -тетрагідроканабінолу відіграє TM3-домен, а зокрема серин 296 ( $\alpha 1$ ) та серин 307 ( $\alpha 3$ ), котрі на відміну від аланіну 303 ( $\alpha 2$ ) здатні формувати гідроксильний зв'язок із ОН-групою тетрагідроканабінолу. Ймовірно, така взаємодія є головною причиною позитивної модуляції  $\alpha 1$ - та  $\alpha 3$ -гліцинових рецепторів під дією  $\Delta^9$ -тетрагідроканабінолу [16].

Yevenes and Zeilhofer [18] продемонстрували, що лише комбінація трьох амінокислотних замін T59A/A261G/A303S у  $\alpha 2$ -гліциновому рецепторі надавала йому чутливості до потенціуючої дії N-арахідоноїл-гліцину. Одиначні мутації A261G, T59A, так само, як і подвійна мутація не були здатні змінити реакцію  $\alpha 2$ -рецепторів на аплікацію N-арахідоноїл-гліцину. Зважаючи на подібність субодинично-вибіркового впливу гінголевої кислоти та N-арахідоноїл-гліцину на гліцинові рецептори та їх належність до класу органічних кислот нами було висунуто припущення щодо співпадіння сайтів їх взаємодії з гліциновим рецептором.

Мутація T59A/A261G/A303S, яка передбачає заміну трьох амінокислот у  $\alpha 2$ -субодиниці на відповідні амінокислоти з  $\alpha 1$ -субодиниці, наділяє  $\alpha 2$ -гліцинові рецептори здатністю потенціюватися під дією гінголевої кислоти. Таким чином, нами було встановлено амінокислотні залишки, відповідальні за взаємодію  $\alpha 1$ -рецепторів



із гінкголевою кислотою, що збігаються із сайтом взаємодії рецептора із N-арахідоноіл-гліцином. Питання про те, яким саме чином ці амінокислоти безпосередньо визначають чи впливають на місце взаємодії  $\alpha 1$ -субодиниці із модульовальними речовинами, вимагає подальших досліджень.

Амінокислоти, на вивченні яких була сфокусована наша увага, відіграють важливу роль у формуванні сайтів взаємодії гліцинового рецептора із модуляторами [14, 16 – 18, 21]. Вперше демонструючи амінокислотні залишки, що необхідні для позитивної модуляції  $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів гінкголевою кислотою, ми підтвердили провідне значення амінокислот A52/G254/S296 для потенціації гліцинових рецепторів. Встановлення принципів модуляції гліцинових рецепторів та механізмів їх взаємодії з фармакологічноактивними речовинами є важливим для кращого розуміння функціонування рецептора та необхідним для розробки ліків, які могли би застосовуватись як високо специфічна терапія гіперплексії.

Г.В. Малеева<sup>1,2</sup>, С. И. Булдакова<sup>1</sup>, Г. Г. Скибо<sup>2</sup>, П. Д. Брежестовский<sup>1</sup>

#### АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ $\alpha 1$ -ГЛИЦИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ С ГИНКГОЛЕВОЙ КИСЛОТОЙ

Ранее нами было показано, что гинкголевая кислота обладает способностью избирательно потенцировать токи, опосредованные  $\alpha 1$ -субъединицами глицинового рецептора. Следующим шагом стало проведение сравнительного анализа аминокислотных последовательностей  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -субъединиц для определения аминокислотных остатков, которые могут быть ответственны за различия в действии гинкголевой кислоты на эти рецепторы. С использованием метода *patch-clamp* в конфигурации «целая клетка» нами было продемонстрировано, что мутация трех аминокислотных остатков T59/A261/A303 в  $\alpha 2$ -субъединице, на соответствующие им из  $\alpha 1$ -субъединицы, делает  $\alpha 2$ -рецепторы чувствительными к потенцирующему влиянию гинкголевой кислоты. Амплитуда токов, опосредованных  $\alpha 2$ -мутантными рецепторами, после аппликации гинкголевой кислоты увеличились на  $89 \pm 14\%$ . Так же, как и для  $\alpha 1$ -рецепторов, для  $\alpha 2$ -мутантных рецепторов было характерным сниже-

ние полуэффективной дозы для глицина под действием гинкголевой кислоты. Таким образом, субъединичная избирательность действия гинкголевой кислоты связана с тремя аминокислотными остатками, различными для  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -субъединиц глицинового рецептора.

Ключевые слова: глициновый рецептор; гинкголевая кислота; ионные токи; *patch-clamp*; точечные мутации.

G. Maleeva<sup>1,2</sup>, S. Buldakova<sup>1</sup>, G. Skibo<sup>2</sup>, P. Bregestovski<sup>1</sup>

#### AMINOACID RESIDUES INVOLVED IN POSITIVE MODULATION OF $\alpha 1$ GLYCINE RECEPTORS BY GINGKOLIC ACID

Previously, we have shown that ginkgolic acid has an ability to potentiate currents, mediated by  $\alpha 1$  subunits of glycine receptor. In order to define the mechanism of subunit specific action of ginkgolic acid we have performed comparative analysis of the amino acid sequences of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  subunits of glycine receptor. Amino acids that contribute to the different action of ginkgolic acid on glycine receptors formed by these subunits were determined. Using whole-cell configuration of patch-clamp recording, we have demonstrated that mutation of three residues in  $\alpha 2$  subunit for corresponding ones from  $\alpha 1$  subunit makes  $\alpha 2$  receptors sensitive to the potentiation by ginkgolic acid. Currents, mediated by  $\alpha 2$  mutant receptors, increased by  $89 \pm 14\%$  after application of ginkgolic acid. Similarly to  $\alpha 1$  receptors  $\alpha 2$  mutant receptors have shown a decrease in  $EC_{50}$  for glycine under the action of ginkgolic acid. Thus, subunit selectivity of the ginkgolic acid is in strong connection with three amino acid residues that are different in  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  subunits of glycine receptor.

Key words: glycine receptor; ginkgolic acid; ionic currents; patch-clamp; point mutations.

<sup>1</sup>Institute de Neurosciences des Systemes, INSERM UMR 1106, Aix-Marseille Université, France ;

<sup>2</sup>Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv.

#### REFERENCES

1. Malosio M, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H. Wide spread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J.* 1991; 10:2401–09.
2. Betz H, Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem.* 2006; 97:1600–10.
3. Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev.* 2004; 84:1051–95.
4. Langosch D, Thomas L, Betz H. Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85:7394–98.
5. Haeger S, Kuzmin D, Detro-Dassen S, Lang N, Kilb M, Tsetlin V, Betz H, Laube B, Schmalzing G. An

- intramembrane aromatic network determines pentameric assembly of Cys-loop receptors. *Nat Struct Mol Biol.* 2010; 17(1):90-8.
6. Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, Betz H. Cloning and expression of the 58 kd  $\beta$  subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron.* 1990; 4(6):963-70.
  7. Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron.* 2005; 45:727-39.
  8. Dutertre S, Becker C-M, Betz H. Inhibitory glycine receptors: an update. *J Biol Chem.* 2012; 287:40216-23.
  9. Schaefer N, Vogel N and Villmann C. Glycine receptor mutants of the mouse: what are possible routes of inhibitory compensation? *Front Mol Neurosc.* 2012; doi: 10.3389/fnmol.2012.00098.
  10. Shiang R, Ryan S, Zhu Y-Z, Hahn A, O'Connell P, Wasmuth J. Mutations in the alpha subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nat Gen.* 1993; 5:351-8.
  11. Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23:519-27.
  12. Maleeva G, Buldakova S, Bregestovski P. Selective potentiation of alpha 1 glycine receptors by ginkgolic acid. *Front Mol Neurosc.* 2015; doi: 10.3389/fnmol.2015.00064.
  13. Yevenes GE, Zeilhofer HU. Allosteric modulation of glycine receptors. *Br J Pharmacol.* 2011; 164:224-36.
  14. Rundstrom N, Schmieden V, Betz H, Bormann J, Langosch D. Cyanotriphenylborate: Sybtype-specific blocker of glycine receptor chloride channels. *PNAS.* 1994; 91:8950-4.
  15. Yang Z, Cromer B, Harvey R, Parker M, Lynch J. A proposed structural basis for picrotoxinin and picrotin binding in the glycine receptor pore. *J Neurochem.* 2007; 103:580-9.
  16. Xiong W, Cheng K, Cui T, Godlewski G, Rice KC, Xu Y, Zhang L. Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. *Nat Chem Biol.* 2011; 7(5):296-303.
  17. Mascia MP, Mihic SJ, Valenzuela CF, Schofield PR, Harris RA. A single amino acid determines differences in ethanol actions on strychnine-sensitive glycine receptors. *Mol Pharmacol.* 1996; 50(2):402-6.
  18. Yevenes GE, Zeilhofer HU. Molecular sites for the positive allosteric modulation of glycine receptors by endocannabinoids. *PLoS One.* 2011; 6: e23886.
  19. Webb TI, Lynch JW. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des.* 2007; 13(23):2350-67.
  20. Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature.* 1997; 389(6649):385-9.
  21. Fuentealba J, Munoz B, Yevenes G, Moraga-Cid G, Perez C, Guzman L, Rigo JM, Aguayo LG. Potentiation and inhibition of glycine receptors by tutin. *Neuropharmacology.* 2011; 60:453-9.
  22. Du J, Lu W, Wu S, Cheng Y, Gouaux E. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature.* 2015; doi:10.1038/nature14853.
  23. Bormann J, Rundstrom N, Betz H, Langosch D. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and heterooligomers. *EMBO J.* 1993; 12:3729-37.

*Матеріал надійшов  
до редакції 03.08.2015*



# Калікс[4]арени як модулятори енергозалежної акумуляції $\text{Ca}^{2+}$ та функціонування електронно-транспортного ланцюга в мітохондріях гладенького м'яза

Г.В. Данилович<sup>1</sup>, Ю.В. Данилович<sup>1</sup>, Р.В. Родік<sup>2</sup>, В.І. Кальченко<sup>2</sup>, О.Ю. Чуніхін<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ; <sup>2</sup>Інститут органічної хімії НАН України, Київ; e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua; vik@bpci.kiev.ua

*Вивчено вплив супрамолекулярних макроциклічних сполук калікс[4]аренів (C-97, C-99, C-107) у концентрації 100 нмоль/л на процес енергозалежного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза, а також аутофлуоресценцію мітохондріальних коензимів нікотинамідаденіндинуклетиду (НАДН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) і гідродинамічний діаметр цих органел. Із використанням  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого флуоресцентного барвника Fluo-4 AM показано, що вибрані калікс[4]арени пригнічують енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями. Накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  (80 мкмоль/л в середовищі) супроводжується зростанням флуоресцентної відповіді зонда до  $1,57 \pm 0,04$  відн. од. За дії калікс[4]аренів C-97, C-99, C-107 флуоресцентний сигнал знижувався до значень  $0,88 \pm 0,08$ ,  $0,92 \pm 0,08$  та  $0,78 \pm 0,04$  відн. од. відповідно. Отже, вибрані калікс[4]арени призводять до вивільнення попередньо акумульованого мітохондріями  $\text{Ca}^{2+}$ . За дії C-97 та C-99 флуоресцентний сигнал від НАДН знижується до  $-0,11 \pm 0,02$  та  $-0,12 \pm 0,02$  відн. од. відповідно щодо контрольного значення  $-0,05 \pm 0,01$  відн. од. Аналіз флуоресцентної відповіді НАДН та ФАД у суспензії ізольованих мітохондрій свідчить, що вплив досліджуваних сполук на функціональну активність електронно-транспортного ланцюга пов'язаний із початковим стимулюванням активності I комплексу та наступним пригніченням  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних НАД-вмісних дегідрогеназ циклу Кребса. Разом з цим використання методу фотонної кореляційної спектроскопії для оцінки зміни об'єму мітохондрій (їхнього гідродинамічного діаметра) за дії вибраних калікс[4]аренів показало, що втручання в роботу електронно-транспортного ланцюга призводить до змін осмотичного балансу між матриксом мітохондрій і зовнішнім середовищем, наслідком чого є зростання об'єму ізольованих органел. Зокрема, за присутності C-97 гідродинамічний діаметр мітохондрій зростає на  $22 \pm 6\%$ , а C-99 – на  $34 \pm 8\%$ . Отже, одержані результати свідчать про доцільність подальших досліджень впливу калікс[4]аренів на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз та біоенергетику мітохондрій клітин гладеньких м'язів для пошуку ефективних модифікаторів їхньої функціональної активності.*

*Ключові слова:* мітохондрії; електронно-транспортний ланцюг; транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ ; гладенькі м'язи.

## ВСТУП

Електрохімічний потенціал на внутрішній мітохондріальній мембрані є регулятором таких ключових структур як АТФ-синтаза та пора перехідної провідності, а його величина вказує на ефективність функціонування дихального ланцюга. Електричний потенціал мітохондрій регулює локалізовані в ній катіон-транспортувальні системи, зумовлю-

© Г.В. Данилович, Ю.В. Данилович, Р.В. Родік, В.І. Кальченко, О.Ю. Чуніхін

ючи важливу роль цих органел в підтриманні  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу клітин гладеньких м'язів [1-3].

Генерація потенціалу мітохондріальної мембрани забезпечується комплексами I – IV дихального ланцюга, а первинними переносниками електронів при окиснювальному фосфорилуванні є коензими нікотинамідаденіндинуклеотид (НАДН) та флавінаденіндинуклеотид (ФАДН<sub>2</sub>). Їх окиснен-

ня у мітохондріальному електронно-транспортному ланцюзі призводить до транслокації протонів через комплекси I, III та IV внутрішньої мембрани з матриксу у міжмембранний простір, а протонний градієнт разом з АДФ контролюють швидкість синтезу АТФ мітохондріями. Порушення дихання мітохондрій відображається в змінах редокс-стану піридинового та флавінового нуклеотидів. Таким чином, співвідношення окисненої та відновленої форм НАДН та ФАДН<sub>2</sub> є показником біоенергетики мітохондрій. НАДН та окислена форма ФАДН<sub>2</sub> – ФАД володіють власною флуоресценцією, зміни якої можуть відображати редокс-стан внутрішньомітохондріальних аденінових нуклеотидів, а, отже, бути маркером функціональної активності мітохондрій [4,5].

Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі, передусім за рахунок стимуляції його транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортером, що функціонує як електрофоретична система, супроводжується активацією мітохондріальних дегідрогеназ (піруватдегідрогеназний комплекс та НАД-вмісні дегідрогенази циклу Кребса, зокрема  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа та ізоцитратдегідрогеназа) [6]. Отже, зміни концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях за дії як ендогенних, так і екзогенних модифікаторів (в тому числі фармакологічних агентів), є суттєвим чинником впливу на функціонування електронно-транспортного ланцюга. Тому пошук речовин, які здатні змінювати концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій клітин гладеньких м'язів, що мають вирішальне значення у забезпеченні функціонування внутрішніх органів, і, відповідно, інтенсивність роботи електронно-транспортного ланцюга, є важливою проблемою сучасної молекулярної фізіології і біохімії.

У біохімічних і фізіологічних дослідженнях останніх років значна увага приділяється супрамолекулярним макроциклічним сполукам – калікс[4]аренам, а саме їх здатності модулювати перебіг катіон-транс-

портувальних процесів в субклітинних структурах [7]. У поле нашого зору увійшли калікс[4]арени – С-97, С-99, С-107, які можуть впливати як на потенціал плазмалеми, у зв'язку з убаїноподібним інгібуванням  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної активності, так і на потенціал внутрішньої мембрани мітохондрій клітин гладенького м'яза матки (міометрія). Вибрані калікс[4]арени в концентраціях 50-100 нмоль/л викликали деполаризацію плазмалеми міоцитів та транз'єнтну (5-10 хв) гіперполяризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани [8].

Метою роботи було дослідження впливу калікс[4]аренів – С-97, С-99, С-107 на енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  та зміни аутофлуоресценції піридинового та флавінового аденіндинуклеотидів в ізольованих мітохондріях гладенького м'яза матки щурів.

## МЕТОДИКА

*Одержання фракції мітохондрій міометрія.* Препарат ізольованих мітохондрій одержували із міометрія невагітних щурів за допомогою диференційного центрифугування [9]. Наркотизацію щурів викликали інгаляцією діетилового ефіру, після чого їх декапітували. Дотримувались усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). Після видалення матки і очищення її від жирової та сполучної тканини, препарат тримали у 0,9 %-му розчині  $\text{NaCl}$ . Міометрій подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 2x2 мм, які переносили у робочий розчин з температурою 4 °С наступного складу (ммоль/л): 10–HEPES (pH 7,4), 250–цукроза, 1–EGTO. Тканину подрі за допомогою гомогенізатору типу «Політрон» тричі по 20 с із охолодженням на льоду протягом 1 хв, співвідношення тканина : робочий розчин складала 1 : 9. Гомогенат центрифугували протягом 15 хв при 1 тис. г за 4 °С. Супернатант центрифугували протягом 15 хв при 12 тис. г за 4 °С. Осад

ресуспендували у робочому розчині складу (ммоль/л): 10–HEPES (рН 7,4), 250 – цукроза. Знову центрифугували протягом 15 хв при 12 тис. g за 4 °С. Впродовж експерименту одержану фракцію ізольованих мітохондрій зберігали на льоду. Визначали вміст білка у фракції мітохондрій за стандартним методом Bradford [10]. Середнє його значення було 2 мг/мл, а в пробі – 50 мкг/мл.

*Процедура навантаження мітохондрій флуоресцентним зондом Fluo-4 АМ.* Навантаження мітохондрій зондом Fluo-4 АМ в концентрації 2 мкмоль/л проводили у середовищі, яке містило 10 ммоль/л HEPES (рН 7,4, 37 °С), 250 ммоль/л цукрози, 0,1 % бичачий сироватковий альбумін, протягом 30 хв при 37 °С. Для покращення процесу навантаження змішували барвник із Pluronic F-127 (0,02 %) [11].

*Дослідження вмісту іонізованого Са в мітохондріях із використанням методу протокової цитофлуориметрії.* Відносні значення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій, навантажених Fluo-4 АМ, реєстрували за допомогою методу протокової цитофлуориметрії на протоковому цитометрі COULTER EPICS XLTM (Beckman Coulter, США) з аргонним лазером ( $\lambda_{\text{зб.}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл.}} = 520$  нм, канал F11; програмне забезпечення SYSTEM ПТМ Software; “Beckman Coulter”, США). Використовували робочий протокол аналізу зразків, який був створений для характеристики фракції ізольованих мітохондрій міометрія. Події для аналізу обирали введенням логічного обмеження за параметрами бічного та прямого світлорозсіювання (SS та FS) в протокол протокового цитофлуориметра. Аналіз проб припиняли за умови реєстрації 10000 подій в межах виділеної ділянки. Середовище, з якого здійснювалась енергозалежна акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями, мало склад (об’єм 2 мл, ммоль/л): 20–HEPES (рН 7,4, 37 °С), 250–цукроза, 2–калій-фосфатний буфер (рН 7,4, 37 °С), 3– $\text{MgCl}_2$ , 3–АТФ, 5–сукцинат натрію, концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становила 80 мкмоль/л.

Енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  проводили протягом 5 хв. Величину флуоресцентної відповіді наводили у відносних одиницях як  $F/F_0$ , де  $F_0$  – початковий рівень флуоресценції,  $F$  – флуоресцентний сигнал після внесення діючих речовин.

*Реєстрація флуоресценції НАДН та ФАД в мітохондріях із використанням методу спектрофлуориметрії.* Реєстрацію відносних значень рівня власної флуоресценції НАДН ( $\lambda_{\text{зб.}} = 350$  нм,  $\lambda_{\text{фл.}} = 450$  нм) та ФАД ( $\lambda_{\text{зб.}} = 450$  нм,  $\lambda_{\text{фл.}} = 533$  нм) у фракції мітохондрій міометрія досліджували із використанням флуориметричного методу на спектрофлуориметрі Quanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096. Дослідження проводили в середовищі наступного складу (об’єм 2 мл, ммоль/л): 20–Hepes (рН 7,4, 37 °С), 2– $\text{K}^+$ -фосфатний буфер (рН 7,4, 37 °С), 120– $\text{KCl}$ , 5–піруват натрію, 5–сукцинат натрію, аліквота (100 мкл) мітохондрій фракції містила 100 мкг білка. Відносні одиниці флуоресценції від НАДН та ФАД розраховували як відношення  $(F-F_0)/F_0$ , де  $F_0$  – початковий флуоресцентний сигнал,  $F$  – флуоресцентний сигнал за відповідні проміжки часу. В експериментах щодо впливу ротенону, антимицину враховували власну флуоресценцію цих речовин.

*Визначення гідродинамічного діаметра мітохондрій.* Значення гідродинамічного діаметра мітохондрій оцінювали за допомогою лазерного кореляційного спектрометра ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Велика Британія) з обчислювальним блоком-корелятором марки Computing correlator type 7032 та гелій-неоновим лазером ЛГН-111 із  $\lambda = 633$  нм і потужністю 25 мВт. Реєстрацію автокореляційної функції розсіюваного від суспензії мітохондрій лазерного опромінення проводили протягом 1 хв, 10-разово, під кутом розсіювання 90°. Автокореляційну функцію обробляли за допомогою стандартної комп’ютерної програми PCS-Size mode v 1.61. Склад середовища інкубацій (1 мл) відповідав опи-

саному вище для вивчення флуоресценції нуклеотидів. Аліквота мітохондріальної фракції була 50 мкл, що відповідало 50 мкг за білком.

Кожний експериментальний графік, котрий наведено в статті, являв собою типовий результат, що відтворювався 5 разів. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням пакету стандартних програм IBM PC, застосовуючи загальновідомі методи [12] і критерій t Стьюдента.

Синтезували каліксаренфосфонові кислоти C-97 (5-біс(дигідроксифосфорил)метил-25,27-дипропоксикалікс[4]арен, C-99 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметил)-25,27-дипропоксикалікс[4]арен, C-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-5,27-дипропоксикалікс[4]арен) у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом член-кор. НАН України Кальченка В.І.

Калікс[4]арени розчиняли в ДМСО. При проведенні експериментів контролем слугувало внесення аліквоти розчинника до середовища інкубації.

В роботі були використані наступні реактиви: НЕРЕС, диметилсульфоксид (ДМСО), піруват натрію, сукцинат натрію, цукроза, АТФ, виробництва фірми «Sigma» (США), Fluor-4 AM, Pluronic F-127 – «Invitrogen» (США), бичачий сироватковий альбумін, мінеральні солі вітчизняного виробництва.

Розчини готували на бідистильованій воді, яка мала питому електропровідність не більше ніж 2,0 мкСм/см. Електропровідність води реєстрували за допомогою кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Основним механізмом, який забезпечує надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до матрикса мітохондрій, є функціонування низькоафінного  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера, що забезпечує потенціалзалежний, високоємнісний, чутливий до рутенієвого червоного шлях акумуляції катіона, активність якого оптимальна за мікромолярних концентрацій позамітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$  [1-2, 13]. Вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій гладеньких м'язів відбувається значною мірою за участю  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника. Ця транспортна система в певних умовах здатна забезпечити як  $\Delta\text{pH}$ -залежне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій (аверсний режим), так і акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  з цитозолу за відносно низьких (субмікромолярних) концентрацій катіона (реверсний режим) [1-3, 14].

Структурні формули досліджуваних калікс[4]аренів представлені на рис. 1. В основі їх будови лежить макроциклічне поліфенольне кільце – так звана “калікс[4]аренова чаша”, яка має замісники різної хімічної природи на верхньому вінці. Вибрані калікс[4]арени відрізняються взаєморозташуванням фосфонових залишків на

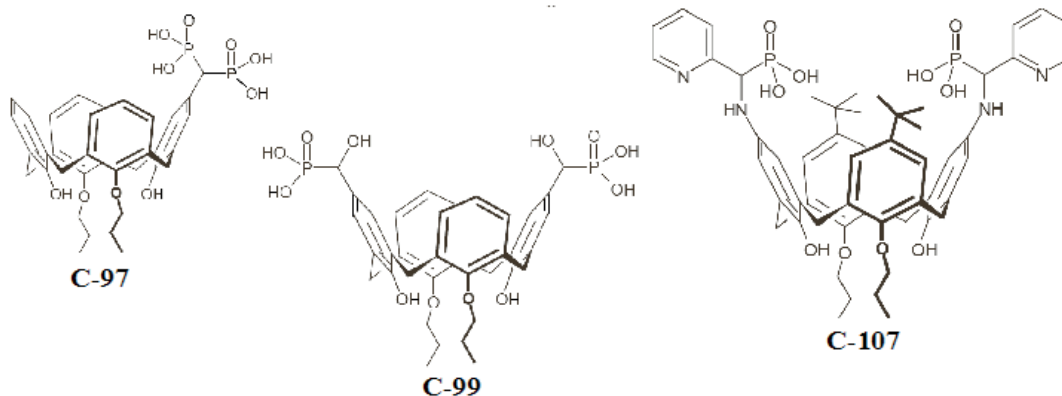


Рис.1. Структурні формули досліджуваних калікс[4]аренів

фенольних кільцях «калікс[4]аренової чаші». У випадку С-107 до складу замісників входить також азотовмісний гетероцикл (залишок піридину). Слід зазначити, що суто «калікс[4]аренова чаша» та замісники окремо не впливають на катіон-транспортувальні системи та поляризацію субклітинних структур міометрія [8]

Проведені дослідження виявили, що калікс[4]арени С-97, С-99 та С-107 в концентрації 100 нмоль/л мають тенденцію до зниження вмісту ендogenous іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях за умови 5-хвилинної передінкубації з ними фракції органел (рис. 2, а). Втім, зазначені зміни не є статистично вірогідними. Також калікс[4]арени перешкоджають наступній енергозалежній акумуляції катіону, а у випадку С-99 спостерігається тенденція до ще більшого зниження рівня іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій. Внесення калікс[4]аренів у середовище інкубації після енергозалежної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями призводить до статистично значущого зниження його вмісту, навіть нижче від базального (див. рис. 2, б). Такі ефекти не залежали від хімічної структури та взаєморозташування замісників у макроциклі. З нашої точки зору, гальмування енергозалежного транспорту Са в мітохондрії зумовлено адитивною дією: «каліксаренова

чаша» і замісники. Причому у випадку впливу калікс[4]аренів на досліджувану транспортувальну систему хімічна природа замісників не має вирішального значення.

Наші попередні дослідження виявили, що калікс[4]арени С-97 та С-99 здатні стимулювати  $\Delta\text{pH}$ -залежний вихід іонів Са з мітохондрій гладенького м'язу матки [15].

Отже, вибрані калікс[4]арени можуть пригнічувати енергозалежну акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями міометрія та знижувати концентрацію катіона, попередньо накопиченого в енергозалежному процесі, стимулюючи  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник їхньої внутрішньої мембрани. Але ефект вибраних калікс[4]аренів на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи мітохондрій є меншим, ніж на катіон-транспортувальні ензими плазматичної мембрани, зокрема  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФазу [16]. Така дія досліджуваних сполук може призвести до зниження активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних мітохондріальних дегідрогеназ і відповідного гальмування роботи електронно-транспортного ланцюга. Щоб перевірити це припущення необхідно вивчити вплив досліджуваних калікс[4]аренів на функціональну активність електронно-транспортного ланцюга, маркером активності якого, як зазначалось, виступає редокс-стан піридинового та флавінового нуклеотидів.

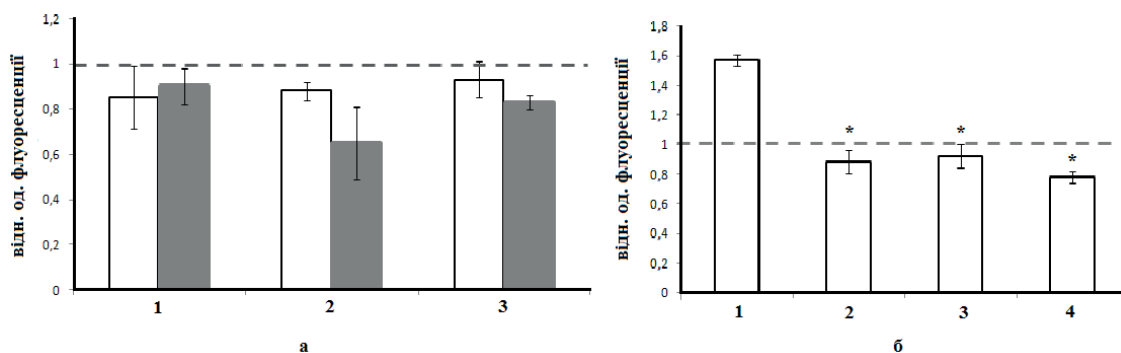


Рис.2. Вплив калікс[4]аренів на трансмембранний обмін  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях міометрія. Вміст іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі: а – за умови передінкубації суспензії мітохондрій з калікс[4]аренами (100 нмоль/л): 1 – С-97, 2 – С-99, 3 – С-107; прозорі стовпчики – передінкубація 5 хв з калікс[4]аренами, сірі стовпчики - додавання 80 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  в стандартному середовищі інкубації для енергозалежної акумуляції.

б – за умови попередньої енергозалежної акумуляції: 1 – додавання 80 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , 2 – С-97, 3 – С-99, 4 – С-107.

За 1 прийнято рівень іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях (базальний) до внесення іонів Са та калікс[4]аренів. \*  $P < 0,05$  відносно значень при додаванні 80 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$



Для того, щоб продемонструвати відповідність між роботою електронно-транспортного ланцюга та окисно-відновним статусом аденинових нуклеотидів було проведено ряд попередніх досліджень. Вивчали залежність змін флуоресцентного сигналу НАДН та ФАД в нормі та за умова специфічного блокування I та III комплексів дихального ланцюга, а також при додаванні протонифору.

Виявлено реципрокність змін флуоресценції НАДН та ФАД. За присутності в середовищі інкубації пірувату та сукцинату (5 ммоль/л) флуоресценція від НАДН знижується, за рахунок функціонування I комплексу дихального ланцюга, флуоресценція від ФАД зростає (відповідно вміст  $\text{ФАДН}_2$  – знижується), що зумовлено роботою II комплексу (сукцинатдегідрогенази) (рис. 3). Ці результати відповідають уявленням інших авторів щодо змін редокс-стану зазначених нуклеотидів за нормального функціонування електронно-транспортного ланцюга у присутності субстратів дихання [4].

Блокування I комплексу ротеноном (5 мкмоль/л) або III комплексу антимицином А (1 мкг/мл) [17] призводило до зростання рівня флуоресценції НАДН, та не відображалось на флуоресценції від ФАД. У разі дії антимицину

інтенсивність окиснення ФАД була меншою, ніж в контролі, тобто повного блокування активності II комплексу не спостерігалось (графічні результати не наведено).

Протонофор СССР (10 мкмоль/л) викликав більш інтенсивне зниження флуоресценції від НАДН та ФАД, що вказує на посилення роботи I комплексу, але одночасно пригнічувалась активність II комплексу (графічні дані не наведено). Відомо, що внаслідок руйнування градієнту  $\text{H}^+$  відбувається роз'єднання дихання та окисного фосфорилування, наслідком чого є компенсаторне посилення функціональної активності окремих елементів дихального ланцюга мітохондрій [18].

Таким чином, одержані нами попередні результати свідчать про можливість дослідження функціональної активності електронно-транспортного ланцюга ізольованих мітохондрій міометрія, використовуючи експериментальні дані щодо змін власної флуоресценції коензимів НАДН та ФАД.

Внесення калікс[4]аренів спричинювало більш інтенсивне зниження флуоресценції від НАДН ізольованих мітохондрій порівняно з ДМСО, який використовували як контроль (рис. 4, а, б), що може бути зумовлено

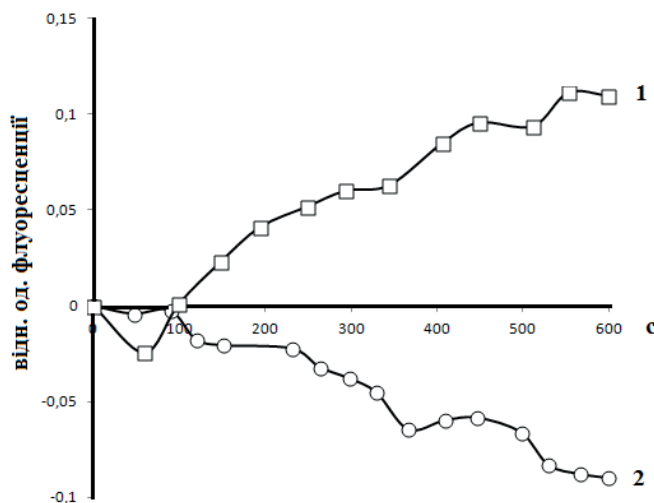


Рис. 3. Зміни флуоресценції від ФАД (1) та НАДН (2) в ізольованих мітохондріях клітин міометрія. Результати типового експерименту



стимулюванням І комплексу. Як зазначалося вище, калікс[4]арени зумовлюють транзйентне зростання потенціалу внутрішньої мітохондріальної мембрани, яке триває близько 5 хв [8]. Вихід іонів  $Ca^{2+}$  з матриксу, спричинений досліджуваними сполуками, з часом може призвести до зниження активності ензимів циклу трикарбонових кислот з відповідним гальмуванням електронно-транспортного ланцюга та зменшенням поляризації мітохондріальної мембрани, що і пояснює лише короткотривалий їхній гіперполяризуючий ефект. Поряд з цим спостерігається відсутність змін флуоресценції від ФАД відносно ДМСО (рис. 4, в).

Важливою морфологічною ознакою дії речовин-модифікаторів функціонування дихального ланцюга та трансмембранного обміну катіонів в мітохондріях є зміна об'єму органел. Прецизійною методикою вивчення їхнього набухання є фотонна кореляційна

спектрометрія, яка дає змогу оцінити зміни гідродинамічного діаметра субклітинних структур [19].

Середнє значення гідродинамічного діаметра мітохондрій становило  $547 \pm 49$  нм, а за наявності аламетицину ( $7,5$  мкг/мл) збільшилося до  $800 \pm 39$  нм. Аламетицин використовується як потенційно найменш агресивний чинник пермеабілізації внутрішньої мітохондріальної мембрани [20]. Зміни гідродинамічного діаметра за дії аламетицину ми застосували як контроль – 100% набухання. Калікс[4]арени викликали збільшення цього показника в середньому на  $22 \pm 6\%$  (С-97) та  $34 \pm 8\%$  (С-99) щодо контролю (рис. 5).

Калікс[4]арени здатні в дослідах *in vitro* впливати на  $Ca^{2+}$ -транспортувальні процеси в мітохондріях гладенького м'язу та змінювати їхню енергетику. Результати наших досліджень вказують на те, що дія калікс[4]аренів на  $Ca^{2+}$ -транспортувальні системи

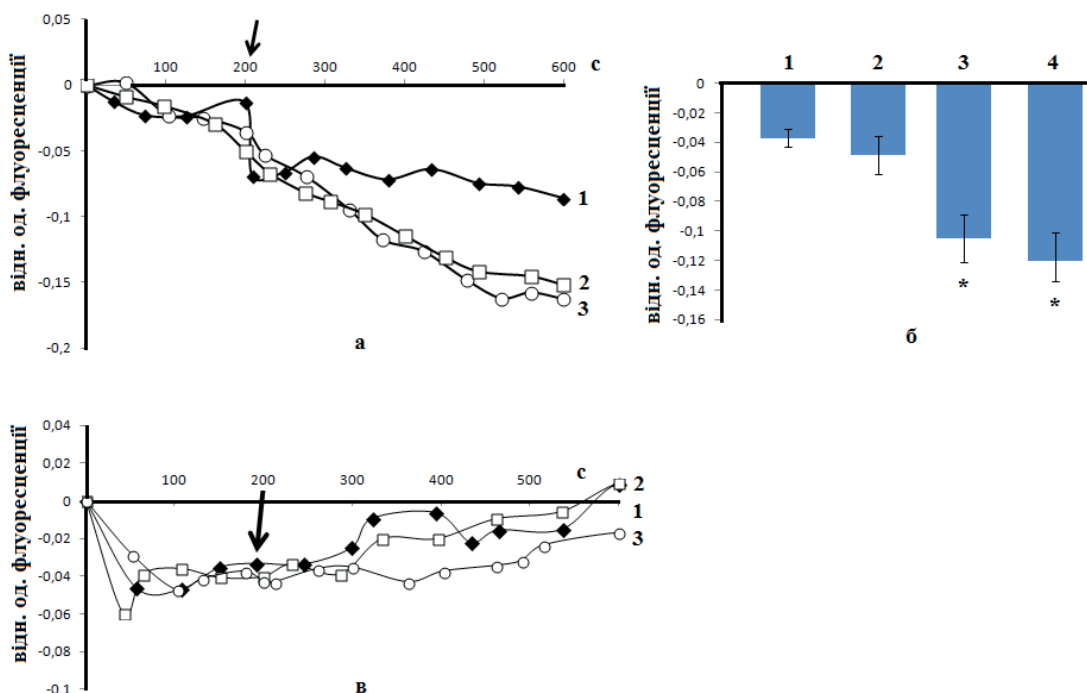


Рис. 4. Зміни флуоресценції від НАДН (а, б) та ФАД (в) за впливу калікс[4]аренів. 1 – внесення ДМСО, 2 – 100 нмоль/л С-97, 3 – 100 нмоль/л С-99. Дані типового експерименту (а, в; стрілочкою вказано момент додавання ефекторів) та статистична обробка експериментальних результатів для НАДН (б): 1 – зміни флуоресценції від НАДН у контролі, 2 – внесення ДМСО, 3 – 100 нмоль/л С-97, 4 – 100 нмоль/л С-99. \*  $P \leq 0,05$  відносно значень флуоресценції НАДН за наявності ДМСО. Для розрахунків середніх показників використовували величини флуоресцентного сигналу на 10-й хвилині інкубації

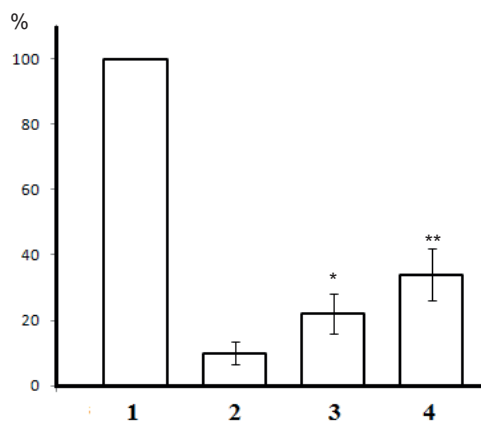


Рис. 5. Зміни гідродинамічного діаметра мітохондрій за дії калікс[4]аренів. 1 – контрольне (100 %) набухання в присутності аламетицину (7,5 мкг/мл), 2 – ДМСО, 3 – 100 нмоль/л С-97, 4 – 100 нмоль/л С-99. \*  $P \leq 0,1$ , \*\*  $P < 0,05$  відносно змін гідродинамічного діаметра за наявності ДМСО

мітохондрій спрямована на зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі, а аналіз флуоресцентної відповіді НАДН та ФАД свідчить, що вплив калікс[4]аренів на функціональну активність електронно-транспортного ланцюга, передусім, пов'язаний із стимулюванням активності  $\text{I}^{\text{ro}}$  комплексу з послідуєчим пригніченням  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних НАД-вмісних дегідрогеназ циклу Кребса. Зміни у функціонуванні електронно-транспортного ланцюга, викликані калікс[4]аренами, призводять до змін осмотичного балансу між матриксом мітохондрій та зовнішнім середовищем.

*Автори висловлюють щире вдячність академіку НАН України, професору С.О. Костеріну за цінні рекомендації під час обговорення експериментальних результатів і в процесі написання рукопису.*

**А.В. Данилович<sup>1</sup>, Ю.В. Данилович<sup>1</sup>, Р.В. Родик<sup>2</sup>, В.І. Кальченко<sup>2</sup>, А.Ю. Чунихин<sup>1</sup>**

#### **КАЛИКС[4]АРЕНЫ КАК МОДУЛЯТОРЫ ЭНЕРГОЗАВИСИМОЙ АККУМУЛЯЦИИ $\text{Ca}^{2+}$ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРОННО-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ В МИТОХОНДРИЯХ ГЛАДКИХ МЫШЦ**

Изучено влияние супрамолекулярных макроциклических соединений калікс[4]аренов (С-97, С-99, С-107) в

концентрации 100 нмоль/л на процесс энергозависимого транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в изолированных митохондриях гладких мышц, а также аутофлуоресценцию митохондриальных коэнзимов никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД) и гидродинамический диаметр этих органелл. С использованием  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительного флуоресцентного красителя Fluo-4 AM показано, что выбранные калікс[4]арены подавляют энергозависимую аккумуляцию  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями. Накопление  $\text{Ca}^{2+}$  (80 мкмоль/л в среде) сопровождается ростом флуоресцентного ответа зонда от условной единицы до величины  $1,57 \pm 0,04$  отн. ед. флуоресценции. При действии калікс[4]аренов С-97, С-99, С-107 флуоресцентный сигнал снижался до значений  $0,88 \pm 0,08$ ,  $0,92 \pm 0,08$  и  $0,78 \pm 0,04$  отн. ед. соответственно. Итак, выбранные калікс[4]арены приводят к высвобождению предварительно аккумулированного митохондриями  $\text{Ca}^{2+}$ . Под действием С-97 и С-99 флуоресцентный сигнал от НАДН снижается до  $-0,11 \pm 0,02$  и  $-0,12 \pm 0,02$  отн. ед. соответственно по отношению к контрольному значению –  $-0,05 \pm 0,01$  отн. ед. Анализ флуоресцентного ответа НАДН и ФАД в суспензии изолированных митохондрий свидетельствует, что влияние исследуемых соединений на функциональную активность электронно-транспортной цепи связано с начальным стимулированием активности  $\text{I}^{\text{ro}}$  комплекса и последующим угнетением  $\text{Ca}^{2+}$  зависимых НАД-содержащих дегидрогеназ цикла Кребса. Наряду с этим использование метода фотонной корреляционной спектроскопии для оценки изменения объема митохондрий (их гидродинамического диаметра) под действием выбранных калікс[4]аренов показало, что вмешательство в работу электронно-транспортной цепи приводит к изменениям осмотического баланса между матриксом митохондрий и внешней средой, следствием чего является рост объема изолированных органелл. В частности, в присутствии С-97 гидродинамический диаметр митохондрий увеличился на  $22 \pm 6$  %, а С-99 - на  $34 \pm 8$  %. Итак, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейших исследований влияния калікс[4]аренов на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз и биоэнергетику митохондрий клеток гладких мышц с целью поиска эффективных модификаторов их функциональной активности. Ключевые слова: митохондрии; электронно-транспортная цепь; транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ ; гладкие мышцы.

**H.V. Danylovyeh<sup>1</sup>, Yu.V. Danylovyeh<sup>1</sup>, R.V. Rodik<sup>2</sup>, V.I. Kalchenko<sup>2</sup>, A.Ju. Chunikhin<sup>1</sup>**

#### **CALIX[4]ARENES AS MODULATORS OF ENERGY-DEPENDENT $\text{Ca}^{2+}$ -ACCUMULATION AND FUNCTIONING OF THE ELECTRON TRANSPORT CHAIN IN SMOOTH MUSCLE MITOCHONDRIA**

The influence of supramolecular macrocyclic compounds calix[4]arenes (C-97, C-99, C-107) at a concentration of

100 nM in the process of energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -transport in isolated mitochondria of smooth muscle, as well as autofluorescence mitochondrial coenzyme NADH, FAD and hydrodynamic diameter of these organelles was investigated. Using  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluorescent dye Fluo-4 AM it was shown that the selected calix[4]arenes can suppress energy-dependent accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria. Accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  (80  $\mu\text{M}$  in the medium) accompanied by the growth of the fluorescent probe response from a conventional unit to a value of  $1,57 \pm 0,04$  ( $n=5$ ). Calix[4]arenes C-97, C-99, C-107 falls fluorescent signal below the  $0,88 \pm 0,08$ ,  $0,92 \pm 0,08$  and  $0,78 \pm 0,04$  respectively. Thus, the selected calix[4]arenes lead to release of previously accumulated  $\text{Ca}^{2+}$  from mitochondria. Under the influence of C-97 and C-99 fluorescent signal from NADH reduced to  $-0,11 \pm 0,02$  and  $-0,12 \pm 0,02$ , respectively, in relation to the reference value  $-0,05 \pm 0,01$  ( $n=5$ ). Analysis of fluorescence response NADH and FAD in a suspension of isolated mitochondria suggests that the effects of test compounds on the functional activity of the electron transport chain is associated with the initial stimulation of its I-th complex and subsequent inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NAD-containing Krebs cycle dehydrogenases. Along with this, the use of photon correlation spectroscopy to assess changes in the volume of mitochondria (their hydrodynamic diameter) under the action of selected calix[4]arenes has shown that interference with the electron transport chain leads to changes in the osmotic balance between the matrix of the mitochondria and the external environment. The result is the growth of isolated organelles volume. In particular, the hydrodynamic diameter of mitochondria increased by  $22 \pm 6\%$  and  $34 \pm 8\%$  ( $n=5$ ) in presence of C-97 or C-99. The conclusion was done about the advisability of further studies of the calyx[4]arenes effect on smooth muscle  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostase and mitochondrial bioenergetics in order to find effective modifiers of their functional activity.

Keywords: mitochondria; electron transport chain;  $\text{Ca}^{2+}$ -transport; smooth muscle.

<sup>1</sup>Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; <sup>2</sup>Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: danylovykh@biochem.kiev.ua; vik@bpci.kiev.ua

## REFERENCES

1. Kostyuk PG, Kostyuk OP, Lukyanets EA. Intracellular calcium signaling: structures and functions. Kiev: Naukova dumka, 2010. [Ukrainian].
2. Santo-Domingo J, Demaurex N Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):907-12
3. Pan S<sup>1</sup>, Ryu SY, Sheu SS. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  influx mechanisms. *Sci China Life Sci*. 2011 Aug;54(8):763-9
4. Wang HW, Wei YH, Guo HW. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence for detection of cell death. *Anticancer Agent Med Chem*. 2009; 9(9):1012-7
5. Heikal AA. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark Med*. 2010;4(2):241-63.
6. Gellerich FN, Gizatullina Z, Trumbeckaite S, Nguyen HP, Pallas T, Arandarcikaite O, Vielhaber S, Seppet E, Striggo F. The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1797(6-7):1018-27.
7. Giuliani M, Morbioli I, Sansone F, Casnati A moulding calixarenes for biomacromolecule targeting. *Chem. Commun.*, 2015, DOI: 10.1039/C5CC05204A.
8. Danylovykh HV, Danylovykh IuV, Kolomiets' OV, Kosterin SO, Rodik RV, Cherenok SO, Kal'chenko VI, Chunikhin OIu, Horchev VF, Karakhim SO. Changes in polarization of myometrial cells plasma and internal mitochondrial membranes under calixarenes action as inhibitors of plasma membrane  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2012 Nov-Dec;84(6):37-48. [Ukrainian].
9. Kosterin SA, Bratkova NF, Kursky MD. The role of sarcolemma and mitochondria in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent control of myometrium relaxation. *Biochemistry (Moscow)*. 1985; 50(8):1350-1361. [Russian].
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.
11. Kolomiets' OV, Danylovykh IuV, Danylovykh HV, Kosterin SO.  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. *Ukr Biochem J*. 2013 Jul-Aug;85(4):30-9 [Ukrainian].
12. Bailay NTJ. *Statistical methods in biology*. Great Britain: Cambridge University Press; 1995.
13. Malli R, Graier WF. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  channels: Great unknowns with important functions. *FEBS Lett*. 2010; 584:1942-47.
14. Wei AC, Liu T, Cortassa S, Winslow RL, O'Rourke B. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  influx and efflux rates in guinea pig cardiac mitochondria: low and high affinity effects of cyclosporine A. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1373-81.
15. Kolomiets' OV, Danylovykh IuV, Danylovykh GV.  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in the myometrium mitochondria: modulation of exogenous and endogenous compounds. *Fisiol. Zh*. 2014;60(5):33-42. [Ukrainian].
16. Veklich TO, Koshechkova NS, Rodik RV, Boiko VI, Vorobets' ZD, Kosterin SO. Comparative study of calixarene effect on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase activity in plasma membrane of contractile and mobile cell. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2007;79(3):19-28. [Ukrainian].
17. Agarwal B, Dash RK, Stowe DF, Bosnjak ZJ, Camara AK. Isoflurane modulates cardiac mitochondrial bioenergetics by selectively attenuating respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1837(3): 354–365.

18. Watzke N<sup>1</sup>, Diekert K, Obrdlik P. Electrophysiology of respiratory chain complexes and the ADP-ATP exchanger in native mitochondrial membranes. *Biochemistry*. 2010 Dec 7;49(48):10308-18.
19. Kandaurova N.V., Chunikhin A.Ju., Babich L.G., Shlykov S.G., Kosterin S.O. Modulators of transmembrane calcium exchange in myometrium mitochondria change their hydrodynamic diameter. *Ukr Biochem J*. 2010;82(6):52-57. [Ukrainian].
20. Gostimskaya IS, Grivennikova VG, Zharova TV, Bakeeva LE, Vinogradov AD. In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. *Anal Biochem*. 2003;313(1):46-52.

*Матеріал надійшов  
до редакції 14.12.2015*

# Role of matrix metalloproteinase 9 and its tissue inhibitor 1 in development and prognosis of diabetic retinopathy

S.V. Ziablitsev<sup>1</sup>, A.V. Korobova<sup>2</sup>, O.V. Petrenko<sup>3</sup>, V.N. Serduk<sup>4</sup>, S.U. Mogilevsky<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ukrainian science-practical center of endocrine surgery, transplantation of endocrine organs and tissue Health Ministry of Ukraine, Kyiv; <sup>2</sup>M. Gorky Donetsk National Medical University, Krasny Liman; <sup>3</sup>L.M. Shupik National medical academy of postgradual education, Kyiv; <sup>4</sup>SE «Dnepropetrovsk Medical Academy Health Ministry of Ukraine», Dnipro; e-mail: zsv1965@gmail.com

*The article presents the results of investigation of violations in the proteolysis system in patients with type 2 diabetes and diabetic retinopathy (DR). We studied the levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in the blood and in the intraocular fluid of patients with type 2 diabetes depending upon the stage of DR. We have established that the level of MMP-9 and TIMP-1 in the blood and in the intraocular fluid increased in patients with type 2 diabetes without signs of DR and with any stage of DR compared to the levels of these parameters in patients without diabetes. Increasing the levels of MMP-9 and TIMP-1 took place with increasing of DR severity and reached its maximum levels at the proliferative stage of DR. It was found that the levels of MMP-9 in the intraocular fluid and type 2 diabetes duration affected the probability of developing diabetic macular edema. At the level of MMP-9  $\geq 105$  ng/ml and 2 diabetes duration  $\geq 10$  years, the probability of developing macular edema was 100%. As a result of the construction of predictive models it was found that the level of MMP-9 in the intraocular fluid, stage of DR at the beginning of observation and type 2 diabetes duration had influence on the probability of the development of proliferative DR over 4 years of follow-up. If the level of MMP-9  $\geq 100$  ng/ml, type 2 diabetes duration  $\geq 10$  years and absence of DR at the beginning of observation were observed the probability of developing proliferative DR would compose 85.9%.*

Key words: proteolysis system; metalloproteinase-9; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1; intraocular fluid; diabetic retinopathy.

## INTRODUCTION

In recent years the proteolysis system which includes matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP) is in increasing interest when studying chronic inflammatory processes, cardiovascular, autoimmune and neoplastic diseases [1, 2]. MMPs are a family of secreted or membrane-type, zinc- or calcium-dependent proteolytic enzymes which are essential in embryogenesis, morphogenesis and tissue remodeling [2-4]. Increasing evidences suggest an important role of MMP-9 in pathogenesis of myocardial infarction, rheumatoid arthritis, cancer, obstructive lung diseases, multiple sclerosis, hepatitis and

liver cirrhosis, as well as in development of such complication of diabetes mellitus (DM) as diabetic retinopathy (DR) [5-9].

MMP-9 is a zinc-containing MMP with gelatinase activity and its substrates include collagens IV, V, VII, X, XIV, fibrin, gelatin, fibronectin, elastin, vitronectin, proteoglycan-binding protein, entactin, osteonectin, chondroitin sulfate. Retinal extracellular matrix has an ordered structure and vascular basement membrane comprises collagen IV, fibronectin, laminin vitronektin [7, 10]. There are several types of cells including endotheliocytes, basophils, neutrophils, smooth muscle cells and activated macrophages which secrete MMP-9 under the

© S.V. Ziablitsev, A.V. Korobova, O.V. Petrenko, V.N. Serduk, S.U. Mogilevsky



influence of proinflammatory cytokines and other factors [11].

DR is a major cause of blindness among working-age people suffering from DM [12, 13]. According to Health Ministry of Ukraine data the prevalence of DM in our country is 2.5%. However according to International Diabetes Federation data it was 2009 when the prevalence of DM in Ukraine has already been 9.6% with 92% of patients with DM type 2 [14, 15]. Worldwide, the number of people with DR will increase from 126.6 million in 2010 to 191 million by 2030 [12]. DR leads to a decrease in visual function in 30-90% of diabetic patients [13, 16]. Although DR has traditionally been considered a late complication of diabetes, it can justifiably be regarded as a typical pathological change in retinal vascular bed [17]. In recent years an efficiency of metabolic control and blood pressure control in protection of DR progression has been proven. However in our country only 13.1% of patients achieved target levels of glycosylated hemoglobin (HbA1c) < 7% in 2014 [18]. The earliest preclinical signs of DR include selective apoptosis of pericytes, Müller cells, glial cells and endotheliocytes, as well as an increase in mitochondrial damage. However, the precise pathophysiological mechanism of retinal vascular bed cells death in the DR is still unclear [8, 10, 11, 19]. The greatest threats for blindness development in patients with DM type 2 are diabetic macular edema (DME) and proliferative diabetic retinopathy (PDR) [16, 17, 20].

Based on the above reasons, the goal of our study was to investigate the role of disturbances in the proteolysis system (MMP-9 and TIMP-1) in the development and progression of DR.

## METHODS

MMP-9 and TIMP-1 levels were determined in the blood and intraocular fluid (IOF) of 154 patients (163 eyes), of which 112 patients (121 eyes) had DM type 2 (the study group) and 42 patients (42 eyes) were not diabetic (the

control group). All patients were subjected to surgery for age-related cataract by means of phacoemulsification with further intraocular lens implantation. The patients' mean age was  $67.55 \pm 0.83$  years in the study group and  $67.09 \pm 1.49$  years in the control group ( $P=0.84$ ). There were 62.5 % female and 37.5% male patients in the study group and 59.5% female and 40.5% male patients in the control group, respectively ( $P=0.73$ ). DM type 2 mean duration in the study group was  $6.07 \pm 0.31$  years (minimal – 0.5 year; maximal – 18 years). Patients receiving statins and fibrates and those who had renal failure, pancreatitis, neoplastic diseases, obstructive respiratory diseases, prior myocardial infarction, glaucoma, age-related macular degeneration, intravitreal injections of medications and laser coagulation of the retina in history were excluded. The study group patients with HbA1c > 8.0% were also excluded. Written informed consent on blood and IOF sampling for determining of MMP-9 and TIMP-1 levels and the use of research results for scientific purposes was obtained from each patient. MMP-9 and TIMP-1 levels in patients' blood and IOF were determined on the ELISA analyzer «PR2100 Sanofi diagnostic Pasteur» (France) by means of kits for ELISA “matrix metalloproteinase-9” and “tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1” produced by Bender Medsystems (Austria) according to the instructions of the manufacturer. Follow-up in the study group was 4 years with ophthalmologic examination of patients each 6 months. The degree of DR severity in patients with DM type 2 was determined after cataract surgery using a DR severity scale of the American Academy of Ophthalmology [21]. Ophthalmologic examination included visometry, refractometry, pneumotometry, biomicroscopy, contact retinal biomicroscopy with Goldmann lens. Optical coherence tomography on the tomograph Stratus OCT, Carl Zeiss (Germany), color photography of ocular fundus on Visucam Zeiss apparatus; fluorescent retinal angiography if indicated, were also carried out. The final

assessment of the retina state in the study group was performed at the beginning of follow-up after surgery, as well as at the end of the 1-st and 4-th year of observation.

For statistical analysis Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004) were used. Quantitative variables were expressed as  $M \pm m$  where  $M$  – mean value,  $m$  – standard deviation, median  $Me$  – median. Cause-effect relationships and the role of prognostic risk factors in DME development in patients with DM type 2 during 1-st year of follow-up were investigated. A mathematical model for predicting DME development was based on the results of observations of 121 eyes in the study group. A mathematical model to predict PRD development was based on the results of observations of 112 eyes in the study group (as patients with signs of PRD at the beginning of observations were excluded). Prognostic risk factors include MMP-9 levels in IOF, sex, age, DM duration and a degree of DR at the beginning of observations (it was estimated by scale from 0 to 3, where 0 – no DR 1 – initial nonproliferative DR (NPDR), 2 – moderate NPDR, 3 – severe NPDR).

A probability of the event (DME or PRD development) ranging from 0 to 1 was predicted using binary logistic regression. There was no probability of the event if  $P=0-0.5$  (i.e. less than 50%). Otherwise there was more than 50% probability the event to occur if  $P>0.5$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

It was established that after cataract surgery in the study group there were 51.2% cases (62 eyes) with no DR, 16.5% cases (20 eyes) of

initial NPDR, 18.2% cases (22 eyes) of moderate NPDR, 6.6% cases (8 eyes) of severe NPDR and 7.5% cases (9 eyes) of PDR.

Mean blood MMP-9 and TIMP-1 levels in patients of the study group were increased compared to those in the control group (table 1).

Blood MMP-9 levels in patients with DM type 2 having different stages of DR ranged from 55.89 ng/ml to 124.65 ng/ml, while in nondiabetic patients a minimal blood level of MMP-9 was 30.89 ng/ml, and maximal – 80.00 ng/ml.

Minimal blood TIMP-1 level in patients of the study group was 239.34 ng/ml, and maximal – 496.50 ng/ml, while in the control group minimal blood TIMP-1 level was 127.58 ng/ml, and maximal – 433.90 ng/ml, respectively.

Our data on an increase in blood MMP-9 and TIMP-1 levels in patients with DM type 2 are consistent with the results obtained by foreign researchers [9, 22]. However in Tayebjee M.H. et al. study there was not a statistically significant difference in MMP-9 levels between patients with DM type 2 and the control group [22]. This perhaps could be explained by the presents in the aforementioned study of patients with concomitant somatic pathology which may affect MMP-9 levels. According to Derosa G. et al. study plasma levels of MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 are increased in diabetic patients compared to nondiabetic individuals, that could reflect pathological changes in extracellular matrix remodeling at this disease [9]. In our opinion, an increase in blood MMP-9 and TIMP-1 levels in patients with DM type 2 suggests that in patients with DM type 2 and DR there is a systemic involvement of body vessels in chronic immune inflammation and accelerated

**Table 1. Blood MMP-9 and TIMP-1 levels in patients of the study and control groups ( $M \pm m$ ;  $Me$ ; min; max)**

Indexes	The study group (n=112)	The control group (n=42)	Statistical significance. P
MMP-9 ng/ml $Me$ ; min; max	79.37 $\pm$ 1.45 77.12; 55.89; 124.65	51.28 $\pm$ 1.7 50.0; 30.89; 80.00	$P<0.001$
TIMP-1 ng/ml $Me$ ; min; max	339.87 $\pm$ 5.56 326.06; 239.34; 496.50	218.44 $\pm$ 11.81 189.86; 127.58; 433.90	$P<0.001$

atherosclerosis as DM type 2 is an equivalent of coronary heart disease [23]. Furthermore, MMP-9 is considered as a marker of systemic inflammation and as a marker of atheromatous plaque destabilization [23].

It was found that blood MMP-9 levels in patients with DM type 2 increased in accordance with the severity of retinal lesions (table 2).

In the study group, even in the absence of DR, blood MMP-9 levels exceeded those in the control group ( $P < 0.001$ ). The highest blood MMP-9 levels were revealed in patients with PDR –  $103.34 \pm 6.14$  ng/ml. Blood TIMP-1 levels in patients of the study group in the absence of DR and at any stage of DR were higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The highest blood TIMP-1 levels were revealed in patients with PDR –  $436.06 \pm 23.49$  ng/ml.

In Beránek M. et al. study (2010) elevated blood MMP-9 levels were identified in patients with DM and PDR as well as in patients with DM type 2 and not PDR compared to the control group [24]. In general, our results were consistent with the data of that study.

In our study it was found that mean MMP-9 and TIMP-1 levels in IOF are increased in patients with DM type 2 compared to those in patients of the control group ( $P < 0.001$ ) (table 3).

Table 4 shows MMP-9 and TIMP-1 levels in IOF of patients with DM type 2 according

to the stage of DR, as well as a comparison of these variables between groups of patients without DR, with initial, moderate and severe NPDR and PDR and with the control group. It was found that MMP-9 and TIMP-1 levels in IOF of patients of the study group are increased at any stage of DR and in those having no DR as compared to patients of the control group ( $P < 0.05$ ). The levels of MMP-9 and TIMP-1 increased in accordance with the severity of DR and peaked at the proliferative stage of the disease –  $117.78 \pm 6.35$  ng/ml and  $512.13 \pm 19.26$  ng/ml, respectively (table 4).

Abu El-Asrar A.M. et al. (2013) by means of Western blot and zymography analysis demonstrated significant increases in the expression levels of MMP-1, MMP-7, MMP-9 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in vitreous samples from 32 PDR patients compared to nondiabetic controls [25]. In that study it was also shown an increase in the expression of MMP-9 by vascular endothelial cells and stromal cells in fibrovascular epiretinal membranes in PDR. In epiretinal membranes of patients with PDR cytoplasmic immunoreactivity for MMP-9 was present in vascular endothelial cells, monocytes, macrophages and neutrophils. These findings suggested that intraocular cellular production is the relevant source of MMP-9 and VEGF and that systemic inflow mechanism is

**Table 2. Blood MMP-9 and TIMP-1 levels in patients of the study group depending on DR stage (M±m)**

DR stage	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)
An absence of DR (n=54)	$70.59 \pm 1.15$ *	$310.65 \pm 5.39$ *
Initial NPDR (n=19)	$77.61 \pm 1.31$ * #	$330.25 \pm 6.81$ * #
Moderate NPDR (n=22)	$84.55 \pm 2.0$ * #	$349.88 \pm 7.23$ * #
Severe NPDR (n=8)	$97.46 \pm 8.02$ * #	$408.59 \pm 25.02$ * #
PDR (n=9)	$103.34 \pm 6.14$ * #	$436.06 \pm 23.49$ *

\* difference in comparison with the control group is statistically significant,  $P < 0.05$ ;

# difference in comparison of similar indexes levels between the different stages of DR (between an absence DR and initial NPDR; between initial NPDR and moderate NPDR; between moderate NPDR and severe NPDR; between severe NPDR and PDR),  $P < 0.05$ .

**Table 3. MMP-9 and TIMP-1 levels in IOF from patients of the study and control groups (M±m; Me; min; max)**

Indexes	The study group (n=121)	The control group (n=42)	Statistical significance P
MMP-9 ng/ml Me; min; max	85.97±1.57 82.1; 55.35; 146.52	46.92±2.35 43.15; 22.45; 87.05	P<0.001
TIMP-1 ng/ml Me; min; max	397.63±7.33 366.05; 256.18; 680.87	231.36±16.44 191.29; 132.55; 650.76	P<0.001

rather improbable. The authors concluded that it was MMP-1 and MMP-9 contributed to the retinal neovascularization and fibrosis resulting in PDR development.

Our findings of increased levels of MMP-9 in IOF in initial stages of NPDR and in PDA are consistent with the views of foreign authors on the dual role of MMP-9 in DR development: in early stages of the disease MMP-9 promotes retinal capillary cell death and increased permeability of the inner blood-retinal barrier, and later, in the proliferative stage, it is involved in processes of retinal neovascularization [19].

TIMP-1 levels were significantly increased in the vitreous of diabetic patients with the highest levels in PDR patients. In that study a strong correlation between TIMP-1 expression and proMMP-9 in vitreous of patients with PDR was also found. Demonstrated that human diabetic neovascular membranes contain high levels of type IV collagenases which include MMP-9 and

MMP-2, while active forms of these enzymes are not found in the normal human retina.

According to the results of calculations the final prognostic model for DME development within 1<sup>st</sup> year of follow-up in patients with DM type 2 includes two features: levels of MMP-9 in IOF and DM type 2 duration. In general form the equation for the binary logistic regression is as follows:

$$P = \frac{1}{1 - 2.718^{-9.951 + (-0.112 \times X_1 - 0.266 \times X_2)}},$$

where  $X_1$  - MMP-9 levels in IOF (ng/ml),  $X_2$  - DM type 2 duration (years).

It was found that at MMP-9 levels  $\geq 105$  ng/ml and DM type 2 duration  $\geq 10$  years the probability for DME development within 1-st year follow-up is 100% (P=1). At MMP-9 levels = 90 ng/ml and DM type 2 duration = 5 years the probability for DME development within 1-st year follow-up is still high 81% (P=0.81).

**Table 4. MMP-9 and TIMP-1 levels in IOF from patients of the study group depending on DR stage (M±m)**

DR stage	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)
An absence of DR (n=62)	76.32±1.51 *	362.86±8.45 *
Initial NPDR (n=20)	81.54±1.61 * #	391.38±14.74 * #
Moderate NPDR (n=22)	96.67±1.8 * #	433.57±16.12 * #
Severe NPDR (n=8)	109.376±4.39 * #	464.90±22.36 * #
PDR (n=9)	117.78±6.35 * #	512.13±19.26 *

\* difference in comparison with the control group is statistically significant, P<0.05;

# difference in comparison of similar indexes levels between the different stages of DR (between an absence DR and initial NPDR; between initial NPDR and moderate NPDR; between moderate NPDR and severe NPDR; between severe NPDR and PDR), P<0.05.

In our study DME developed within 1-st year of follow-up in 28 eyes (23.14% of cases) of which 8 eyes did not have signs of DR at the beginning of observation, 2 eyes had signs of initial NPDR, 14 eyes – moderate NPDR and 4 eyes – PRD. The presence of DME was confirmed by examination data, optical coherence tomography and FAG of the retina. These patients required laser treatment and/or intravitreal VEGF inhibitors. Of 28 eyes with DME in 26 eyes (92.7%) MMP-9 levels in IOF were above 90 ng/ml.

Within 4-year follow-up PDR developed in 19.64% of cases (22 of 112 eyes in patients of the study group) and it was accompanied by occurrence of a large number of hard and cotton-like exudates, an increase in number of microhemorrhages and occurrence of large intraretinal and preretinal hemorrhages, optic disc neovascularization and retinal neovascularization. PDR development was confirmed by examination data and FAG of the retina. These patients required laser treatment, vitreoretinal surgery and intravitreal VEGF inhibitors. The mean MMP-9 level in IOF in these patients was  $102.37 \pm 2.72$  ng/ml, TIMP-1 –  $495.67 \pm 21,85$  ng/ml, DM type 2 duration –  $9.41 \pm 0.08$  years.

Within 4-year follow-up DR occurred and progressed in 45 eyes (37.19% of cases): in 28 eyes DME has developed, in 22 eyes PDR has developed and in 8 eyes without DR signs of moderate NPDR have developed.

According to the results of calculations the final prognostic model for PDR development within 4-year follow-up in patients with DM type 2 includes three features: a stage of DR at the beginning of observation, levels of MMP-9 in IOF and DM type 2 duration. The equation for the binary logistic regression is as follows:

$$P = \frac{1}{1 - 2.718^{-16.665 + (-0.125 \times X_1 - 0.594 \times X_2 - 0.338 \times X_3)}},$$

where  $X_1$  – MMP-9 levels in IOF (ng/ml),  $X_2$  – DM type 2 duration (years),  $X_3$  – a stage of DR at the beginning of observation.

It was found that at MMP-9 level  $\geq 105$  ng/ml and DM type 2 duration  $\geq 10$  years and an

absence of DR at the beginning of observation the probability for PDR development within 4-year follow-up is high and accounts 85.9 % ( $P=0.859$ ).

Thus, MMP-9 levels in IOF of patients with DM type 2, the initial degree of DR severity as well as DM type 2 duration were statistically significant risk factors for DR progression within 4 years of follow-up.

## CONCLUSIONS

Alterations in the proteolysis system in patients with DR and DM type 2 were revealed. They included an increase in MMP-9 and TIMP-1 levels in blood and IOF in patients with DM and the absence of signs of DR and in patients with DM and DR of any stage compared to those in nondiabetic patients ( $P < 0.05$ ). MMP-9 and TIMP-1 levels increased in accordance to an increase in DR severity: MMP-9, TIMP-1 levels reached a maximum in PDR ( $103.34 \pm 6.14$  ng/ml and  $436.06 \pm 23.49$  ng/ml in blood and  $117.78 \pm 6.35$  ng/ml and  $512.13 \pm 19.26$  ng/ml in IOF, respectively).

By means of prognostic model constructing it was established that MMP-9 levels in IOF and DM type 2 duration have an effect on the probability for DME development. At MMP-9 levels  $\geq 105$  ng/ml and DM type 2 duration  $\geq 10$  years the probability for DME development within 1-year follow-up is 100%. At MMP-9 levels 90 ng/ml and DM type 2 duration 5 years the probability for DME development within 1-year follow-up is 81%.

By means of prognostic model constructing it was established that MMP-9 levels in IOF, a stage of DR at the beginning of observation and DM type 2 duration have an effect on the probability for PDR development in patients with DM type 2 within 4-year follow-up. At MMP-9 levels  $\geq 105$  ng/ml, DM type 2 duration  $\geq 10$  years and an absence of DR at the beginning of observation the probability for PDR development within 4-year follow-up is high and accounts 85.9% ( $P=0.859$ ).



**С.В. Зяблицев<sup>1</sup>, О.В. Коробова<sup>2</sup>, О.В. Петренко<sup>3</sup>,  
В.М. Сердюк<sup>4</sup>, С.Ю. Могилевський<sup>3</sup>**

## **РОЛЬ МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ 9 ТА ЇЇ ТКАНИННОГО ІНГІБІТОРА 1 В РОЗВИТКУ І ПРОГНОЗУВАННІ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ**

У статті наведено результати дослідження порушень у системі протеолізу у хворих на цукровий діабет (ЦД) 2-го типу та діабетичну ретинопатію (ДР). Вивчали вміст матриксної металопротеїнази 9 (ММП-9) і її тканинного інгібітора 1 (ТІМП-1) у крові та внутрішньоочній рідині (ВОР) хворих на ЦД 2-го типу залежно від стадії ДР. Встановлено зміни в системі протеолізу у хворих на ДР і ЦД 2-го типу, які полягали в підвищенні вмісту ММП-9 і ТІМП-1 у крові та ВОР як за відсутності ознак ДР, так і за будь-якої її стадії порівняно з цими показниками у хворих без діабету. Підвищення вмісту ММП-9 і ТІМП-1 у крові та ВОР хворих на ЦД 2-го типу відбувалося зі збільшенням тяжкості ДР: за проліферативної ДР ці показники досягли максимуму. Встановлено, що вміст ММП-9 у ВОР і тривалість ЦД 2-го типу впливають на ймовірність розвитку діабетичного макулярного набряку. За вмісту ММП-9 $\geq$ 105 нг/мл і тривалості ЦД 2-го типу понад 10 років вона становить 100 %. У результаті побудови прогностичної моделі встановлено, що на ймовірність розвитку проліферативної ДР у хворих на ЦД 2-го типу протягом 4 років впливають: вміст ММП-9 у ВОР, стадія ДР на початку спостереження та тривалість ЦД 2-го типу. За вмісту ММП-9 $\geq$ 100 нг/мл, тривалості ЦД 2-го типу понад 10 років і відсутності ознак ДР на початку спостереження ймовірність розвитку проліферативної ДР становила 85.9%.

Ключові слова: система протеолізу; металопротеїназа-9; тканинний інгібітор матриксної металопротеїнази 1; внутрішньоочна рідина; діабетична ретинопатія.

<sup>1</sup>Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, Київ; <sup>2</sup>Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, Красний Лиман; <sup>3</sup>Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, Київ; <sup>4</sup>ДУ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро

**С.В. Зяблицев<sup>1</sup>, А.В. Коробова<sup>2</sup>, О.В. Петренко<sup>3</sup>,  
В.Н. Сердюк<sup>4</sup>, С.Ю. Могилевський<sup>3</sup>**

## **РОЛЬ МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ 9 І ЇЇ ТКАНЕВОГО ІНГІБІТОРА 1 В РОЗВИТКУ І ПРОГНОЗУВАННІ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ**

В статті приведені результати досліджень порушень у системі протеолізу у хворих на цукровий діабет (СД) 2-го типу та діабетичної ретинопатії (ДР). Вивчали вміст матриксної металопротеїнази 9 (ММП-9) і її тканевого інгібітора 1 (ТІМП-1) у крові та внутрішньоочній рідині (ВГЖ) у хворих на СД 2-го типу імуноферментним методом. Установлено зміни в системі протеолізу у хворих на ДР і СД 2-го типу, які полягали в підвищенні вмісту ММП-9 і ТІМП-1 у крові та ВГЖ як при відсутності ознак ДР, так і при будь-якій її стадії порівняно з цими показниками у хворих без діабету. Підвищення вмісту ММП-9 і ТІМП-1 у крові та ВГЖ хворих на СД 2-го типу відбувалося зі збільшенням тяжкості ДР: за проліферативної ДР ці показники досягли максимуму. Установлено, що вміст ММП-9 у ВГЖ і тривалість СД 2-го типу впливають на ймовірність розвитку діабетичного макулярного набряку. При вмісту ММП-9 $\geq$ 105 нг/мл і тривалості СД 2-го типу понад 10 років вона становить 100%. У результаті побудови прогностичної моделі встановлено, що на ймовірність розвитку проліферативної ДР у хворих на СД 2-го типу протягом 4 років впливають: вміст ММП-9 у ВГЖ, стадія ДР на початку спостереження та тривалість СД 2-го типу. При вмісту ММП-9 $\geq$ 100 нг/мл, тривалості СД 2-го типу понад 10 років і відсутності ознак ДР на початку спостереження ймовірність розвитку проліферативної форми становить 85.9%.

Ключевые слова: система протеолізу; металопротеїназа-9; тканевої інгібітор матриксної металопротеїнази-1; внутрішньоочна рідина; діабетична ретинопатія.

Ключевые слова: система протеолізу; металопротеїназа-9; тканевої інгібітор матриксної металопротеїнази-1; внутрішньоочна рідина; діабетична ретинопатія.

<sup>1</sup>Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МЗ України, Київ; <sup>2</sup>Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, Красний Лиман; <sup>3</sup>Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, Київ; <sup>4</sup>ГУ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро

## **REFERENCES**

1. Evrosimovska B, Velickovski B, Dimova C, Veleska-Stefkovska D. Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases). J Cell Anim Biol. 2011; 5(7). 113-20.
2. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. Biochem Pharmacol. 2008; 75(2): 346-59. doi: 10.1016/j.bcp.2007.07.004.
3. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999; 274: 21491-4. doi: 10.1074/jbc.274.31.21491.
4. Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. Lab Invest. 2005; 85(5): 597-607. doi: 10.1038/labinvest.3700251.
5. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. Front Biosc. 2006; 11: 1696-701.
6. Rogowicz A, Zozulińska D, Wierusz-Wysocka B. Role of matrix metalloproteinases in the development of vascular complications of diabetes mellitus – clinical implications.

- Pol Arch Med Wewn. 2007; 117 (3): 1-7.
7. Bhatt LK, Addepalli V. Attenuation of diabetic retinopathy by enhanced inhibition of MMP-2 and MMP-9 using aspirin and minocycline in streptozotocin-diabetic rats. *Amer J Translat Res*. 2010; 2(2): 181-9.
  8. Kowluru RA, Mohammad G, dos Santos JM, Zhong Q. Abrogation of MMP-9 gene protects against the development of retinopathy in diabetic mice by preventing mitochondrial damage. *Diabetes*. 2011; 60(11): 3023-33. doi:10.2337/db11-0816.
  9. Derosa G, D'Angelo A, Tinelli C, Devangelio E, Consoli A, Miccoli R, Penno G, Del Prato S, Paniga S, Cicero AFG. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabet Metabol*. 2007; 33(2): 129-34. doi: 10.1016/j.diabet.2006.11.008.
  10. Rangasamy S, McGuire PG, Das A. Diabetic retinopathy and inflammation: novel therapeutic targets. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2012; 19 (1): 52-9.
  11. Kowluru RA. Role of Matrix Metalloproteinase-9 in the development of diabetic retinopathy and its regulation by H-Ras. *Invest Ophthalmol Visual Sci*. 2010; 51(8): 4320-26. doi: 10.1167/iops.09-4851.
  12. Zheng Y, He M, Congdon N. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy. *Ind J Ophthalmol*. 2012; 60(5): 428-31. doi: 10.4103/0301-4738.100542.
  13. El-Azab MF, Mysona BA, El-Remessy AB. Statins for prevention of diabetic-related blindness: a new treatment option? *Exp Rev Ophthalmol*. 2011; 6(3): 269-72. doi: 10.1586/eop.11.36.
  14. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010; 87(1): 4-14. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007.
  15. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 7 ed.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.
  16. Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38: 752-65. doi:10.1016/j.biocel.2005.08.002.
  17. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet*. 2010; 376(9735): 124-36. doi: 10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
  18. Tronko MD, Sokolova LK, Vlasenko NV, Kostukevich AA., 2015. Achieving the goals in treatment of patients with diabetes mellitus in Ukraine. Results Diabetes Management Practices Study (IDMPS). *Endokrynologia*. 20(4): 658-68. [Ukrainian].
  19. Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. *Exp Opin Invest Drugs*. 2012; 21(6): 797-805. doi: 10.1517/13543784.2012.681043.
  20. Demirel S, Argo C, Agarwal A, Parriott J, Sepah YJ, Do DV, Nguyen QD. Updates on the clinical trials in diabetic macular edema. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2016; 23(1): 3-12. http://doi.org/10.4103/0974-9233.172293.
  21. Global Diabetic Retinopathy Project Group. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003; 110(9): 1677-82. doi http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420(03)00475-5.
  22. Tayebjee MH, Lim HS, Macfadyen RJ. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(8): 2049-51.
  23. Heo SH, Cho CH, Kim HO, Jo YH, Yoon KS, Lee JH, Park JC, Park KC, Ahn TB, Chung KC, Yoon SS, Chang DI. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of Matrix Metalloproteinases 2 and 9. *J Clin Neurol*. 2011; 7(2): 69-76. http://dx.doi.org/10.3988/jcn.2011.7.2.69.
  24. Beránek M, Kolar P, Tschoplova S, Kankova K, Vasku A. Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2008; 14: 1114-21.
  25. Abu El-Asrar AM, Mohammad G, Nawaz MI et al. Relationship between vitreous levels of Matrix Metalloproteinases and Vascular Endothelial Growth Factor in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2013; 8(12): e85857. doi: 10.1371/journal.pone.0085857.

*Received 17.05.2016*

# Особливості структури хроноритмів іонорегулювальної функції нирок за умов гіпофункції шишкоподібної залози

С.Б. Семененко, С.С. Ткачук, О.В. Ткачук, С.Ю. Каратєєва, В.В. Анцупова

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», Чернівці; e-mail: [semenenko.svitlana@bsmu.edu.ua](mailto:semenenko.svitlana@bsmu.edu.ua)

*У роботі досліджено особливості хроноритмічних перебудов іонорегулювальної функції нирок за умов гіпофункції шишкоподібної залози. Для вивчення гіпофункції епіфіза тварин утримували в умовах постійної світлової стимуляції впродовж 7 діб. Встановлено, що гіпофункція шишкоподібної залози спричиняє порушення циркадіанної організації іонорегулювальної функції нирок порівняно з контрольною групою тварин. За умов фізіологічної пінеалектомії спостерігали підвищення екскреції іонів натрію ( $6,11 \pm 0,81$  ммоль/год), а його концентрація в плазмі крові залишалася підвищеною цілодобово. Отримані результати вказують на істотні зміни інтегральних характеристик ритмів показників електролітного обміну та вагому роль шишкоподібної залози у забезпеченні фізіологічного гомеостазу.*

*Ключові слова: циркадіанний ритм; нирки; шишкоподібна залоза.*

## ВСТУП

Нині у сучасній фізіології з'ясування хроноритмічних аспектів нейрогуморальних та внутрішньоклітинних механізмів регуляції гомеостазу залишається одним з найбільш актуальних питань [1]. Ритмічність розглядається як обов'язкова властивість живої матерії на всіх рівнях організації [2], а вивчення ритмів функціонування різних систем організму, чинників, що впливають на їх формування, представляє безпосередній інтерес для сучасної біології і медицини [3]. Біологічні ритми – періодично повторювані зміни характеру й інтенсивності фізіологічних процесів і явищ, котрі властиві біосистемам на всіх рівнях організації [4]. Прийнято концепцію про циркадіанну систему організму, функціональними ланками якої є шишкоподібна залоза, що відіграє важливу роль у процесах адаптації до дії різних чинників довкілля та супрахіазматичні ядра гіпоталамуса, які розглядаються як основний генератор біорит-

мів більшості функцій організму [5]. Нирки також характеризуються чіткою часовою збалансованістю функцій [6], однак, особливості циркадіанної організації та механізми біоритмічної регуляції ниркових функцій залишаються недостатньо вивченими [7].

Світлові подразники як екзогенні фактори у формуванні добового ритму діяльності нирок опосередковуються і через шишкоподібну залозу [8]. Після пінеалектомії розвивається десинхроноз діуретичної реакції й іонорегулювальної функції нирок, що проявляється зменшенням амплітуди коливань, зміщенням ритму сечовиділення і калійурезу з нічного на денний період, а також компенсованим ацидозом, котрий супроводжується зменшенням виведення вільних іонів водню та амонію [9].

Мета нашої роботи – вивчити особливості структури хроноритмів іонорегулювальної функції нирок за умов гіпофункції шишкоподібної залози.

© С.Б.Семененко, С.С. Ткачук, О.В. Ткачук, С.Ю. Каратєєва, В.В. Анцупова

## МЕТОДИКА

Досліди провели на 72 статевозрілих нелінійних самцях білих щурів масою 0,15-0,18 кг, тварин утримували в умовах віварію при сталій температурі та вологості повітря на стандартному харчовому раціоні. До контрольної і дослідної груп ввійшло по 36 тварин, які впродовж 7 діб перебували за умов звичайного світлового режиму (12 год світло і 12 год темрява) і фізіологічної пінеалектомії (24 год освітлення) відповідно [10]. На 8-му добу тваринам проводили навантаження підігрітою до кімнатної температури водопровідною водою (5% від маси тіла) і досліджували показники іонорегулювальної функції нирок за умов форсованого діурезу [10]. Вивчали концентрацію, екскрецію, абсолютну та відносну реабсорбцію, проксимальний та дистальний транспорт іонів натрію, концентраційний індекс, натрій/калієвий коефіцієнт та кліренс іонів натрію [11].

Експерименти проводили з 4-годинним інтервалом упродовж доби. Дослідження в контрольних та дослідних тварин у нічний період доби проводили при слабкому (2 лк) червоному світлі, яке практично не впливає на біосинтез мелатоніну шишкоподібною залозою. Всі етапи експерименту здійснено з дотриманням основних вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин.

Результати обробляли статистично методом “Косинор-аналізу”, а також параметричними методами варіаційної статистики. Діагностика функціональних особливостей ґрунтувалася на основі аналізу змін характеристик мезору, амплітуди, акрофази та форми кривої циркадіанного ритму. Отримані індивідуальні хронограми для кожної тварини групували за принципом ідентичності максимальної акрофази і фазову структуру (за інтервалом часу між акро- та батифазою).

Отримані експериментальні результати обробляли на персональних комп’ютерах пакетом програм EXCEL-2003 “Microsoft Corp.,

США”. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки ( $\bar{x}$ ), її дисперсії і похибки середньої ( $S_x$ ). Для виявлення вірогідності відмінностей результатів у тварин використовували критерій  $t$  Стьюдента, після чого визначали вірогідність відмінності вибірок ( $P$ ) і довірчий інтервал середньої за таблицями розподілу Стьюдента. Вірогідними вважали значення, для яких  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин, які перебували в умовах фізіологічної функції шишкоподібною залозою, динаміка екскреції іонів натрію впродовж доби була двофазною. Найвищу екскрецію спостерігали о 4.00, високі її рівні зберігалися до 8-ї години, а батифаза припадала на 24.00. Тенденцію до підвищення екскреції іона виявляли в ранковий та денний періоди доби з новим піком о 4.00 і поступовим спадом (рис. 1). Мезор ритму становив  $6,11 \pm 0,81$  ммоль/год, амплітуда коливань не перевищувала 33 %. У перерахунку на 100 мкл клубочкового фільтрату рівень екскреції іонів натрію впродовж доби становив  $2,24 \pm 0,14$  ммоль/мкл з амплітудою 27 %. Хроноритм концентрації іонів натрію в сечі мав однофазний характер з акрофазою о 4.00 та батифазою о 20.00 (рис. 2) і мезором  $3,91 \pm 0,19$  ммоль/л. Амплітуда ритму не перевищувала 29 % від

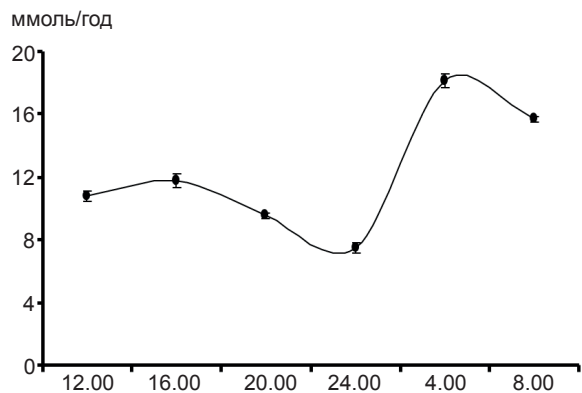


Рис. 1. Хроноритми екскреції іонів натрію (ммоль/год) у контрольних щурів

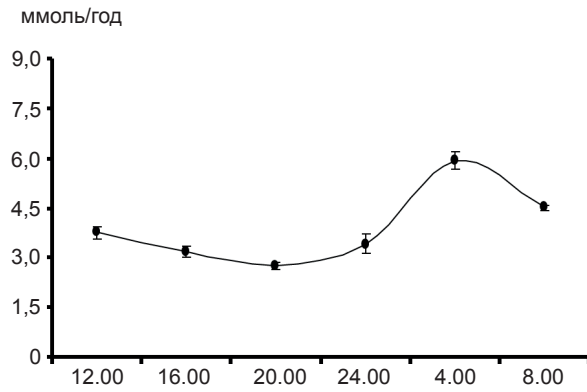


Рис. 2. Хроноритми концентрації іонів натрію в сечі (ммоль/л) у контрольних щурів

мезору. Фільтраційна фракція іонів натрію також змінювалась упродовж доби. Батифазу цього показника виявляли о 12.00, акрофазу — о 4.00. Мезор становив  $77,11 \pm 3,18$  ммоль/хв з амплітудою 19 %. Аналогічно змінювалися показники абсолютної реабсорбції вказаного іона (таблиця). Середньодобовий рівень відносної реабсорбції іонів натрію сягав  $99,92 \pm 0,02$  % з акрофазою о 24.00, що відповідало батифазі екскреції іонів натрію. Подібною архітектонікою відзначався ритм проксимального транспорту іонів натрію, тоді як у дистальному сегменті нефрона

**Вплив гіпофункції шишкоподібної залози на мезор і амплітуду ритмів ниркового транспорту іонів натрію у білих щурів ( $\bar{x} \pm S$ ; n=36)**

Показники	Контроль		Гіпофункція шишкоподібної залози	
	Мезор	Амплітуда, %	Мезор	Амплітуда, %
Концентрація іонів натрію у сечі, ммоль/л	$3,91 \pm 0,19$	$29,22 \pm 1,61$	$6,71 \pm 0,65^{**}$	$20,71 \pm 1,34^{**}$
Екскреція іонів натрію, ммоль/год	$6,11 \pm 0,81$	$16,27 \pm 1,31$	$8,11 \pm 0,56$	$11,92 \pm 0,82^*$
Екскреція іонів натрію, ммоль/100 мкл клубочкового фільтрату	$2,24 \pm 0,14$	$26,91 \pm 1,91$	$6,62 \pm 0,32^{**}$	$28,82 \pm 1,89$
Концентрація іонів натрію у плазмі, ммоль/л	$123,73 \pm 3,82$	$5,03 \pm 1,21$	$138,91 \pm 2,82^{**}$	$3,12 \pm 0,69$
Натрій/калієвий коефіцієнт, ум. од.	$0,32 \pm 0,05$	$41,72 \pm 1,51$	$0,93 \pm 0,19^{**}$	$31,11 \pm 1,95^{**}$
Фільтраційна фракція іонів натрію, ммоль/хв	$77,11 \pm 3,18$	$19,11 \pm 1,02$	$37,53 \pm 2,33^{**}$	$28,12 \pm 1,57^{**}$
Абсолютна реабсорбція іонів натрію, ммоль/хв	$76,91 \pm 2,35$	$9,02 \pm 0,82$	$37,43 \pm 1,41^{**}$	$28,11 \pm 0,81^{**}$
Відносна реабсорбція іонів натрію, %	$99,92 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	$99,62 \pm 0,07^{**}$	$0,14 \pm 0,91$
Кліренс іонів натрію, мл/год	$0,07 \pm 0,01$	$14,16 \pm 1,21$	$0,06 \pm 0,01$	$11,72 \pm 0,19$
Кліренс безнатрієвої води, мл/год	$1,56 \pm 0,05$	$9,43 \pm 0,21$	$1,16 \pm 0,01$	$5,76 \pm 0,31^{**}$
Проксимальний транспорт іонів натрію, ммоль/год	$4,47 \pm 0,09$	$10,11 \pm 0,21$	$2,11 \pm 0,15^{**}$	$14,81 \pm 0,31^{**}$
Дистальний транспорт іонів натрію, ммоль/год	$192,72 \pm 6,73$	$10,56 \pm 0,21$	$162,36 \pm 6,62^{**}$	$5,56 \pm 0,07^{**}$
Проксимальний транспорт іонів натрію, ммоль/100 мкл клубочкового фільтрату	$11,82 \pm 0,29$	$4,22 \pm 0,41$	$12,81 \pm 0,26$	$4,13 \pm 0,93$
Дистальний транспорт іонів натрію, ммоль/100 мкл клубочкового фільтрату	$0,61 \pm 0,07$	$32,43 \pm 0,41$	$1,11 \pm 0,08^{**}$	$20,64 \pm 0,19^{**p}$
Концентраційний індекс іонів натрію, ум. од.	$0,14 \pm 0,01$	$34,44 \pm 0,41$	$0,11 \pm 0,05$	$21,62 \pm 0,99^{**}$

\*  $P < 0,01$ , \*\*  $P < 0,001$  порівняно з контролем



акрофазу іона спостерігали о 8.00, батифазу - о 24.00.

Таке циркадіанне співвідношення між процесами проксимального і дистального транспорту, а також те, що середньодобовий рівень проксимальної реабсорбції в перерахунку на 100 мкл клубочкового фільтрату істотно перевищував мезор дистального транспорту іонів натрію є свідченням фізіологічної узгодженості між облігатною та факультативною реабсорбцією іонів натрію.

Узагальнюючи результати проведеної серії досліджень слід відмітити, що функції нирок у контрольних тварин підпорядковані чіткій циркадіанній організації. Добові ритми показників функцій нирок відображають аналогічні зміни ренальних процесів.

Порівняно з контрольною групою тварин за умов гіпофункції шишкоподібної залози спостерігали підвищення екскреції іонів натрію (див. таблицю), а його концентрація в плазмі крові залишалася підвищеною цілодобово (рис. 3). Висока концентрація іонів натрію в плазмі крові при гіпофункції шишкоподібної залози зберігалася, хоча знижувалися базисні рівні ритмів абсолютної та відносної реабсорбції цього іона (див. таблицю), а архітекtonіки ритмів вказаних показників незначно відрізнялися від хронограм контрольних щурів. Підвищена концентрація іонів натрію в плазмі крові щурів призводила до компенсаторної акти-

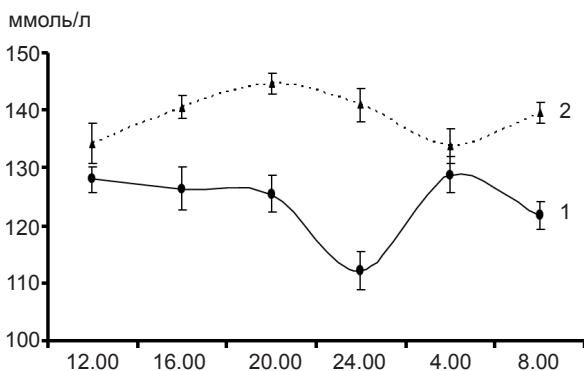


Рис. 3. Хроноритми концентрації іонів натрію (ммоль/л) у плазмі крові щурів з гіпофункцією шишкоподібної залози: 1 – контроль, 2 – гіпофункція шишкоподібної залози

вації їх виділення, включаючи всі можливі механізми. Це підтверджувалося високим кліренсом іонів натрію о 12.00, 24.00 та 4.00 і зниженням кліренсу безнатрієвої води в усі досліджувані проміжки доби порівняно з контролем (див. таблицю). Вірогідно знижена фільтраційна фракція іонів натрію в щурів із гіпофункцією шишкоподібної залози призводила до активації проксимального транспорту іона в перерахунку на 100 мкл клубочкового фільтрату упродовж доби, за винятком 4.00, відносно відповідних показників у контрольних тварин. Незважаючи на високу концентрацію іонів натрію в плазмі крові виявлено також вірогідне зростання (на 83 %) мезору дистального їх транспорту порівняно з контролем (див. таблицю). Амплітуда вірогідно знижувалася на 21 %, архітекtonіка ритму була подібною до хронограм у контрольних тварин. Відмічено вірогідне підвищення базисного рівня та амплітуди ритму на 28 % амонійного коефіцієнта (див. таблицю), зміщення фазової структури ритму відносно значень тварин контрольної групи.

Отримані результати свідчать про вагомую роль епіфіза мозку у забезпеченні фізіологічного гомеостазу і повинні братися до уваги при діагностиці та прогнозуванні порушень функції нирок у клінічній та експериментальній практиці з урахуванням циркадіанних біоритмів.

## ВИСНОВКИ

1. Гіпофункція шишкоподібної залози призвела до незначного зниження реабсорбції іонів натрію впродовж періоду спостережень порівняно з контрольними тваринами.

2. За умов гіпофункції шишкоподібної залози відмічено порушення обміну іонів натрію з вираженим натрійурезом, який був істотно більшим, ніж у контрольних тварин; спостерігалася також активація проксимального транспорту іонів натрію у перерахунку на 100 мкл клубочкового фільтрату протягом доби за умов зміненої фазової структури ритму відносно контролю.

3. Фізіологічна пінеалектомія призвела до зниження базисного рівня ритму дистального транспорту іонів натрію порівняно з контролем.

**С.Б. Семененко, С.С. Ткачук, О.В. Ткачук, С.Ю. Каратеева, В.В. Анцупова**

### **ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ХРОНОРИТМОВ ИОНОРЕГУЛИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК В УСЛОВИЯХ ГИПОФУНКЦИИ ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

В работе рассмотрены особенности хроноритмических перестроек ионорегулирующей функции почек в условиях гипофункции шишковидной железы. Для изучения гипофункции эпифиза животных содержали в условиях постоянной световой стимуляции на протяжении 7 сут. Установлено, что гипофункция эпифиза мозга привела к нарушениям циркадианной организации ионорегулирующей функции почек в сравнении с контрольной группой животных. В условиях физиологической пинеалэктомии наблюдали повышение экскреции ионов натрия ( $6,11 \pm 0,81$  ммоль/ч), а его концентрация в плазме крови оставалась повышенной круглосуточно. Полученные результаты свидетельствуют об существенных изменениях интегральных характеристик ритмов показателей электролитного обмена, что подтверждает важную роль шишковидной железы в обеспечении физиологического гомеостаза.

Ключевые слова: циркадианный ритм; почки; шишковидная железа.

**S.B. Semenenko, S.S. Tkachuk, O.V. Tkachuk, S.Y. Karateeva, V.V. Antsupova**

### **SPECIFIC FEATURES OF CHRONORHYTHMOLOGIC CHANGES OF THE ION-REGULATING FUNCTION OF THE KIDNEYS UNDER THE HYPOFUNCTION OF THE PINEAL GLAND**

The paper investigates the specific features of chronorhythmologic changes of the ion-regulating function of the kidneys under the hypofunction of the pineal gland. For the study of hypofunction of the pineal gland, animals were maintained under constant light stimulation during 7 days. It has been established that the hypofunction epiphysis point out disturbances of the phasic structure of the ion-regulating function in relation to chronograms of the intact group of

rats. In terms of physiological pinealectomy observed increase in the excretion of sodium ions ( $6,11 \pm 0,81$  mmol/h) and the concentration of this cation in the blood plasma remained elevated around the clock. The obtained results indicate significant changes of integral characteristics of the rhythms of electrolyte metabolism and the important role of the pineal gland in ensuring physiological homeostasis. Key words: circadian rhythm; kidneys; pineal gland.

*Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi.*

### **REFERENCES**

1. Agadzhanian NA, Brunin DV, Radysh IV, Ermakova NV. Chronophysiological features of Central hemodynamic in women of reproductive age. *Technol Liv Sys.* 2014; 11(1): 3-6 [Russian].
2. Dzherieva IS, Volkova NI, Rappaport SI. Melatonin as a regulator of metabolism. *Klin med.* 2012; 90(10): 27-30 [Russian].
3. Dallmann R, Viola AU, Tnokh L, Cajochen C, Bromm SA. The human circadian metabolom. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2012; 109(7): 26-9.
4. Orlova NI, Pronina TS. Circadian rhythms in puberty facts and approaches. *Institut vozrastnoy fiziologii. RAN Almanach J New Res.* 2014; 1: 40-7 [Russian].
5. Jom LO, Jonsson A. Hour does light affect melatonin. *Med Hypot.* 2008; 71(3): 458.
6. Bryukhanov VM, Zvereva AJ. The kidney role in regulation of circade rithms of the organizm. *Nephrol.* 2010; 14(3): 17-31 [Russian].
7. Ilyaskin AV, Baturina GS, Katkova LE, Solenov EI, Ivanova LN. Effect of hypoosmotic shock on the volume of renal collecting duct epithelial cells of brattleboro rats with hereditarily defective vasopressin synthesis. *Doklady RAN.* 2013; 453(1): 102-5 [Russian].
8. Krestinina OV, Odinkova SV, Baburina YI, Azarashvili TS. Age-related effect of melatonin on permeability transition pore opening in rat brain. *Biochem Sup Ser Memb Cell Biol.* 2013; 3a (4): 286-293 [Russian].
9. Natchin Y.V. Fluid and electrolyte homeostasis - role of reflexes, hormones, incretins and autacoids is characterized. *Fiziol Zh.* 2011; 57(5): 13-5 [Ukrainian].
10. Pishak VP, Bulyk RYe. Mechanism of pineal participation in the provision of circadian rhythmicity of physiological functions. *Buk Med Herald.* 2006; 10 (4): 4-7 [Ukrainian].
11. Zamorskii II, Sopova IY, Khavinson VK. Effects of melatonin and epithalamin on the content of protein and lipid peroxidation products in rat cortex and hippocampus under conditions of acute hypoxia. *Bull Exper Biol Med.* 2003; 154 (1): 51-3 [Ukrainian].

*Матеріал надійшов до редакції 25.05.2016*

# Flavonoid quercetin reduces gliosis after repetitive mild traumatic brain injury in mice

Y.Y. Zabenko, T.A. Pivneva

*Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: pta@biph.kiev.ua*

*The effect of water-soluble form of quercetin on the structural changes of glial cells in hippocampus was investigated in mice after repetitive mild traumatic brain injury. Reactive astro- and microgliosis in hippocampus were observed after brain injury. Iba-1 and GFAP immunohistochemistry was used to visualize astrocytes and microglia cells. Immunopositive cells were counted in hippocampal CA1-area at 5th, 10th and 30th days since the first injury and at 5th, 10th and 30th days since the first quercetin injection. Administration of quercetin led to the decrease in number of activated glial cells. Thus, our study demonstrates the following: repetitive mild traumatic brain injury in mice is associated with reactive gliosis; quercetin showed neuroprotective effects by reducing this gliosis. In view of the described, use of quercetin is appropriate for pharmacological correction of cerebrovascular disorders after traumatic brain injury. Key words: repetitive mild traumatic brain injury; hippocampus; microgliosis; astrogliosis; quercetin.*

## INTRODUCTION

According to Centers for Disease Control and Prevention [1], traumatic brain injury (TBI) is caused by a bump, blow, or jolt to the head or a penetrating head injury that disrupts the normal function of the brain. The severity of a brain trauma is defined depending on the following characteristics [2, 3]: 1) whether or not a person had a loss of consciousness; 2) how long the loss of consciousness was; 3) the length of amnesia; 4) the resulting cognitive, behavioral and physical problems; 5) the recovery.

TBI is considered to be mild, if the loss of consciousness lasted 0-30 minutes and the length of amnesia wasn't longer than 24 hours [4]. Among other common symptoms of concussion, there are dizziness, nausea, reduced attention and concentration, memory problems and headache [5]. However, the signs of initial mild trauma are not always obvious [6], while the recurrence of a brain injury may call more dramatic consequences.

The main activities associated with an increased risk of repeated mild trauma are

contact sports (boxing, American football, ice hockey, soccer, rugby, etc) and participation in military events [7]. Specifically, the evidence of long-term effects of repetitive mild traumatic brain injury (rmTBI) was found in the autopsied brains of retired NFL players which contained accumulations of abnormal tau protein [8]. Unfortunately, standard diagnostic methods (MRI, CT, EEG) [9] still lack sensitivity for immediate tissue changes in mild TBI, while the postmortem data on late neurodegenerative disorders (chronic traumatic encephalopathy, Alzheimer's disease, Parkinson's disease) due to repeated trauma is growing [10]. Respectively, animal models are still necessary for studying pathophysiology of rmTBI.

Each case of TBI is not a single event, but a whole cascade, starting from an immediate mechanical injury (primary injury) and continuing with metabolic, cellular and molecular events (secondary injury) that may evolve from minutes to months [11, 12]. Mild TBI, being a closed head trauma, is defined by the secondary processes which nevertheless

may lead to consequences not considered as mild [13].

With help of animal models, it was shown that concussion induces such consecutive changes as ion flux (increased potassium and calcium and decreased magnesium), metabolic alterations (activation of glycolysis and increased energy demands for cell membrane pumps to restore cellular ionic homeostasis) and disruption to cerebral blood flow (impaired autoregulation) [14]. As a result, TBI is followed by membrane degradation of vascular and cellular structures and ultimately necrotic or programmed cell death (apoptosis) [15].

One of the main phenomena that cause cell death at brain trauma is oxidative stress related to the generation of reactive oxygen species (superoxides, hydrogen peroxide, nitric oxide and peroxynitrite). Thus, oxidative stress plays a role of a specific target for the treatment of mild TBI [16]. Antioxidants derived from natural products are considered to be potentially effective scavengers of reactive oxygen species [17]. Particularly, flavonoids are substances of such kind and are already used for treating many important common diseases [18].

Flavonoids form a subclass of polyphenols, which are characterized as containing two or more aromatic rings, each bearing at least one aromatic hydroxyl and connected with a carbon bridge, and are widely distributed in nature and in foods (fruit, vegetables, grains, bark, roots, stems, flowers, tea and wine) [19]. Many studies suggest evidence of neuroprotective, cardioprotective and chemopreventive features of flavonoids [20].

Quercetin is the most studied flavonoid known for inhibiting production of pro-inflammation producing enzymes (cyclooxygenase and lipoxygenase) as well as TNF- $\alpha$ , nitric oxide production and nitric oxide synthase expression [21]. Anti-inflammatory effect of quercetin was shown both in *in vitro* and *in vivo* animal experiments [22–24]. Given the data on positive effect of quercetin at cerebrovascular disorders, we decided to test its water-soluble form corvutin

as a treatment for rmTBI to prevent long-term neurodegenerative changes.

## METHODS

All stages of the experiment were performed in accordance to the law of Ukraine “On the Protection of Animals from Cruelty” (Article 26; No 3447 – IV) and European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

*Animals.* Subjects were 66 mice from 8 to 12 weeks old males of wild-type mouse (weighing 24–40 g). Animals were housed in cages on a 12-hour light–dark cycle, with free access to food and water. The groups were formed as follows: (1) controls – not anesthetized, not injured (n=11); (2) sham-injected mice – injured (n=28); (3) mice injected with quercetin – anesthetized, injured (n=27).

*The model of repetitive mild traumatic brain injury.* We induced rmTBI by using a model proposed earlier [25]. Its design represents a modification of Marmarou’s weight-drop model [26] which reproduced single diffuse TBI from mild to severe in rats. Both in original scheme and in modified, the skull of a mouse is exposed to an impact with a weight guided by a vertical tube. The tube is pre-fixed to a stationary object like wall or rack. In both schemes, the severity of injury depends on the height from which the load falls and the weight of the latter. Respectively, in our study the 95 g weight fell from the 1 m height. The weight of the load was revised from 450 g to 95 g in accordance with the ratio between the weight of the brain of rats and mice. In our study, an experimental animal, lightly anaesthetized with diethyl ether, was not fixed in the apparatus, and after the weight fell, it fell too (through a piece of aluminum foil pre-attached on top of the H-shaped box), landing on a damper support. We avoided rebounding of the weight and, consequently, additional blows to the skull by using a nylon fishing line that stopped the load from falling after the impact



due to its length. According to this model, neither scalp incision nor attachment of helmet to the mouse skull were done. Mice were subjected to 5 head impacts (1/day for 5 successive days).

**Drug administration.** Injured mice were intraperitoneally injected with corvutin (PJSC SIC “Borshchahivskiy CPP”, Ukraine) which is a complex of quercetin with povidone. Corvutin dissolved in saline was injected to animals i. p. in a dose of 100 mg/kg (quercetin amount in a dose – 10 mg/kg) according to the following scheme: (1) the first day – the first injection (in an hour after the last injury) and the second injection in 6 hours; (2) the second day – two injections within 6 hours; (3) from the third day to the fifth day – single injection daily.

**Immunohistochemical staining.** Immunohistochemical staining of glial cells was performed as previously described [27]. At 5th, 10th, and 30th days after rmTBI, mice were deeply anaesthetized with an i. p. injection of calipsol and intracardially perfused with 0.1 M phosphate buffer (PB), followed by 4% phosphate-buffered paraformaldehyde (PFA). After perfusion, the brains were quickly removed, immersed in the same fixative and postfixed overnight at 4°C. Frontal 50- $\mu$ m-thick brain sections were cut on the vibratome (VT1000A Leica, Wetzlar, Germany). The sections were left overnight at 4°C for incubation with primary antibodies diluted in the solution (0.1 M PB, 1% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100). To identify the glial cells the following primary antibodies were used: polyclonal rabbit anti glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:1500; Dakocytomation, Glostrup, Denmark), polyclonal rabbit anti-Iba-1 (1:1000; Wako, Osaka, Japan). On the next day, sections were incubated with the secondary anti-rabbit antibody Alexa Fluor 594 (1:1000, Molecular Probes Inc., USA) diluted in the solution (0.1 M PB, 0.5% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100). The immunostained sections were mounted with fluorescent mounting medium Immu-Mount (Thermo Scientific, Waltham, MA). Confocal images of glial cells were acquired with a laser scanning microscope

(FV1000-BX61WI, Olympus, Tokyo, Japan). For the evaluation of cells, the program “Image J” was used. The number of cells was calculated in 0.1 mm<sup>2</sup>. The area of interest (Fig. 1) was located in hippocampal CA1-zone.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed in StatSoft Statistica 6.0. The two-tailed Student’s t-test was used to assess the significance of differences between samples ( $P < 0.05$  was considered to indicate statistical significance). All data were shown as mean  $\pm$  SD.

## RESULTS AND DISCUSSION

No signs of skull fractures and hemorrhages were detected after delivering rmTBI. In our previous study, evaluation of water content in brain in controls and injured animals also didn’t show edema presence [28]. However, immunohistochemical analysis revealed glial changes following the mechanical trauma. The results of our study showed the development of astro- and microgliosis due to experimental rmTBI, which was presented by gradual increase in number of astrocytes and microglial cells up to 30th day. The injection of quercetin to the injured mice lead to the inhibition of gliosis.

Astrocytes and microglia cells play mixed role in brain injury, both promoting and inhibiting regeneration of neural tissue, depending on

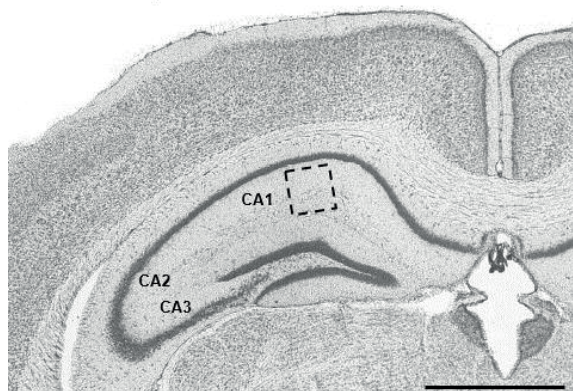


Figure 1. ROI in hippocampal CA1-zone. CA1, CA2, CA3 – fields of hippocampus. The dotted square indicates the location and the size of the ROI. Scale bar = 1 mm

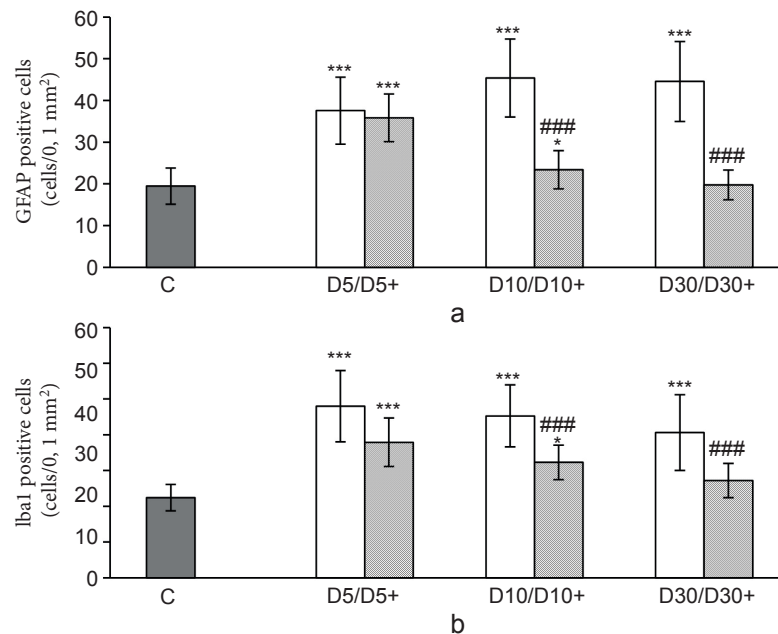


specific conditions [29]. For example, reactive astrocytes secrete molecules of extracellular matrix that form glial scar and thus limit axonal regeneration. On the other hand, this way astroglia isolates the site of damage and prevents its extension. Furthermore, astrocytes express trophic factors necessary for neuronal survival. Microglia also produces neuroprotective factors, additionally clearing cellular debris and orchestrating neurorestorative processes in an injured brain [30]. However, the effect of dysregulated microglia may be detrimental to neurons due to intensive production of proinflammatory and cytotoxic mediators [31]. Astro- and microgliosis are responses of the brain to the development of pathology and are presented as morphological and quantitative changes of astrocytes and microglia cells. The task of our research was the quantitative analysis of glial changes in CA1-zone of hippocampus after delivering rmTBI and subsequent corvitin injection in mice.

Immunohistochemical studies have shown that the number of GFAP-positive astrocytes increased significantly on 5th day ( $37.55 \pm 8.23$ ),

10th day ( $45.36 \pm 9.57$ ) and 30th day ( $44.54 \pm 9.79$ ) since the first injury in comparison with the control ( $19.44 \pm 4.45$ ) (Fig. 2, A). It should be noted that the number of GFAP-positive astrocytes was doubled on 5th day since the injury in comparison with the control ( $P < 0.001$ ). The number of activated astrocytes gradually grew up to 10th day, and such indicators maintained up to a month. Immunohistochemical study showed that the increase of the GFAP-positive astrocytes was observed in layers (*str. pyramidale*, *str. radiatum*, *str. lacunosum-moleculare*) of the hippocampal CA1 zone. Thus, reactive astrogliosis in hippocampal area CA1 was observed. GFAP-positive astrocytes acquired pronounced hypertrophied structure: their processes were thickened and shortened; volume of soma increased.

Study of the microglial reaction at the traumatic brain injury revealed that the number of Iba1-positive microglia increases and its indicator on 5th day amounted to  $48.00 \pm 9.97$ , on 10th day –  $45.29 \pm 8.70$ , on 30th day –  $40.63 \pm 10.62$  compared to controls ( $22.40 \pm 3.71$ ), ( $P < 0.001$ )



**Figure 3.** Changes in number of astrocytes (A) and microglial cells (B) of hippocampal area CA1 in control, after delivering brain injury (on day 5, day 10 and day 30 since the first impact) and after quercetin treatment (on day 5+, day 10+ and day 30 + since the first injection). \*, \*\* and \*\*\*  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$  in comparison with control, ###, ###  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$  in comparison within each pair of the bars. Results are the mean  $\pm$  SD

(Fig. 2, B) The number of activated microglial cells gradually reduced to a month after the injury. Iba1-positive microglia cells were observed in all layers of the hippocampal CA1-zone. The morphology of the microglial cells transformed from the resting (ramified) to an activated (amoeboid shape) form with short thick processes and the hypertrophic soma. Thus, after rmTBI, reactive gliosis is observed in CA1-zone of the hippocampus, which indicates the development of inflammatory processes in the brain.

Administration of quercetin resulted in the inhibition of reactive astrogliosis. The calculation of astrocytes after the quercetin administration revealed the decrease of cell numbers, and by 30th day this indicator reached the level of control (Fig. 2, A). The numbers of astrocytes were  $35.82 \pm 5.91$  on 5th day,  $23.36 \pm 4.70$  – on 10th and  $19.77 \pm 3.68$  - on 30th day. Among the samples with rmTBI and those with rmTBI plus the quercetin administration, statistically significant difference was shown between the groups on 10th day and 30th day ( $P < 0.001$ ). Thus, the level of activated astrocytes decreased after the quercetin administration.

Microgliosis reduce was less evident than one of astrogliosis (Fig. 2, B). The number of microglia cells on 5th day ( $37.89 \pm 6.80$ ) since the first quercetin injection slightly differed from one on 5th day after the injury ( $48.00 \pm 9.97$ ). On 10th day ( $32.27 \pm 4.80$ ) after the treatment, the number of cells was less than on day 10 ( $45.29 \pm 8.70$ ) after the injury, however, it hasn't decreased much in comparison with the sample five days ago ( $37.89 \pm 6.80$ ). The maximum decrease of Iba1-positive microglial cells was observed on 30th day ( $27.18 \pm 4.78$ ). The difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ) between the groups of mice on 5th day since the first injury and ones with injury and quercetin injection. The difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ) between the groups of animals on 10th and 30th days with quercetin injection in comparison with those without drug administration. Despite the fact that the level of activation

of microglia following quercetin administration decreases, it remains high enough in comparison with the control. The quercetin application reduces the degree of reactive microgliosis after the rmTBI which allows to make a conclusion about its neuroprotective effects.

It is known that long-term effects of the mild TBI leads to neurodegenerative diseases such as chronic traumatic encephalopathy, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, etc [11, 15, 16]. The manifestations of secondary damage are mainly associated with cytotoxic and inflammatory processes that lead to metabolic changes in brain homeostasis due to vascular insufficiency [12, 17, 23, 32]. Oxidative stress as a consequence of a mechanical brain trauma is a powerful damaging factor that in turn leads to alterations in cerebral blood flow. After TBI occurs, the release and activation of free radicals take place. It must be noted that natural flavonoids possess a powerful antioxidant effect, and quercetin is the most studied flavonoid among them. Among diverse properties of phenols, to which quercetin belong, their ability to produce a protective effect against lipoperoxidative damage stands out [33].

Numerous experimental models have been developed to replicate various aspects of the TBI in humans to understand better the mechanisms of damage, their correction and treatment. We used a new model of rmTBI, that simulates the most common form of head injury in humans. Our data indicate the effective neuroprotective impact of water-soluble form of quercetin at the repetitive mild traumatic brain injury.

**Є.Ю. Забенько, Т.А. Півнева**

#### **ФЛАВОНОЇД КВЕРЦЕТИН ЗМЕНШУЄ ГЛІОЗ ПІСЛЯ ЛЕГКОЇ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВОЇ ТРАВМИ У МИШЕЙ**

Вплив водорозчинної форми кверцетину на структурні зміни гліальних клітин у гіпокампі досліджували у мишей після повторюваної легкої черепно-мозкової травми. Реактивний астрогліоз і мікрогліоз спостерігали у гіпокампі після механічного пошкодження головного мозку. Астроцити та клітини мікроглії візуалізували за

допомогою імунофлуоресцентного забарвлення анти-GFAP- та анти-Iba1-антитілами. Імунопозитивні клітини підраховували у CA1-зоні гіпокампа на 5, 10 та 30-ту добу після першої травми, а також на 5, 10 та 30-ту добу після першої ін'єкції кверцетину. Введення кверцетину призводило до зниження кількості активованих гліальних клітин. Таким чином, за результатами нашого дослідження, повторювана легка черепно-мозкова травма пов'язана з реактивним гліозом; кверцетин виявив нейропротективні властивості, призвівши до зменшення реактивного гліозу. Є підстави для використання кверцетину у фармакологічній корекції цереброваскулярних порушень після черепно-мозкової травми.

Ключові слова: повторювана легка черепно-мозкова травма; гіпокамп; мікрогліоз; астрогліоз; кверцетин.

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ; e-mail: pta@biph.kiev.ua*

**Е. Ю. Забенько, Т. А. Пивнева**

### **ФЛАВОНОИД КВЕРЦЕТИН УМЕНЬШАЕТ АСТРОГЛИОЗ ПОСЛЕ ЛЁГКОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У МЫШЕЙ**

Влияние водорастворимой формы кверцетина на структурные изменения глияльных клеток в гиппокампе исследовали у мышей после повторяемой лёгкой черепно-мозговой травмы. Реактивный астроглияоз и микроглияоз наблюдали в гиппокампе после механического повреждения головного мозга. Астроциты и клетки микроглия визуализировали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания анти-GFAP- та анти-Iba1-антителами. Иммуноположительные клетки подсчитывали в CA1-зоне гиппокампа на 5, 10 и 30-е сутки после первой травмы, а также на 5, 10 и 30-е сутки после первой инъекции кверцетина. Введение кверцетина приводило к снижению количества активированных глияльных клеток. Таким образом, по результатам нашего исследования, повторяемая лёгкая черепно-мозговая травма связана с реактивным глияозом; кверцетин проявил нейропротективные свойства, приведя к уменьшению реактивного глияоза. Существуют основания для использования кверцетина в фармакологической корекции цереброваскулярных нарушений после черепно-мозговой травмы.

Ключевые слова: повторяемая лёгкая черепно-мозговая травма; гиппокамп; микроглияоз; астроглияоз; кверцетин.

### **REFERENCES**

- Centers for Disease Control and Prevention. TBI: Get the Facts. 2016 [updated 2016 Jan 22; cited 2016 Mar 15]; Available from: [www.cdc.gov/traumaticbraininjury/get\\_the\\_facts.html](http://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/get_the_facts.html)
- Frey WF, Savage RC. The road to rehabilitation: Part 8 – Journey Toward Understanding: Concussion & Mild Brain Injury. Vienna: Brain Injury Association of

- America; 2001.
- Blyth BJ, Bazarian JJ. Traumatic alterations in consciousness: traumatic brain injury. *Emerg Med Clin North Am.* 2010;28(3):571-94.
- Kay T, Harrington D, Adams R, Anderson T, Berrol S, Cicerone K et al. Definition of mild traumatic brain injury. *J Head Traum Rehab.* 1993;8(3):86-7.
- Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron.* 2012;76(5):886-99.
- Gourley MM, Valovich McLeod TC, Bay RC. Awareness and recognition of concussion by youth athletes and their parents. *Athl Train Sport Heal Care.* 2010;2(5):208-18.
- Jordan BD. The clinical spectrum of sport-related traumatic brain injury. *Nature reviews. Neurology.* 2013;9(4):222-30.
- McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, Gavett BE, Budson AE, et al. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009;68(7):709-35.
- Daneshvar DH, Riley DO, Nowinski CJ, McKee AC, Stern R a, Cantu RC. Long-term consequences: effects on normal development profile after concussion. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2011;22(4):683-700.
- McKee AC, Robinson ME. Military-related traumatic brain injury and neurodegeneration. *Alzheim Dement.* 2014;10(3 Suppl):242-53.
- Granacher R. Traumatic brain injury: methods for clinical and forensic neuropsychiatric assessment. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2015.
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(2):128-42.
- Shultz SR, Bao F, Omana V, Chiu C, Brown A, Cain DP. Repeated mild lateral fluid percussion brain injury in the rat causes cumulative long-term behavioral impairments, neuroinflammation, and cortical loss in an animal model of repeated concussion. *J Neurotrauma.* 2012;29(2):281-94.
- Barth J, Freeman JR, Broshek DK. Mild head injury. In: Ramachandran VS, editor. *Encyclopedia of human brain.* San Diego: Academic Press; 2002. p. 81-92.
- Gay MR, Rosenthal SL. Current understanding of concussion: treatment perspectives. In: Slobounov SM, Sebastianelli WJ, editors. *Concussions in athletics: from brain to behavior.* New York: Springer; 2014.
- Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth.* 2007;99(1):4-9.
- Slemmer JE, Shacka J, Weber JT. Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr Med Chem.* 2008;15:404-14.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96(2-3):67-202.
- Middleton Jr E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):673-751.

20. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 2004;36(7):838-49.
21. Kelly GS. Quercetin. Monograph. *Altern Med Rev.* 2011;16(2):172-9.
22. Cho J-Y, Kim I-S, Jang Y-H, Kim A-R, Lee S-R. Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2006;404(3):330-5.
23. Schültke E, Kamencic H, Skihar VM, Griebel R, Juurlink B. Quercetin in an animal model of spinal cord compression injury: correlation of treatment duration with recovery of motor function. *Spinal Cord.* 2010;48(2):112-7.
24. Kovalenko TM, Osadchenko IO, Tsupykov OM, Pivneva TA, Shalamaï AS, Moïbenko OO, Skybo HH. Neuroprotective effect of quercetin during experimental brain ischemia. *Fiziol Zh.* 2006;52(5):21-7 [Ukrainian].
25. Kane MJ, Angoa-Perez M, Briggs DI, Viano DC, Kreipke CW, Kuhn DM. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosci Methods.* 2012; 203(1):41-9.
26. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 1994;80(2):291-300.
27. Pivneva TA, Tsupikov OM, Pilipenko MN, Vasilenko DA, Skibo GG. Structural modifications of astrocytes in the hippocampus after experimental cerebral ischemia in gerbils. *Neurophysiology.* 2005;37(5):359-64.
28. Zabenko Y, Pivneva T. Behavioral reactions and structural alterations of hippocampal tissue after repetitive mild traumatic brain injury in mice. *Biologia.* 2014; 59(2): 63-71.
29. Pannese E. *Neurocytology: fine structure of neurons, nerve processes, and neuroglial cells.* 2nd edition. Springer. 2015.
30. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol.* 2016; 275 (3): 316-27.
31. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011;91(2):461-553.
32. Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, Shohami E, Stahel PF. Pharmacology of traumatic brain injury: where is the “golden bullet”? *Mol Med.* 2008;14(11-12):731-740.
33. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med.* 1995;19(4):4816.

*Received 29.01.2016*

# Вплив донора сірководню на внутрішньоочний тиск у щурів

І.М. Михейцева, Т.І. Сіроштаненко

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України», Одеса;  
e-mail: mda@soborka.net

*Досліджували вплив 1%-го розчину гідросульфиду натрію (NaHS) на внутрішньоочний тиск (ВОТ) у інтактних щурів та при моделюванні офтальмогіпертензії за допомогою тривалого системного введення адреналіну. Донор сірководню при одноразовому застосуванні у вигляді крапель у порожнину ока викликав гіпотензивний ефект, який був доволі слабкий при нормотензії та яскраво виявлений у разі офтальмогіпертензії. Тривале введення за схемою гідросульфиду натрію на тлі введення індуктора моделі адреналіну значною мірою попереджувало зростання ВОТ у щурів. Робиться висновок, що сірководень бере участь у регуляції гідродинаміки ока і підтримці нормального рівня ВОТ.*

*Ключові слова: сірководень; NaHS; модель офтальмогіпертензії; внутрішньоочний тиск; гіпотензивний ефект.*

## ВСТУП

Тривалий час сірководень був відомим виключно як токсичний забруднювач навколишнього середовища. Останнім часом його почали вивчати як регулятор багатьох процесів в організмі. Показано, що він продукується в деяких тканинах ссавців і надає різні фізіологічні ефекти [1]. Спочатку було відомо про участь ендogenous гідросульфиду в нейрональних процесах [2]. Пізніше встановлено його вплив на клітини гладеньких м'язів [3], а також те, що сірководень викликає релаксацію гладеньких м'язів судин, активуючи АТФ-залежні калієві канали [4]. Вивчається роль сірководню в регуляції кров'яного тиску [5, 6].

Нормальний внутрішньоочний тиск (ВОТ) – важлива складова гомеостазу. Підтримка його рівня забезпечується складним механізмом регуляції руху внутрішньоочної рідини. Порушення цього процесу є патогенетичним фактором розвитку таких очних захворювань, як глаукома. У механізмах регуляції ВОТ задіяні структури циліарного

тіла і трабекулярної мережі. Гідродинаміка очей здійснюється за участю гладеньком'язових клітин цих структур. Тому доволі ймовірним регулятором цих процесів може бути молекула сірководню. Однак на сьогоднішній день щодо участі  $H_2S$  у регуляції функцій очей літературних даних дуже мало. Існують окремі відомості, що він може викликати фармакологічні ефекти в тканинах очей ссавців, змінювати симпатичну і глутаматергічну нейротрансмісію, відігравати регуляторну роль у процесах сигнальної трансдукції в очах [7]. Є повідомлення про наявність ферментів, які здійснюють біосинтез сірководню в очних тканинах [8, 9]. На відміну від вивчення значення і впливу сірководню в нервовій і серцево-судинній системі, практично відсутні дослідження, спрямовані на встановлення фармакологічного ефекту цієї речовини на ВОТ, його потенційних можливостей у впливі на вивільнення і/або доступність нейротрансмітерів у передньому відділі ока, а також прямої дії сірководню на гладеньком'язові структури очей. Виявлення регуляторної функції сірководню в оці, впливу

© І.М. Михейцева, Т.І. Сіроштаненко



його на ВОР або виявлення його в фізіологічній концентрації в передньому відділі ока дало змогу розширити уявлення про механізми формування підвищеного офтальмотонусу при очній гіпертензії різної етіології, а також патогенезі глаукоми і відкрило б нові перспективи в лікуванні цих захворювань.

Мета нашої роботи – вивчити вплив донора сірководню (натрію гідросульфід) на ВОР щурів в умовах формування офтальмогіпертензії.

## МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 30 дорослих щурах (понад 9 міс) лінії Вістар обох статей масою 200–300 г, згідно з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). ВОР щурам вимірювали апланатичним тонометром з масою плунжера 2 г. Відбитки у лінійних одиницях вимірювали за допомогою окуляр-лінзи зі вбудованою лінійкою (МПБ-2). Перерахунок на одиниці ртутного стовпчика проводили за формулою Головіна [10]. ВОР вимірювали під місцевою анестезією 0,5%-м розчином алкаїну.

Очну гіпертензію у щурів викликали внутрішньоочеревинним введенням розчину адреналіну за розробленою нами схемою [11,12]. Всього було зроблено по 20 ін'єкцій кожному щуру тричі на тиждень через день, у дозі від 10 до 15 мкг на 100 г маси тварини. У декількох серіях експерименту вивчали вплив сірководню на ВОР у здорових щурів і щурів з підвищеним офтальмотонусом. Як донор сірководню застосовували 1%-й розчин натрію гідросульфід (NaHS) у фізіологічному розчині.

У привчених до рук експериментаторів щурів визначали фоновий ВОР. Тварин розділили на 2 групи по 15 щурів у кожній і провели кілька серій експерименту. Спочатку гідросульфід натрію інстилювали одноразово в обидва ока здорових щурів і вимірювали

ВОР через 30, 60, 180 хв після закапування. Далі тваринам I групи моделювали очну гіпертензію. Вони впродовж 6 тиж отримували розчин адреналіну. Цим щурам проводили моніторинг ВОР як у період моделювання, так і після. Через місяць по закінченні ін'єкцій на тлі високого ВОР щурам I групи одноразово закапали розчин NaHS і виміряли рівень офтальмотонусу через 30, 60 і 180 хв після закапування.

Щурам II групи протягом 2 тиж щодня раз у день закапували розчин NaHS по одній краплі в обидва ока. В кінці цієї серії експерименту також виміряли ВОР. На тлі інстиляцій донора сірководню щурам почали вводити адреналін. Розчин NaHS інстилювали в очі одночасно з ін'єкціями адреналіну протягом 2 тиж двічі на тиждень. Наступні 2 тиж щури отримували тільки адреналін. Останні 2 з 6 тиж моделювання очної гіпертензії щурам знову двічі на тиждень закапували розчин NaHS. У ці періоди і пізніше після припинення введення адреналіну періодично вимірювали офтальмотонус. Через місяць після закінчення ін'єкцій адреналіну щури II групи знову отримували інстиляції в око донора сірководню щодня протягом 5 днів, після чого їм вимірювали ВОР.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час експерименту було показано, що донор сірководню вплинув на офтальмотонус тварин. У першій серії експерименту вивчено вплив однократної дії NaHS на ВОР щурів і оцінено ступінь цього впливу у здорових тварин і тварин з офтальмогіпертензією (табл.1). Показано, що через 30 хв після інстиляцій розчину NaHS у групі здорових щурів ВОР було знижено незначно (на 4,8%), а в групі з очною гіпертензією - на 27%. Через 1 год це зниження становило 8,4 і 36,2% відповідно. Через 3 год після інстиляцій розчину NaHS рівень ВОР у щурів з гіпертензією був нижче від вихідного на 34,8%, а у здорових ця різниця була статистично незначущою.

Слід відмітити, що вплив сірководню на ВОТ у тварин з високим рівнем офтальмотонусу був набагато більше виражений, ніж у щурів з нормальним тиском. Якщо у здорових тварин з нормальним вихідним рівнем офтальмотонусу при одноразовому закапуванні 1%-го розчину NaHS це зниження було мінімальним, то при розвинутій очній гіпертензії воно було досить помітним – більш ніж на третину від вихідного рівня. Таку різницю в ефекті NaHS на здорових очах і з гіпертензією, вважаємо, можна пояснити різним станом тонусу гладеньком'язових клітин судин і дренажної зони очей. У здорових очах є нормальний тонус гладеньких м'язів як судин, так і структур дренажної зони, тоді як в очах з гіпертензією адреналін створив підвищений контрактильний фон. Дія сірководню на очну гідродинаміку могла бути зумовлена його здатністю знижувати саме підвищений тонус цих структур.

На наступному етапі експерименту тривалі введення в кон'юнктивальну порожнину очей щурів при моделюванні офтальмогіпертензії, що відтворюється системним введенням адреналіну, розчину гідросульфиду натрію в профілактично-лікувального режимі значною мірою запобігло підвищенню ВОТ. У табл. 2 представлено результати офтальмотонусу в двох групах. У I групі з очною гіпертензією відзначено динамічне підвищення ВОТ. Через 2 тиж моделювання (введення адреналіну) очний показник підвищився на 27,7%, через 4 – на 48%, через 6 тиж - на 40% від вихідних значень. Тиск в оці продовжував підвищуватись і по закінченні введення адреналіну. Через

тиждень після припинення ін'єкцій його значення перевищило вихідні на 58%, залишаючись на цьому рівні весь період спостереження (ще 1 міс). Динаміка офтальмотонусу в групі II, що отримувала донор сірководню у вигляді очних інстиляцій до початку і під час адреналінових ін'єкцій, була іншою, підвищення ВОТ було значно менш вираженим.

Через 2 тиж експерименту ВОТ у цих тварин був підвищеним на 27,3% від вихідного, через 4 тиж – на 22%, через 6 – на 16%. Через тиждень після закінчення введення препаратів (як адреналіну, так і натрію гідросульфиду) він був вищим від початкового на 15%, але через 4 тиж без інстиляцій NaHS вже перевищував вихідні значення на 37%.

Порівнюючи значення ВОТ між двома експериментальними групами, відзначили, що через 4 тиж моделювання і наступні терміни спостереження різниця рівня цього показника була високовірогідною. Починаючи з цього періоду в групі, що отримувала донор сірководню, рівень офтальмотонусу був статистично значимо нижчим, ніж у групі з очною гіпертензією без закапування. Так, ця різниця між групами через 4 тиж введення препаратів становила 21,2%, через 6 тиж - 20,5%. Після закінчення моделювання через тиждень припинення введення препаратів в II групі ВОТ був нижчим, ніж в I групі на 30,4%, через 4 тиж - на 18,2%.

На завершальному етапі експерименту через 4 тиж після закінчення введення препаратів (адреналіну, гідросульфиду натрію) тваринам II групи на тлі початку підйому

**Таблиця 1. Динаміка внутрішньоочного тиску у щурів здорових і з офтальмогіпертензією після одноразового закапування в око 1%-го розчину NaHS (M±m)**

Група щурів	Вихідне значення	Після закапування через		
		30 хв	60 хв	180 хв
Здорові	19,0±0,22	18,1±0,24**	17,4±0,37***	18,4±0,37
З офтальмогіпертензією (адреналін)	29,3±1,08	21,4±0,96*	18,7±0,5*	19,1±0,41*

Примітки: тут і в табл. 2 \* P <0,001; \*\* P <0,02; \*\*\* P <0,01 порівняно з вихідним значенням.

**Таблиця 2. Внутрішньоочний тиск у щурів в хронічному експерименті при моделюванні офтальмогіпертензії з інстиляцією і без 1%-го розчину NaHS**

Схема досліджу	Вихідні значення	Під час введення препаратів			Після закінчення введення препаратів через	
		2 тиж	4 тиж	6 тиж	1 тиж	4 тиж
Введення адреналіну	19,1±0,3	24,4±0,7*	28,3±0,9*	26,8±0,7*	30,3±0,9*	30,7±0,7*
Введення адреналіну і NaHS	18,3±0,4	23,3±0,8*	22,3±0,5***	21,3±0,7**	21,1±0,3**	25,1±0,6***

офтальмотонусу, знову 5 діб закапували в порожнину ока розчин NaHS. Вимірювання показали гіпотензивну дію препарату і на цьому етапі експерименту. Офтальмотонус у цих тварин знизився з  $25,1 \pm 0,6$  до  $19,7 \pm 0,5$  мм рт.ст. (на 21,5%). Тривалість цього зниження була незначною і через 2-3 доби ВОТ повернувся до рівня 25-26 мм рт.ст. Однак цей показник залишався достовірно нижчим, ніж у групі, що не одержувала донор сірководню.

Таким чином, сірководень, що надходить в камеру ока з його донором NaHS, впливав на очну гідродинаміку, значною мірою знижуючи розвиток офтальмогіпертензії через вплив на дренажну систему ока. Дія сірководню на шляхи відтоку рідини в очах могла бути пов'язаною з його здатністю впливати на гладеньку мускулатуру і викликати вазодилатацію. Така здатність молекули сірководню була показана для гладеньком'язових клітин раніше [13]. Ця активність дигідросульфідів визначена дією на  $K_{ATP}$ -канали [4, 14].

Kulkarni та співавт. [15] показали, що донор сірководню гідросульфід натрію знижував концентрацію норадреналіну і адреналіну в ізольованих препаратах райдужки – циліарного тіла з очей свині. Було відмічено релаксуючу дію NaHS і  $Na_2S$  на гладенькі м'язи циліарного тіла і райдужки. Констрикція цих м'язів, викликана карбохолом, знімалася при дії донора сірководню. Автори дійшли висновку, що інгібуюча дія цих речовин в ізольованих райдужках свині залежить від біосинтезу сірководню за участю ферментів цистеїн- $\gamma$ -ліази і цистеїн- $\beta$ -

синтази [16]. В очах кроликів з нормотензією було показано вплив двох донорів сірководню GYY4137 і ACS67 в зниженні симпатичної нейроредрачі в судинній мережі очей [17]. Автор припускає, що такий вплив може викликати зниження вмісту норадреналіну і релаксацію м'язів райдужної оболонки. Це призводить до збільшення простору між трабекулярною мережею, що в свою чергу, ймовірно, знижує офтальмотонус.

У нашому експерименті тривала гіперадреналінемія могла викликати суттєве скорочення гладеньком'язової мускулатури, звуження просвіту судин і трабекулярної мережі та розвиток офтальмогіпертензії. Донор сірководню при однократному місцевому введенні цим тваринам знижував ВОТ на третину, тоді як у щурів з нормальним тиском очей ефект був незначним. Тривале введення за схемою розчину NaHS при формуванні моделі очної гіпертензії значною мірою запобігло підвищенню офтальмотонусу в дослідних тварин, надавши розслаблюючу дію на дренажні структури очей і перешкоджаючи утворенню утруднення відтоку внутрішньоочної рідини.

## ВИСНОВКИ

1. Одноразові інстиляції 1%-го розчину донора сірководню гідросульфідів натрію в порожнину ока щурів з офтальмогіпертензією істотно знижували у них ВОТ. Гіпотензивний ефект зберігався понад 3 год. Подібна дія для очей з нормальним тиском

була слабовиражена.

2. Тривалі інстиляції розчину NaHS щурам при моделюванні адреналінової офтальмогіпертензії значною мірою запобігли підвищенню ВОТ.

3. Сірководень бере участь у регуляції гідродинаміки ока і підтримці нормального рівня ВОТ.

**И.Н. Михейцева, Т.И. Сироштаненко**

### **ЭФФЕКТ ДОНОРА СЕРОВОДОРОДА НА ВНУТРИГЛАЗНОЕ ДАВЛЕНИЕ У КРЫС**

Исследовали влияние 1%-го раствора гидросульфида натрия (NaHS) на внутриглазное давление (ВГД) у интактных крыс и при моделировании офтальмогипертензии с помощью длительного системного введения адреналина. Донор сероводорода при однократном введении в виде капель в полость глаза вызвал гипотензивный эффект, который был довольно слабым при нормотензии и ярко выраженным при офтальмогипертензии. Длительное введение по схеме раствора NaHS на фоне введения индуктора модели адреналина в значительной степени предотвратило рост ВГД. Делается вывод, что сероводород принимает участие в регуляции гидродинамики глаза и поддержании нормального уровня офтальмотонуса. Ключевые слова: сероводород; NaHS; модель офтальмогипертензии; внутриглазное давление; гипотензивный эффект.

**I.N. Mikheyitseva, T.I. Siroshstanenko**

### **EFFECT OF HYDROGEN SULPHIDE DONOR ON INTRAOCULAR PRESSURE IN RATS**

It has been investigated the effect of a 1% solution of sodium hydrosulfide NaHS on intraocular pressure (IOP) in intact rats and during modeling them of ocular hypertension, using prolonged systemic administration of adrenaline. A single administration of hydrogen sulphide donor as drops into cavity of the eye has caused the hypotensive effect, which was pretty weak in the normotensive eyes and pronounced in the eyes with ocular hypertension. Long-term administration of NaHS solution by the scheme, during administration of adrenaline as a model inductor, has largely prevented IOP rise. It done conclusion that hydrogen sulphide is involved in the regulation of eye hydrodynamics and maintaining normal levels of IOP. Key words: hydrogen sulphide; NaHS; ocular hypertension model; intraocular pressure; hypotensive effect.

*The Filatov State Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy NAMS of Ukraine, Odesa*

### **REFERENCES**

1. Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amin Acids*. 2004; 26:243-54.
2. Abe K, Kimura H The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*. 1996; 16: 1066-71.
3. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 237: 527-31.
4. Tang G, Jang G, Wu L, Liang W, Wang R. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 2005; 68: 1757-64.
5. Wagner CA. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator. *J Nephrol*. 2009; 22 (2): 173-6.
6. Sagiraju Sowmya, Yada Swathi, Ai Ling Yeo et al. Hydrogen sulfide: Regulatory role on blood pressure in hyperhomocysteinemia. *Vasc Pharmacol*. 2010; 53(3-4): 138-43.
7. Ohia SE, Opere CA, Monjok EM, Kouamou G, Leday AM, Njie-Mbye YF. Role of hydrogen sulfide production in inhibitory action of L-cysteine on isolated porcine irides. *Curr Eye Res*. 2010; 35(5):402-7.
8. Pong WW, Stouracova R, Frank N, Kraus JP, Eldred WD. Comparative localization of cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase in retina: differences between amphibians and mammals. *J Comp Neurol*. 2007; 505(2):158-65.
9. Persa C, Osmotherly K, Chao-Wei Chen K, Moon S, Lou MF. The distribution of cystathionine beta-synthase (CBS) in the eye: implication of the presence of a trans-sulfuration pathway for oxidative stress defense. *Exp Eye Res*. 2006; 83(4):817-23.
10. Shevalev VE. Hyperbolic ruler to measure tonogram. *Ophthalmol J*. 1947; 3:140-144.
11. Mikheyitseva I. N. Glaucoma modeling and adrenalin stress. *Clin Exp Med Res J*. 2014; 4:427-37
12. Mikheyitseva I. N. Method of modeling of increased intraocular pressure in rats. *Ukr. patent №38446*, 2009.
13. Kimura H, Nagai Y, Umenura K, Kimura Y. Physiological roles of hydrogen sulfide: synaptic modulation, neuroprotection, and smooth muscle relaxation. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:795-803.
14. Szabu C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2007; 6:917-35.
15. Kulkarni KH, Monjok EM, Zeyssig R, et al. Effect of hydrogen sulfide on sympathetic neurotransmission and catecholamine levels in isolated porcine iris-ciliary body. *Neurochem Res*. 2009; 34(3):400-6.
16. Monjok E, Kulkarni K et al. Inhibitory action of hydrogen sulfide on muscarinic receptor-induced contraction of isolated porcine irides. *Exp Eye Res*. 2008; 87: 612-6 .
17. Salvi A. Effect of hydrogen sulfide donors on sympathetic neurotransmission and intraocular pressure of the eye. *Thesis of Dissertation*, 2013.

*Матеріал надійшов до редакції 01.07.2016*



# Порівняння спектроскопічних властивостей внутрішньоочної рідини у хворих з катарактою і первинною відкритокутовою глаукомою

С.В. Колотілов, В.О. Мельник, А.С. Литвиненко, С.О. Сотнік, О.О. Гуржій

ТОВ «Клініка Візіобуд-плюс», Київ; Інститут фізичної хімії ім. Л.В. Писаржевського НАН України, Київ; e-mail: elenahurzhi@gmail.com

*Порівнювали спектроскопічні властивості внутрішньоочної рідини (ВОР) у пацієнтів з катарактою (60 пацієнтів, 60 очей) і комбінацією її та первинної відкритокутової глаукоми (ПВКГ, 36 пацієнтів, 36 очей). Зразки ВОР були взяті інтраопераційно. З анамнезу було відомо, що у передопераційному періоді пацієнти обох груп отримували різні види місцевої медикаментозної гіпотензивної терапії з різною кратністю та тривалістю закапування. Спектри поглинання зразків ВОР вимірювали в діапазоні довжин хвиль 190-1100 нм. Спостерігали дві смуги поглинання з максимумами при 202 та 267 нм незалежно від діагнозу (другий максимум у спектрах деяких зразків зміщений у довгохвильову ділянку). Середня оптична густина ВОР при 202 нм у пацієнтів без ПВКГ достовірно нижче порівняно зі значеннями у хворих з глаукомою. Така відмінність імовірно пояснюється накопиченням продуктів метаболізму у ВОР пацієнтів з ПВКГ, що в свою чергу може бути викликано сповільненням її потоку. Тим не менш статистично значимих відмінностей середньої оптичної густини ВОР при 267 нм між двома групами не спостерігається.*

*Ключові слова: катаракта; первинна відкритокутова глаукома; оптична густина внутрішньоочної рідини; спектروفотометрія.*

## ВСТУП

Глаукома – хронічне прогресуюче захворювання, яке відноситься до групи оптичних нейропатій і характеризується постійним чи періодичним підвищенням внутрішньоочного тиску (ВОТ), атрофією зорового нерва і виникненням характерних дефектів поля зору у зв'язку з загибеллю гангліозних клітин сітківки та пошкодженням їх аксонів [1, 2]. Найбільш розповсюдженою є первинна відкритокутова глаукома (ПВКГ). За останніми прогнозами ВОЗ очікується збільшення кількості хворих з глаукомою до 60,5 млн до 2020 р., серед яких 74% - пацієнти з ПВКГ [1]. Провідним фактором ризику її прогресування є підвищення ВОТ [3]. Це найбільш ймовірно зумовлено підвищенням резистентності шляхів відтоку внутрішньоочної рідини, особливо в ділянці трабеку-

лярної сітки, здебільшого за рахунок змін юкстаканалікулярної тканини [4]. Проте, незважаючи на велику кількість проведених досліджень, в тому числі дослідження змін трабекулярної сітки та особливостей складу внутрішньоочної рідини, дотепер не існує єдиної теорії розвитку глаукоми.

До складу ВОР входять неорганічні іони –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , бікарбонат- і фосфат-іони; високомолекулярні сполуки – білки, гіалуронова кислота, а також низка низькомолекулярних органічних речовин – амінокислоти (зокрема тирозин і цистеїн), аскорбінова кислота і аскорбат-аніони, глюкоза, глутатіон, сечова кислота тощо. Такі біохімічні зміни складу ВОР, як різниця концентрацій гіалуронової кислоти [5], трансформуючого фактора росту  $\beta$  (ТФРВ) [6], ендотеліну-1 [7] і загального білка [8,9], можуть відіграти важ-

© С.В. Колотілов, В.О. Мельник, А.С. Литвиненко, С.О. Сотнік, О.О. Гуржій



ливу роль у патофізіології ПВКГ. У деяких дослідженнях вивчалися зміни біохімічного складу ВОР у хворих з різними типами глаукомного процесу та було показано, що поряд з накопиченням псевдоексfolіативного матеріалу, порушується електролітний баланс ВОР [9], а також збільшується концентрація метаболітів (оксиду азоту [10] та ін.), різних фракцій ліпідів (сфінголіпіди, цераміди [11]) і білків [8,9]. Білковий склад ВОР значно впливає на морфологію клітин трабекулярної сітки і експресію білків [12].

Таким чином, аналіз складу ВОР може бути корисним для уточнення певних ланцюгів патогенезу глаукоми та успішного лікування пацієнта. Концентрацію різних речовин у ВОР людини і тварин з низкою захворювань визначали за допомогою деяких аналітичних методів, в тому числі високоефективної рідинної хроматографії з електрохімічним детектуванням [13], ензиматичних [14], спектроскопічних методів [15], більшість з яких є технічно трудомісткими та потребують спеціального обладнання або ж дають змогу визначити лише 1-2 речовини одночасно. Також оцінювали інтегральні показники складу ВОР, наприклад, загальну антиоксидантну ємність (total reactive antioxidant potential) [16].

Деякі речовини внутрішньоочної рідини поглинають світло в УФ-спектрі в діапазоні хвиль довжиною 200-300 нм, зокрема, білки (а саме, амінокислотні залишки тирозину, триптофану та фенілаланіну [17]), аскорбінова кислота [18] і глутатіон [19]. Таким чином, УФ-спектр може розглядатися як інтегральна характеристика вмісту метаболітів у ВОР. У літературі описане дослідження УФ-спектрів поглинання ВОР, у якому показано, що спектр поглинання суттєво різниться залежно від виду тварини, при чому їхня належність до певного класу не корелює зі спектральними характеристиками [20]. Ідея роботи полягала в пошуку відмінностей (або спростування припущення про їх існування) між спектром поглинання ВОР людини і наявністю у неї глаукоми.

Мета нашої роботи - порівняння електронних спектрів поглинання зразків ВОР у пацієнтів з діагнозом катаракти та її комбінацією з ПВКГ, а також встановлення існування відмінностей між параметрами спектра поглинання (положенням піків на спектрі та оптичною густиною ВОР при їх довжинах хвиль) та наявністю глаукоми.

## МЕТОДИКА

У дослідженні брали участь 96 пацієнтів (96 очей), серед них 60 % (58 пацієнтів) – жінки, середній вік яких становив 66,9 роки, 40 % (38 пацієнтів) – чоловіки, середній вік – 65,2 роки. Хворі були поділені на 2 групи. До першої групи увійшли 60 пацієнтів (60 очей), котрим проводили факоемульсифікацію (ФАКО) катаракти з імплантацією інтраокулярної лінзи (ІОЛ) за стандартною методикою. Другу групу склали 36 пацієнтів (36 очей) з катарактою та ПВКГ, яким виконували комбіноване оперативне лікування: модифікована тунельна трабекулопунктура (МТП) та ФАКО з імплантацією ІОЛ. Згідно з класифікацією Нестерова-Буніна, у 19 пацієнтів (52,7%) було діагностовано глаукому II стадії, у 7 пацієнтів (19,4%) – III стадії, у 10 пацієнтів (27,9%) – I стадії. З нормальним ВОТ було 9 пацієнтів (25%), з помірно підвищеним – 16 (44,4%) та з високим – 11 (30,6%). Хворі обох груп були оглянуті в період від 1 тиж до 1 міс до операції. У передопераційному періоді вони отримували різні види місцевої медикаментозної гіпотензивної терапії з неоднаковою кратністю та тривалістю закапування. Також всім пацієнтам робили інстиляції антибактеріальних препаратів (офтаквікс – левофлоксацин; «Santen», Фінляндія) в передопераційному періоді для попередження розвитку інфекційних ускладнень та інстиляції препаратів для місцевої анестезії (алкаїн – проксиметокан; «Alcon», США) під час операції. Відбирали ВОР об'ємом 10–200 мкл інтраопераційно перед проведенням екстракції катаракти. Застосову-

вали стерильний інсуліновий шприц з голкою 26 gauge через перший парацетез, після чого рідину поміщали в стерильну пробірку Епендорф. Зразки зберігали в холодильнику при +5 °С без попереднього заморожування чи стерилізації. Час, що пройшов з моменту їх відбору до моменту дослідження, вимірювали та фіксували. Якщо не вказано іншого, аналіз проводили через 24 год після відбору зразків.

Спектри поглинання зразків ВОР (виражені як залежності оптичної густини розчину в безрозмірних одиницях логарифмічної шкали від довжини хвилі випромінювання в нанометрах) вимірювали в діапазоні довжин хвиль 190–1100 нм за допомогою спектрофотометра Specord 210 («Analytic Jena AG», Німеччина). Порцію 10–100 мкл рідини (залежно від наявної кількості) вміщували в кварцову кювету товщиною 10 мм, об'єм доводили до 2 мл фізіологічним розчином (0,9 %-м розчином хлориду натрію в дистильованій воді) та ретельно перемішували. Вимірювання проводили проти фізіологічного розчину.

Враховуючи, що точні концентрації у ВОР речовин, що поглинають, невідомі, а коефіцієнти їхньої екстинкції можуть істотно відрізнятись, для порівняння зразків оптичну густину проби перераховували на умовну оптичну густину нерозведеної ВОР, яка далі по тексту позначається як *оптична густина ВОР*. Останню при довжині хвилі  $\lambda$  визначали за формулою (обговорення застосованих рівнянь наведено в розділі «Результати та обговорення»):

$$A_{\lambda} = A_{\lambda_{\text{розв}}} V_{\text{розв}} / V_{\text{проби}}$$

де  $A_{\lambda_{\text{розв}}}$  – оптична густина розведеної ВОР при довжині хвилі  $\lambda$ .

$V_{\text{розв}}$  (мкл) – об'єм розведеної рідини в кюветі (2000 мкл у всіх зразках),

$V_{\text{проби}}$  (мкл) – об'єм порції досліджуваної рідини.

Статистичну обробку значень оптичної густини ВОР проводили порівнянням довірчих інтервалів ( $P < 0,05$ ) середніх значень у межах груп, а також використовуючи критерій  $t$  Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ:

В електронному спектрі поглинання ВОР пацієнтів в УФ-ділянці (типовий спектр поглинання зразка ВОР наведено на рис. 1) спостерігається смуга поглинання в діапазоні 230–300 нм, максимум якої в абсолютній більшості випадків знаходиться при  $267 \pm 1$  нм. Наявність цієї смуги може пояснюватися поглинанням УФ-випромінювання ароматичними кільцями та системами спряжених подвійних зв'язків (електронні переходи типу  $\pi-\pi^*$ ) в органічних частинках [21], що є у ВОР. Крім того, між 190 та 220 нм спостерігається смуга поглинання з максимумом при  $202 \pm 1$  нм. Наявність цієї смуги може пояснюватися поглинанням УФ-випромінювання фрагментами органічних молекул з насиченими (переходи типу  $\sigma-\sigma^*$ ) або неспряженими подвійними зв'язками (переходи типу  $\pi-\pi^*$ ). Сталість форми спектра та положення максимумів смуг поглинання ( $202 \pm 1$  і  $267 \pm 1$  нм) для різних зразків свідчить про те, що поглинання випромінювання в цьому діапазоні різними зразками ВОР зумовлене однаковою набором речовин, а відношення їхніх концентрацій одна до одної в різних зразках близькі (на відміну від сумарної концентрації таких речовин, що буде описано нижче).

Оптична густина, ум. од.

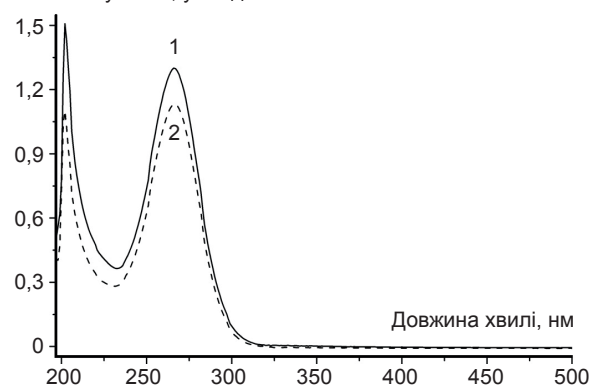


Рис. 1. Типові спектри поглинання досліджених зразків внутрішньоочної рідини кожної з досліджених груп (1 – пацієнти з катарактою та первинною відкритокутовою глаукомою, 2 – хворі лише з катарактою). Зразки розведено в 20 разів

Середнє значення оптичної густини ВОР при довжині хвилі 202 нм (рис. 2) у пацієнтів другої групи було на 27 % більше, ніж у хворих першої групи ( $P < 0,05$ ). При довжині хвилі 267 нм не спостерігалось статистично значимої різниці цього показника між першою та другою групами.

У трьох досліджених випадках (2 зразки належать пацієнтам з катарактою та ПВКГ, 1 – пацієнту лише з катарактою) пік у діапазоні 230–300 нм зміщений та викривлений (рис. 3) порівняно зі спектрами решти 93 зразків (приклад спектрів двох з цих 93 зразків наведено на рис. 1, на спектрах решти 91 спостерігаються піки тієї самої форми та при тих самих значеннях довжин хвиль, що і на рис. 1, але оптичні густини піків змінюються від зразка до зразка). У решті деталей спектри цих 3 зразків подібні до таких інших 93 зразків, зокрема, наявний пік при довжині хвилі 202 нм тієї ж форми. Разом з тим у результатах обстеження цих 3 пацієнтів не виявлено якихось інших характерних особливостей, які відрізняли б їх від 93 пацієнтів з типовим спектром ВОР.

Спектр поглинання зразка ВОР при вказаному способі зберігання змінюється з часом. Через добу після відбору оптична густина при довжині хвилі 267 нм знижується

Середня оптична густина ВОР, ум. од.

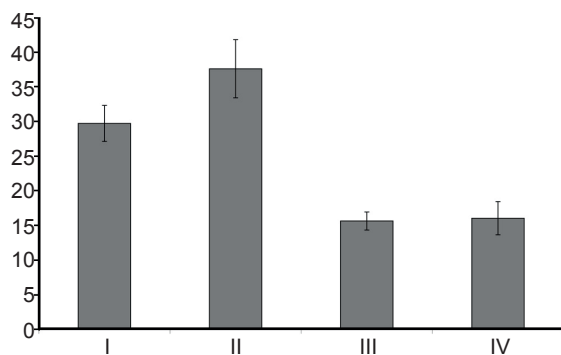


Рис. 2. Порівняння середніх оптичних густин внутрішньоочної рідини при довжинах хвиль максимумів піків у пацієнтів; I та III – пацієнти з катарактою (пік при 202 та 267 нм відповідно), II та IV – пацієнти з катарактою та первинною відкритокутовою глаукомою (пік при 202 та 267 нм відповідно)

Оптична густина, ум. од.

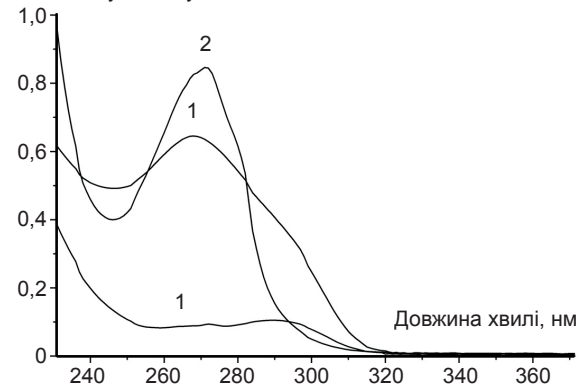


Рис. 3. Спектри поглинання зразків внутрішньоочної рідини, що відрізняються за формою та положенням піка від спектрів решти досліджених зразків (цифра 1 позначає зразки, що належать пацієнтам з катарактою та глаукомою, 2 – пацієнти лише з катарактою). Для наочності показано лише діапазон довжин хвиль від 230 до 370 нм, масштаб осей змінено порівняно з рис. 1

ся в середньому на  $17 \pm 6\%$  (рис. 4, вказане дослідження проводили для 6 зразків – по 3 зразки з кожної групи), при довжині хвилі 202 нм – зростає в середньому на  $17 \pm 10\%$ . При вимірюванні спектрів зразків, що зберігалися протягом 1–2 тиж, спостерігається зсув положення піка при 267 до 290 нм. Зміна спектрів зразків ВОР із часом може бути пов'язана з денатурацією білків, окисненням аскорбінової кислоти киснем повітря, а та-

Оптична густина ВОР, ум. од.

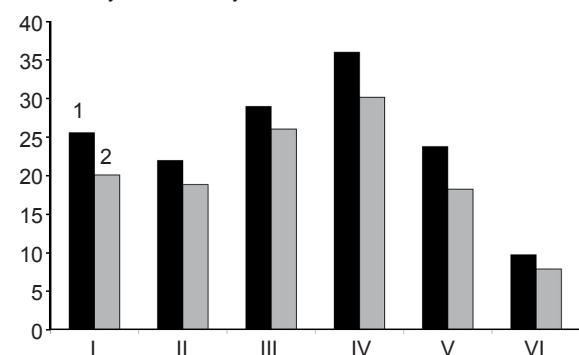


Рис. 4. Зміна оптичної густини внутрішньоочної рідини (при довжині хвилі піка  $267 \pm 1$  нм) для 6 зразків через добу після відбору (1 – значення, виміряне в той же день, 2 – через добу). 3 зразки (I–III) належать пацієнтам лише з катарактою, інші 3 (IV–VI) – з глаукомою та катарактою

кож бактеріальним перетворенням органічних речовин.

Згідно з законом Бугера-Ламберта-Бера оптична густина розчину  $A_\lambda$  при довжині хвилі  $\lambda$  лінійно залежить від концентрації речовини, що поглинає випромінювання [21]:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l,$$

де  $l$  – товщина кювети (у нашій роботі була сталою),  $c$  – молярна концентрація речовини, що поглинає,  $\varepsilon_\lambda$  – коефіцієнт екстинкції речовини, що поглинає, при довжині хвилі  $\lambda$  (для певної речовини та заданої довжини хвилі – величина стала). Аліквоту зразка ВОР перед вимірюваннями розводили фізіологічним розчином для отримання необхідного для вимірювання об'єму рідини. Значення оптичної густини при цьому потрапляли у придатний для точних вимірювань діапазон; якщо воно виявлялося надто високим, зразок розводили додатково. Таким чином, вимірювана величина  $A_\lambda$  пропорційна концентрації речовини у розведеному зразку, що дає змогу обчислити параметр, пропорційний до концентрації у вихідному зразку ВОР.

$$c = A_\lambda / (\varepsilon_\lambda \cdot l).$$

$c_0 = c \cdot (V_{\text{розв}} / V_{\text{проби}}) = A_\lambda / (\varepsilon_\lambda \cdot l) \cdot (V_{\text{розв}} / V_{\text{проби}}) = [V_{\text{розв}} / (\varepsilon_\lambda \cdot l)] \cdot [A_\lambda / V_{\text{проби}}]$ , причому  $V_{\text{розв}} / (\varepsilon_\lambda \cdot l)$  у рамках цієї роботи є константою (при певній довжині хвилі  $\lambda$ ).

Різниця в середній оптичній густині ВОР при довжині хвилі максимуму піка  $202 \pm 1$  нм між пацієнтами першої групи (лише катаракта) та другої (ПВКГ та катаракта) відповідає більш високому середньому вмісту органічних речовин, що поглинають при 202 нм, у ВОР пацієнтів з ПВКГ та катарактою, порівняно зі значеннями у хворих лише з катарактою. Враховуючи, що ймовірною причиною підвищення ВОТ при глаукомі є уповільнення відтоку рідини через трабекулу [22] (внаслідок збільшення об'єму клітин, що вистилають структури трабекулярної сітки і шлеммового каналу [23], накопичення екстрацелюлярного матеріалу в просвітах трабекулярної сітки, а

також втрати нею клітин [24]), підвищення концентрації органічних сполук у ВОР може також бути пов'язано зі зниженням швидкості їхнього видалення з її відтоком при збереженні незмінної швидкості їхнього утворення.

## ВИСНОВКИ

В УФ-спектрах поглинання ВОР пацієнтів в діапазоні 190–300 нм спостерігаються дві смуги поглинання. У більшості випадків форма та положення максимуму цих смуг ( $202 \pm 1$  та  $267 \pm 1$  нм) не залежить від наявності чи відсутності ПВКГ. Подібність положень максимумів та форм смуг поглинання для різних зразків може пояснюватися тим, що поглинання випромінювання в різних зразках зумовлено одними і тими ж речовинами, і співвідношення їхніх концентрацій у різних зразках близькі. Водночас середня оптична густина ВОР при довжині хвилі максимуму поглинання 202 нм у групах пацієнтів з та без ПВКГ відрізняється, що може свідчити про різну сумарну концентрацію речовин, що поглинають при цій довжині хвилі. Середня оптична густина ВОР при 202 нм у групі пацієнтів без ПВКГ достовірно нижча порівняно з групою пацієнтів з даним захворюванням, що може бути пов'язано із накопиченням продуктів метаболізму у ВОР пацієнтів з ПВКГ, що в свою чергу може бути викликане уповільненням її відтоку у цих пацієнтів. Однак статистично значимої різниці середньої оптичної густини ВОР при 267 нм між групами пацієнтів з і без ПВКГ не спостерігається.

Спектрофотометрія внутрішньоочної рідини може бути дієвим інструментом для додаткової діагностики пацієнтів з патологією органа зору, однак, враховуючи зміну оптичної густини при зберіганні, важливим є проведення вимірювань через певні (фіксовані) проміжки часу після відбору зразка.



**S.V. Kolotilov, V.O. Melnyk, A.S. Lytvynenko,  
S.O. Sotnik, O.O. Hurzhii**

### **COMPARISON OF SPECTROSCOPIC PROPERTIES OF INTRAOCULAR FLUID IN PATIENTS WITH CATARACT AND PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA**

This paper presents a comparison of spectroscopic properties of aqueous humour in patients with cataract (60 patients, 60 eyes) and combination of cataract and primary open angle glaucoma (POAG, 36 patients, 36 eyes). The samples of aqueous humour were collected during the surgery. Both groups of patients were treated with different types of local drug antihypertensive therapy with different multiplicity and duration of instillation during the preoperative period. The absorption spectrum of aqueous humour were measured in the wavelength range 190–1100 nm. There were two absorption bands with maximums at 202 and 267 nm in the absorption spectrum (2nd maximum of some samples was shifted to larger wavelengths). The mean absorbance of aqueous humour at 202 nm in patients without POAG was significantly lower than in patients with POAG. This difference could be explained with accumulation of metabolites in aqueous humour of patients with POAG, which in turn may be caused by deceleration of aqueous humour flow in patients with POAG. Meanwhile, there were no statistically significant differences of mean absorbance of aqueous humour at 267 nm between the patients of both groups.

Key words: cataract; primary open-angle glaucoma; optical density of aqueous humour; spectroscopy.

*Ophthalmological Clinic "Visiobud plus", Kyiv; Institute of Physical Chemistry of L.B. Pisargevskiy NAS Ukraine, Kyiv*

**С.В. Колотилов, В.А. Мельник,  
А.С. Литвиненко, С.А. Сотник, Е.А. Гуржий**

### **СРАВНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВНУТРИГЛАЗНОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ С КАТАРАКТОЙ И ПЕРВИЧ- НОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ**

В данной работе представлено сравнение спектроскопических свойств внутриглазной жидкости (ВГЖ) у больных с катарактой (60 пациентов, 60 глаз) и комбинацией ее и первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ, 36 пациентов, 36 глаз). Забор образцов ВГЖ произведен интраоперационно. Из анамнеза было известно, что в предоперационном периоде пациенты обеих групп получали разные виды местной медикаментозной гипотензивной терапии с различной кратностью и длительностью закапывания. Спектры поглощения образцов ВГЖ измеряли в диапазоне длин волн 190–1100 нм. Независимо от диагноза наблюдали две полосы поглощения с максимумами при 202 и 267 нм (второй максимум на спектрах некоторых образцов смещен в длинноволновую область). Средняя оптическая плотность ВГЖ при 202 нм у пациентов без

ПОУГ достоверно ниже по сравнению с пациентами с глаукомой. Такое различие может объясняться накоплением продуктов метаболизма во ВГЖ у пациентов с ПОУГ, что в свою очередь может быть вызвано замедлением ее тока. В то же время статистически значимых отличий средней оптической плотности ВГЖ при 267 нм между двумя группами не наблюдается.

Ключевые слова: катаракта; первичная открытоугольная глаукома; оптическая плотность внутриглазной жидкости; спектрофотометрия.

### **REFERENCES**

1. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90: 262–7.
2. Kwon Y.H., Fingert J.H., Kuehn M.H., Alward W.L. Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med.* 2009; 360: 1113–24. doi: 10.1056/NEJMra0804630.
3. Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet.* 2004; 22: 1711–20.
4. Mäepea O, Bill A. Pressures in the juxtacanalicular tissue and Schlemm's canal in monkeys. *Exp Eye Res.* 1992; 54: 879–83.
5. Navajas EV, Martins JR, Melo LA Jr et al. Concentration of hyaluronic acid in primary open-angle glaucoma aqueous humor. *Exp Eye Res.* 2005; 80: 853–7.5.
6. Picht G, Welge-Luessen U, Grehn F, Lütjen-Drecoll E. Transforming growth factor beta 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and their relation to filtering bleb development. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001; 239: 199–207.
7. Koliakos GG, Konstas AG, Schlötzer-Schrehardt U et al. Endothelin-1 concentration is increased in the aqueous humor of patients with exfoliation syndrome. *Br J Ophthalmol.* 2004; 88: 523–7.
8. Beardsley TL, Shields MB. Effect of timolol on aqueous humor protein concentration in humans. *Am J Ophthalmol.* 1983; 95: 448–50.
9. Prata Tdos S, Navajas EV, Melo LA Jr, Martins JR, Nader HB, Belfort R Jr. Aqueous humor protein concentration in patients with primary open-angle glaucoma under clinical treatment. *Arq Bras Oftalmol.* 2007; 70: 217–20.
10. Kotikoski H1, Moilanen E, Vapaatalo H, Aine E. Biochemical markers of the L-arginine-nitric oxide pathway in the aqueous humor in glaucoma patients. *Acta Ophthalmol Scand.* 2002 Apr; 80(2): 191–5.
11. Ayman J. Aljohani, Gustavo C. Munguba. Sphingolipids and ceramides in human aqueous humor *Molecular Vision* 2013; 19.
12. Fautsch MP, Howell KG, Vrabel AM, Charlesworth CM, Muddiman DC, Johnson DH. Primary trabecular meshwork cells incubated in human aqueous humor differ from cells incubated in serum supplements. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 30: 1035–40.
13. Stuart P. Richer, R.C. Rose. Water soluble antioxidants in



- mammalian aqueous humor: interaction with UV B and hydrogen peroxide. *Vis Res.* 1998;38: 2881–88.
14. E. de Berardinis, O. Tieri, A. Polzella and N. Iuglio, The Chemical Composition of the Human Aqueous Humour in Normal and Pathological Conditions. *Exp Eye Res.* 1965; 4:179-186.
15. Tiago dos Santos Prata; Eduardo Vitor Navajas; Luiz Alberto Soares Melo Jr.; João Roberto Maciel Martins; Helena Bonciani Nader; Rubens Belfort Jr., Aqueous humor protein concentration in patients with primary open-angle glaucoma under clinical treatment. *Arq Bras Ophtalmol.* 2007;70(2):217-20.
16. Sandra M. Ferreira, S.Fabián Lerner, R. Brunzini, Pablo A. Evelson, Susana F. Llesuy, Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Amer J Ophthalmol.* 2004; 137(1);62–69.
17. Olson, B. J. and Markwell, J. 2007. Assays for Determination of Protein Concentration. *Cur Prot Prot Sci.* 48:3.4:3.4.1–3.4.29.
18. S. A. Markarian \* and H. R. Sargsyan, Electronic absorption spectra of ascorbic acid in water and water-dialkyl-sulfoxide mixtures, *J Appl Spectroscopy.* 201; 78(1):6-9.
19. M. V. Riley, R. F. Meyer and E. M. Yates, Glutathione in the aqueous humor of human and other species. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1980; 19(1):94-96.
20. Amund Ringvold, Erlend Anderssen Egil Jellum, Ellen Bjerkås, Geir A. Sonerud, Peder J. Haaland, Tone Pahle Devor, Inge Kjønneksen, UV-Absorbing Compounds in the Aqueous Humor from Aquatic Mammals and Various Non-Mammalian Vertebrates, *Ophthalm Res.* 2003;35:208–16.
21. O.V. Sverdlova. Electronic spectra in organic chemistry. *L Chemistry.* 1985; 2: 248. [Russian].
22. Charles W. McLaughlin, Mike O. Karl, Sylvia Zellhuber-McMillan. Electron probe X-ray microanalysis of intact pathway for human aqueous humor outflow. *Amer J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295(1): 1083-91.
23. Al-Aswad LA, Gong H, Lee D, O'Donnell ME, Brandt JD, Ryan WJ, Schroeder A, Erickson KA. Effects of Na-K-2Cl cotransport regulators on outflow facility in calf and human eyes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 1695–1701.
24. B'Ann True Gabelt, Paul L. Kaufman. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma *Progress in Retinal and Eye Res.* 2005; 24: 612-37.

*Матеріал надійшов  
до редакції 25.05.2016*

# Стан глутатіонзалежної ланки антиоксидантної системи крові при застосуванні порошку насіння фенугреку тварин з експериментальним ожирінням

В.В. Конопельнюк, Л.І. Кот, Т.В. Коваль, Т.Д. Хілько, І.В. Якубцова, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; e-mail: tkhilko@gmail.com

*Досліджено вміст відновленого глутатіону (GSH) та активність глутатіонзалежних ферментів: глутатіонпероксидази (GP) і глутатіон-S-трансферази (GT) у сироватці крові щурів при введенні в дієту насіння *Trigonella foenum graecum* L. на фоні розвитку експериментального ожиріння. Встановлено, що розвиток ожиріння у щурів супроводжувався порушенням гомеостазу в глутатіонзалежній системі сироватки крові. У тварин, які перебували на висококалорійній дієті, разом зі зниженням (у 1,2 раза) вмісту GSH зменшувалась активність GP (у 1,7 раза) та зростала (у 1,7 раза) активність GT порівняно з контролем через 14 тиж. Доповнення висококалорійної дієти 2%-ми дрібнодисперсного порошку насіння *Trigonella foenum graecum* L. знижувало приріст маси тіла щурів на 21% та здійснювало позитивний модулювальний вплив на вміст GSH і активність GP, GT у тварин з експериментальним ожирінням*

*Ключові слова: дієтіндуковане ожиріння; відновлений глутатіон; глутатіонпероксидаза; глутатіон-трансфераза; дрібнодисперсний порошок насіння *Trigonella foenum graecum* L.*

## ВСТУП

Нині ожиріння є однією з пріоритетних і соціально значущих проблем сучасної науки та медицини. Загальновизнано, що зростання частоти ожиріння серед населення розвинених країн набуває загрозливих темпів, що порівнюють з епідемією [1]. Це зумовлено малорухливим способом життя, характерним для сучасного суспільства, переїданням, вживанням шкідливих для організму продуктів, постійними психологічними стресами. Надлишкова маса тіла часто асоціюється з розвитком серцево-судинних захворювань, призводить до порушень вуглеводного, ліпідного, пуринового обмінів та гемостазу, цукрового діабету II типу, а отже, в результаті до зниження тривалості життя [2,3].

Незважаючи на наявність багатьох досліджень, що стосуються терапії хворих із ожирінням,

результати лікування не завжди задовільні. Різноманітні низькокалорійні дієти, які часто супроводжуються порушеннями в обміні речовин, а також побічні ефекти та ускладнення, в тому числі алергічні реакції, що зумовлені медикаментозною терапією, спонукають до розробки більш ефективних схем лікування метаболічних порушень. У сучасній медичній практиці все частіше для лікування ожиріння застосовують препарати рослинного походження, що містять сполуки з різною біологічною активністю, які мають здійснювати на організм людини комплексний фізіологічний вплив, добре сприймаються та не викликають побічних реакцій. Особливу увагу приділяють вмісту у сировині антиоксидантів, що здатні попереджати вільнорадикальне окиснення біологічних структур організму, таким чином запобігаючи розвитку патологічних змін.

© В.В. Конопельнюк, Л.І. Кот, Т.В. Коваль, Т.Д. Хілько, І.В. Якубцова, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко

Patil і Jain [4] показали ефективність складових *Trigonella foenum graecum* L. у лікуванні цілого ряду патологічних станів. Насіння рослини містить велику кількість біологічно активних речовин, зокрема вуглеводи (45-60%), ліпіди (6-10%), білки (20-30%), стероїдні сапоніни (5-6%), флавоноїди, алкалоїди (2-3%), ефірні олії, вітаміни, мікроелементи тощо [5]. Завдяки своєму унікальному біохімічному складу цій рослині притаманні протизапальні, антидіабетичні, гіпохолестеринемічні, імуномодулювальні та антиоксидантні ефекти [6]. Тому перспектива подальших досліджень *Trigonella foenum graecum* L. як потенційного засобу для корекції метаболічних порушень за умов ожиріння є достатньо обґрунтованою.

Важливе значення у розвитку патологічних змін при ожирінні має надмірна активація вільнорадикальних процесів, і як наслідок, порушення про- та антиоксидантної рівноваги і розвиток оксидативного стресу [7]. Система глутатіону є однією із активних складових антиоксидантної системи захисту організму, яка відіграє значну роль у пригніченні патологічного процесу, її виснаження може призводити до виникнення серйозних цитотоксичних і деструктивних ушкоджень [8]. Вивчення змін у глутатіоновій системі важливе для пошуку нових фармакологічних засобів, зокрема природного походження, які здатні корегувати стан окисного стресу.

Метою нашої роботи було оцінити вміст відновленого глутатіону (GSH), активності глутатіонзалежних ензимів: глутатіон-S-трансферази (GT) і глутатіонпероксидази (GP) у сироватці крові щурів як за умов експериментальної моделі ожиріння, так і при доповненні висококалорійної дієти 2%-м дрібнодисперсним порошком насіння *Trigonella foenum graecum* L.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях з початковою масою 150–170 г,

яких утримували за стандартних умов віварію, з дотриманням положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей.

Впродовж першого тижня тварини перебували на стандартному раціоні харчування з вільним доступом до води. На 8-му добу їх розподілили на 3 групи по 10 у кожній. До 1-ї групи ввійшли контрольні тварини, які отримували стандартний корм віварію та воду *ad libitum*. Тварини 2-ї і 3-ї груп з модельованим експериментальним ожирінням протягом 14 тиж перебували на висококалорійній дієті, яка складалася зі стандартного корму: свинячого жиру (10%), курячих яєць (10%), цукру (19%), арахісу (5%), сухого молока (5%), рослинної олії (1%) [9]. Щури 3-ї групи отримували 14 тиж висококалорійну дієту, яка додатково містила 2% дрібнодисперсного порошку насіння *Trigonella foenum graecum* L., який був наданий професором Ш. Макаєм з Університету імені Святого Штефана.

Вміст GSH в сироватці крові щурів визначали спектрофлуориметричним методом з використанням ортофталевого альдегіду, в результаті реакції якого з GSH утворюються високофлуоресцентні продукти, які активуються при 350 нм, і мають чітко виражений пік при 420 нм [10, 11]. Активність GP визначали за методом Разиграєва з використанням пероксиду водню та 5,5 – дитіобіс (2-нітробензойної) кислоти [12]. Активність GT оцінювали за швидкістю утворення кон'югату з 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ), який характеризується максимумом поглинання при 346 нм [13]. Ферментативну активність перераховували на 1 мг білка, вміст якого визначали за методом Бредфорд.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики із застосуванням One-Way ANOVA і t-test стандартного пакету прикладних програм Statistica 8.0. Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано тест Ша-

піро-Вілка. Порівняння вибірок проводили за допомогою критерію *t* Стьюдента. Експериментальні результати представляли у вигляді  $M \pm m$  для кожної експериментальної групи. Різницю між показниками вважали статистично значущою при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нині актуальним є пошук сполук природного походження, які могли б корегувати метаболічні порушення за умов розвитку ожиріння. Насінню *Trigonella foenum graecum* L. завдяки наявності у своєму складі широкого спектра біологічно активних сполук (галактоманани, стероїдні сапоніни, 4-гідроксиізолейцин, флавоноїди тощо), властиві багато терапевтичних ефектів. Вживання насіння рослини може сприяти зниженню вмісту холестерину в плазмі крові та зниженню його синтезу в печінці.

На рис. 1 відображено динаміку зростання маси тіла щурів експериментальних груп протягом 14 тиж. Під час досліджень було встановлено, що після споживання висококалорійної дієти кінцева маса ( $416,3 \pm 9,511$  г) тіла щурів була значно вищою порівняно з початковою масою ( $179,9 \pm 18,076$  г) тварин 2-ї групи. Таким чином, протягом розвитку

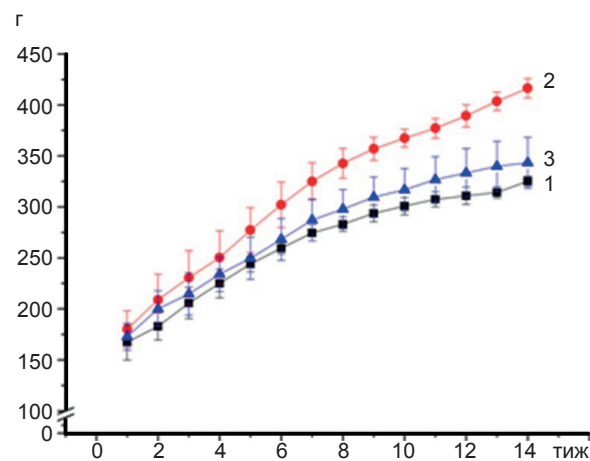


Рис.1. Маса тіла щурів в нормі (1), при дієтіндукованому ожирінні (2) та за умов споживання *Trigonella foenum graecum* L. на фоні висококалорійної дієти (3)

ожиріння зареєстровано збільшення маси тіла тварин у 2,3 раза.

У 3-й групі щурів, що споживали висококалорійну дієту, доповнену 2% порошку насіння фенугреку, не спостерігалось надмірного зростання маси тіла тварин. Порівняно з 2-ю групою цей показник був меншим на 21%. Отже, наші результати свідчать, що активні сполуки *Trigonella foenum graecum* L. можуть впливати на засвоєння поживних речовин, знижують приріст маси тіла щурів. Іншими авторами також отримані дані подібного характеру. Вони вважають, що застосування *Trigonella foenum graecum* L. інгібує формування нових диференційованих «малих» жирових клітин з преадипоцитів та накопичення ліпідів, що запобігає збільшенню маси тіла, викликаному споживанням їжі з високим вмістом жирів [14].

Одним з критеріїв розвитку ожиріння є ефективність годування тварин. Це відношення набраної маси (г) до кількості спожитого корму (г). Згідно з отриманими результатами спостерігалось зростання цього показника в групі тварин, які споживали висококалорійну дієту. У них ефективність годування була більшою на 34,5% порівняно з щурами, що споживали стандартний корм (контрольна група). А ефективність годування щурів, що разом з висококалорійним кормом отримували 2% дрібнодисперсного порошку насіння фенугреку, є такою ж самою, як і в контрольній групі щурів. У щурів 3-ї групи цей показник був меншим на 26% порівняно з тваринами 2-ї групи. Можна передбачати, що збільшення показника ефективності годування у щурів, які отримували висококалорійну дієту, пов'язане з висококалорійним складом корму, а зменшення у щурів 3-ї групи – з гіполіпідемічними властивостями складових порошку насіння *Trigonella foenum graecum* L.

Відомо, що насіння *Trigonella foenum graecum* L. може мати дозозалежний ефект на модуляцію активності ферментів антиоксидантного захисту, зокрема супероксиддисмутази, каталази та GT [16]. Великого значення

набуває дослідження вмісту GSH – основного модулятора ферментативної редокс-системи глутатіону, а також активності глутатіонзалежних ензимів: GT та GP, що забезпечують детоксикацію перекисів, органічних гідроперекисів, інактивацію вільних радикалів та таким чином захищають організм від окисного пошкодження, що відбувається при різних патологічних станах, в тому числі і ожирінні. Причиною виникнення оксидативного стресу є дисбаланс між інтенсивною продукцією вільних радикалів і депресією антиоксидантних систем клітини. Накопичення в клітинах вільних радикалів може призводити до окисної модифікації молекул, пошкодження клітинних структур і, як наслідок, клітинної загибелі. За таких умов важливою ланкою в процесах інактивації вільних радикалів є система глутатіону [16].

Найбільш важливий компонент глутатіонзалежної антиоксидантної системи GSH, який швидко мобілізується в разі підвищеного вмісту активних форм кисню та відновлює їх у реакціях з утворенням окисненого глутатіону (GSSG), у такий спосіб забезпечує резистентність клітин до ПОЛ, вільних радикалів, алкілювання білків, і попереджує пошкодження структури ДНК. Враховуючи безпосередню участь глутатіону у багатьох процесах життєдіяльності клітини, в тому числі диференціації, проліферації, апоптозу, порушення його гомеостазу може свідчити про розвиток патологічних змін на фоні розвитку ожиріння [8, 17].

Таким чином, для оцінки загального стану антиоксидантної системи організму за умов розвитку дієтіндукованого ожиріння нами було визначено вміст відновленого глутатіону в сироватці крові щурів. Після 14 тиж вживання висококалорійної дієти спостерігали зниження цього показника у 1,2 раза відносно контролю, що, ймовірно, свідчило про його використання в реакціях знешкодження токсичних вільнорадикальних сполук, які утворилися на фоні довготривалого висококалорійного навантаження (рис.2).

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших досліджень [18], в яких показано зниження вмісту GSH у сироватці крові та гомогенатах тканин печінки, серця, та аорти щурів, які довготривало споживали висококалорійну дієту. Як свідчать результати наших досліджень, споживання 2% дрібнодисперсного порошку *Trigonella foenum graecum L.* разом з висококалорійним харчовим раціоном протягом 14 тиж призводило до підвищення вмісту GSH в сироватці крові щурів (див. рис.2).

Одночасно зі змінами вмісту GSH за умов розвитку ожиріння змінювалась активність глутатіонзалежних ферментів. Так, разом зі зниженням вмісту GSH зменшується активність GP в 1,7 раза у сироватці крові тварин, що знаходились на висококалорійній дієті, порівняно з контролем (рис. 3). Отже, вміст GSH та активність GP зменшувалися при дегенеративних змінах тканин у досліджуваних тварин. Таке пригнічення ферментативної активності може бути пов'язано з тим, що функціонування GP залежить від вмісту внутрішньоклітинного GSH, який відіграє роль не лише субстрату реакцій, але й фактора, необхідного для постійного відновлення розміщених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп, які окиснюються у процесі

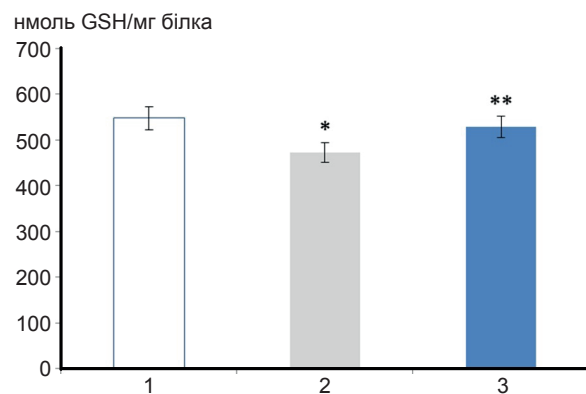


Рис.2. Вміст відновленого глутатіону в сироватці крові щурів в нормі (1), при дієтіндукованому ожирінні (2) та за умов споживання *Trigonella foenum graecum L.* на фоні висококалорійної дієти (3).

\* P < 0,05 щодо значень відносно контролю, \*\* P < 0,05 щодо значень при дієтіндукованому ожирінні



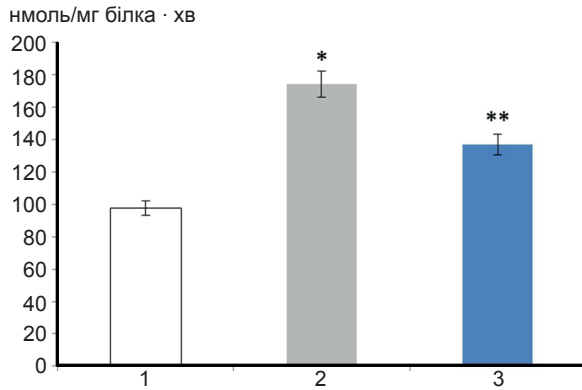


Рис.3. Активність глутатіонтрансферази в сироватці крові щурів в нормі (1), при дієтично-індукованому ожирінні (2) та за умов споживання *Trigonella foenum graecum L.* на фоні висококалорійної дієти (3).

\*  $P < 0,05$  щодо значень відносно контролю,

\*\*  $P < 0,05$  щодо значень при дієтично-індукованому ожирінні

глутатіонпероксидазної реакції [18]. Також не виключено, що зниження активності GP за умов експериментального ожиріння протягом 14 тиж може бути зумовлено не тільки вичерпанням доступного пулу GSH, а й накопиченням продуктів ліпопероксидації.

На відміну від GP активність GT підвищувалась у 1,7 раза за умов споживання висококалорійної дієти порівняно з контролем (рис. 4). Активацію цього показника у сироватці крові щурів з експериментальним ожирінням можна вважати компенсаторною реакцією

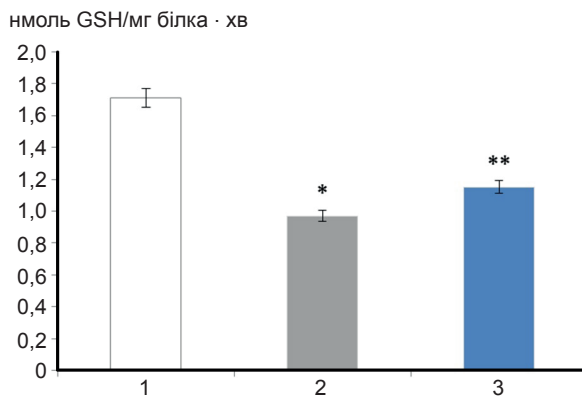


Рис.4. Активність глутатіонпероксидази в сироватці крові щурів в нормі (1), при дієтично-індукованому ожирінні (2) та за умов споживання *Trigonella foenum graecum L.* на фоні висококалорійної дієти (3).

\*  $P < 0,05$  щодо значень відносно контролю, \*\*  $P < 0,05$  щодо значень при дієтично-індукованому ожирінні

при зниженні активності GP за умов тривалого споживання висококалорійної дієти щурами. Узгоджена робота GP та GT попереджає подальше прогресування пероксидації, розповсюдження неферментативних реакцій, накопичення вторинних метаболітів.

У тварин, яким давали дрібнодисперсний порошок фенугрека разом з висококалорійною дієтою, зареєстровано підвищення ферментативної активності GP в 1,2 раза та зниження ферментативної активності GT в 1,3 раза порівняно з тваринами, які споживали лише висококалорійну дієту. Таким чином, доповнення висококалорійної дієти біологічно активними сполуками насіння *Trigonella foenum graecum L.* здійснювало модульований вплив на вміст GSH та активність GP, GT у сироватці крові дослідних тварин. Вивчення його хімічного складу показало наявність амінокислот, які беруть безпосередню участь у синтезі глутатіону [19]. Саме сірковмісні амінокислоти (цистеїн і метіонін) є важливими в синтезі GSH. Нині відомо, що кількість та якість харчового білка і метіоніну впливають на вміст глутатіону в печінці щурів. Навіть порівняно невелике додавання в раціон сірковмісних амінокислот приводить до посилення його синтезу. Такі зміни досліджуваних показників за доповнення висококалорійної дієти 2% дрібнодисперсного порошку насіння *Trigonella foenum graecum L.*, ймовірно, свідчать про залучення цих компонентів антиоксидантної системи до реакцій знешкодження токсичних вільнорадикальних сполук, які утворилися на фоні розвитку ожиріння.

Аналізуючи отримані результати, можна заключити, що умови наших експериментів дозволили змодельовати дієтично-індуковане ожиріння у щурів. Використання 2% дрібнодисперсного порошку насіння *Trigonella foenum graecum L.* з висококалорійним раціоном знижує приріст маси тіла щурів. Це може бути зумовлено не зменшенням харчової активності тварин, а, ймовірно, пов'язане з впливом на метаболічні процеси (попередження всмоктування жирів, підвищення утилізації жирів).

Розвиток ожиріння у щурів супроводжувався порушенням гомеостазу в глутатіонзалежній антиоксидантній системі сироватки крові. Доповнення висококалорійної дієти порошком насіння *Trigonella foenum graecum* L. здійснювало позитивний модулюючий вплив на вміст GSH і активність GP, GT у тварин з експериментальним ожирінням.

Подальше вивчення змін показників глутатіонової ланки антиоксидантного захисту за умов застосування препаратів рослинного походження сприятиме пошуку та розробці нових засобів профілактики, щоб запобігти розвитку тяжких супутніх ускладнень надлишкової маси тіла.

**В.В. Конопельнюк, Л.І. Кот, Т.В. Коваль,  
Т.Д. Хилько, І.В. Якубцова,  
Т.Д. Преображенская, Л.И. Остапченко**

#### **СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНЗАВИСИМОГО ЗВЕНА АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПОРОШКА СЕМЯН ФЕНУГРЕКА У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ**

Исследовано содержание восстановленного глутатиона (GSH) и активность глутатионзависимых ферментов: глутатионпероксидазы (GP) и глутатион-S-трансферазы (GT) в сыворотке крови крыс при введении в диету семян *Trigonella foenum graecum* L. на фоне развития экспериментального ожирения. Установлено, что развитие ожирения у крыс сопровождалось нарушением гомеостаза в глутатион-зависимой системе сыворотки крови крыс. У животных, находившихся на высококалорийной диете, наряду со снижением (в 1,2 раза) содержания GSH уменьшалась активность GP (у 1,7 раза) и возрастала активность GT (у 1,7 раза) по сравнению с показателями контроля через 14 нед. Дополнение высококалорийной диеты 2%-ми мелкодисперсного порошка семян *Trigonella foenum graecum* L. уменьшало прирост массы тела крыс на 21% и осуществляло положительное модулирующее влияние на содержание GSH и активность GP, GT у животных с экспериментальным ожирением.

Ключевые слова: диетиндуцированное ожирение; восстановленный глутатион; глутатионпероксидаза; глутатионтрансфераза; мелкодисперсный порошок семян *Trigonella foenum graecum* L.

**V.V. Konopelnyuk, L.I. Kot, T.V. Koval,  
T.D. Khilko, I.V. Yakubtsova,  
T.D. Preobrazhenska, L.I. Ostapchenko**

#### **STATUS OF GLUTATHIONE-DEPENDENT LINK OF BLOOD ANTIOXIDANT SYSTEM UNDER APPLICATION OF FENUGREEK SEED POWDER IN ANIMALS WITH EXPERIMENTAL OBESITY**

The content of reduced glutathione (GSH) and activity of glutathione-dependent enzymes: glutathione peroxidase (GP) and glutathione-S-transferase (GT) in blood serum of rats in the diet supplemented of fine powder seeds *Trigonella foenum graecum* L. on the background of experimental obesity. It was established that the development of obesity in rats was accompanied by violation of homeostasis in the glutathione-dependent system of blood serum. It has been shown that animals on high-calorie diet along 14 weeks had a decrease (1,2) in GSH concentration, a decline (1,7) in GP activity and the increase (1,7) of GT activity compared with control values. Addition to high-calorie diet 2% fine powder seeds *Trigonella foenum graecum* L. reduced the body weight gain by 21%, carried positive modulating effect on the content of GSH and GP, GT activity in animals with experimental obesity.

Key words: diet-induced obesity; reduced glutathione; glutathione peroxidase; glutathione transferase; fine powder seeds *Trigonella foenum graecum* L.

*Taras Shevchenko National University of Kyiv.*

#### **REFERENCES**

1. Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev.* 2007; 29: 1-5.
2. Markhon NA, Mamchur VI, Zhylyuk VI, Lievykh AE. Comparative analysis of experimental approaches in reproducing of metabolic syndrome. *J Med Biol Problems.* 2015; 1(17): 156-62. [Ukrainian].
3. Pasiyeshvili LM, Zheleznyakova NM, Pasiyeshvili TM. Obesity as a social problem. Stages of the disease formation in subjects with biliary diseases. *Contemp Gastroenterol.* 2008; 6: 6-9.
4. Patil S, Jain G. Holistic approach of *Trigonella foenum-graecum* in Phytochemistry and Pharmacology. *Curr Trends Technol Sci.* 2014; 3: 34-48.
5. Moradi Kor N., Moradi K. Physiological and pharmaceutical effects of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a multipurpose and valuable medicinal plant. *Global J Med Plant Res.* 2013; 1(2): 199-206.
6. Kaur J, Singh H, Khan MU. Multifarious therapeutic potential of fenugreek: a comprehensive review. *Int J Res Pharm Biomed. Sci.* 2011; 2(3): 863-71.
7. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci.* 2011; 12: 3117-32.
8. Kalinina EV, Chernov NN, Novichkova MD. Role of

- glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry*. 2014; 79(13): 1562-83.
9. Shen X.-H, Tang Q.-Y, Huang J, Cai W. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. *Experim. Biol Med*. 2010; 235: 47-51.
  10. Mokrasch LC, Teschke EJ. Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a specific fluorometric assay. *Anal Biochem*. 1984; 140(2): 506-9.
  11. Hissin PJ, Hilf RA. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74(1): 214-26.
  12. Razygraev AV. Method of determination of glutathione peroxidase activity using hydrogen peroxide and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Klin-Lab Konsilium*. 2004; 4: 19-22. [Russian].
  13. Vlasova SN, Shabunina EI, Pereslyagina IA. Activity of glutathione dependent enzymes in red blood cells liver chronic disease in children. *Lab Delo*. 1990; 8: 19-21. [Russian].
  14. Ghorbani A, Hadjzadeh M, Rajaei Z, Zendehbad SB. Effects of fenugreek seeds on adipogenesis and lipolysis in normal and diabetic rats. *Pakistan J Biol Sci*. 2014; 17: 523-8.
  15. Choudhary D; Chandra D; Choudhary S; Kale R.K. Modulation of glyoxalase, glutathione S-transferase and antioxidant enzymes in the liver, spleen and erythrocytes of mice by dietary administration of fenugreek seeds. *Food Chem*. 2001; 39(10): 989-97.
  16. Reznikov OH, Polumbryk OM, Balion YH, Polumbryk MO. Pro- and antioxidant systems and pathological processes in humans. *Bull NAS Ukraine*. 2014; 10: 17-29. [Ukrainian].
  17. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. 2009; 390(3): 191-214.
  18. Iskra R. Condition of glutathione link of antioxidant system in different organs and tissues of rats at chromium nanoaquaricite action. *Eksperim Clin Physiol Biochem*. 2011; 3: 28-33. [Ukrainian].
  19. Denisenko YK, Novgorodtseva TP. Effect of prolonged high-fat diet on thiol-disulfide homeostasis in rats. *Int J BioMed*. 2013; 3(3): 197-200.

*Матеріал надійшов до редакції 12.05.2016*

# Оцінка ефективності наночастинок ортованадату гадолінію для коригування неонатально індукованої репродуктопатії у самців щурів

І.О. Белкіна<sup>1</sup>, Н.П. Смоленко<sup>1</sup>, В.К. Клочков<sup>2</sup>, Ю.В. Малюкін<sup>2</sup>, Е.С. Чистякова<sup>1</sup>, Н.О. Карпенко<sup>1</sup>, Ю.І. Караченцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», Харків; <sup>2</sup>ДУ «Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України», Харків; e-mail: chistelina@i.ua; nina\_karpenko@mail.ru

*Вивчали ефективність наночастинок ортованадату гадолінію (НЧ GdVO<sub>4</sub>) для коригування розладів чоловічої репродуктивної функції на моделі неонатально індукованої репродуктопатії. Нащадки інтактних щурів-батьків з 3-ї по 22-гу добу життя на тлі емоційного стресу («Maternal separation stress») отримували надмірну кількість суміші фітоестрогенів (ФЕ) з молоком матері (1-ша група). У віці 10 міс самцям 1-ї групи упродовж 70 діб з кормом вводили НЧ GdVO<sub>4</sub> у дозі 0,33 мг/кг (2-га група) або референтний препарат спеман у дозі 158 мг таблеткової маси на 1 кг маси тіла (3-тя група). Досліджено статеву поведінку й фертильність самців, розраховано інтегральний показник репродуктивного потенціалу (Фі) порівняно з контрольною групою, які отримували розчинник (вода). У 1-ї групи статеву поведінку самців характеризувалася прискоренням спарювальних реакцій на самицю (дворазове скорочення латентності садок та інтромісії) та зниженою спроможністю до завершення парування еякуляцією та початку другого туру копуляції. Самці цієї групи запліднювали менше самиць (67 щодо 91 % у контролі), які майже всі завагітніли. Неонатально індуковане погіршення якості статевих клітин зумовило більші ніж двократне зростання внутрішньоутробних втрат у вагітних і зменшення загальної кількості плодів у самиці (на 21 %). Це визначило зменшення Фі самців у 2,6 рази порівняно з контролем. Застосування НЧ GdVO<sub>4</sub> відновило показники статевої поведінки самців до рівня контрольної групи, що спричинило зростання кількості запліднених самиць (до 95 %). У вагітних самиць на тлі зменшення рівня внутрішньоутробних втрат (до 15,2 щодо 18,1 % у контролі, P<0,05) на 25 % (P<0,05) зростає кількість плодів, що свідчить про підвищення якості сперматозоїдів. Показник Фі збільшився до 8,3±0,5 відносно 3,0±0,3 од. у 1-ї групі, що було статистично достовірно вище, ніж у контрольній та 3-ї групах. Застосування НЧ GdVO<sub>4</sub> у щурів з патологією репродуктивної функції та метаболічними розладами, що індуковані неонатально, нормалізує статеву поведінку, відновлює фертильність та підвищує репродуктивний потенціал ефективніше за референтний препарат спеман.*

*Ключові слова: неонатальний стрес; фітоестрогени; наночастинок рідкоземельних металів; самці щурів; репродуктивний потенціал.*

## ВСТУП

Нині найбільш актуальною є проблема чоловічої гіпофертильності. За даними різних дослідників у 30-40 % випадків причиною подружнього непліддя є порушення статевої функції у чоловіка, з яких приблизно 30 % становить так зване ідіопатичне непліддя [1, 2]. Крім того, існує тенденція до пізнього

© І. О. Белкіна, Н. П. Смоленко, В. К. Клочков, Ю. В. Малюкін, Е. С. Чистякова, Н. О. Карпенко, Ю. І. Караченцев

входження у вік батьківства як жінками, так і чоловіками [3, 4], тобто «старіння» репродуктивної функції є додатковим негативним чинником гіпофертильності.

Для розвинених країн, де зростають темпи депопуляції [5], важливою є розробка препаратів, спроможних позитивно впливати на чоловічу репродуктивну функцію та підвищувати якість життя у пізньому зрілому

віку. Сучасна терапія зазвичай застосовує екзогенні гонадотропіни, антиестрогени, препарати тестостерону, вітаміни [6], що нерідко ускладнюється визначенням адекватної дози, протипоказаннями та побічними ефектами [7]. Існуючі терапевтичні засоби для лікування гіпофертильності мало ефективні, а сучасні допоміжні репродуктивні технології мають завищу ціну.

Це є підставою для пошуку нових напрямків створення препаратів для корекції розладів репродуктивної функції чоловіків. В останні десятиріччя накопичуються дані про роль інсуліну у фізіології репродуктивної системи [8, 9]. Останній за допомогою найвищих регуляторних механізмів (гонадотропний рилізінг-гормон та гонадотропні гормони) діє на стероїдо- й гаметогенез і впливає на плідність самців, посилюючи рухливість сперматозоїдів, збільшуючи продукування NO та підвищуючи чутливість акросомальної реакції до специфічних стимулів [10, 11].

З'являється все більше доказів, що такі стани, як цукровий діабет 1-го й 2-го типів, інсулінорезистентність можуть бути причетними до поширеності репродуктопатій у осіб репродуктивного та працездатного віку [12]. Цілком вірогідно, що використання інсуліноміметиків та інсулінсенситайзерів буде сприяти відновленню порушеної репродуктивної функції й плідності. У цьому сенсі увагу привертають ванадійовмісні сполуки, проте вони токсичні [13, 14] та мають слабку адсорбцію у шлунково-кишковому тракті. На відміну від загальноприйнятого у світі пошуку біологічно активних речовин у напрямку дослідження чотиривалентних солей та органічних ванадилів [15], перспективним є використання унікальних властивостей сполук ванадію у наноформі завдяки змінам біодоступності наноречовини. Раніше ми показали, що за умов тривалого надходження наночастинок ортованадату гадолінію (НЧ GdVO<sub>4</sub>) у старіючих самців стимулюється стероїдогенез (тестостерон) та сперматогенез на тлі гальмування розвитку вікової гіпер-

глікемії та зростання маси тіла [16].

Мета роботи – визначення ефективності НЧ GdVO<sub>4</sub> для коригування розладів чоловічої репродуктивної функції на моделі неонатально індукованої репродуктопатії.

## МЕТОДИКА

Експериментальні роботи з тваринами виконували відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, котрі використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [17]. Для дослідження ефективності НЧ GdVO<sub>4</sub> (20-40 нм) у новонароджених щурят було відтворено модель неонатальної патології введенням фітоестрогенів (ФЕ) на тлі емоційного стресу – 1-ша група [18]. Усього у досліді було задіяно 55 самців і 78 самиць щурів популяції Вістар з розплідника інституту.

Самці по досягненні 10-місячного віку протягом 70 діб натще отримували з кормом НЧ GdVO<sub>4</sub> у дозі 0,33 мг/кг (2-га група) та препарат порівняння спеман, який містить складну рослинну композицію (стимулює сперматогенез та призначається у випадках гіпофертильності чоловіків [19]) у дозі 158 мг таблеткової маси на 1 кг маси тіла (3-тя група) [20]. Об'єм розчину корегували щотижня з урахуванням змін маси тіла тварин. Інтактні тварини відповідного віку, які отримували розчинник (вода) у відповідному об'ємі, увійшли до контрольної групи.

Після формування у самців статевого досвіду у присмерковий час впродовж 15 хв досліджували статеву поведінку у парних тестах з рецептивною самицею після оваріектомії за часовими та кількісними показниками садок, інтромісії та еякуляцій. Розраховували тривалість постеякуляторного рефрактерного періоду.

Фертильність самців вивчали згідно з загальноприйнятою методикою [21] за



результатами парування з інтактними здоровими самицями. Розраховували індекси запліднення та вагітності; рівень загальних внутрішньоутробних втрат на 20-ту добу вагітності. Крім того, оцінювали репродуктивний потенціал самців за розрахунковим показником середньої реалізованої плідності (фертильності) самців ( $\Phi_i$ ) за рівнянням:

$$\Phi_i \pm S_{\Phi_i} = \frac{N_2 \times N_3 \times (N_4 \pm S_{N_4})}{N_1 \times N_1} = \frac{N_2 \times N_3 \times N_4}{N_1 \times N_1} \pm \frac{N_2 \times N_3 \times S_{N_4}}{N_1 \times N_1}$$

де:  $N_1$  – кількість самиць у групі;  $N_2$  – кількість запліднених самиць;  $N_3$  – кількість вагітних самиць;  $N_4$  – середня кількість плодів у самиці;  $S_{N_4}$  – помилка середнього арифметичного кількості плодів у самиці [22].

Щурів утримували у стандартних умовах віварію при природному освітленні, раціоні та питному режимі *ad libitum* [23]. По закінченні експерименту їх швидко декапітували. Самиць вводили в легкий тіопентал натрієвий наркоз, а самців не наркотизували для запобігання змін вмісту статевих гормонів.

Отримані результати відповідали закону нормального розподілу, тому наведені як середнє арифметичне та його похибка. Статистичну вірогідність відмінностей між групами оцінювали із застосуванням критеріїв *t* Стьюдента та  $\chi^2$ -квадрат за допомогою програми Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз показників статевої поведінки самців 1-ї групи виявив стимулювання ініціації парування, що виражалось у скороченні у 2 рази латентних періодів садок ( $54 \pm 16$  с щодо  $111 \pm 21$  с у контролі;  $P < 0,05$ ) та майже 2,5 рази інтромісії ( $55 \pm 16$  с щодо  $135 \pm 37$  с у контролі;  $P < 0,05$ ). Це означає, що у дослідних тварин стан статевого потягу (аналог лібідо у людини) був сильнішим, ніж у контролі, але досягти кінцевого елемента спарювальної поведінки – еякуляції, та розпочати другий

тур спарювання був спроможний лише один самець з восьми. Тобто навіть при швидкому початку спарювання дослідні тварини не встигали за час тесту провести повноцінний статевий акт, що свідчить про зростання латентності еякуляції.

Послаблення статевої активності у самців щурів 1-ї групи призводить до погіршення фертильності та плідності. Це виявилось у вірогідному зниженні частки запліднених інтактних самиць до 67 % порівняно з таким у контролі (91 %), хоча майже усі запліднені самиці цієї групи виявилися вагітними (93 відносно 100 % у контролі). На їх розтині зафіксовано вірогідне зменшення (на 21 %) загальної кількості плодів (таблиця) за рахунок зростання відсотка внутрішньоутробних втрат більш ніж в 2 рази порівняно з таким у контролі (рис. 1). Значення  $\Phi_i$  у самців 1-ї групи було нижче за контрольні у 2,6 рази ( $P < 0,05$ ; рис. 2). Отже, стресування та фітоестрогенізація щурят чоловічої статі у неонатальний період призводить до репродуктивних порушень у дорослому віці. Аномальні сперматозоїди порівняно з морфологічно нормальними статевими клітинами мають нижчу запліднювальну здатність. Це зумовлено як меншою їх здатністю до penetрації ооцитів, так і змінами в реакції гіперактивації, капацитації та акросомної реакції. У таких сперматозоїдах частіше рееструються аномалії хроматину, а інколи – збільшення рівня структурних хромосомних аберацій, що надалі може негативно впливати на наступний розвиток ембріонів або взагалі на настання вагітності після запліднення [24, 25].

Відомо, що лікування пацієнтів з так званою ідіопатичною гіпофертильністю, за якої неможливо встановити причини розладу, викликає особливу складність. Використана в експерименті модель неонатально індукованої гіпофертильності, на яку отримано патент [18], достатньо повно відтворює такий стан. Зокрема, у дорослих самців на тлі нормальної вікової концентрації статевих гормонів, показників спермограми, гормональної функ-

**Показники перебігу вагітності інтактних самок, запліднених самцями з неонатальною патологією, які отримували наночастинки ортованадату гадолінію ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ )**

Показник	Інтактні тварини (n=28)	Самці з неонатальною патологією (n=13)	Самці з неонатальною патологією, які отримували наночастинки ортованадату гадолінію (n=20)	Самці з неонатальною патологією, які отримували спеман (n=17)
Кількість плодів у приплоді (загальна)	9,0±0,4	7,2±0,8*	9,6±0,6**	8,8±0,8
самиць	4,1±0,4	3,3±0,4	4,8±0,6**	4,5±0,5
самців	4,9±0,3	3,9±0,6	4,9±0,6	4,4±0,5
Відношення самиць до самців	1,1±0,2	1,0±0,2	1,4±0,3	1,4±0,3
Маса плодів, г				
самиці	2,1±0,0	2,1±0,0	2,1±0,1	2,1±0,1
самці	2,3±0,0	2,2±0,0	2,2±0,2	2,4±0,1
Довжина плодів, мм				
самиці	30,2±0,3	30,8±0,4	29,9±0,3	29,9±0,3
самці	31,3±0,3	31,6±0,4	31,5±0,2	31,4±0,4
Ано-генітальна відстань у плодів, мм				
самиці	1,1±0,0	1,1±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
самці	2,9±0,0	2,9±0,0	3,0±0,0	2,9±0,1

\* P<0,05 відносно контролю, \*\* P<0,05 відносно групи тварин з неонатальною патологією; n – кількість приплодів

ції кори надниркових та щитоподібної залоз реєстрували погіршення запліднювальної здатності; більший рівень загибелі зародків у вагітних самиць, запліднених цими самця-

ми; зниження Фі самців на 69,2 % [26]. Крім того, вони відрізняються від інтактних тварин більшою масою тіла (майже на 20 %), що збігається з підвищеним вмістом глюкози натще

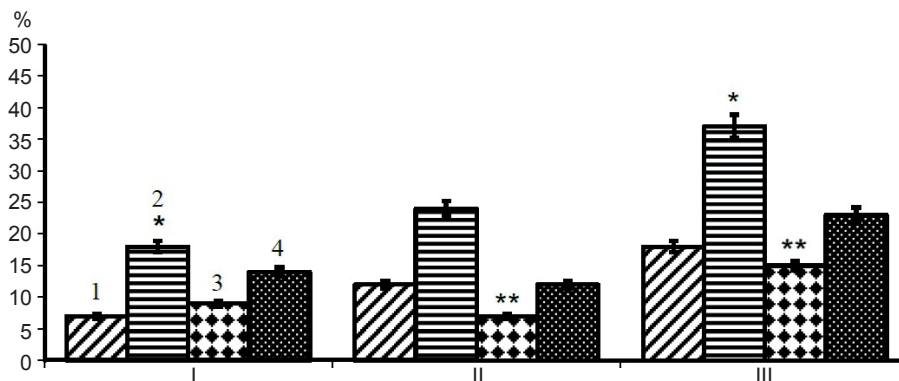


Рис. 1. Внутрішньоутробна загибель плодів самиць, запліднених самцями з неонатальною патологією, які отримували наночастинки ортованадату гадолінію: I – преімплантаційна; II – постімплантаційна; III – загальна; 1 – інтактні тварини; 2 – самці з неонатальною патологією; 3 – самці з неонатальною патологією, які отримували наночастинки ортованадату гадолінію; 4 – самці з неонатальною патологією, які отримували спеман.

\* P<0,05 відносно контролю; \*\* P<0,05 відносно значень у самців з неонатальною патологією

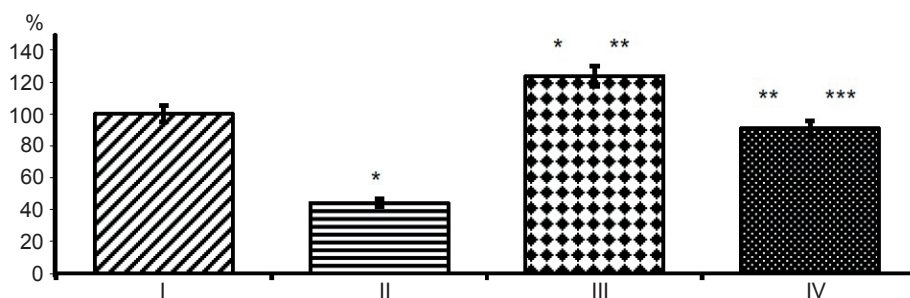


Рис. 2. Зміна інтегрального показника плідності самців з неонатальною патологією, які отримували наночастинок ортованадату гадолінію (за 100 % прийнято значення контрольної групи): I – інтактні тварини, II – самці з неонатальною патологією, III – самці з неонатальною патологією, які отримували наночастинок ортованадату гадолінію, IV – самці з неонатальною патологією, які отримували сперман. \*  $P < 0,05$  відносно контролю, \*\*  $P < 0,05$  відносно значень самців з неонатальною патологією, \*\*\*  $P < 0,05$  відносно значень самців з неонатальною патологією, які отримували наночастинок ортованадату гадолінію

(до  $6,1 \pm 0,1$  щодо  $4,7 \pm 0,3$  ммоль/л у контролі) та концентрації тригліцеридів та загального холестерину [18]. Тому вибір такої патогенетичної моделі є обґрунтованим, як такої, що поєднує метаболічні порушення та репродуктивну патологію. Можна стверджувати, що ця модель пояснює розвиток частини випадків ідіопатичної гіпофертильності у чоловіків.

Призначення НЧ  $GdVO_4$  тваринам 2-ї групи вже на 56-ту добу призвело до збільшення кількості елементів залицяльної поведінки (у 2,2 рази;  $P < 0,05$ ) та відсотка тварин (до 37,5 %), що спроможні до еякуляції. Ініціація спарювання (латентність садок та інтромісії) й час настання еякуляції у цих самців були подібні до таких у інтактних тварин. Слід зазначити, що надання тваринам НЧ  $GdVO_4$  наближує статевий потяг та ініціацію спарювання до показників інтактних тварин, а також сприяє ефективності спарювання (збільшення відсотка тварин з еякуляцією). Треба акцентувати, що зміни статевої поведінки у такому напрямку спостерігалися вже на 26-ту добу. Ефект препарату порівняння сперману, який давали тваринам 3-ї групи, був подібним до того, що спостерігали при введенні шурам НЧ  $GdVO_4$ , тобто статистично значущих розбіжностей між групами не виявлено.

Такі ж позитивні зміни спостерігалися й у показниках фертильності та плідності. Так, у самців 2-ї групи частка запліднених ними

інтактних самиць вірогідно зросла до 95 %, що було вище, ніж у дослідних тварин без корекції (67 %), і свідчить про покращення статевої активності та якості сперматозоїдів після вживання сполуки. Ефект сперману (3-тя група) був слабкішим: частка запліднених самиць дорівнювала 86 %, що не відрізнялося від результату 1-ї групи ( $P = 0,16$ ).

Майже усі запліднені самиці виявилися вагітними (95 та 92 % у 2-й та 3-й групах відповідно). Кількість плодів на самицю у 2-й групі збільшилася на 25 % ( $P < 0,05$ ), а у 3-й групі – на 22 % ( $P > 0,05$ ) порівняно зі значеннями без корекції (див. таблицю). Такі зміни пояснюються зниженням рівня загальних внутрішньоутробних втрат з 37 % у групі без корекції до 15 % у 2-й групі ( $P < 0,05$ ) та до 23 % ( $P > 0,05$ ) – у 3-й групі (див. рис. 1).

Загалом, і це є найголовнішим, ці зміни призвели до статистично значущого зростання  $\Phi_i$  у тварин 2-ї групи – майже у 3 рази порівняно зі значенням 1-ї групи (див. рис. 2). У 3-ї групі цей показник також зріс у 1,5 рази, але різниця з тваринами, що не отримували лікування, не набувала статистичної значущості.

Згідно з нашими попередніми дослідженнями, споживання НЧ  $GdVO_4$  старими самцями шуриків призвело до збільшення концентрації тестостерону, активації сперматогенезу, збільшення антиоксидантної активності зрілих сперматозоїдів, зменшення індукованої

хемілюмінесценції суспензії епідидимальних сперматозоїдів у реакції Фентона [16]. Цілком можливо, що аналогічні зміни покращення якості статевих клітин відбувалися у самців щурів з неонатально індукованою патологією, що призвело до зменшення утворення аномальних зародків.

Таким чином, застосування оксидів рідкісноземельних металів (а саме  $GdVO_4$ ) у вигляді наночастинок у самців щурів з неонатально індукованими розладами репродуктивної функції призводить до збільшення майже в 3 рази відсотка тварин, які за час тесту досягли еякуляції, до зростання на 30 % кількості запліднених самиць та сприяє їх плодючості. За своєю ефективністю, яку ми оцінювали за інтегральним показником  $Fi$ , досліджувана речовина перевищує референтний препарат спеман.

**И.О. Белкина<sup>1</sup>, Н.П. Смоленко<sup>1</sup>, В.К. Клочков<sup>2</sup>,  
Ю.В. Малюкин<sup>2</sup>, Э.Е. Чистякова<sup>1</sup>,  
Н.А. Карпенко<sup>1</sup>, Ю.И. Караченцев<sup>1</sup>**

#### **ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ОРТОВАНДАТА ГАДОЛИНИЯ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НЕОНАТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕПРОДУКТОПАТИИ У САМЦОВ КРЫС**

Цель работы – определение эффективности наночастиц ортованадата гадолия ( $NP\ GdVO_4$ ) для коррекции расстройств мужской репродуктивной функции на модели неонатально индуцированной репродуктопатии. Потомки интактных крыс-родителей с 3-го по 22-й день жизни на фоне эмоционального стресса («Maternal separation stress») получали избыточное количество смеси фитоэстрогенов с молоком матери (1-я группа). В возрасте 10 мес самцам в течение 70 сут с кормом давали  $NP\ GdVO_4$  в дозе 0,33 мг/кг (2-я группа) или референтный препарат спеман в дозе 158 мг таблеточной массы на 1 кг массы тела (3-я группа). Исследовали половое поведение и фертильность самцов, рассчитывали интегральный показатель репродуктивного потенциала  $Fi$  в сравнении со значениями контрольной группы (вода). В 1-й группе половое поведение самцов характеризовалось ускорением половых реакций на самку (двукратное укорочение латентности садок и интромиссий) и сниженной способностью к завершению копуляций эякуляцией и началу второго тура спариваний. Самцы этой группы оплодотворяли меньше самок (67 против 91 % в контрольной группе), которые почти все забеременели. Не-

онатально индуцированное ухудшение качества половых клеток обусловило более, чем двукратное увеличение внутриутробных потерь у беременных и уменьшение общего количества плодов у самки (на 21 %). Это определило уменьшение  $Fi$  самцов в 2,6 раза по сравнению с контролем. Применение  $NP\ GdVO_4$  восстановило показатели полового поведения самцов до уровня контрольной группы, что обусловило увеличение количества оплодотворенных самок (до 95 %). У беременных самок на фоне уменьшения уровня внутриутробных потерь (до 15,2 против 18,1 % в контроле) на 25 % увеличилось количество плодов, что свидетельствует об улучшении качества сперматозоидов. Показатель  $Fi$  увеличился до  $8,3 \pm 0,5$  против  $3,0 \pm 0,3$  ед. в группе без коррекции, что статистически достоверно выше, чем в контрольной и 3-й группах. Применение  $NP\ GdVO_4$  у крыс с патологией репродуктивной функции и метаболическими нарушениями, индуцированными неонатально, нормализует половое поведение, восстанавливает фертильность и повышает репродуктивный потенциал эффективнее, чем референтный препарат спеман.

Ключевые слова: неонатальный стресс; фитоэстрогены; наночастицы редкоземельных металлов; самцы крыс; репродуктивный потенциал.

**I. O. Belkina<sup>1</sup>, N. P. Smolenko<sup>1</sup>, V. K. Klochkov<sup>2</sup>,  
Yu. V. Malukin<sup>2</sup>, E. E. Chistyakova<sup>1</sup>,  
N. A. Karpenko<sup>1</sup>, Yu. I. Karachentsev<sup>1</sup>**

#### **THE EFFECT OF GADOLINIUM ORTHOVANADATE NANOPARTICLES BY NEONATAL INDUCED REPRODUCTIVE DISEASE IN MALE RATS**

For the purpose to develop of method for treatment of male hypofertility the efficiency of gadolinium orthovanadate nanoparticles ( $NP\ GdVO_4$ ) in rats with neonatal induced reproductive disease, has been investigated. The progeny of intact rats parents were exposed to emotional stress («Maternal separation stress») and received an excessive amount of the blend of phytoestrogens (Ph) with mother's milk (1st group) from 3 to 22 day life. At the age of 10 months males received  $NP\ GdVO_4$  (0.33 mg/kg; 2nd group) or speman (158 mg/kg; 3rd group) with feed over the 70 days. Sexual behavior and fertility of males were investigated; the integrated indicator of reproductive potential ( $Fi$ ) was calculate and was estimated with the data of animals from group Control who were given vehicle (water). In the 1st group sexual behavior of males was characterized by accelerating sexual responses on female (double shortening of mounting and intromission latency) and a reduced ability to achieve ejaculation and to start the second round of copulations. The less females have been inseminated by these males (67% vs. 91% in Control group), but almost all became pregnant. As a result of the neonatal induction deterioration in the quality of male gametes intrauterine pregnancy loss increased more than twice, and the total number of foetus decreased (on 21%). These changes have led to a



reduction of the male integrated indicator of reproductive potential (Fi) in 2.6 times compared with control animals. Using a NP GdVO<sub>4</sub> rehabilitated male sexual behaviour indicators to Control group level, resulting in an increase in the number of fertilized females (up to 95%). In pregnant females decreased fetal losses (up to 15.2% vs. 18.1% in control, p<0,05) and increase in the number of fetuses (on 25%, p<0,05) that shows an improvement in the quality of sperm. The integrated indicator of reproductive potential (Fi) increased to (8.3 ± 0.5) vs. (3.0 ± 0.3) u. in the 1st group (without treatment), that statistically higher than in groups Control and 3rd. Application of NP GdVO<sub>4</sub> in rats with neonatal inductive pathology of the reproductive function and metabolic disorders normalizes sexual behaviour, the quality of sperm that restores male fertility and improves reproductive potential much more efficiently than the reference drug speman.

Key words: neonatal stress, phytoestrogens, rear-earth-based nanoparticles, male rats, reproductive potential.

<sup>1</sup>SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of NAMS of Ukraine», Kharkov;

<sup>2</sup>Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine, Kharkov; e-mail: chistelina@i.ua

## REFERENCES

1. Gorpynchenko I, Nikitin O. Marriages infertility. New reality. *Man Health*. 2010; (3):184-90. [Russian].
2. Yatskiv O, Tamovska A. Causes and forms of male infertility and methods of diagnosis ejaculate, as the main indicator of male health. *Visn Lviv Univ Ser Biol*. 2012; 60:4-20. [Ukrainian].
3. Social Medicine and Health Organization. Voronenko YuV, Moskalenko VF, editor. Ternopil: Ukrmedkniga: 2000. [Ukrainian].
4. The health status of Ukraine's population and the results of the health. Kiev: 2003. [Ukrainian].
5. Eberhardt P. Distribution and dynamics of rural population in Central Eastern Europe in the 20th century. *Geogr Pol*. 1994. (63):75-94.
6. Tiktinskiy OL, Mihaylichenko VV, *Andrology*. Sankt-Peterburg: Mediapress: 1999. [Russian].
7. Kulakov VI. Infertile marriage. Current approaches to diagnosis and treatment. Eds VI Kulakov. Moscow: GAOTAP-Media: 2005. [Russian].
8. Baccetti B, LaMarca A, Piomboni P, et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod*. 2002;17:2673-7.
9. Shrivastav P, Swann J, Jeremy JY, Thompson C, Shaw RW, Dandona P. Sperm function and structure and seminal plasma prostanoid concentrations in men with IDDM. *Diabetes Care*. 1989;12:742-4.
10. Schoeller EL, Schon S, Moley KHM. The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis. *Cell Tissue Res*. 2012;349(3):839-47.
11. Lampiao F, Du Plessis SS. Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide

- production. *Asian J Androl*. 2008;10:799-07.
12. Luchitskij YeV, Tronko ND. Androgen deficiency states in men with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: pathogenetic role and the possibility of correcting. In: Luchitskij YeV, Bondarenko VA, editor. *Selected lectures on clinical andrology*. Kiev, Harkiv: Nova Soft: 2010. p. 115-43. [Ukrainian].
13. Domingo JL. Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents: a review of their toxic effects. *Biol Trace Elem Res*. 2002;88(2):97-112.
14. Morgan AM, El-Tawil OS. Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. *Pharmacol Res*. 2003; 47(1):75-85.
15. Crebelli R, Leopardi P. Long-term risks of metal contaminants in drinking water: a critical appraisal of guideline values for arsenic and vanadium. *Ann Ist Super Sanita*. 2012;48(4):354-61.
16. Karpenko NA, Malukin YV, Koreneva EM, Klochkov VK, Kavok NS, Smolenko NP, Pochernyaeva SS. The Effects of Chronic Intake of Cerium Dioxide or Gadolinium Ortovanadate Nanoparticles in Aging Male Rats: 3-rd Proceedings of the international conference nanomaterials «Applications and properties»; 2013; Sept. 16-21; Alushta the Crimea, Ukraine. p. 04NABM28-1 – 04NABM28-4.
17. Reznikov AG. General ethical principles of animal experimentation. *Endocrinology*. 2003; 8(1):142-5. [Ukrainian].
18. Karpenko N, Chistyakova E, Korenyeva Ye. Velichko N. Method simulation induced neonatal males hypofertility. Ukraine patent US 95758. 2015.
19. Kuzmenko VV, Alferov KV. Our experience with Speman drug: Proceedings of Scientific Conference «Men's Health»; 2003; Novem. 19-21; Moscow. p. 16. [Russian].
20. Ribolovlyev YuR. Prediction of xenobiotics on human action. *Pharmacol Toxicol*. 1991; (1): P. 110-4. [Russian].
21. Bishovets TF. Experimental study embryotoxic action of drugs guidance: methodical recommendations. In: OV Stefanov, editor. *Preclinical studies of drugs*. Kiev: Avitsena: 2001. p. 115-38. [Ukrainian].
22. Karpenko NO, Talko VV, Omelchuk ST, Lapta SS. Integral assessment of the reproductive function of male laboratory animals. *Ukr Biopharm Zh*. 2011; 13(2): 64-8. [Ukrainian].
23. Zapadnyuk IP. *Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in experiments*. Kiev: Vischa Skola: 1983. [Russian].
24. Ingel FN, Gevorkyan NM, Ilyushina NA., Long psychomotor stress as an inducer of mutations in mammals and modifier mutagenesis. *Bull Experim Biol Med*. 1993; 116 (9):307-9. [Russian].
25. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004; (82):378-83.
26. Karpenko NO, Smolenko NP, Korenyeva YeM, Chistyakova EYe, Velichko NF. Dynamics and spoluchenist age involution of some components of male reproductive function. *Probl Endocrin Patol*. 2014; (1):49-54. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов до редакції 18.12.2015.*



# Особливості аргіназного шляху метаболізму L-аргініну в сперматозоїдах чоловіків при різних формах патоспермії

Р.В. Фафула, О.К. Онуфрович, У.П. Єфремова, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького;  
e-mail: roman\_fafula@ukr.net

*При різних формах патоспермії у чоловіків досліджували зміни активності аргінази сперматозоїдів та гормональний профіль периферичної крові. Встановлено, що активність аргінази в сперматозоїдах чоловіків з олігозоо-, астенозоо-, олігоастенозоо- та лейкоцитоспермією знижується в 2,1, 2,3, 2,4 і 3,3 раза відповідно. Це вказує на пригнічення аргіназного шляху метаболізму L-аргініну, яке суттєво не залежить від типу порушення сперматогенезу. Проте зниження активності аргінази має найбільш виражений характер у пацієнтів з лейкоцитоспермією, адже лейкоцити стимулюють утворення реактивних форм кисню, індукцію та розвиток оксидативного та нітразивного стресу в сперматозоїдах. Пригнічення аргіназного шляху метаболізму L-аргініну має пристосувальне значення, яке полягає в обмеженні його біодоступності та запобіганні надлишкового утворення NO у цитотоксичних для сперматозоїдів концентраціях. Відзначено також зміщення сироваткового вмісту гонадотропних і статевих гормонів у чоловіків з різними формами патоспермії. Так, зокрема вміст фолікулостимулюючого гормону при олігозооспермії, спричиненій гіпогонадізмом вищий вдвічі, а у разі лейкоцитоспермії в 1,8 раза щодо значень у фертильних чоловіків. Водночас за умов астенозооспермії цей показник нижчий в 2,2 раза стосовно значень у чоловіків з нормозооспермією, проте знаходиться в межах фізіологічної норми. Вміст тестостерону нижчий в 1,6 раза у чоловіків з порушенням сперматогенезу за типом олігозооспермії і знаходиться на нижній межі фізіологічної норми. Встановлено, що у неплідних чоловіків з порушенням сперматогенезу за типом олігозооспермії пригнічення активності аргінази сперматозоїдів позитивно корелює зі зниженням їх концентрації в еякуляті ( $r = 0,68$ ).*

*Ключові слова: аргіназа; оксид азоту; неплідність у чоловіків.*

## ВСТУП

Непліддя є важливою соціально-демографічною та медико-біологічною проблемою не тільки для України, а й для більшості розвинутих країн, його частка за різними даними сягає до 35-50 %. Серед причин цієї патології вагоме місце займають порушення сперматогенезу [1]. Одним з ключових патогенетичних ланок розвитку непліддя у чоловіків є порушення функціонування NO-сигнальної системи [2]. Оксид азоту (NO) – молекула, якій властива висока реакційна здатність та широкий спектр біорегуляторних ефектів у різних органах, зокрема і в чоловічій ста-

тевій системі. Ензиматичне утворення NO здійснюється за участю NO-синтаз (NOS), які експресуються у різних клітинах статевої системи чоловіків [3]. Швидкість продукції NO значною мірою залежить від біодоступності L-аргініну, який виступає субстратом для NOS.

Аргіназа (EC 3.5.3.1) – металоензим циклу сечовини, який каталізує гідроліз L-аргініну до сечовини та орнітину, конкуруючи за спільний субстрат із NOS та впливаючи на її активність. Співвідношення між різними шляхами метаболізму L-аргініну (NO-синтазним (окисним) та аргіназним (неокисним)) підтримує фізіологічний пул цієї

© Р.В.Фафула, О.К.Онуфрович, У.П.Єфремова, Д.З.Воробець, З.Д. Воробець

амінокислоти у клітинах та детермінує інтенсивність продукції NO та його метаболітів [4]. Відомо, що ензим представлений у двох ізоформах: аргіназа I – ензим цитозольної локалізації, який найбільш інтенсивно експресується у клітинах печінки і, головним чином, задіяний в утворенні сечовини, аргіназа II – ензим мітохондріальної локалізації, який ідентифіковано в різних типах клітин. Вона бере участь в біосинтезі поліамінів, орнітину, проліну, глутамату та в прозапальних процесах [5]. Таким чином, аргіназа відіграє важливу роль у регуляції клітинного синтезу NO і модифікує його біологічні ефекти [6]. У свавців аргіназу ідентифіковано в клітинах простати, сім'яників, у сім'яній рідині та сперматозоїдах.

У науковій літературі можна зустріти поодинокі дані щодо активності аргінази в сперматозоїдах чоловіків з непліддям, проте ці дані є вкрай суперечливими [7]. Вивчення активності аргінази в патогенезі порушень репродуктивної функції чоловіків є перспективним, оскільки з'ясування нових відомостей дасть можливість удосконалити діагностику і сприятиме розробленню правильної тактики й оптимальних схем обґрунтованого лікування.

Метою нашої роботи було дослідити активність аргінази в сперматозоїдах неплідних чоловіків з різними порушеннями спермогенезу та встановити кореляційний зв'язок між активністю аргінази і гормональним профілем периферичної крові.

## МЕТОДИКА

Проаналізовано дані 72 чоловіків, що проходили первинне обстеження у зв'язку з непліддям у консультативній поліклініці Львівської обласної клінічної лікарні з січня 2014 по квітень 2016 р. Середній вік пацієнтів становив  $26,2 \pm 4,2$  років. Критерії включення: вік 21-39 років, неплідність у шлюбі 1-10 років, чоловічий фактор неплідності, за умов олігозооспермії або терато- і/або астенозоо-

спермії. Критерії виключення: неплідність у шлюбі понад 10 років, азооспермія, надмірне вживання алкоголю та вплив будь-яких шкідливих фізико-хімічних чинників під час діагностично-лікувальних заходів.

Усіх пацієнтів було розділено на 4 групи. За показниками спермограм олігозооспермія була виявлена у 12 пацієнтів (16,7 %), які увійшли в 1-шу групу, астенозооспермія у 17 пацієнтів (23,6 %), що склали 2-гу групу, олігоастеноспермія у 10 пацієнтів (13,9 %), які увійшли в 3-тю групу. У 39 (54,2 %) обстежуваних неплідних чоловіків вміст лейкоцитів у спермі становив  $<1,0 \cdot 10^6$  /мл, лише у 33 (45,8 %) пацієнтів відзначалася лейкоцитоспермія, тобто вміст лейкоцитів коливався від  $1,0 \cdot 10^6$  до  $3,0 \cdot 10^6$  /мл, що свідчило про наявність запального процесу у цього відсотка чоловіків. Вони склали 4-ту групу. До контрольної групи увійшло 20 соматично здорових чоловіків віком від 22 до 39 років зі збереженою фертильністю й нормозооспермією та підтвердженим батьківством (перебувають у шлюбі протягом 3-10 років і мають 1-3 здорових дітей).

Матеріалом для дослідження були зразки сім'яної рідини, яку отримували мастурбацією після статевої абстиненції 3-5 днів. Показники спермограм (концентрація сперматозоїдів, їх рухливість, морфологія та відсоток живих форм) оцінювали за допомогою світлооптичної мікроскопії, згідно з директивами щодо їх проведення (ВООЗ, 2010) [8]. Матеріал отримували відповідно до передбачених заходів, спрямованих на забезпечення задовільних умов збереження здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм. Умови відбору дослідних зразків відповідали вимогам принципів Гельсінської декларації охорони прав людини, конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та положенням відповідних законів України.

Сперматозоїди чоловіків відмивали від плазми еякуляту 3-разовим центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв у середо-

вищі, яке містило (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 30, Нерес (рН 7,4) – 30. Вміст загального протеїну в пробах визначали методом Лоурі з використанням набору виробництва НВФ “Simko Ltd” (Україна). Активність аргінази визначали на пермеабілізованих сперматозоїдах. Для цього до їх суспензії додавали детергент сапонін у кінцевій концентрації 0,5 %. Аргіназну активність обчислювали за утворенням сечовини, вміст якої визначали спектрофотометрично за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (НВФ “Simko Ltd”). Середовище інкубації (об’єм 0,5 мл) для визначення аргіназної активності містило (ммоль/л): L-аргінін – 100, MnCl<sub>2</sub> – 2, тріс-НCl (рН 9,5) – 20. Кількість протеїну в пробі не перевищувала 50-100 мкг. Тривалість інкубації при 37 °С становила 90 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням до середовища інкубації аліквоти пермеабілізованих сперматозоїдів, а зупиняли – додаванням 1 мл 50%-го розчину трихлороцтової кислоти. Після центрифугування в надосадовій суміші визначали вміст сечовини. У контрольні зразки замість суспензії клітин вносили відповідну аліквоту фізрозчину. Крім дослідних і контрольних проб готували також пробу, яка містить стандартний розчин сечовини (16,65

ммоль/л). Гормональний профіль сироватки периферичної крові чоловіків (вміст гонадотропних та статевих гормонів) визначали методом імуноферментного аналізу.

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення *MS Office*. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами двох вибірок використовували критерій *t* Стьюдента для незалежних вибірок. Вірогідними вважали результати за умови  $P < 0,05$ . Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна похибка середнього. Кількість дослідів (*n*) відповідає кількості зразків, досліджених у кожному випадку (кожен раз використовували сперматозоїди від одного пацієнта або здорового донора).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У табл. 1 наведено результати основних морфофункціональних характеристик еякуляту інфертильних чоловіків з різними формами патоспермії. Відмічаються статистично вірогідні відхилення за основними показниками спермограм у всіх досліджуваних групах. Найбільш виражені зміни спостерігаються у значенні концентрації лейкоцитів в еякуляті інфертильних чоловіків (4-та група), проте

Таблиця 1. Основні морфофункціональні характеристики еякуляту інфертильних чоловіків з різними формами патоспермії

Досліджувані показники еякулятів	Нормозооспермія	Інфертильні чоловіки			
		олігозооспермія	астенозооспермія	олігоастенозооспермія	лейкоциспермія
Концентрація сперматозоїдів, 10 <sup>6</sup> мл <sup>-1</sup>	50,0 $\pm$ 6,40	11,95 $\pm$ 2,35 ***	44,30 $\pm$ 5,35	9,95 $\pm$ 1,65 ***	46,40 $\pm$ 6,20
Відносна кількість рухливих сперматозоїдів, %	52,86 $\pm$ 3,22	42,33 $\pm$ 4,95	24,05 $\pm$ 5,35 ***	26,05 $\pm$ 4,25 ***	42,34 $\pm$ 3,24
Кількість патологічних форм, %	32,8 $\pm$ 2,8	39,72 $\pm$ 3,2	45,5 $\pm$ 5,2 *	42,7 $\pm$ 3,2	42,4 $\pm$ 3,6
Концентрація лейкоцитів в еякуляті, 10 <sup>6</sup> мл <sup>-1</sup>	0,28 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,08	0,44 $\pm$ 0,09	1,56 $\pm$ 0,25 ***

Примітка: тут і в табл. 2: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  відносно контрольної групи (нормозооспермія).

інші показники спермограми знаходяться в межах фізіологічної норми.

Слід відмітити, що активність аргінази в сперматозоїдах неплідних чоловіків з олігозооспермією в 2,1 раза нижча ( $P < 0,001$ ), ніж при нормозооспермії (рис. 1). У чоловіків з порушеним сперматогенезом за типом астенозооспермії активність аргінази вірогідно нижча в 2,3 раза порівняно з контролем. У разі поєднаної патології (олігоастенозооспермія) аргіназна активність сперматозоїдів є дещо нижчою, ніж при ізольованих порушеннях та в 2,4 раза ( $P < 0,001$ ) нижча, ніж у фертильних чоловіків.

За наявності лейкоцитоспермії цей показник був нижчим в 3,3 раза ( $P < 0,001$ ) щодо значень у фертильних чоловіків. Загальновідомо, що лейкоцити є маркерами запалення та/або наявності інфекції. Вони негативно впливають на сперматозоїди, стимулюють утворення реактивних форм кисню, індукцію та розвиток оксидативного стресу, у такий спосіб пригнічуючи рухливість і функціональну активність сперматозоїдів [9]. Активні форми кисню, які продукуються лейкоцитами, можуть викликати пошкодження ДНК сперматозоїдів [10].

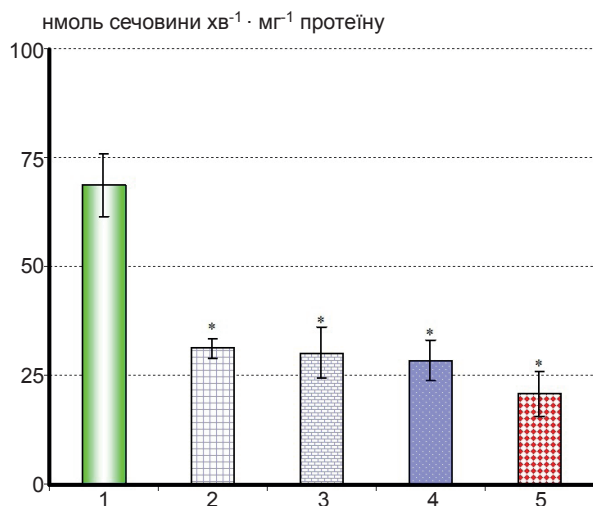


Рис. 1. Аргіназна активність сперматозоїдів чоловіків з різними формами патоспермії: 1 - нормозооспермія (контроль), 2 - олігозооспермія, 3 - астенозооспермія, 4 - олігоастенозооспермія, 5 - лейкоцитоспермія. \* $P < 0,001$  щодо контролю

Функціональна активність аргінази має важливе клінічне значення. Конкуруючи з NOS за спільний субстрат, яким є L-аргінін, аргіназа знижує біодоступність останнього та регулює утворення NO. Залежно від концентрації та умов утворення, останній і його вільнорадикальні похідні проявляють регуляторні або цитотоксичні ефекти. Низькі концентрації NO підвищують рухливість сперматозоїдів, а його надлишок призводить до порушення сперматогенезу. Показано, що L-аргінін збільшує рухливість сперматозоїдів пацієнтів з астенозооспермією, а аргіназа відіграє важливу роль у забезпеченні рухливості сперматозоїдів і запобіганні передчасної акросомної реакції [11].

Відомо, що внутрішньоклітинна локалізація аргіназ визначає різні шляхи метаболізму L-аргініну. Колокалізація цитозольної аргінази I та орнітиндекарбоксилази спрямовує перетворення орнітину на синтез поліамінів, тоді як мітохондріальна аргіназа II та орнітиамінотрансфераза зумовлюють утворення проліну та L-глутамату. Власне, аргіназа II функціонально пов'язана з утворенням поліамінів у позапечінкових тканинах. Поліаміни є органічними полікатионними сполуками, які відіграють важливу роль у процесах реплікації та диференціації клітин, регулюванні продукції NO в клітинах та транспортуванні  $Ca^{2+}$ . Окрім того, вони проявляють антирадикальні властивості та відіграють протекторну роль запобігаючи пероксидації ліпідів і сприяють антиоксидантному захисту [12].

У науковій літературі відомості щодо активності (експресії) аргінази в сперматозоїдах чоловіків є обмеженими. Отримані нами середні значення активності аргінази в сперматозоїдах чоловіків з нормозооспермією є дещо вищими порівняно з літературними даними [13]. Наші результати, в яких показано пригнічення активності аргінази в сперматозоїдах інфертильних чоловіків з різними формами патоспермії, узгоджуються з даними інших авторів. Зокрема відомо, що цей показник у фертильних чоловіків є істот-

но вищим, ніж у неплодних з астенозооспермією [7]. Також активність аргінази сім'яної плазми є вищою в здорових чоловіків, ніж у пацієнтів з астенозооспермією. Введення хворим з астенозооспермією добавок цинку в раціон призводить до нормалізації показників спермограм та статистично вірогідного відновлення активності аргінази сперматозоїдів та сім'яної плазми до контрольних значень. У роботі Eskiosak та співавт. [14] показано, що активність аргінази сім'яної плазми здорових чоловіків є істотно нижчою за умов психологічного стресу, ніж протягом нестресового періоду. Встановлено наявність позитивного кореляційного зв'язку між активністю аргінази і концентрацією сперматозоїдів, активністю аргінази й індексом рухливості сперматозоїдів. Аналогічні залежності між активністю аргінази сім'яної плазми та концентрацією і рухливістю сперматозоїдів виявлено у баранів і биків [15, 16].

Слід зауважити, що отримані нами результати суперечать даним дослідників, які виявили, що аргіназна активність сперматозоїдів неплодних чоловіків з олігозооспермією є суттєво вищою, ніж у здорових донорів [13]. Водночас, ними не виявлено статистично достовірної різниці в активності аргінази сім'яної плазми неплодних чоловіків з олігозооспермією та здорових донорів. Проте також показано наявність позитивного кореляційного зв'язку між активністю аргінази (як в сперматозоїдах, так і в сім'яній плазмі) і рухливістю сперматозоїдів і негативного кореляційного зв'язку між активністю аргінази та концентрацією сперматозоїдів. Застосовуючи сучасні протеомічні технології та методи біоінформатики встановлено [17], що експресія протеїну мітохондріальної аргінази II характерна лише для сперматозоїдів неплодних чоловіків з одностороннім варикоцеле, а у фертильних чоловіків її не ідентифіковано.

Зростання аргіназної активності у чоловіків з олігозооспермією може мати пристосувальне значення, яке полягає в обмеженні біодоступності *L*-аргініну, який є субстратом для

надсинтезу NO за участю NOS. Гіперпродукцією NO виявлено [18] при запальних захворюваннях урогенітального тракту, яку пов'язують з патоспермією через прямі токсичні ефекти NO та стимуляцію перикисного окиснення ліпідів. Проте слід зауважити, що взаємозв'язок активності (експресії) аргінази та NOS є значно складнішим, ніж просто конкуренція за спільний субстрат [19]. В умовах фізіологічної норми афіність ізоформ NOS до *L*-аргініну (2-20 мкмоль/л) є на три порядки вищою, ніж для аргінази (2-20 ммоль/л), тому за нормальних умов ці ензими не можуть конкурувати за спільний субстрат. Окрім того, біодоступність *L*-аргініну регулюється також його синтезом *de novo* та функціонуванням транспортувальних систем цієї амінокислоти. Пригнічення активності аргінази, на нашу думку, може бути пов'язано з інгібуванням ензиму нітритами – кінцевими стабільними продуктами метаболізму NO. Показано наявність негативного кореляційного зв'язку між концентрацією NO та активністю аргінази в сім'яній плазмі за умов психологічного стресу, причому протягом нестресового періоду цей зв'язок не простежується [14].

Одним з патогенетичних механізмів чоловічого неплоддя є порушення гормональної регуляції сперматогенезу, в якому ключову роль відіграють чоловічі статеві гормони андрогени. Взаємодіючи із специфічними андрогенними рецепторами, вони визначають розвиток чоловічих статевих ознак, активують та підтримують сперматогенез. Етіологію різних форм патоспермії пов'язують з гормональними порушеннями [20]. Встановлено, що андрогени регулюють експресію аргінази та аргінін- і орнітинметаболізуючих ензимів [21]. Здатність андрогенів до регулювання експресії аргінази I та аргінази II продемонстровано в гормончутливих клітинних лініях простати у чоловіків з раком простати [22].

У табл. 2 наведено результати гормонального профілю крові інфертильних чоловіків з різними формами патоспермії.



Таблиця 2. Гормональний профіль крові інфертильних чоловіків з різними формами патоспермії

Гормони	Нормо-зооспермія	Інфертильні чоловіки			
		олігозооспермія	астенозооспермія	олігоастенозооспермія	лейкоцитоспермія
Фолікулостимулюючий гормон, МО/мл	6,8±0,8	13,8±2,3 **	3,1±0,4 **	6,6±1,2	10,2±1,6 *
Лютеїнізуючий гормон, МО/л	5,2±2,2	7,2±1,1	2,8±0,5	7,1±0,9	8,4±1,5
Тестостерон, нмоль/л	16,8±2,1	10,7±1,1 *	15,2±1,2	12,6±1,6	12,4±1,6
Естрадіол, пг/мл	23,8±7,2	40,8±8,8	31,8±7,7	38,2±7,0	43,2±9,2
Пролактин, нг/мл	12,4±2,2	10,8±4,2	12,8±4,3	12,4±5,2	13,2±3,6

При вивченні гормонального профілю сироватки периферичної крові у чоловіків з різними формами патоспермії відзначено зміщення вмісту гонадотропних і статевих гормонів. Найбільш виражені вірогідні зміни спостерігаються у вмісті фолікулостимулюючого гормону та тестостерону. Так, вміст фолікулостимулюючого гормону в чоловіків з олігозооспермією, спричиненою гіпогонадизмом, у середньому в 2 рази, а з лейкоцитоспермією в 1,8 рази вищий, ніж у фертильних чоловіків. У разі астенозооспермії цей показник нижчий в 2,2 рази щодо значень при нормозооспермії і знаходиться в межах фізіологічної норми. Вміст тестостерону нижчий в 1,6 рази у чоловіків з порушенням сперматогенезу за типом олігозооспермії і знаходиться на нижній межі фізіологічної норми. Концентрація лютеїнізуючого гормону, естрадіолу та пролактину у неплідних чоловіків з різними формами патоспермії статистично вірогідно не відрізняється від контролю. Слід зазначити, що вміст естрадіолу вищий у неплідних чоловіків, проте ці зміни не є статистично достовірними.

Більшість дослідників підтверджує високий вміст фолікулостимулюючого гормону у хворих з олігозооспермією порівняно з нормозооспермією або у чоловіків з підтвердженим батьківством [23, 24]. Проте, Alaa

Shaker та співавт. [25] змін у вмісті фолікулостимулюючого гормону при патосперміях не виявили. Відомості щодо вмісту іншого гонадотропного гормону (лютеїнізуючого гормону) теж різняться [23, 25]. Суперечливі дані отримані й при вивченні сироваткових концентрацій статевих гормонів. Переважна більшість авторів підтверджує зниження вмісту тестостерону у неплідних чоловіків з олігозооспермією [24, 25], проте деякими дослідниками не виявлено відхилень значень цього показника [23, 26]. Shaikh MA та співавт. [27] виявили зниження вмісту тестостерону не лише у чоловіків з олігозооспермією, але й з астенозооспермією. Літературні дані щодо вмісту естрадіолу та пролактину в неплідних чоловіків з різними формами патоспермії також вкрай різняться. Таким чином, однозначної думки щодо зміщення сироваткових концентрацій гонадотропних і статевих гормонів в неплідних чоловіків з різними формами патоспермії дотепер немає.

Оскільки дані літератури [21] свідчать, що функціональна активність сперматозоїдів тісно пов'язана зі вмістом андрогенів, ми встановили кореляційний зв'язок між активністю аргінази та концентрацією тестостерону в сироватці крові неплідних чоловіків з олігозооспермією (рис. 2).

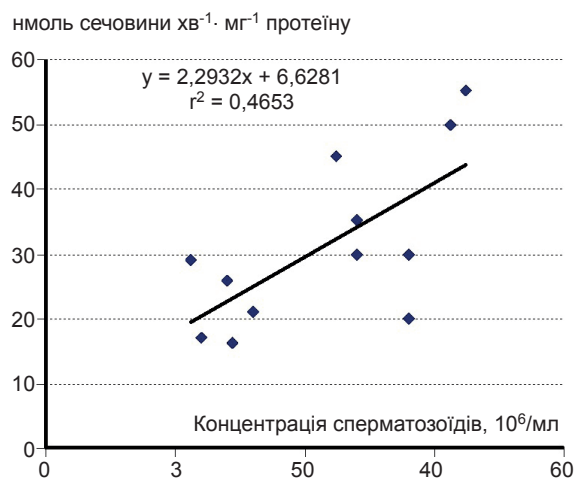


Рис. 2. Кореляційний зв'язок активності аргінази сперматозоїдів неплідних чоловіків з олігозооспермією та концентрації сперматозоїдів у еякуляті

У чоловіків з порушенням сперматогенезу за типом олігозооспермії пригнічення активності аргінази сперматозоїдів позитивно корелює зі зниженням їх концентрації в еякуляті ( $r = 0,68$ ). Кореляційним аналізом статистично достовірних залежностей між змінами аргіназної активності при різних формах патоспермій та іншими показниками гормонального профілю неплідних чоловіків не виявлено.

Таким чином, отримані нами результати вказують на порушення функціональної активності системи *L*-аргінін–NO у сперматозоїдів неплідних чоловіків, яке проявляється в інгібуванні активності аргінази. Спостерігається пригнічення аргіназної активності, що свідчить про порушення в неокисному шляху обміну *L*-аргініну. Найбільш виражені зниження активності аргінази відмічається при лейкоцитоспермії, що, очевидно, пов'язано з утворенням активних форм кисню та ініціацією процесів перекисного окиснення ліпідів. На нашу думку, пригнічення активності аргінази пов'язане з оксидативним і нітрооксидативним стресом та гіперпродукцією NO, який пригнічує активність аргінази. Припускається, що зниження активності аргінази призводить до дисбалансу в системі *L*-аргінін–NO, що спричинює порушення запліднювальної здатності сперматозоїдів.

**R.V. Fafula, O.K. Onufrovych, U.P. Iefremova, D.Z. Vorobets, Z.D. Vorobets**

### THE PECULIARITIES OF ARGINASE PATHWAY OF *L*-ARGININE IN SPERMATOZOA IN MEN WITH DIFFERENT FORMS OF PATHOSPERMIA

The changes in arginase activity of spermatozoa and hormonal profile of peripheral blood of infertile men with various forms pathospermia have been studied. It has been found that arginase activity in the sperm cells of men with oligozoospermia, astenoospermia, oligoastenoospermia and leucocytospermia is decreased in 2.1, 2.3, 2.4 and 3.3 times respectively. This indicates about inhibition of arginase pathway of *L*-arginine metabolism, which is not significantly dependent on the type of disruption of spermatogenesis. The most significant changes have been observed in infertile men with leucocytospermia since white blood cells stimulate the formation of reactive oxygen species, induction and development of oxidative and nitrate stress in spermatozoa. Inhibition of arginase pathway of *L*-arginine metabolism has adaptive role, which is to limit bioavailability of *L*-arginine and to prevent excessive formation of NO in cytotoxic concentrations to sperm cells. It has been noted changes in serum concentrations of gonadotropin and sex hormones in men with various forms of pathospermia. The most expressed significant changes were in levels of follicle stimulating hormone and testosterone. The concentration of follicle stimulating hormone in patients with oligozoospermia caused by hypogonadism is twice higher and in patients with leucocytospermia in 1.8 times higher than in fertile men. In patients with astenoospermia this value is in 2.2 times lower than in normozoospermic samples but within the physiological norm. The testosterone level in men with oligozoospermia is in 1.6 times lower than in fertile men but within the physiological norm. It has been found that arginase inhibition of spermatozoa positively correlated with a decrease in their concentration in the ejaculate of infertile men with oligozoospermia ( $r = 0.68$ ).  
Keywords: arginase; nitric oxide; infertility in men.

*Danylo Halytsky Lviv National Medical University.*

**Р.В. Фафула, О.К. Онуфрович, У.П. Єфремова, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець**

### ОСОБЕННОСТИ АРГИНАЗНОГО ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА *L*-АРГИНИНА В СПЕРМАТОЗОИДАХ МУЖЧИН ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ПАТОСПЕРМИИ

Исследовано изменения активности аргиназы в сперматозоидах и гормональный профиль периферической крови бесплодных мужчин при различных формах патоспермии. Обнаружено угнетение аргиназного пути метаболизма *L*-аргинина в сперматозоидах мужчин с олиго-, астено-, олигоастенозоо- и лейкоцитоспермией. Наиболее выраженные изменения отмечаются у бесплодных мужчин

при лейкоцитоспермії. Следует отметить изменение содержания в сыворотке крови гонадотропных и половых гормонов у мужчин с различными формами патоспермії. Наиболее значительные достоверные изменения наблюдаются в содержании фолликулостимулирующего гормона и тестостерона. Установлено, что у бесплодных мужчин с нарушением сперматогенеза по типу олигозооспермії подавление активности аргиназы сперматозоидов положительно коррелирует со снижением их концентрации в эякуляте ( $r = 0,68$ ).

Ключевые слова: аргиназа; оксид азота; бесплодие у мужчин.

## REFERENCES

- Lee LK, Foo KY. Recent insights on the significance of transcriptomic and metabolomic analysis of male factor infertility. *Clin Biochem.* 2014; 47(10-11):973-82.
- Kullisaar T, Türk S, Kilk K, Ausmees K, Punab M, Mandar R. Increased levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in male partners of infertile couples. *Andrology.* 2013; 1(6):850-8.
- Foghi K, Novin MG, Jabbari ZM, Najafi T, Heidari MH, Yasoori AR. Immuno-histochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in testicular cells of men with nonobstructive azoospermia. *Iran J Reprod Med.* 2011; (9):277-80.
- Barska ML, Brodyak IV, Sybirna NO. The study individual components of oxidative unoxidative pathways of L-arginine metabolism in leukocytes in diabetes type 1. *Med Chem.* 2006; 8(3):67-9 [Ukrainian].
- Stephen DC, Hong Y, Wayne, WG, Rita MK, Paul Y, Ramaswamy KI. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Gen Metab.* 2004; (81):38-44.
- Mori M: Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr.* 2007, 137:1616S-1620S.
- Hadwan MH, Almashhedy LA, Razzaq AS. Study of the effects of oral zinc supplementation on peroxynitrite levels, arginase activity and NO synthase activity in seminal plasma of Iraqi asthenospermic patients. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014; (12): 1.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization Press; 2010.
- Lackner JE, Lakovic E, Waldhor T, Schatzl G, Marberger M. Spontaneous variation of leukocytospermia in asymptomatic infertile males. *Fertil Steril.* 2008; 90(5):1757-60.
- Gavriliouk D, Aitken RJ. Damage to Sperm DNA Mediated by reactive oxygen species: its impact on human reproduction and the health trajectory of offspring. *Adv Exp Med Biol.* 2015; (868):23-47.
- Morgante G, Scolaro V, Tosti C, Di Sabatino A, Piomboni P, De Leo V. Minerva. Treatment with carnitine, acetyl carnitine, L-arginine and ginseng improves sperm motility and sexual health in men with asthenospermia. *Urol Nefrol.* 2010; 62(3):213-8.
- Rhee HJ, Kim EJ, Lee JK. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *J Cell Mol Med.* 2007; 11(4). P.685-703.
- Elgun S, Kacmaz M, Sen I, Durak I. Seminal arginase activity in infertility. *Urol Res.* 2000 Jan; 28(1):20-3.
- Eskioçak S, Gozen AS, Taskiran A, Kilic AS, Eskioçak M, Gulen S. Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(5):581-8.
- Gür S, Kandemir FM. Relationships between seminal plasma arginase activity and spermatological parameters in rams. *Andrologia.* 2012; 44(2):86-91.
- Türk G, Gura S, Kandemir FM, Sünmez M. Relationship between seminal plasma arginase activity and semen quality in Saanen bucks. *Small Rum Res.* 2011; 97(1-3):83-7.
- Agarwal A, Sharma R, Durairajanayagam D, Ayaz A, Cui Z, Willard B, Gopalan B, Sabanegh E. Major protein alterations in spermatozoa from infertile men with unilateral varicocele. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015; (13):8.
- Semenova AV, Tomilova IK, Panikratov KD, Kadykova EL, Basharin AV. The role of nitric oxide in fertility disorders in men. *Urologia.* 2005; (6):31-6 [Russian].
- Venkatakrishnan P, Nakayasu ES, Almeida IC, Miller RT. Arginase activity in mitochondria – an interfering factor in nitric oxide synthase activity assay. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; (394):448-52.
- Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl* 2006; (8):143-57.
- Levillain O, Diaz JJ, Blanchard O, Déchaud H. Testosterone down-regulates ornithine aminotransferase gene and up-regulates arginase II and ornithine decarboxylase genes for polyamines synthesis in the murine kidney. *Endocrinology.* 2005; 146(2):950-9.
- Gannon PO, Godin-Ethier J, Hassler M, Delvoye N, Aversa M, Poisson AO, Péant B, Alam Fahmy M, Saad F, Lapointe R, Mes-Masson AM. Androgen-regulated expression of arginase 1, arginase 2 and interleukin-8 in human prostate cancer. *PLoS One.* 2010; 5(8):e12107.
- Taha AB, Rashid KH. Etiology of infertility in couples attending maternity hospital in Erbil Zanco. *J Med Sci.* 2013; 17(1): 322-30.
- Wei TC, Huang WJ, Lin AT, Chen KK. The role of hormones on semen parameters in patients with idiopathic or varicocele-related oligoasthenoteratozoospermia (OAT) syndrome. *J Chin Med Assoc.* 2013; 76(11):624-8.
- Alaa Shaker Al-Nahi. Evaluation of FSH, LH, testosterone, prolactin, TSH and T4 hormones levels in different subgroups of infertile males. *Al-Kufa J Biol.* 2016; 7(3):47-54.
- Sharma MK, Parchwani D, Pankaj M, Upadhyah A. Relationship between thyroid profile and semen quality. *Nat J Comm Med.* 2012; 3(1):20-4.
- Shaikh MA, Khan MS, Turabi A, Shakoor KA, Ali I. Semen and hormonal analysis of patients with azoospermia and oligozoospermia. *Intl Chem Phann Med J.* 2004; 1(2):131-33.

*Матеріал надійшов до редакції 16.05.2016*

## CONTENTS

A.N. Goltsev, I.V. Rassokha, T.G. Dubrava, L.V. Ostankova, M.V. Ostankov, V.I. Safonov, A.V. Zykova. Experimental therapy of graft-versus-host disease by mesenchymal stromal cells grown on oxide nanocoatings	3
O.P. Kolesnyk, S.A.Fedulova, N.S. Veselovsky. Analysis of quantal parameters of GABA release during short-term depression and facilitation of synaptic transmission	12
G. Maleeva, S. Buldakova, G. Skibo, P. Bregestovski. Aminoacid residues involved in positive modulation of $\alpha 1$ glycine receptors by ginkgolic acid	19
H.V. Danylovyh, Yu.V. Danylovyh, R.V. Rodik, V.I. Kalchenko, A.Ju. Chunikhin. Calix[4] arenes as modulators of energy-dependent $\text{Ca}^{2+}$ -accumulation and functioning of the electron transport chain in smooth muscle mitochondria	27
S.V. Ziablitsev, A.V. Korobova, O.V. Petrenko, V.N. Serduk, S.U. Mogilevsky. Role of matrix metalloproteinase 9 and its tissue inhibitor 1 in development and prognosis of diabetic retinopathy	37
S.B. Semenenko, S.S. Tkachuk, O.V. Tkachuk, S.Y. Karateeva, V.V. Antsupova. Specific features of chronorhythmologic changes of the ion-regulating function of the kidneys under the hypofunction of the pineal gland	45
Y.Y. Zabenko, T.A. Pivneva. Flavonoid quercetin reduces gliosis after repetitive mild traumatic brain injury in mice	50
I.N. Mikheyteva, T.I. Sirosthanenko. Effect of hydrogen sulphide donor on intraocular pressure in rats	57
S.V. Kolotilov, V.O. Melnyk, A.S. Lytvynenko, S.O. Sotnik, O.O. Hurzhii. Comparison of spectroscopic properties of intraocular fluid in patients with cataract and primary open-angle glaucoma	62
V.V. Konopelnyuk, L.I. Kot, T.V. Koval, T.D. Khilko, I.V. Yakubtsova, T.D. Preobrazhenska, L.I. Ostapchenko. Status of glutathione-dependent link of blood antioxidant system under application of fenugreek seed powder in animals with experimental obesity	69
I.O. Belkina, N.P. Smolenko, V.K. Klochkov, Yu.V. Malukin, E.E. Chistyakova, N.A. Karpenko, Yu.I. Karachentsev. The effect of gadolinium orthovanadate nanoparticles by neonatal induced reproductive disease in male rats	76
R.V. Fafula, O.K. Onufrovych, U.P. Iefremova, D.Z. Vorobets, Z.D. Vorobets. The peculiarities of arginase pathway of <i>L</i> -arginine in spermatozoa in men with different forms of pathospermia	83