

Фізіологічний журнал

ТОМ 62 № 3 2016

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Pavlyk O., Iemets O., Stroy D., Volosovets O., Kryvopustov S., Dosenko V.</i> Single-nucleotide polymorphism (rs11204981) in filaggrin gene and its functional significance for asthma among children with eczema	3
<i>Калініченко О.В., Мишуніна Т.М., Тронько М.Д.</i> Активність синтаз оксиду азоту та його концентрація в тканині карцином щитоподібної залози людини	9
<i>Кальниш В.В., Пишинов Г.Ю., Моїсеєнко С.В., Опанасенко В.В., Алексєєва Л.М., Висоцька Л.Г.</i> Особливості регуляції ритму серця при адаптації людини до умов Антарктики	20
<i>Вовкун Т.В., Янчук П.І., Штанова Л.Я., Весельський С.П., Шаламай А.С.,</i> Зовнішньосекреторна функція печінки щурів при дії корвітину	30
<i>Ходосовский М.Н.</i> Влияние гипоксического прекодиционирования на механизмы транспорта кислорода и окислительные повреждения при синдроме ишемии-реперфузии печени у кроликов	39
<i>Літовка І.Г., Березовський В.Я., Весельський С.П., Жернокльов У.О.</i> Ремодельовання кісткової тканини після введення екзогенного мелатоніну в різні сезони року	48
<i>Павлов С.Б., Кумечко М.В., Літвінова О.Б., Бабенко Н.М., Гончарова А.В.</i> Порушення регуляторних механізмів ремодельовання кісткової тканини в умовах експериментальної хронічної хвороби нирок	54
<i>Левічева Н.О., Тіткова А.М.</i> Особливості лімбіко-неокортикальних і моноамінергічних взаємодій у формуванні синдрому відміни інгаляцій парів органічного розчинника «646» у щурів	60
<i>Зай С.Ю., Заводовський Д.О., Богущька К.І., Ноздренко Д.М., Прилуцький Ю.І.</i> Перспективи застосування C ₆₀ -фулерену як засобу профілактики і корекції ішемічно-реперфузійних порушень у скелетній м'язовій тканині	66

<i>Serebrovska T.V., Serebrovska Z.O., Egorov E. Fitness and therapeutic potential of intermittent hypoxia training: a matter of dose</i>	78
ІСТОРІЯ НАУК	
<i>Березовський В.Я. Дві долі видатних жінок-дослідників. (До 100-річчя від дня народження професора І.В. Торської та 106-річчя професора Р. Леві-Монтальчіні) . . .</i>	92

Single-nucleotide polymorphism (rs11204981) in filaggrin gene and its functional significance for asthma among children with eczema

O. Pavlyk¹, O. Iemets¹, D. Stroy², O. Volosovets¹, S. Kryvopustov¹, V. Dosenko²

¹O.O.Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine, ²O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Sector of Molecular Physiology, Kyiv;
e-mail: pavlykel@gmail.com

The aim of this study was to determine whether SNP in filaggrin gene and expression of filaggrin mRNA in buccal epithelium are associated with childhood eczema and with the phenotype of childhood eczema combined with asthma. Genotyping for FLG (rs11204981) was performed in the following populations: patients with asthma (n = 99); ages 5-18 years (8 ± 2.1), and control group (n = 98); ages 5-18 years (12 ± 2.1) by using Real-time PCR. Level of mRNA expression was estimated by using reverse transcription and following real-time PCR. It was found out that 5.05 % of patients and 2.02 % of control group had minor allele (AA; P>0.05), 27.27 % and 36.36 % of patients and control group, respectively, had heterozygous allele (GA; P>0.05) and 67.68 % and 61.62 % had major allele (GG) (P>0.05). Variants with the AA-genotype of the FLG rs11204981 were found to be 2.5 times more frequently among patients than in control group. We also found out that the level of mRNA FLG expression in GG-genotype is 22.8 ± 11.67 (P>0.05 compared to AA-genotype), 92.95 ± 35.3 in GA genotype (P<0.05 compared to GG-genotype) and 21.8 ± 13.4 in AA genotype (P>0.05 compared to GA-genotype). Thus, heterozygous variant has significantly higher expression of filaggrin in buccal epithelium. We suggest that SNP in FLG (rs11204981) may serve as an important predictive marker for the combined eczema plus asthma phenotype, and that the highest level of expression in heterozygous may have a protective role in developing allergy phenotype.

Key words: snp; filaggrin; asthma; paediatrics.

INTRODUCTION

Eczema is a chronic inflammatory skin condition commonly associated with other atopic diseases, such as asthma. Genetic variants in epidermal proteins, such as filaggrin, are thought to play a critical role in the development of eczema and have been associated with the combination of eczema plus asthma [1].

Filaggrin is a major structural protein in the stratum corneum involved in the terminal differentiation of the epidermis and formation of the skin barrier [2]. The filaggrin gene (*FLG*) is located within the epidermal differentiation complex, a region on chromosome 1q21. Mutations in the filaggrin gene are the most significant known genetic factor for the develop-

ment of atopic dermatitis [3]. Genetic variants (SNPs) in *FLG* also confer risk for the associated allergic diseases such as asthma [4-8]. Researches highlighted the importance of skin barrier function in the pathogenesis of atopic diseases and have motivated a surge in research characterizing the filaggrin-deficient skin barrier and its consequences. This reduction in barrier function may allow the development of inflammation due to the increased penetration of allergen through the skin allowing IgE sensitization. Studies of functional significance of genetic variants in *FLG* showed that this gene is likely to contribute to mechanisms by which a quantitative reduction in intracellular filaggrin (mRNA expression) levels results in the paracellular barrier defects [9].

© O. Pavlyk, O. Iemets, D. Stroy, O. Volosovets, S. Kryvopustov, V. Dosenko

We hypothesized that polymorphism rs11204981 in promoter region of *FLG* would be associated with childhood eczema and with the eczema plus asthma phenotype. To test this hypothesis, we examined differences in the frequency of this SNP between children without allergic pathology (control group) and children with eczema plus asthma and estimated that variants with the AA genotype of the *FLG* rs11204981 were at 2.5 times more frequent among patients than in control group. Functional analysis of this SNP showed that mRNA *FLG* expression in heterozygous is 4 times higher than GG-genotype ($P < 0.05$) and 4.3 times higher than AA genotype ($P > 0.05$).

METHODS

The control group included 98 children aged 5 to 18 years (12 ± 2.1) without allergic disease at the time of examination or history. Children in the control group had negative skin prick test and/or normal spirometry results as well as negative data on the presence of allergic diseases in parents and close relatives.

The study included patients with asthma ($n = 99$); ages 5-18 years ($8 \pm 2/1$). All children had symptoms of asthma, eczema or symptoms of eczema in anamnesis, allergic rhinitis, or at least one positive skin prick test result to a panel of 15 aeroallergens. Skin prick tests were carried out and interpreted by Global Allergy and Asthma European Network protocol, developed by using a common panel of inhalant allergens based on published practice guidelines, the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Position Paper, the Nordic standards and the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase II protocol. The research included children 5 to 18 years of age from subspecialty department at Kiev Children's Hospital and control subjects from the general population. All procedures performed in study were in accordance with the ethical standards of the O. Bogomolets National Medical University ethical committee and with the 1964

Helsinki declaration and its later amendments. Parents signed an informed consent prior to their inclusion in the study.

Outcome measures

The definition of eczema was adapted from a validated questionnaire (ISAAC) and included a parental report of the child's scratching *and* redness, "raised bumps" or dry skin/scaling during the childhood. Cases with eczema included children with a physician's diagnosis or a parental report of eczema. Physical examination findings are considered to be consistent with eczema including erythema, papulation, excoriations, and/or lichenification. Testing for asthma were performed; the definition included a parental report of persistent wheezing (≥ 2 wheezing episodes that is not associated with a cold or upper respiratory tract infection), spirometry (a reduced FEV_1 and FEV_1/FVC ratio, positive test with β_2 -agonists), increased IgE level, positive skin prick tests with aeroallergens (Table 4).

Selection of SNP

An SNP rs11204981 in *FLG*, which was located in promoter region, was selected for genotyping, as it hypothetically can affect expression of *FLG* mRNA and is reported to be common in European populations.

DNA and RNA extraction

Buccal epithelium was taken by using buccal brushes with the following freezing of samples and their storage at -20°C . DNA for genotyping was extracted from the samples by using Isogene kits (Russian Federation) according to manufacturer's protocol. RNA was extracted from buccal epithelium samples by using phenol-chloroform extraction. The concentration of total DNA and RNA was determined by using a NanoDrop spectrophotometer ND1000 (NanoDrop Technologies Inc., USA).

qPCR Genotyping

Amplification reactions were performed by using a 7500 Fast Real-time PCR System ("Ap-

plied Biosystems”, USA) in a final reaction volume of 20 μ l, which contained 2X TaqMan Universal Master Mix (“Applied Biosystems”, USA), assayC_1792560_10 and the template cDNA. The thermal cycling conditions involved a denaturation step at 95°C for 20 s, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 3 s and 60°C for 30 s. Analysis of the data was carried out with 7500 Fast Real-Time PCR Software.

Reverse transcription and real-time PCR

RNA was reverse transcribed with random hexamer primers by using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (“Thermo Scientific”, USA). Single-strand obtained from cDNA was used for real-time PCR. Gene expression of *FLG* was determined by using the TaqMan gene expression assay (Hs_00856927_g1, Applied Biosystems, USA). The pairs of forward and reverse primers for the genes indicated above and the TaqMan probes for the target mRNAs were designed based on the human mRNA sequence by “Applied Biosystems”. Gene expression in each probe was normalized to β -actin, as a housekeeping gene, by using TaqMan β -actin control reagent (FAM Probe). The thermal cycles of PCR amplification were the following: initial denaturation step at 95°C for 20 s, and treatment at 95°C for 3 s and 60°C for 30 s (45 cycles) with the use of 7500 Fast Real-Time PCR (“Applied Biosystems”). Analysis of the data was carried out with 7500 Fast Real-Time PCR Software.

Median age (years) (n=99)
Sex ratio (% male) (n=99)
Mean SCORAD (CI) (n=51)
Median total IgE, kU•l⁻¹ (IQ) (n=24)
AD prevalence (n=99)
FEV₁, % (n=76)
FEV₁/FVC ratio (n=76)
FEV₁ improvement after salbutamol (n=76)

Value
8 \pm 2.1
57.6%
20 (16 – 24)
821.4 (42 – 8000)
35%
76.4 (28.64 – 117.8)
106.74 (84.4 – 118.39)
12.5 (0.4 – 87.2)

Genotyping

We found that SNP was in Hardy-Weinberg equilibrium. Our main results are as follows: 5.05 % of patients and 2.02 % of control group

Statistical analysis

χ^2 test was performed to investigate if there was any difference in the frequency of the genotype and allele between the asthma patient group and the normal control group. A P-value of less than 0.05 (P<0.05) was considered statistically significant. Frequency distribution of genotypes was analyzed by using Pearson chi-square test with Excel 2010 software. SNPAnalyzer (web-based software) was used to examine Hardy-Weinberg equilibrium.

RESULTS

100% of children have atopic dermatitis in history, 35.35 % of children have manifestations of atopic dermatitis in the form of rashes, dry skin, peeling, pruritus, lichenification during last year. 80.81% had mild severity on a scale SCORAD, 20.20 % – average severity. Other concomitant allergic pathology was determined in 46 % of children (allergic rhinitis, food allergy). 72.73 % of children were in a state of exacerbation of asthma, manifested in wheezing and cough (of which 60.61 % had mild exacerbation severity, 39.39 % had moderate severity of exacerbation), 28.28 % of children had remission. 60.61 % of patients had decreased FEV₁ (<80%), 34.34 % had positive test with β_2 -agonist.

Characteristics of the patients with atopic dermatitis and asthma:

had minor allele (AA; P> 0.05 by χ^2 -test, OR – 2.28 (95%CI 0.42–1.2), 27.27 % and 36.36 % of patients and control group, respectively, had heterozygous allele (GA; P> 0.05 by

χ^2 -test, OR – 1,69 (95% CI 0.92-3.1) and 67.68 % and 61.62 % had major allele (GG; P>0.05 by χ^2 -test). Variants with the AA-genotype of

the *FLG* rs11204981 were found to be 2.4 times more frequent among patients than in control group (Tables 1-3, Fig 1, 2).

Table 1. Odds ratio for co-dominant inheritance model in children with asthma. Odds ratios with 95% confidence intervals.

Genotype	Genotype (n)		Odds Ratio and 95% CI
	Control	Patients	
GG	61	67	1 (ref)
GA	36	27	1.69 (0.92-3.1)
AA	2	5	2.28 (0.42-12.2)

Table 2. Odds ratio for dominant inheritance model in children with asthma. Odds ratios with 95% confidence intervals.

Genotype	Genotype (n)		Odds Ratio and 95% CI
	Control	Patients	
GG	61	67	1
GA/AA	38	32	0.77 (0.43-1.38)

Table 3. Odds ratio for recessive inheritance model in children with asthma. Odds ratios with 95% confidence intervals.

Genotype	Genotype (n)		Odds Ratio and 95% CI
	Patients	Control	
GG/GA	97	94	1
AA	2	5	2.58(0.49-13.62)

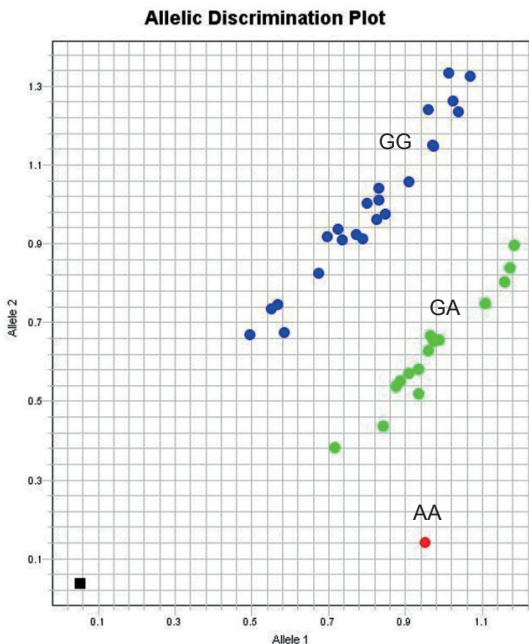


Fig. 1 Allelic discrimination plot for real time PCR results detecting the homozygous genotype GG, heterozygous GA and homozygous AA. Minor allele (AA) was present at 5.05 % of patients, 27.27 % had heterozygous allele (GA) and 67.68 % had major allele (GG)

FIG expression

We also found that the level of mRNA FLG expression in GG-genotype is 22.8 ± 11.67 (P>0.05 compared to AA-genotype), 92.95 ± 35.3 in GA-genotype (P<0.05 compared to GG-genotype) and 21.8 ± 13.4 in AA genotype (P>0.05 compared to GA-genotype). Thus, heterozygous variant has significantly higher expression of filaggrin in buccal epithelium (Fig 2).

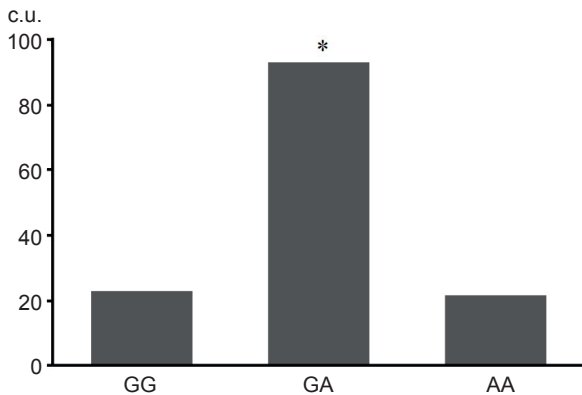


Fig.2 Messenger ribonucleic acid expression depending on FLG genotype

DISCUSSION

Evidence from the literature has established that epidermal barrier function plays a critical role in eczema and possibly in the phenotype of eczema plus asthma. The combination of eczema plus asthma may represent a distinct endophenotype with unique pathogenic and prognostic implications. Identification of risk factors that may modify the risk of asthma among children with eczema is important. In addition, improved understanding of the relationship between eczema and asthma may provide mechanistic insights into the pathogenesis of asthma. We explored the relationship of childhood eczema plus asthma with epithelial protein encoded on 1q21 as well as with data from RNA expression studies and allele frequency differences in asthmatic populations. We demonstrated a possible connection between an SNP in *FLG* and eczema plus asthma among children. The AA genotype of the rs11204981 SNP conferred an approximately 2.5 times increased risk for eczema plus asthma phenotype. Findings for RNA filaggrin expression in buccal epithelium appear to be related to *FLG* polymorphism. Thus *FLG* polymorphism may affect filaggrin expression in the skin.

In this article, we determined the frequency of the rs11204981 SNP and showed that minor allele occurs 2.4 times more frequently among patients, although there was no statistical significance. Association of genotype with clinical parameters also was not established previously. Some researchers demonstrated association of an increased risk of developing atopic dermatitis with other *FLG* polymorphisms. In particular, positive associations of rs2184951 and rs12730241 [6] with asthma and allergic diseases were determined. Polymorphism rs11204981 has been widely studied in the European population and therefore was chosen by us for this research.

However, in the study of the expression level of the filaggrin mRNA we were able to show that this polymorphism is functional and affects the expression of filaggrin. mRNA *FLG* expression in heterozygote is 4 times higher than common

homozygous genotype ($P < 0.05$) and 4.3 times higher than homozygous risk genotype ($P > 0.05$).

CONCLUSIONS

Our research has demonstrated functional significance of heterozygote genotype of *FLG* polymorphism, thus suggesting that this polymorphism may have a predictive value in the development of asthma and eczema affecting the expression of that gene. Thereby, polymorphisms in *FLG* may independently serve as useful markers to predict the development of asthma among children with eczema.

О.В. Павлик¹, О.В. Ємець¹, Д.О. Строй², О.П. Волосовець¹, С.П. Кривоустов¹, В.Є. Досенко²

ФУНКЦІОНАЛЬНЕ ЗНАЧЕННЯ ОДНО-НУКЛЕОТИДНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ (RS11204981) В ГЕНІ ФІЛАГРІНУ (FLG) ДЛЯ ЛІКУВАННЯ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДІТЕЙ З АТОПІЧНИМ ДЕРМАТИТОМ.

Метою нашого дослідження було визначити зв'язок однонуклеотидного поліморфізму в гені філагрину і експресії його мРНК в букальному епітелії та фенотипом бронхіальної астми з супутнім атопічним дерматитом у дітей. Генотипування філагрину (rs11204981) проводили в групі хворих з бронхіальною астмою (n=99) віком 5-18 років ($8 \pm 2,1$ років) і контрольній групі (n=98) віком 5-18 років ($12 \pm 2,1$ років) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Рівень експресії мРНК оцінювали з використанням зворотної транскрипції та наступної ПЛР у реальному часі. Ми виявили, що у 5,05 % пацієнтів і у 2,02 % здорових дітей був мінорний алейний варіант (AA), 27,27 і 36,36 % відповідно мали гетерозиготний алей (GA), 67,68 і 61,62 % – мажорний алей (GG). Варіанти з генотипом AA з rs11204981 *FLG* виявилися в 2,4 раза частіше у пацієнтів, ніж у контрольній групі. Нами було виявлено, що рівень експресії мРНК філагрину у пацієнтів з GG-генотипом становить $22,80 \pm 11,67$ ($P > 0,05$ порівняно з генотипом AA), $92,95 \pm 35,30$ в GA-генотипі ($P < 0,05$ порівняно з GG-генотипом) і $21,80 \pm 13,40$ у генотипі AA ($P > 0,05$ порівняно з GA-генотипом). Таким чином, гетерозиготний варіант має значно вищу експресію філагрину в епітелії слизової оболонки рота. Ми вважаємо, що поліморфізм у гені *FLG* (rs11204981) може бути важливим прогностичним маркером для фенотипу бронхіальної астми та атопічного дерматиту, і що високий рівень експресії в гетерозиготному стані може свідчити про протекторну роль цього генотипу у розвитку алергії. Ключові слова: однонуклеотидний поліморфізм; філагрін; астма; педіатрія.

¹Національний медичний університет
ім. О.О. Богомольця, Київ,

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ

Е.В. Павлик¹, О.В. Емец¹, Д.А. Строй², А.П.
Волосовець¹, С.П. Кривоустов¹, В.Е. Досенко²

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОДНО- НУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА (RS11204981) В ГЕНЕ ФИЛАГРИН (FLG) ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИ- ТОМ

Целью нашего исследования было определить связь однонуклеотидного полиморфизма в гене филагрина и экспрессии его мРНК в буккальном эпителии и фенотипа бронхиальной астмы с сопутствующим атопическим дерматитом у детей. Генотипирование филагрина (rs11204981) проводили в группе больных с бронхиальной астмой (n = 99) в возрасте 5-18 лет (8±2,1 лет) и контрольной группе (n = 98) в возрасте 5-18 лет (12±2,1 лет) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Уровень экспрессии мРНК оценивали с использованием обратной транскрипции и последующей ПЦР в реальном времени. Мы обнаружили, что у 5,05% пациентов и у 2,02% здоровых детей был минорный аллельный вариант (AA), 27,27 и 36,36% соответственно имели гетерозиготный аллель (GA), 67,68 и 61,62% – мажорный аллель (GG). Варианты с генотипом AA rs11204981 гена *FLG* оказались в 2,4 раза чаще у пациентов, чем в контрольной группе. Нами было выявлено, что уровень экспрессии мРНК филагрина у пациентов с GG-генотипом составляет 22,80±11,67 (P>0,05 по сравнению с генотипом AA), 92,95±35,30 в GA-генотипе (P<0,05 по сравнению с GG-генотипом) и 21,80±13,40 в генотипе AA (P>0,05 по сравнению с GA-генотипом). Таким образом, гетерозиготный вариант имеет значительно более высокую экспрессию филагрина в эпителии слизистой оболочки рта. Мы считаем, что полиморфизм в гене *FLG* (rs11204981) может быть важным прогностическим маркером для фенотипа бронхиальной астмы и атопического дерматита, и высокий уровень экспрессии в гетерозиготном состоянии может свидетельствовать о протекторной роли этого генотипа в развитии аллергии.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм; филаггин; астма, педиатрия.

¹Національний медичний університет
ім. А.А. Богомольця, Київ,

²Інститут фізіології ім. А.А. Богомольця
НАН України, Київ

REFERENCES

1. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol.* 2012; 132:949-63.
2. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2006; 38:441–6. doi:10.1038/ng1767.
3. Brown SJ, Irwin McLean WH. One remarkable molecule: Filaggrin. *J Inv Dermatol.* 2012; 132 (3 Pt 2): 751–62. doi:10.1038/jid.2011.393.
4. Chang YC, Wu WM, Chen CH, Hu CF, Hsu LA. Association between P478S polymorphism of the filaggrin gene and risk of psoriasis in a Chinese population in Taiwan. *Arch Dermatol Res.* doi: 10.1007/s00403-007-0821-2
5. Kim EJ, Jeong MS, Li K, Park MK, Lee M-K, Yoon Y, Cho D-Y, Seo SJ. Genetic Polymorphism of FLG in Korean Ichthyosis Vulgaris Patients. *Ann Dermatol.* 2011; 23(2): 170–6.
6. Lambert MH, Tremblay K, Madore AM, Laprise C. Association between filaggrin family member genes, asthma, atopy and atopic asthma with atopic dermatitis history in the subjects from the Saguenay-Lac-Saint-Jean founder population. *All Asth Clin Immunol.* 2010; 6: 4. doi: 10.1186/1710-1492-6-S3-P4.
7. Kim S-Y, Yang SW, Kim H-L, Kim S-H, Kim SJ, Park S-M, et al. Association between P478S polymorphism of the filaggrin gene & atopic dermatitis. *Indian J Med Res.* 2013; 138(6): 922–7.
8. Wang I-J, Lin T-J, Kuo C-F, Lin S-L, Lee Y-L, Chen P-C. Filaggrin polymorphism P478S, IgE level, and atopic phenotypes. *Br J Dermatol.* 2011; 164:791–6.
9. Cole C, Karin Kroboth K, Schurch NJ. Filaggrin-stratified transcriptomic analysis of pediatric skin identifies mechanistic pathways in patients with atopic dermatitis. *J All Clin Immunol.* 2014; 134(1): 82–91. doi: 10.1016/j.jaci.2014.04.021

Received 09.12.2015

Активність синтаз оксиду азоту та його концентрація в тканині карцином щитоподібної залози людини

О.В. Калініченко, Т.М. Мишуніна, М.Д. Тронько

ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ;
e-mail: mishunina@list.ru

При дослідженні активності конститутивної форми синтази оксиду азоту (сNOS) встановлено, що в папілярних карциномах щитоподібної залози вона відповідає такій у незмінній позапухлинній тканині, тоді як в фолікулярних карциномах вона менша вдвічі. Водночас активність індукційної синтази оксиду азоту (іNOS) вища як в папілярних, так і в фолікулярних карциномах. Такі зміни супроводжуються більшим вмістом оксиду азоту в папілярних карциномах і незначними змінами в фолікулярних. У медулярних карциномах вивчені показники відповідали таким у незмінній тканині, а в метастазах папілярної карциноми на фоні відсутності змін активності ферментів утворення оксиду азоту вміст його був суттєво вищим. Збільшений вміст оксиду азоту та активності іNOS в папілярних карциномах щитоподібної залози суттєво не залежать від характеристик їх агресивності, проте зміни вмісту відсутні в пухлинах категорії T4 на фоні зниженої при цьому активності сNOS і менш виражений у пухлинах, які оточені тканиною за наявності в ній хронічного тиреоїдиту. Крім того, в папілярних карциномах папілярної чи фолікулярної будови вміст оксиду азоту не відрізнявся від норми, був трохи вищим у пухлинах солідної чи гетерогенної будови з наявністю солідних ділянок, тоді як в карциномах папілярно-фолікулярної будови він був більшим в 2, а в тканині солідно-інсулярної будови – в 3 рази. Підвищену активність іNOS спостерігали в карциномах різної будови, за виключенням пухлин солідної будови, в яких вона виявилася на рівні норми, та в пухлинах солідно-інсулярної будови, де вона суттєво (як і активність сNOS) вища порівняно з пухлинами іншої будови. Система генерації оксиду азоту бере участь у трансформації клітин щитоподібної залози та прогресії пухлинного росту, зокрема через регуляцію апоптозу, що видно з аналізу даних, отриманих як в рамках виконання цього дослідження, так і раніше. При цьому характер такої участі в папілярних карциномах щитоподібної залози, які мають неоднакову гістологічну будову, різниться. Ключові слова: оксид азоту; конститутивна та індукційна синтази оксиду азоту; карциноми щитоподібної залози; апоптоз.

ВСТУП

Оксид азоту (NO) – один з центральних регуляторів фізіологічних і біохімічних процесів – безперервно продукується в організмі ферментативним шляхом і за певних умов є потенційно токсичною молекулою. В нормі він бере участь у регуляції найважливіших внутрішньо- та міжклітинних реакцій, які відбуваються в усіх системах організму, тому цій молекулі надають особливого значення в розвитку патології. Функціональна відповідь клітини на дію оксиду азоту різнопланова; вона та баланс між фізіологічними, регуля-

© О.В. Калініченко, Т.М. Мишуніна, М.Д. Тронько

торними та/чи цитотоксичними властивостями молекули значною мірою залежить не тільки від фенотипу клітини-мішені, але і від локальної концентрації оксиду азоту, а також редокс-стану власне цієї молекули, а також інших молекул, що її оточують у тканинах, в яких вона синтезується і реалізує свої ефекти [1].

Радикал оксиду азоту у біологічних системах реагує з киснем, іонами металів і супероксидним аніон-радикалом. При взаємодії з останнім утворюється токсичний пероксинітрит, якому властиві всі функції оксиду азоту і який є потужним оксидантом

[2]. Він може продукувати високореакційно-спроможні гідроксильні радикали, що сприяє посиленню окисного стресу [1]. Відомо, що активні форми кисню, які утворюються при цьому, можуть окиснювати білки та ліпіди, пошкоджувати ДНК і, таким чином, викликати мутації, що призводять до трансформації клітин. З іншого боку, в мітохондріях оксид азоту діє як фізіологічний месенджер, що модулює швидкість транспорту електронів через компоненти електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. Залежно від вмісту утвореного пероксинітриду, останній та активні радикали кисню можуть викликати розвиток мітохондріальних дисфункцій, результатом чого є апоптозна чи некротична загибель клітини [1]. Водночас нітрозилування регуляторних білків, зокрема ефекторних каспаз, призводить, навпаки, до блокування апоптозу [2]. Порушення регуляції та реалізації останнього є також основою для розвитку низки патологічних процесів. Більшість авторів схиляються до висновків, що розбіжності у спрямованості ефектів ендogenous оксиду азоту залежать не тільки від його вмісту та типу клітин, а також від активності онкогенів і стадії клітинного циклу, тому цю молекулу вважають фізіологічним модулятором проходження клітинного циклу, проліферації та апоптозу [3].

Не викликає вже сумнівів, що саме окисний стрес при недостатності функції антиоксидантних систем є одним з центральних механізмів розвитку вузлових, запальних, автоімунних чи онкологічних захворювань щитоподібної залози [4, 5]. Проте питання щодо участі оксиду азоту в реалізації цих механізмів в щитоподібній залозі за її патології залишається до кінця не визначеним, а дані досліджень багато в чому суперечливі. Як приклад, застосування апоптозмодулювального препарату, який створений на основі вітаміну B_{12} та оксиду азоту (нітрозилкобаламін) і який підвищує вміст останнього, призвело до різкого зниження об'єму неоперабельної карциноми щитоподібної залози

[6], тоді як інгібітор NOS, який викликає зменшення вмісту оксиду азоту, підвищує в клітинній культурі фолікулярного раку щитоподібної залози кількість клітин, які гинуть за апоптозом [7].

Раніше ми показали, що в тканині хронічного тиреоїдиту, дифузного токсичного зобу, зобозміненої тканині хворих на еутиреоїдний вузловий зоб і в тканині фолікулярних аденом зміни активності ферментів, які відповідають за генерацію оксиду азоту (конститутивна та індукційна синтази оксиду азоту – cNOS та iNOS), а також його вмісту залежать від деяких клінічних характеристик перебігу хвороби та морфологічних особливостей досліджуваної тканини [8-10].

Метою цієї роботи було визначити вміст оксиду азоту (його метаболітів) та активність cNOS та iNOS у тканині карцином щитоподібної залози.

МЕТОДИКА

Досліджено 44 зразки папілярної, 5 фолікулярної, 3 медулярної карцином, 6 метастазів папілярної карциноми, 6 позапухлинної тканини з інвазією пухлинних клітин, а також 14 зразків позапухлинної незміненої тканини щитоподібної залози нормофолікулярної будови; останні склали групу порівняння. Всі пацієнти, тканина щитоподібної залози яких була досліджена, знаходилися в еутиреоїдному стані.

Зразки тканин промивали охолодженим фізіологічним розчином, зважували, подрібнювали та гомогенізували у 3-5-кратному об'ємі середовища такого складу: цукроза – 250 ммоль/л, тріс- HCl -буфер – 20 ммоль/л, натрієва сіль етилендіамін-тетраоцтової кислоти – 1 ммоль/л (рН 7,4).

Вміст метаболітів NO (суму нітрит- і нітрат-аніонів) визначали в гомогенатах спектрофотометричним методом за розвитком забарвлення в реакції діазотування нітритом сульфаніламідом, який входить до складу реактиву Гріса [11]. Для відновлення нітрат- до

нітрит-аніона при проведенні кольорової реакції у проби добавляли хлорид кадмію до кінцевої концентрації 2,5 %. Інтенсивність забарвлення реєстрували на спектрофотометрі («JanWay», Великобританія) при довжині хвилі 540 нм. Для побудови калібрувальної кривої використовували водний розчин нітрит-аніону натрію (1 моль/л), вміст якого в тканині виражали у наномолях на 1 мг білка.

Активність cNOS визначали за кількістю утворених під час інкубації метаболітів NO, вміст яких (у вигляді нітрит-аніона) встановлювали як описано вище. Інкубаційна суміш, об'ємом 1 мл, містила (в ммоль/л): фосфатний буфер (pH 7,4) – 50, хлорид натрію – 1, хлорид кальцію – 2, нікотинаміддинуклеотид відновлений – 1, L-аргінін – 2,2, а також 1-2 мг білка гомогенату [12]. Час інкубації становив 60 хв. Для визначення активності iNOS до складу інкубаційної суміші замість хлориду кальцію для зв'язування ендогенного Ca^{2+} додавали тетраацетат етиленгліколю у кінцевій концентрації 4 ммоль/л. Активність ферментів виражали у наномолях NO_2^- , утвореного за 1 год на 1 мг білка. Вміст останнього визначали за однією з модифікацій загальноприйнятого методу Лоурі, після його осадження трихлороцтовою кислотою.

Одержані результати опрацьовані статистично з використанням критерію t Стьюдента та представлені в таблицях у вигляді $M \pm m$. Критичний рівень значимості приймали за 0,05. При вивченні можливого зв'язку між показниками, що вивчали, розраховували непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена. При аналізі отриманих результатів враховували висновки патоморфологічних досліджень післяопераційного матеріалу. На проведення досліджень був отриманий дозвіл від Комітету з біоетики Інституту.

Перед викладенням та аналізом результатів зазначимо, що при розподілі зразків папілярних карцином по групах враховували лише один з показників (будова тканини, категорія пухлини TNM, наявність капсули, інвазії, склеротичних чи некротичних змін

тощо), розуміючи при цьому, що разом із досліджуваною характеристикою пухлини мають і інші. Проте у реальних умовах неможливо скласти вибірки, в яких зразки пухлинної тканини щитоподібної залози у кожній з груп мали б лише одну з таких характеристик, тому подібним аналізом, незважаючи на його гетерогенність, на нашу думку, можна все таки отримати певну інформацію.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Активність cNOS у папілярних карциномах відповідає такій у незмінній позапухлинній тканині щитоподібної залози нормофолікулярної будови, тоді як у фолікулярних карциномах вона менша майже наполовину (табл. 1). Водночас активність iNOS вища як у папілярних, так і у фолікулярних карциномах. Такий характер змін активності ферментів синтезу оксиду азоту супроводжується збільшенням його вмісту в папілярних карциномах і незначними змінами у фолікулярних. У 3 зразках медулярних карцином вивчені показники відповідали таким у незмінній тканині, а в метастазах папілярної карциноми на фоні відсутності змін активності ферментів утворення оксиду азоту вміст останнього був суттєво вищим (на 450 %), як і в позапухлинній тканині з ознаками інвазії пухлинних клітин, хоча в останньому випадку активність обох синтаз були значно вищими за норму (див. табл. 1).

Проведений аналіз характеру змін у системі генерації оксиду азоту в папілярних карциномах залежно від певних клінічних і біологічних характеристик останніх показав, що вміст оксиду азоту високий лише в карциномах категорії T1, а активність iNOS (але не cNOS) збільшена в пухлинах категорій T1-T3 (табл. 2). В папілярних карциномах категорії T4 активність cNOS суттєво нижча порівняно з такою в незмінній тканині щитоподібної залози, а вміст оксиду азоту та активність iNOS відповідають нормі і менші, ніж у тканині пухлин категорії T1-T3.

Таблиця 1. Вміст метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтази (NOS) у незмінній тканині щитоподібної залози, в карциномах, метастазах папілярної карциноми та позапухлинній тканині з інвазією пухлинних клітин останньої (M±m)

Тканина	Вміст NO ₂ ⁻ , нмоль/мг білка	Активність, нмоль NO ₂ ⁻ •год ⁻¹ •мг ⁻¹ білка	
		cNOS	iNOS
Незмінена (n=14)	2,63±0,56	7,11±1,19	5,07±0,64
Медулярної карциноми (n=3)	4,42±1,17	6,44±1,95	5,78±1,64
Фолікулярної карциноми (n=5)	3,20±0,44	4,02±0,55 **	9,70±1,84 *
Папілярної карциноми (n=44)	4,01±0,39 *	6,57±0,65	11,25±1,20 *
Метастазів папілярної карциноми (n=6)	14,55±3,92 *	6,09±1,45	3,51±0,66
Позапухлинна з інвазією пухлинних клітин папілярної карциноми (n=6)	7,89±2,13 *	34,21±9,34 *	19,27±5,62 *

* P < 0,05 щодо незміненої тканини; ** P < 0,05 щодо папілярної карциноми.

Вищий вміст оксиду азоту в папілярних карциномах суттєво не залежить від їх біологічних характеристик, а саме від наявності капсули, розповсюдження пухлинних клітин

Таблиця 2. Вміст метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтази (NOS) в незмінній тканині щитоподібної залози та в папілярних карциномах з різними біологічними характеристиками (M±m)

Тканина	Вміст NO ₂ ⁻ , нмоль/мг білка	Активність, нмоль NO ₂ ⁻ •год ⁻¹ •мг ⁻¹ білка	
		cNOS	iNOS
Незмінена (n=14)	2,63±0,56	7,11±1,19	5,07±0,64
Папілярної карциноми категорії			
T1 (n=7)	5,49±1,19 ***	7,19±1,48	11,28±2,67 ***
T2 (n=11)	4,03±1,36	5,06±1,12	9,93±1,99 ***
T3 (n=22)	3,87±0,61 **	6,95±1,00	13,19±1,88 ***
T4 (n=4)	1,94±0,43	4,02±0,59 *	3,85±0,87
N0 (n=26)	4,20±0,69	6,66±0,91	12,94±1,50 *
N1 (n=18)	3,66±0,64	6,01±0,86	8,87±1,70 *
інкапсульованої (n=15)	4,15±1,08	4,80±0,87	9,57±1,55 *
неінкапсульованої (n=29)	3,85±0,48	7,52±0,85 ***	11,82±1,70 *
без кровоносної інвазії (n=24)	4,15±0,78	5,61±0,76	11,62±1,51 *
з кровоносною інвазією (n=20)	3,77±0,53	7,68±1,07	10,84±1,96 *
без лімфатичної інвазії (n=32)	4,20±0,59	6,49±0,69	12,40±1,42 *
з лімфатичною інвазією (n=12)	3,31±0,77	6,90±1,66	7,92±2,00
без тиреоїдної інвазії (n=27)	3,59±0,55	7,44±0,86	10,68±1,37 *
з тиреоїдною інвазією (n=17)	4,56±0,88	5,25±0,99	12,13±2,27 *
без інвазії у м'які тканини (n=26)	4,00±0,68	5,75±0,71	10,43±1,24 *
з інвазією у м'які тканини (n=18)	3,94±0,65	7,82±1,22	12,51±2,43 *
без фіброзно-склеротичних змін (n=17)	4,41±0,94	6,10±0,76	9,21±1,39 *
з фіброзно-склеротичними змінами (n=27)	3,72±0,53	6,85±0,95	12,47±1,71 *
без некротичних змін (n=18)	3,75±0,53	5,77±0,69	9,75±1,54 *
з некротичними змінами (n=26)	4,32±0,92	7,79±1,25	13,55±1,84*
без тиреоїдиту у позапухлинній тканині (n=30)	4,56±0,66 *	7,11±0,84	12,63±1,45*
з тиреоїдитом у позапухлинній тканині (n=14)	2,75±0,43 ****	5,45±0,99	8,41±1,95 ****

* P < 0,05 щодо незміненої тканини; ** P < 0,05 щодо карциноми категорії T4; *** P < 0,05 щодо інкапсульованої карциноми; **** P < 0,05 щодо карциноми без тиреоїдиту в позапухлинній тканині.

по залозі, метастазів пухлини до лімфовузлів, інвазії до кровоносних чи лімфатичних судин, а також до м'яких тканин, наявності виражених фіброзно-склеротичних чи некротичних змін. Щодо cNOS, то активність, яка відповідає нормі, спостерігається в карциномах з різними біологічними характеристиками, за виключенням інкапсульованих, де вона нижча, ніж у тканині неінкапсульованих. Підвищена активність iNOS, яка зареєстрована у загальній групі пухлин, простежується і в підгрупах; дещо суттєвіше це видно в тканині неінкапсульованих папілярних карцином і карцином категорії N0, в пухлинах, які не інвазують до лімфатичних судин, а також за наявності фіброзно-склеротичних чи некротичних змін, хоча вірогідних змін між групою, де ознака відсутня, і групою, де вона є, не зафіксовано (див. табл. 2). Лише у разі, коли карцинома інвазує до лімфатичних судин, активність ферменту знаходиться на рівні, який встановлений в незмінній тканині.

Зважаючи на участь системи оксиду азоту в механізмах розвитку запальних та автоімунних реакцій, зокрема і в щитоподібній залозі [13], ми проаналізували зміни активності ферментів генерації оксиду азоту та його вмісту в папілярних карциномах залежно від наявності хронічного тиреоїдиту в позапухлинній тканині. Як видно з результатів такого аналізу, вміст оксиду азоту та активність iNOS в тканині карцином за наявності тиреоїдиту в позапухлинній тканині є нижчими порівняно з такими в пухлинах, коли в навколишній тканині він відсутній (див. табл. 2).

В одному з досліджень відмічено, що найбільше зростання експресії iNOS спостерігається у карциномах великих розмірів і в пухлинах хворих старшого (понад 45 років) віку [14]. За нашими результатами активність cNOS та iNOS ніяк не пов'язана з розміром пухлин ($\rho = + 0,02$ і $\rho = - 0,02$ відповідно), а для вмісту оксиду азоту, навпаки, визначений негативний корелятивний зв'язок з ним ($\rho = - 0,33$, $P < 0,02$). Щодо віку хворих, то наші результати підтверджують висновок, що у хворих віком понад 40 років активність iNOS у папілярних карциномах вища, ніж у пухлинах молодших пацієнтів (табл. 3, $\rho = + 0,36$, $P < 0,01$).

Отже, збільшення вмісту оксиду азоту та активності iNOS в папілярних карциномах щитоподібної залози майже не залежить від характеристик їх агресивності, метастатичного та інвазивного потенціалу, розміру пухлини, проте воно відсутнє в пухлинах категорії T4 на фоні зниженої при цьому активності cNOS і менш виражено в пухлинах, які оточені тканиною з хронічним тиреоїдитом. Водночас, розглядаючи залежність стану системи оксиду азоту в папілярних карциномах різної гістологічної будови було підмічено, що в пухлинах папілярної чи фолікулярної будови вміст оксиду азоту не відрізнявся від норми, був трохи вищим у пухлинах солідної чи гетерогенної будови з наявністю солідних ділянок, тоді як в карциномах папілярно-фолікулярної будови він був збільшеним в 2, а в пухлинах солідно-інсулярної будови – в 3 рази (табл. 4). Підвищена активність

Таблиця 3. Вміст метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтази (NOS) в папілярних карциномах хворих різного віку (M±m)

Тканина карцином хворих віком	Вміст NO ₂ ⁻ , нмоль/мг білка	Активність, нмоль NO ₂ ⁻ •год ⁻¹ •мг ⁻¹ білка	
		cNOS	iNOS
до 17 років (n=5)	6,67±2,34	6,68±1,46	9,41±2,10
21-30 років (n=16)	3,31±0,55	5,52±0,98 *	7,99±1,53 *
31-40 років (n=16)	3,40±0,66	5,99±1,05 *	12,38±1,93
понад 40 років (n=7)	5,02±1,53	10,36±1,73	18,60±3,42

Примітка: *P < 0,05 щодо значень у групі хворих віком понад 40 років

Таблиця 4. Вміст метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтази (NOS) в незмінній тканині щитоподібної залози та у папілярних карциномах різної будови (M±m)

Тканина	Вміст NO ₂ ⁻ , нмоль/мг білка	Активність, нмоль NO ₂ ⁻ •год ⁻¹ •мг ⁻¹ білка	
		cNOS	iNOS
Незмінена (n=14)	2,63±0,56	7,11±1,19	5,07±0,64
Папілярної карциноми будови типової папілярної (n=4)	2,21±0,26	6,75±2,62	10,54±2,38 *
фолікулярної (n=4)	2,00±0,38	4,07±1,49	10,99±2,37 *
папілярно-фолікулярної (n=10)	5,32±1,02 ***,***	7,27±1,46	14,67±2,93 *
солідної (n=7)	3,98±1,29	6,00±1,07	6,77±1,54 ****
гетерогенної з солідними ділянками (n=16)	3,54±0,81	6,50±1,24	11,02±1,99 *
солідно-інсулярної (n=3)	8,13±1,95 ****,****,****	10,32±0,74 ****,****,****,****	19,74±3,66 ****

Різниця вірогідно значуща (P<0,05) відносно: * незміненої тканини; ** карциноми папілярної будови; *** карциноми фолікулярної будови; **** карциноми солідної будови; **** карциноми гетерогенної будови з солідними ділянками; **** карциноми папілярно-фолікулярної будови.

iNOS спостерігалася в карциномах різної фолікулярної будови, за виключенням пухлин солідної будови, в яких активність ферменту виявилася на рівні норми, та в карциномах солідно-інсулярної будови, де вона суттєво (як і активність cNOS) вища порівняно з пухлинами іншої будови.

ОБГОВОРЕННЯ

На цей час вже доведено, що оксид азоту є одним з основних медіаторів протипухлинної дії активованих макрофагів [15]. Водночас підвищений вміст оксиду азоту в щитоподібній залозі при наявності пухлини фіксують не стільки в макрофагах, скільки власне в пухлинних клітинах [14, 16-20]. Це підвищення забезпечується збільшенням експресії ферментів синтезу оксиду азоту, більшою мірою iNOS, експресія якого значно посилюється за дії різних патогенних стимулів, зокрема, у відповідь на зростання в пухлинних клітинах вмісту різноманітних цитокинів. Кальцій-залежна cNOS, яка синтезує оксид азоту у фізіологічних концентраціях в дискретному режимі невеликими порціями у ті проміжки часу, коли в синтезуючій клітині підвищу-

ється концентрація Ca²⁺, є менш потужним ферментом, ніж кальційнезалежна iNOS [21].

Дані досліджень дещо різняться і якщо одні свідчать про те, що найвища активність ферментів, які генерують оксид азоту, спостерігається в тканині за тиреоїдиту і менша в пухлинній тканині [18, 19], то інші вказують на неспецифічність щодо тиреоїдної патології активації експресії iNOS [20]. Найчастіше серед новоутворень щитоподібної залози підвищення експресії iNOS відмічають в оксифільноклітинних (100 %), папілярних (до 80 %), анапластичних (до 60 %) карциномах, тоді як в фолікулярних карциномах і аденомах воно зустрічається рідше (до 40 % і 20 % відповідно) [14], що підтверджено іншими дослідниками, які стверджують, що у фолікулярних новоутвореннях експресія iNOS нижча, ніж в папілярних чи анапластичних карциномах [16]. Водночас за деякими даними експресія як cNOS, так і iNOS збільшена саме в фолікулярних аденомах порівняно з папілярними карциномами [18]. Згідно з нашими результатами активність iNOS дійсно дещо вища в папілярних карциномах порівняно з фолікулярними, до того ж активність cNOS в останніх знижена як відносно такої

в нормальній тканині залози, так і порівняно з активністю ферменту в папілярних карциномах (див. табл. 1). Щодо аденом, то, як показано нами раніше, активність iNOS підвищена лише в оксифільноклітинних аденомах щитоподібної залози [9].

Збільшення утворення оксиду азоту може відігравати важливу роль не тільки у злоякісній трансформації тиреоцитів, але і в прогресії пухлин щитоподібної залози, зокрема їх неоваскуляризації, метастазуванні та інвазії [17, 19, 22]. Вважають, що за дії cNOS синтез оксиду азоту насамперед відбувається у судинному ендотелії при дії ендотеліальної NOS (eNOS) [21]. Зважаючи на це, результати наших досліджень щодо відсутності суттєвих змін в активності cNOS в папілярних карциномах не вкладається у висновок, що неоваскуляризація пухлин пов'язана з активацією експресії eNOS [17]. Більше того, в пухлинах категорії T4 активність cNOS навіть нижча за норму. Слід зазначити, що і інші дослідники не встановили суттєвої експресії eNOS в судинах папілярних карцином, натомість в ендотелії перитуморальної зони вона була значно збільшеною [23].

Допускають, що високий вміст оксиду азоту в пухлинній чи в позапухлинній тканинах, особливо за наявності запалення, може підвищувати метастатичний потенціал і сприяти розвитку інвазивних карцином щитоподібної залози [22]. Проте результати наших досліджень свідчать, що ні вміст оксиду азоту, ні активність його синтаз не були пов'язані з такими характеристиками папілярних карцином, як властивість до метастазування та інвазії (див. табл. 2). За наявності хронічного тиреоїдиту в позапухлинній тканині, де система оксиду азоту суттєво активована [8], активність iNOS та вміст оксиду азоту в папілярних карциномах були навіть меншими порівняно з такими при відсутності тиреоїдиту, хоча дійсно відсоток метастатичних та інвазивних карцином за наявності хронічного тиреоїдиту у позапухлинній тканині був вищим, ніж у групі карцином

за відсутності останнього.

Ми не підтвердили думку щодо активації системи генерації оксиду азоту в великих пухлинах, але згідні з висновками, що утворення оксиду азоту відбувається інтенсивніше в папілярних карциномах хворих, старших за 40 років [14]. Відомо, що у пацієнтів з папілярними карциномами щитоподібної залози вік є одним з значимих чинників прогнозу. Цей критерій прийнятий до уваги у Класифікації раку щитоподібної залози за системою TNM (менше і більше ніж 45 років), а також у прогностичних системах AMES (менше і більше ніж 40 років у чоловіків і 45 років у жінок), AGES и MACIS (менше і більше ніж 40 років).

Зважаючи на роль оксиду азоту в процесах апоптозу цікаво було зіставити результати цього дослідження з тими, які були отримані раніше при вивченні деяких біохімічних механізмів реалізації програмованої загибелі клітин. Перше, що привертає увагу – це прогресуюче зниження вмісту оксиду азоту в папілярних карциномах зі збільшенням категорії пухлин (від T1 до T4) та зниження активності iNOS в тканині пухлин категорії T4 порівняно з пухлинами категорії T1-T3. У літературі свідчення про зміни інтенсивності спонтанного апоптозу залежно від стадії розвитку пухлин неоднозначні. Одні вважають, що на початкових етапах канцерогенезу пухлини характеризуються низькою інтенсивністю загибелі трансформованих клітин; вона підвищується разом з посиленням проліферативної активності на стадії прогресії. Інші дослідники відмічають, що зі зростанням розмірів пухлини інтенсивність спонтанного апоптозу знижується. Дані, що були отримані нами при дослідженні активності каспази-3 та трансмембранного потенціалу мітохондрій у папілярних карциномах щитоподібної залози підтверджують останнє [24, 25]. Вони узгоджуються також з тим, що у клітинах пухлин на початкових стадіях канцерогенезу спостерігається високий вміст вільних радикалів (які індукують

мітохондріальні механізми апоптозу [26], що у свою чергу призводить до активації каспази-3), тоді як у термінальну стадію росту пухлин їх концентрація суттєво знижується [27]. Частково це пояснюють наявністю зсуву метаболізму клітини у напрямку гліколізу, що характерно для злоякісних пухлин і посилюється впродовж їх прогресії [28]. Отже, цей фактор активації апоптозу (висока концентрація активних радикалів) у пухлинах на пізніх стадіях їх розвитку вже не відіграє такої важливої ролі. Висока активність iNOS в пухлинах T1-T3, зниження утворення оксиду азоту та його вмісту в папілярних карциномах категорії T4 відносно перших, а також негативний зв'язок між вмістом оксиду азоту та розміром пухлин вкладаються у ці висновки. До того ж встановлено, що оксид азоту бере участь у нітрозилуванні гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, ферменту, що є медіатором TRAL-індукованого апоптозу у пухлинних клітинах. Нижчий вміст оксиду азоту в папілярних карциномах категорії T4 і, отже, зниження транслокації нітрозильованої форми гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази до ядра також може бути причиною гальмування апоптозу клітин в цих пухлинах [29].

Слід відмітити, що активність каспази-3 вища лише в неметастазуючих папілярних карциномах [25]; iNOS також активніша в таких пухлинах. Таким чином, простежується певний зв'язок між змінами в папілярних карциномах інтенсивності генерації оксиду азоту та його вмістом, з одного боку, та змінами активності каспази-3, з іншого. Крім того, в позапухлинній тканині з ознаками інвазії пухлинних клітин активність обох синтаз оксиду азоту та його вміст різко збільшені (див. табл. 1), а трансмембранний потенціал мітохондрій, виділених з таких пухлин, дуже низький [24]. Зазначені факти відповідають усталеній схемі ініціації мітохондріального шляху апоптозу під дією оксидного стресу (компонентом якого є оксид азоту), що призводить до зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій, відкриття мітохон-

дріальних пор, вивільнення проапоптозних факторів і активації каспази-3.

Раніше ми відмічали, що низка показників, які характеризують біохімічні механізми апоптозу в щитоподібній залозі, дещо відрізняються залежно від особливостей її гістологічної будови, зокрема і будови пухлинної тканини. Так, в папілярних карциномах типової папілярної будови активність каспази-3 не відрізнялася від такої у незміненій тканині щитоподібної залози нормофолікулярної будови, тоді як вона була вищою в пухлинах фолікулярно-папілярної будови і нижчою в пухлинах гетерогенної будови з наявністю солідних ділянок [25]. Характер змін вмісту оксиду азоту в папілярних карциномах за таких характеристик їх будови, у цілому, узгоджується з характером змін активності каспази-3: підвищення вмісту оксиду азоту в пухлинах фолікулярно-папілярної будови порівняно з таким у карциномах типової папілярної будови, нижчий вміст оксиду азоту в пухлинах гетерогенної будови з наявністю ділянок солідної будови і низька активність iNOS в карциномах солідної будови. Отже, відсутність активації утворення оксиду азоту та відсутність підвищення його вмісту спостерігається в клітинах менш диференційованих пухлин (солідних чи фолікулярно-папілярних з солідними ділянками), які мають більш агресивний характер, а саме, високу частоту розповсюдження пухлинних клітин по залозі, екстратиреоїдний ріст, лімфатичну та кровеносну інвазію. Таким пухлинам притаманний низький потенціал щодо синтезу тиреоїдних гормонів за рахунок зниження диференціювання клітин та значне послаблення процесів блокування клітинного циклу на стадії переходу до S-фази. Інтенсивність апоптозу в цих пухлинах, з огляду на зазначене вище, може бути зниженою, тоді як підвищення активності каспази-3 та вмісту оксиду азоту в папілярних карциномах фолікулярно-папілярної будови може свідчити про активацію мітохондріальних механізмів апоптозу в карциномах такої будови.

Водночас у папілярних карциномах солідно-інсулярної будови оксид азоту синтезується, навпаки, найінтенсивніше. Папілярні карциноми з наявністю інсулярного компоненту є агресивними, для них характерне частіше екстракапсулярне розповсюдження, наявність метастазів до лімфовузлів і віддалених метастазів, підвищення кількості мітозів. Протилежний характер змін синтезу оксиду азоту в папілярних карциномах різної будови зі зниженою диференціацією пухлинних клітин (солідних чи папілярно-фолікулярно-солідних, а також солідно-інсулярних) свідчить про складність та неоднозначність біохімічних процесів, які відбуваються в клітинах цих пухлин, у т.ч. і за участю оксиду азоту.

Слід відмітити певну невідповідність у деяких випадках між змінами вмісту оксиду азоту та активності iNOS, що може бути пов'язано з участю цієї молекули в різноманітних внутрішньоклітинних реакціях, створенні різних за об'ємом депо, зокрема при включенні оксиду азоту в динітрозилні комплекси із залізом чи в S-нітрозотіоли [1], а також залученням інших шляхів її утворення [30]. Останнє, а саме активація більш потужного нітритредуктазного компонента ланцюга метаболічних перетворень оксиду азоту, може бути причиною суттєвого підвищення його вмісту в метастазах папілярної карциноми на фоні відсутності змін активності синтаз. Цей шлях активується при гіпоксії, за якої утворення оксиду азоту в реакції ферментативного окислення аргініну, що потребує кисень, гальмується [30]. Можливо, що за локальної гіпоксії підвищення вмісту оксиду азоту в метастазах відбувається саме за рахунок прямого відновлення нітриту за наявності гемопротейнів.

Таким чином, система генерації оксиду азоту бере участь у трансформації клітин щитоподібної залози та прогресії пухлинного росту. При цьому характер такої участі різниться в папілярних карциномах щитоподібної залози, які мають різну гістологічну будову, і

пов'язаний з запальними та/чи автоімунними процесами, що відбуваються в залозі.

**Е.В. Калініченко, Т.М. Мишуніна,
Н.Д. Тронько**

АКТИВНОСТЬ СИНТАЗ ОКСИДА АЗОТА И ЕГО КОНЦЕНТРАЦИЯ В ТКАНИ КАРЦИНОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

При исследовании активности конститутивной формы синтазы оксида азота (сNOS) установлено, что в папиллярных карциномах щитовидной железы она отвечает такой в неизменной внеопухоловой ткани, тогда как в фолликулярных карциномах она вдвое меньше. В то же время активность индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) выше как в папиллярных, так и в фолликулярных карциномах. Такие изменения активности ферментов синтеза оксида азота сопровождались повышенным его содержанием в папиллярных карциномах и незначительными изменениями в ткани фолликулярных. В образцах медулярных карцином изученные показатели отвечали таким в неизменной ткани, а в метастазах папиллярной карциномы на фоне отсутствия измененной активности ферментов образования оксида азота содержание его было значительно выше. Повышенное содержание оксида азота и активности iNOS в папиллярных карциномах щитовидной железы существенно не зависят от характеристик их агрессивности, однако такие изменения отсутствуют в опухолях категории T4 на фоне сниженной при этом активности сNOS, и менее выражены в опухолях, которые окружены тканью при наличии в ней хронического тиреоидита. Кроме того, в папиллярных карциномах папиллярного или фолликулярного строения содержание оксида азота не отличалось от нормы, оно было несколько выше в опухолях солидного или гетерогенного строения с наличием солидных участков, тогда как в карциномах папиллярно-фолликулярного строения оно в 2, а в опухолях солидно-инсулярного строения – в 3 раза выше. Повышенную активность iNOS наблюдали в карциномах разного строения, за исключением опухолей солидного строения, в которых активность фермента оказалась на уровне нормы, и в опухолях солидно-инсулярного строения, где она существенно (как и активность сNOS) выше по сравнению с опухолями иного строения. Система генерации оксида азота принимает участие в трансформации клеток щитовидной железы и прогрессии опухолевого роста, в т.ч. через регуляцию апоптоза, что видно из результатов анализа данных, полученных как в рамках выполнения настоящего исследования, так и ранее. При этом характер такого участия в папиллярных карциномах щитовидной железы, имеющих разное гистологическое строение, отличается.

Ключевые слова: оксид азота; конститутивная и индуцибельная синтазы оксида азота; карциномы щитовидной

железы; апоптоз.

**O. V. Kalinichenko, T. M. Myshunina,
M. D. Tron'ko**

NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY AND ITS CONCENTRATION IN THE TISSUES OF HUMAN THYROID CARCINOMAS

The study of the activity of the constitutive form of nitric oxide synthase (cNOS) revealed that in the papillary thyroid carcinomas it corresponded to that detected in unchanged extratumoral tissue, while the enzyme activity in follicular carcinoma was half lesser. At the same time, the activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was higher in the papillary and follicular carcinomas. Such changes in the enzyme activity were associated with an increase in its level in papillary carcinomas, and with minor changes in follicular carcinomas. In medullary carcinomas the parameters under study corresponded to those in unchanged tissue, and in the papillary carcinoma metastases without changes in enzyme activity of nitric oxide formation, the level of the latter was much higher. Elevated levels of nitric oxide and iNOS activity in papillary thyroid carcinomas did not depend significantly on the aggression characteristics of the latter, being however absent in tumors of T4 category on a background of reduced cNOS activity and less expressed in tumors surrounded by the tissue in the presence of a chronic thyroiditis. Furthermore, in the papillary carcinomas of papillary or follicular structure nitric oxide level did not differ from the normal range, being slightly higher in tumors of solid or heterogeneous structure with presence of solid areas, whereas in carcinomas of papillary-follicular structure it was twice, and in tissue of solid-insular structure three times higher. iNOS hyperactivity was observed in the carcinomas of different structure, except for tumors of solid structure, in the tumor of which enzyme activity was within the normal range, and in tumor of solid-insular structure where it was significantly higher (as well as cNOS activity) compared with tumors of other structure. Nitric oxide generating system is involved in the transformation of thyroid cells and progression of tumor growth, including through apoptosis regulation, as shown by the results of an analysis of data obtained both in the present study and previously. The nature of such involvement in papillary thyroid carcinomas with different histological structure is different.

Key words: nitric oxide; constitutive and inducible nitric oxide synthase; thyroid carcinoma; apoptosis.

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS of Ukraine», Kyiv

REFERENCES

1. Burlaka AP, Sydoryk EP. Radical oxygen species and nitric oxide in tumor process. Kyiv: Naycova Dymka, 2006. [Ukrainian].
2. Poderoso J. The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. Arch Biochem Biophys. 2009; 484(2): 214-20.
3. Napoli C, Paolisso G, Casamassimi A, Al-Omran M, Barbieri M, Sommese L, Infante T, Ignarro L. Effects of nitric oxide on cell proliferation. J Amer College of Cardiol. 2013; 62(2): 89-95.
4. Kandor VI. Autoimmune thyroid disease and apoptosis. Probl Endocrinol. 2002; 48(1): 45-8. [Russian].
5. Fortunato R, Ferreira A, Hecht F, Dupuy C, Carvalho D. Sexual dimorphism and thyroid dysfunction: a matter of oxidative stress? J Endocrinol. 2014; 221(2): R31- R40.
6. Bauer J, Frye G, Bahr A, Gieg J, Brofman P. Anti-tumor effects of nitrosylcobalamin against spontaneous tumors in dogs. Invest New Drugs. 2010; 28(5): 694-702.
7. Melisi D, Rosso F, Curcio A, Tortora C, Nieddu M, Marino G, Lettieri M, Grimaldi A, Luongo E, Romano S, Romano M, Boatto G, Abignente E, Barbarisi A, Rimoli M. Galactosyl derivative of N(omega)-nitro-L-arginine: study of antiproliferative activity on human thyroid follicular carcinoma cells. J Cell Physiol. 2009; 221(2): 440-7.
8. Mishunina TM, Kalinichenko OV, Tron'ko MD, Zurnadzhi LYu. Systems for the generation of nitric oxide in the tissues of the thyroid gland with lymphoid infiltration or chronic thyroiditis. J Acad Med Sci Ukraine. 2015; 21(1): 115-21. [Ukrainian].
9. Mishunina TM, Kalinichenko OV, Tron'ko MD, Zurnadzhi LYu. Nitric oxide and enzymes its synthesis in the tissue of the thyroid benign formations. J Acad Med Sci Ukraine. 2015; 21(3): 42-7. [Ukrainian].
10. Kalinichenko OV, Mishunina TM, Tron'ko MD, Zurnadzhi LYu. Level of nitric oxide and its synthases activity in the thyroid tissues of patients with Graves' disease. Endocrin. 2015; 20(3): 582-9. [Ukrainian].
11. Green L, Wagner D, Glogowski J. Analysis of nitrate, nitrite, and ¹⁵N nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982; 126(1): 131-8.
12. Gula NM, Kosyakova GB, Berdyshev AG. Effect of N-sterolethanolamine on the path of NO-synthase generate of nitric oxide in the aorta and heart of rats with diabetes. Ukr Biochem J. 2007; 79(5): 153-8. [Ukrainian].
13. LoFaro M, Fox B, Whatmore J, Winyard P, Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. Nitric Oxide. 2014; 41: 38-47.
14. Kim K, Kim S, Kim S, Back J, Park M, Kim J. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in thyroid neoplasms and their clinicopathological correlation. J Korean Med Sci. 2006; 21(6): 1064-9.
15. Mardente S, Zicari A, Consorti F, Mari E, Di Vito M, Leopizzi M, Della Rocca C, Antonaci A. Cross-talk between NO and HMGB1 in lymphocytic thyroiditis and papillary thyroid cancer. Oncol Rep. 2010; 24(6): 1455-61.
16. Choe W, Kim S, Hwang T, Lee S. Expression of inducible nitric oxide synthase in thyroid neoplasms: immunohistochemical and molecular analysis. Pathol Int. 2003; 53(7): 434-9.
17. Donckier J, Michel L, Delos M, Havaux X, Van Beneden R. Interrelated overexpression of endothelial and induc-

- ible nitric oxide synthases, endothelin-1 and angiogenic factors in human papillary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol (Oxf). 2006; 64(6): 703-10.
18. Nose F, Ichikawa T, Fujiwara M, Okayasu I. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors: significant correlation with inducible nitric oxide synthase. Am J Clin Pathol. 2002; 117(4): 546-51.
 19. Patel A, Fenton C, Terrell R, Powers PA, Dinauer C, Tuttle RM, Francis GL. Nitrotyrosine, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) are increased in thyroid tumors from children and adolescents. J Endocrinol Invest. 2002; 25(8): 675-83.
 20. Kayser L, Francis D, Broholm H. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthase in neoplastic and autoimmune thyroid disorders. APMIS. 2000; 108(11): 785-91.
 21. Förstermann U., Sessa W. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J. 2012; 33(7): 829-37.
 22. Yasuoka H, Kodama R, Hirokawa M, Takamura Y, Miyauchi A, Sanke T, Nakamura Y. CXCR4 expression in papillary thyroid carcinoma: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis. BMC Cancer. 2008; 8: 274.
 23. Scarpino S, D'Alena F, Di Napoli A, Ballarini F, Prat M, Ruco L. Papillary carcinoma of the thyroid: evidence for a role for hepatocyte growth factor (HGF) in promoting tumour angiogenesis. J Pathol. 2003; 199(2):243-50.
 24. Myshunina TM, Kalinichenko OV, Tron'ko MD, Zurnadzhi LYu. Characteristic of changes mitochondrial membrane permeability of papillary thyroid cancer tissue and thyroid tissue in presence of cancer cells invasion. J Acad Med Sci Ukraine. 2010; 16(5): 5-22. [Ukrainian].
 25. Mishunina TM, Kalinichenko OV, Tronko MD., Statsenko OA. Caspase-3 activity in papillary thyroid carcinomas. \ Exp Oncol. 2010. 32(4): 1-4.
 26. Ramsey M, Sharpless N. ROS as a tumor suppressor? Nat Cell Biol 2006; 8: 1213-4.
 27. Baraboy VA. Biooxidants. Kyiv: Knyha plus, 2006. [Russian].
 28. Mishunina TM. Mechanisms, advantages, and consequences of glycolysis activation in tumoral cells. J Acad Med Sci Ukraine. 2009; 15(3): 1-32. [Ukrainian].
 29. Du Z, Wang H, Zhang H, Gao D. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated death of thyroid cancer cells. Endocrinol. 2007; 148(9): 4352-61.
 30. Lundberg J, Weitzberg E. The biological role of nitrate and nitrite: the times they are a-changin'. Nitric Oxide. 2010; 22(2): 61-3.

*Матеріал надійшов
до редакції 17.12.2015*

Особливості регуляції ритму серця при адаптації людини до умов Антарктики

¹В.В. Кальниш, ¹Г.Ю. Пишнов, ²Є.В. Моїсеєнко, ¹В.В. Опанасенко, ¹Л.М. Алексеєва, ¹Л.Г. Висоцька

¹ДУ «Інститут медицини праці НАМН», Київ,

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: getver1@mail.ru

В роботі розглядаються актуальні питання проблеми вивчення механізмів адаптації людини до антарктичних умов, зокрема, особливості регуляції серцево-судинної системи під час експедиційної діяльності на українській станції «Академік Вернадський». Дослідження виконані безпосередньо в Антарктиці за участю зимівників, що протягом року щомісячно обстежувалися методом електрокардіографії. За результатами варіаційного аналізу ритмокардіограми в антарктичних умовах виявлені фазні перебудови регуляції серцевої діяльності у зимівників. Наприклад, середня тривалість RR-інтервалу, що характеризує гуморальну регуляцію (RRNN), має фазну структуру та коливалася в діапазоні $\pm 7-9$ ум. од. спочатку зимівлі, а в останній фазі зростала до -32 ум. од. На активність розвитку стресового стану у зимівників вказує динаміка швидкості функції індексу напруження (IN_u), де з початку зимівлі і до січня вона коливалася в межах $2-5$ ум. од. за модулем, а в місяці, наближені до від'їзду (лютий, березень), сягала до 46 ум.од. Отримані результати поглиблюють розуміння особливостей реалізації резервів регуляції системи кровообігу під час зміни фаз адаптації. Встановлено домінуюче значення фактора часу на якісні перебудови адаптаційних процесів – якщо за показниками варіабельності серцевого ритму у першому півріччі експедиції виявлені збалансовані регуляційні впливи, то наприкінці строку перебування спостерігається зростання активності симпатичного відділу вегетативної нервової системи та напруження регуляторних механізмів, що може свідчити про незавершену адаптацію організму, яка потребує застосування методів корекції функціонального стану.

Ключові слова: антарктичні зимівники; серцева діяльність; варіабельність серцевого ритму; адаптація; українська станція «Академік Вернадський».

ВСТУП

Сучасні глобальні кліматичні зміни надають додаткову гостроту проблемі адаптації людини до впливу надзвичайних умов середовища [1]. Розуміння адаптаційних перебудов функціональних систем організму особливо набуває актуальності при перебуванні людини у полярних і приполярних регіонах, що характеризуються екстремальними впливами цілого комплексу екологічних та побутових факторів [2, 3]. Мінливий і періодичний характер негативного впливу на організм шкідливих чинників довкілля створює підвищений рівень навантаження на функціональні

резерви, що може призводити до раннього виснаження адаптаційної здатності людини [4]. В результаті можуть виникати ознаки психоемоційної лабільності, астенизації, порушень у системі дихання та кровообігу з розвитком своєрідного гіпоксичного стану [5]. Дизадаптаційний симптомокомплекс людини у північних приполярних регіонах дістав назву «синдром полярного напруження», у південних широтах – «антарктичний синдром» [6, 7]. Психоемоційні та нейровегетативні синдромальні прояви у людини в Антарктиці пов'язують із розвитком хронічного стресу, порушеннями функції щитоподібної залози, виникненням гіпоксії, психологічною

© В.В. Кальниш, Г.Ю. Пишнов, Є.В. Моїсеєнко, В.В. Опанасенко, Л.М. Алексеєва, Л.Г. Висоцька

втомою тощо [8, 9]. При цьому відомо, що зрушення в організмі в результаті тривалого перебування в приполярних умовах завжди позначаються на змінах функціонування системи кровообігу та перебудовах центральних механізмів регуляції [10–12].

Відомо, що під час антарктичної експедиції адаптація організму людини до умов високих широт відбувається у режимі певної етапності функціональних перебудов [13]. Залежно від тривалості перебування в Антарктиці вона поділяється на початковий етап, період відносної стабілізації фізіологічних функцій, період адаптації і період дизадаптації або виснаження [14]. Реалізація адаптаційної здатності організму до дії факторів зовнішнього середовища багато в чому завдячує функціональним резервам серцево-судинної системи, якість перебудов якої регулюється центральними та гуморальними механізмами [15, 16]. Проте у вирішенні проблеми вивчення механізмів адаптації людини до тривалої фахової діяльності в Антарктиці бракує саме даних щодо особливостей регуляції роботи серця на етапах адаптації [17, 18].

Пілотні дослідження змін регуляції серцевої діяльності зимівників після перебування в Антарктиці були виконані за допомогою математичного аналізу ритмокардіограм, що дало змогу оцінювати активність регуляторних механізмів серця, зсув нейрогуморальної рівноваги, участь автономної нервової системи та гуморальних впливів на частоту серцевих скорочень, рівень централізації формування ритму в процесі довготривалої адаптації [19, 20].

Мета нашої роботи – з'ясування особливостей регуляції серцевого ритму антарктичних зимівників під час адаптації до умов тривалої фахової діяльності на станції «Академік Вернадський».

МЕТОДИКА

У дослідженні брали участь 11 антарктичних зимівників (чоловіків) української антарктичної станції «Академік Вернадський» віком

27±2,1 років. Для оцінки функціонального стану серця за допомогою спеціального апаратно-програмного комплексу «Ритмограф» у кожного зимівника протягом 12 міс експедиції раз на два дні зранку реєстрували ритмокардіограму у другому стандартному відведенні [21, 22]. Математичний аналіз варіабельності серцевого ритму (BCP) проводили з використанням методів варіаційної пульсометрії та з додатковим розрахунком низки показників, що характеризують статистичні, автокореляційні та спектральні складові регуляції діяльності серця. Визначали такі інтегральні показники: середню тривалість кардіоінтервалів і зворотну величину середньої частоти серцевих скорочень (RRNN); стандартне відхилення повного масиву кардіоінтервалів (SDNN) Розраховувалися також: індекс напруження (ІН), що інформує про активність компенсаторних механізмів організму та рівень функціонування центрального контуру регуляції серцевого ритму; показники сумарної потужності спектра: нормовану потужність спектра низькочастотного компонента (LF_{norm} – відносний рівень активності вазомоторного центру), питому нормовану потужність дихальних хвиль (HF_{norm}), що характеризує активність парасимпатичної ланки автономної нервової системи [23].

Для оцінювання інших рівнів регуляції серцевої діяльності було використано поглиблене дослідження динаміки BCP зимівників, що здійснювалося за допомогою додаткового аналізу. Для опису динаміки окремих показників BCP і згладжування їх випадкових коливань протягом дослідження було застосовано спеціальний прийом, що полягає в апроксимації точок досліджуваного показника за допомогою полінома: $f(t) = b_0 + b_1t + b_2t^2 + b_3t^3 + b_4t^4 + b_5t^5$. Перша похідна цієї функції $-f'(t)$ відображає швидкість процесу, що вивчається та використовується для отримання додаткової інформації про його трансформацію з перебігом часу (t).

Усі розрахунки проводили за допомогою пакета Statistica.7.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами аналізу були побудовані графіки, що відображають сезонні зміни характеристик ВСР. Аналіз RRNN виявив такі її зміни (рис. 1, а).

Навесні (квітень-травень), у сезон прибуття в Антарктиду, значення цього показника становило 890-900 мс. Влітку він знизився до 850-890 мс, а восени повернувся до вихідного рівня - 890-900 мс. Взимку коливання RRNN знаходилися в межах 850-900 мс, а навесні перед від'їздом додому (в березні наступного року) вони були найнижчими (820 мс).

Однофакторний дисперсійний аналіз показував, що дія фактора часу при цьому є вірогідною. Додаткову інформацію, що дає змогу впевнено судити про особливості динаміки функції $RRNN_t$ (де t – час) є її перша похідна, що відображає швидкість процесу. Відомо, що при нульовому її значенні досліджувана функція має локальний максимум.

Аналіз динаміки показника $f'(t)$ RRNN чітко демонструє, що рівень активації організму антарктичних зимівників не є постійним та має фазну структуру (див. рис. 1, б). Тут можна виділити фазу підвищення $f'(t)$ від моменту прибуття на зимівлю (березень) і до червня, фазу зниження $f'(t)$ з липня по листопад і фазу різкого підвищення $f'(t)$ з січня по самий період відбуття зі станції

(березень наступного року). В перших двох фазах $f'(t)$ коливається в діапазоні $\pm 7-9$ ум. од., а в останній фазі зростає до -32 ум.од.

Перша фаза, яку умовно можна назвати фазою «впрацювання», характеризується певним зменшенням RR-інтервалів кардіограми антарктичних зимівників. Така їх трансформація охоплює період від квітня до липня та характеризує деяке підвищення активації організму в початковий період експедиції. Зазначена активація, очевидно, є адекватною пристосувальною реакцією організму антарктичних зимівників до різкої зміни умов життєдіяльності (холодна пора року, полярна ніч, інверсія сезонів року, адаптація до проживання в умовах соціальної депривації, пристосування до досить монотонної діяльності) [24].

Друга фаза, яку умовно можна назвати «стабілізацією адаптації», відображає поступове зниження рівня активації організму, індикатором якого є збільшення RR-інтервалів кардіограми полярників. Однак це збільшення не рівномірне. Спочатку воно досить інтенсивне, сягає свого максимуму приблизно у вересні (про що свідчить локальний підйом першої похідної функції $RRNN_t$). Потім швидкість трансформації RR-інтервалів знижується, а до листопада прояви подовження зникають. Імовірно, саме

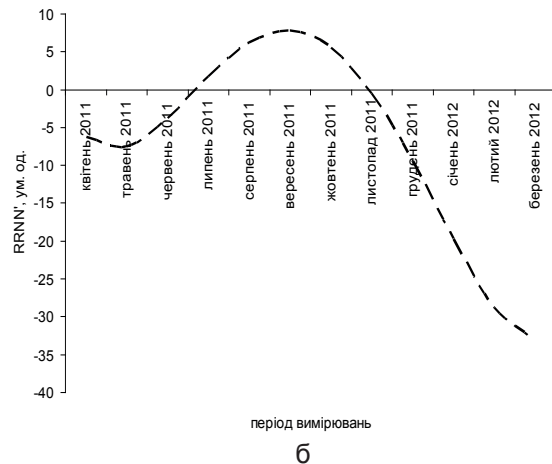
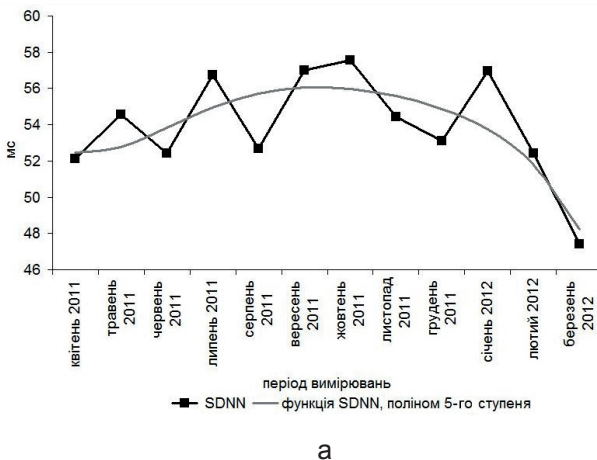


Рис. 1. Динаміка середньої тривалості RR-інтервалів (RRNN) у антарктичних зимівників протягом експедиції. а – середньогрупове значення (емпіричні результати) і його опис за допомогою полінома; б – швидкість його змін

в листопаді, коли полярна зима підходить до завершення, а організм учасників експедиції вже втратив свої фізіологічні резерви, можна говорити про перехід у наступну фазу адаптації до експедиційної діяльності.

Третя фаза, яку можна назвати «напруження механізмів адаптації», характеризується досить інтенсивним скороченням RR-інтервалів (збільшення частоти серцевих скорочень), яке триває до кінця зимівлі (до березня). У цій фазі в організмі антарктичних зимівників активуються фізіологічні процеси, спрямовані на протидію розвитку проявів хронічної втоми. Передумовами такого стану є раніше розглянуті фактори діяльності в умовах зимівлі. Додатковим фактором, що з'являється в цей період, може бути почуття пересичення, яке формується в антарктичних зимівників у результаті монотонної діяльності та тривалого перебування в постійному за своїм складом мікроколективі. Таке пересичення може запускати негативний психологічний механізм, що забезпечує виникнення позитивного зворотного зв'язку, коли відчуття пересичення викликає тільки його посилення при подальшому перебуванні на станції.

Таким чином, можна констатувати, що динаміка RRNN віддзеркалює напруження адаптації в симпатoadреналовій ланці авто-

номної нервової системи людини до нових умов життєдіяльності в Антарктиці. Більш різкі зміни останньої фази RRNN, очевидно, зумовлені сумацією ефектів настання полярного дня та мобілізацією психічних процесів в організмі полярників у зв'язку з підготовкою до від'їзду з експедиції. Як видно, навіть аналіз тільки одного показника серцевого ритму – зміни RRNN надає цінну інформацію про процеси адаптації зимівників, що відбуваються в їх організмі. Виділені три фази адаптації якоюсь мірою є аналогами класичних фаз розвитку неспецифічної адаптації: «мобілізації», «стійкості» і «виснаження».

Додаткові дані про зміну функціонального стану учасників антарктичної експедиції дає значення SDNN, що відображає сумарний ефект вегетативної регуляції кровообігу, а також перша похідна функції SDNN_t (рис. 2, а), що характеризує швидкість змін перебудови ритму (див. рис. 2,б). Як видно з рисунка, вона має нелінійний характер. Однофакторний дисперсійний аналіз цієї функції показав суттєвий вплив фактора часу на зміни SDNN_t ($P < 0,05$). У період з початку зимівлі до вересня функція SDNN_t підвищується і вказує на поступове поліпшення регуляції серцево-судинної системи. Потім до кінця зимівлі спостерігається спочатку повільне, а далі достатньо різке зниження активності цієї

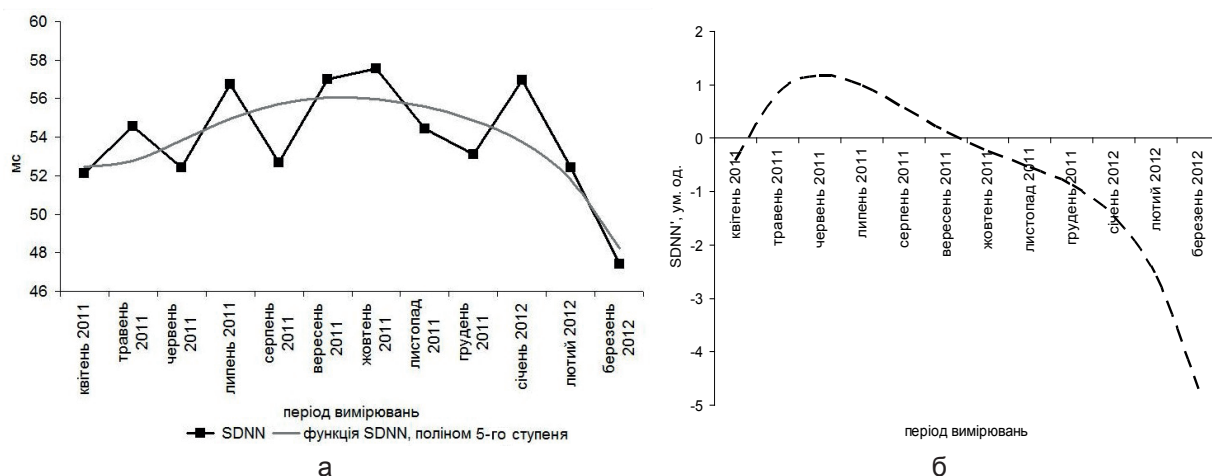


Рис.2. Динаміка стандартного відхилення кардіоінтервалів (SDNN) у антарктичних зимівників протягом експедиції. а – середньогрупове значення SDNN (емпіричні результати) і його опис за допомогою полінома; б – швидкість його змін

регуляції. Перша похідна функції $SDNN_t$ дає змогу визначити, що найбільша швидкість поліпшення сумарного ефекту вегетативної регуляції кровообігу проявляється в липні, а починаючи з січня, вона значно зменшується.

Зона переходу від поліпшення до погіршення ефекту вегетативної регуляції кровообігу охоплює вересень і жовтень, тобто весняні місяці в Південній півкулі та збігається з зоною максимального зниження активації організму зимівників (див. рис. 1, а). Наявність такого феномена може свідчити про поступове вичерпання фізіологічних резервів організму учасників експедиції (перехід від поліпшення до погіршення показників вегетативної регуляції) відбувається на фоні інтенсивного зниження активації фізіологічних процесів у їхньому організмі, що спостерігається у фазі «стабілізації адаптації». Іншими словами, негативні компоненти порушення адекватної адаптації та розвитку хронічного стомлення починають поволі проявлятися вже у вересні, коли швидкість зниження активації фізіологічних процесів поступово зменшується.

Уточнення механізмів адаптації організму учасників експедиції до професійної діяльності на станції «Академік Вернадський» можна отримати при аналізі динаміки ІН,

що віддзеркалює рівень переваги активності центральних механізмів регуляції ритму серця над автономними. Графіки функції IN_t і її першої похідної представлено на рис. 3, а, б.

Аналіз цієї інформації дає можливість констатувати, що досить низький рівень централізації керування ритмом серця залишається більш-менш постійним протягом майже всієї зимівлі. Однак у період грудень – січень (літній місяць для Південної півкулі) спостерігається досить швидке зростання значень ІН, що свідчить про корінну перебудову механізмів адаптації на кінцевому етапі експедиції. Виражену активність розвитку стресового стану у зимівників, що пов'язаний із психологічною установкою на близькість закінчення експедиції, особливо демонструє динаміка швидкості функції IN_t (див. рис. 3, б), де з початку зимівлі і до січня швидкість коливалася в межах 2-5 ум. од. за модулем, а в місяці, наближені до від'їзду (лютий, березень), вона сягає 46 ум.од.

Якщо проаналізувати весь представлений матеріал, то можна відмітити, що значне підвищення IN_t спостерігається у фазу «напруження механізмів адаптації», яка характеризується збільшенням активації фізіологічних функцій організму зимівників, швидкості зміни цієї активації, а також до-

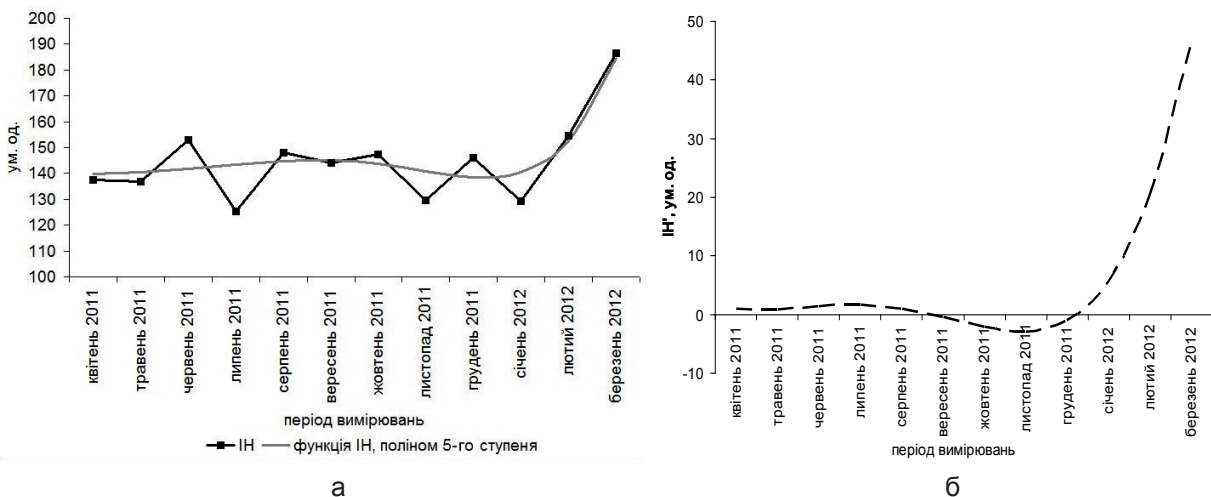


Рис.3. Динаміка індексу напруження (ІН) у антарктичних зимівників протягом експедиції. а – середньогрупове значення ІН (емпіричні результати) і його опис за допомогою полінома. б – швидкість його змін

статньо інтенсивним погіршенням вегетативної регуляції кровообігу. Все це свідчить про розвиток хронічного напруження та хронічного стомлення зимівників у завершальний період експедиції (грудень – березень), що супроводжується значною активацією механізмів адаптації до умов Антарктики.

Подальше уточнення трансформації функціонального стану зимівників у процесі експедиції лежить у площині аналізу активності симпатичної та парасимпатичної ланки автономної нервової системи. Відображає активність симпатичної нервової системи нормований показник сумарної потужності спектра – LF. Незважаючи на слабо виражений коливальний характер змін LF, можна відзначити основну тенденцію його трансформації – близьке до лінійного підвищення його значень в процесі зимівлі, що свідчить про постійне зростання активності симпатичної ланки автономної нервової системи із квітня до березня наступного року (рис. 4, а).

Однофакторний дисперсійний аналіз представлених результатів показав суттєвий вплив фактора часу на активність симпатичної нервової системи ($P < 0,05$). Фізіологічно таке збільшення активності вазомоторного центру можна інтерпретувати як уповільнення часу прийняття та переробки інформації в

ньому, яке супроводжує формування хронічної втоми.

Відомо, що адаптація організму до впливу зовнішніх факторів забезпечується скоординованими між собою спеціалізованими функціональними системами організму, а також певним рівнем внутрішньосистемних кореляційних взаємозв'язків для підтримки гомеостазу. У літературі зміни вегетативного балансу у вигляді активації симпатичної ланки розглядаються як неспецифічний компонент адаптаційної реакції у відповідь на різні стресові впливи, що певною мірою пояснює отримані нами результати.

На виражену активність парасимпатичної ланки автономної нервової системи вказує HF, що представляє сумарну потужність високочастотної зони спектра ВСР. Динаміку цього показника також можна, в основному, описати лінійною функцією (див. рис. 4, б).

Однофакторний дисперсійний аналіз показав відчутний вплив фактора часу на активність парасимпатичного відділу ($P < 0,05$). Причому, як видно з представленого рисунка, починаючи з першого місяця зимівлі, активність парасимпатичної ланки закономірно знижується. Значне зниження сумарної потужності дихальних хвиль свідчить про централізацію керування ритмом серця че-

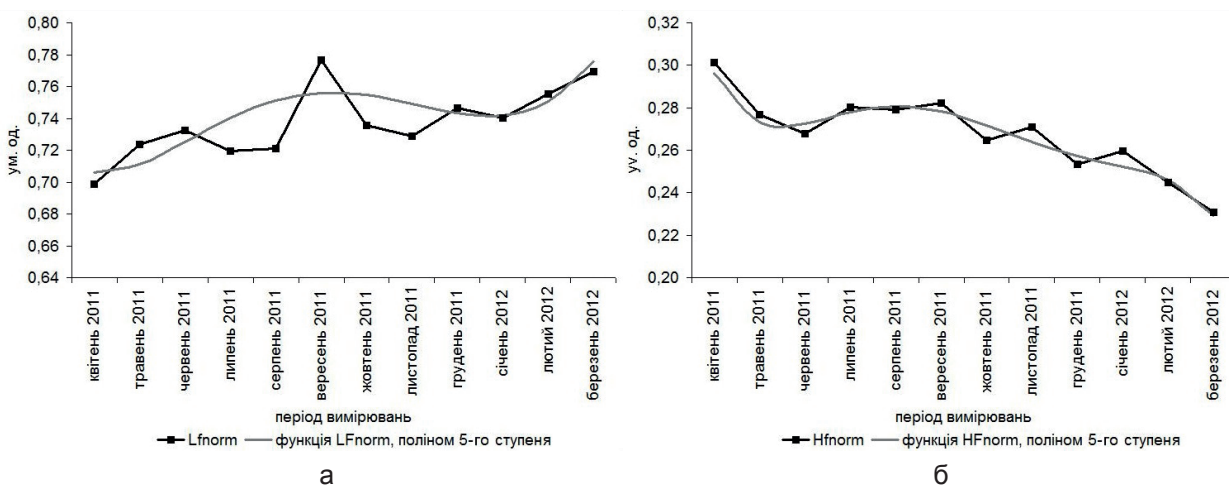


Рис.4. Динаміка показників потужності спектра хвиль варіабельності серцевого ритму у низькочастотному (LF) і високочастотному (HF) діапазонах у антарктичних зимівників протягом експедиції: а – середньогрупові значення LF; б – середньогрупові значення HF

рез залучення до процесу керування вищих відділів мозкових структур.

Відзначений феномен трансформації активності симпатичної та парасимпатичної ланки автономної нервової системи співвідноситься зі змінами сумарного ефекту вегетативної регуляції кровообігу (див. рис.2, а). Виходячи з отриманих результатів, можна спробувати пояснити достатньо складну динаміку цієї регуляції. Так, у першу половину зимівлі (до вересня) $SDNN_t$ зростає внаслідок значного підвищення активності симпатичної та поступового зниження парасимпатичної ланки. Надалі активність автономної нервової системи стабілізується з тенденцією зниження парасимпатичної ланки, що призводить до зменшення сумарної активності вегетативної регуляції кровообігу до кінця зимівлі.

Слід відзначити, що проведені тривалі дослідження змін серцевого ритму в осіб, що перебувають на Антарктичній станції, досить унікальні, оскільки в літературі не часто зустрічаються дані тривалої (протягом року) реєстрації серцевого ритму у однорідної групи осіб середнього віку. При цьому були виключені впливи багатьох соціальних факторів, які наявні при проведенні досліджень у звичайних умовах. Крім того, перебування в експедиції призводить до зрівняння у всіх зимівників режимів праці та відпочинку, дієти, умов проживання тощо. У цьому сенсі отримані матеріали можна вважати достатньо однорідними. З іншого боку, важко підібрати аналоги проведеного дослідження, що зареєстровані на інших контингентах обстежуваних.

Відомо, що серцево-судинна система є однією з основних «слабких» ланок, яка гостро реагує на стресові впливи. Контингент зимівників, насамперед, піддається дії факторів часу та монотонії або однорідності життєдіяльності, що спричинює виникнення функціонального напруження регуляторних систем організму. Найбільш вигідним для рішення завдання вивчення впливу цих факторів є аналіз динаміки показників ВСР, які

першими включаються в процеси адаптації організму.

Для порівняння трансформації показників серцевого ритму з отриманими в цій роботі результатами, очевидно, у першому наближенні можна використовувати дані умов тривалого космічного польоту, де крім перелічених стрес-факторів додатково діє фактор невагомості [25]. Автори показали, що основна динаміка показників вегетативної регуляції кровообігу внаслідок тривалого перебування в невагомості, може бути описана такими положеннями. Під дією фактора часу (наприкінці польоту) відбувається зсув вегетативного балансу у бік посилення активності симпатичної ланки регуляції порівняно зі станом при одномісячному польоті, що підтверджується збільшенням частоти пульсу (на 11% від початкового рівня), зменшенням ВСР (на 30%), зростанням ІН (на 88%). Можливою причиною зазначеного зсуву вегетативного балансу, як зазначають автори, є активація вищих вегетативних центрів. Система регуляції в цей період перебуває в стані функціонального напруження, а новий рівень серцево-судинного гомеостазу закріплюється за допомогою формування нової функціональної системи регуляції автономною нервовою системою.

Звичайно, у разі розгляду фізіологічних показників у зимівників, схожий ефект спостерігається тільки в кінці експедиції, що можна пояснити відсутністю дії на них такого потужного стрес-фактора, як невагомість. Незважаючи на це тотожність зсувів у показниках регуляції ритму серця, ймовірно, може свідчити про певну тотожність механізмів адаптації в обох випадках.

Таким чином, антарктичні умови, як екстремальні для організму людини, дали змогу яскраво продемонструвати тісний зв'язок між регуляторними системами адаптації ЦНС і одним з найважливіших ефекторів життєзабезпечення організму людини - серцево-судинної системи. Результати дослідження показників ВСР свідчать про те, що протягом

перебування полярників в Антарктиці спостерігається зростання активності симпатичної та зниження активності парасимпатичної ланки автономної нервової системи, що приводить до значного напруження регуляторних механізмів.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що під час річної експедиції на станції «Академік Вернадський» перебудови регуляції ритму серця антарктичних зимівників (за RRNN) характеризуються певними флуктуаціями посилення регуляторного напруження симпатoadреналової ланки. За результатами однофакторного дисперсійного аналізу встановлено домінуюче значення фактора часу на якісні перебудови адаптаційних процесів. В результаті виявлено фазні зміни регуляції серцевого ритму, які певною мірою відповідають класичним етапам розвитку процесів неспецифічної адаптації але зі значним подовженням тривалості: «мобілізації», «стійкості» і «виснаження», що розвивається протягом року експедиційної діяльності.

2. Динаміка ВСР має суттєво нелінійний характер. На початку і до середини зимівлі (до вересня) вона зростає, що вказує на поступове поліпшення збалансованості автономної регуляції кровообігу, але у другій половині року перебування в експедиції спостерігається спочатку повільне, а наприкінці зимівлі достатньо різке порушення регуляційної рівноваги.

3. Встановлено, що у завершальний період експедиції (грудень – березень) регуляція ритму серця антарктичних зимівників відбувається на фоні значного підвищення рівня ІН і такі зміни збігаються з проявами погіршення вегетативної регуляції кровообігу, що супроводжується виснаженням механізмів адаптації і потребує застосування методів корекції.

4. Спрямована трансформація активності симпатичної та парасимпатичної ланки автономної нервової системи збігається зі

змінами сумарного ефекту вегетативної регуляції кровообігу, що дає змогу пояснити його досить складну динаміку. У першу половину зимівлі виявлено значне підвищення діяльності симпатичної ланки автономної нервової системи та поступового зниження парасимпатичної. Протягом зимівлі відбувається поступове зниження активності парасимпатичної ланки, що приводить до зниження сумарної активності вегетативної регуляції кровообігу до кінця зимівлі та може свідчити про наявність незавершеної адаптації організму до умов Антарктики.

¹В.В. Кальниш, ¹Г.Ю. Пышнов, ²Є.В. Моїсеєнко, ¹В.В. Опанасенко, ¹Л.М. Алексеева, ¹Л.Г. Высоцкая

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ РИТМА СЕРДЦА ПРИ АДАПТАЦИИ ЧЕЛОВЕКА К УСЛОВИЯМ АНТАРКТИКИ

В работе рассматриваются актуальные вопросы изучения механизмов адаптации человека к антарктическим условиям, в частности, особенностей регуляции сердечно-сосудистой системы в ходе экспедиционной деятельности на украинской антарктической станции «Академик Вернадский». Исследования выполнены непосредственно в Антарктиде при участии зимовщиков, которые на протяжении года ежемесячно обследовались методом электрокардиографии. По результатам вариационного анализа сердечного ритма в антарктических условиях выявлены некоторые особенности перестройки регуляции ритма сердца зимовщиков. В частности, показатель средней продолжительности RR-интервалов, который характеризует гуморальную регуляцию (RRNN), имеет фазную структуру и колеблется в диапазоне $\pm 7-9$ усл.ед. от начала зимовки, а в последней фазе увеличивается до -32 усл.ед. Активность развития стрессового состояния у зимовщиков отражает динамика скорости функции индекса напряженности ($ИН_1$), которая с начала зимовки и до ее завершения колебалась в пределах 2-5 усл.ед. по модулю, а в месяцы перед возвращением (февраль, март), скорость достигала 46 усл.ед. Полученные результаты расширяют понимание особенностей реализации резервов регуляции системы кровообращения в ходе изменений фаз адаптации. Установлено доминирующее значение фактора времени во влиянии на качественные перестройки адаптационных процессов – если по показателям вариабельности сердечного ритма в первом полугодии экспедиции выявлены сбалансированные регуляционные влияния, то в конце срока пребывания наблюдается возрастание активности симпатического отдела вегетативной нервной системы

и напряжение регуляторных механизмов, что может быть признаком незавершенной адаптации, которая требует применения методов коррекции функционального состояния.

Ключевые слова: антарктические зимовики; сердечная деятельность; вариабельность сердечного ритма; адаптация; украинская станция «Академик Вернадский».

¹V.V. Kalnish, G. Yu. ¹Pyshnov, ²E.V. Moiseyenko,
¹V.V. Opanasenko, ¹L.M. Alekseyeva,
¹L.G. Vysotska

HEART RATE REGULATION DURING ADAPTATION TO CONDITIONS IN ANTARCTICA

The article deals with topical issues of the problem of studying the mechanisms of human adaptation to Antarctic conditions, in particular, the characteristics of the restructuring regulation of cardiovascular system during expedition activity at the Ukrainian Antarctic Station «Academic Vernadsky». The studies were performed directly in Antarctica with the participation of winterers, who during a year were surveyed monthly by cardiointervalography and ECG. As a result of analysis of variance of heart rate in Antarctic conditions we identified the phasic restructuring of the regulation of heart rhythm of winterers. The findings extend the understanding of the peculiarities of realization of regulating the circulatory system during the change of adaptation phases. In particular, the RRNN index has a phasic structure and ranges $\pm 7-9$ c.u. from the beginning of wintering, and in the last phase is increased to -32 c.u. The activity of the development of stress condition among winterers reflects the dynamics of changes in the rate IN_t function, which from the beginning of wintering till January ranged from 2-5 c.u. by modulo, and in the months before the return (February, March), the rate reached 46 c.u. It is established a dominant role of the time factor in influencing the quality adjustment of adaptation processes. While during the first half of the expedition heart rate variability had a balanced regulatory influence, at the end of the expedition an increased activity of the sympathetic division of the autonomic nervous system and stress regulatory mechanisms were observed. This may indicate for incomplete adaptation that requires the application of methods of correction of functional state.

Key words: Antarctic winterers; cardiac activity; heart rate variability; adaptation; Ukrainian Antarctic Station «Academic Vernadsky».

¹State Institution Institute for Occupational Health of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;
²O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

REFERENCES

1. Krivoshchekov S, Leutin V, Divert V, Divert G, Platonov Y et al. Systemic mechanisms of adaptation and compensa-

- tion. *Bul SB RAMS*. 2004;2:148-54. [Russian].
2. Moiseenko E, Milinevsky G, Pishnov G. Social and psychological conditions at the Antarctic stations and their impact on the health of members of the expedition. *Proceedings of the Institute of Psychology*. GS Kostyuk APN Ukraine ed. Maksimenko SD.K. 2003;7(1): 286-94. [Ukrainian].
3. Ilyn V, Chernous S, Milinevsky G, Moiseenko E. The heart rhythm variation analysis at Auroral disturbances in the polar regions. *Bul Ukr Antarct Centre. Release 4*, Kiyv. 2002:212-6. [Ukrainian].
4. Moiseenko E. Disadaptation mechanisms and complex pathogenetic correction of functional systems of humans in Antarctica. [dissertation]. Kyiv: Inst Physiol. NAS. 2008. [Ukrainian]
5. Krivoshchekov S, Osipov V. Changes thermoregulation and respiratory systems in humans with adaptation to cold. *Hum. Physiol*. 1993;19(2):125-31. [Russian].
6. Kaznacheev V. "Polar tension syndrome" and some of the questions of human ecology at high latitudes. *Bul USSR*. 1980;1:74-83. [Russian].
7. Catalano F. Modern Technologies and New Perspectives for Antarctic Medicine. 2nd Italian workshop on "Human adaptation in Antarctica and extreme environments", Leghorn, Naval Academy. 2001 September 24:133-4.
8. Bozhko AP, Gorodetskaya IV. The significance of the thyroid status of the body in the implementation of the cold adaptation effect. *I.M. Sechenov's Physiol* 1994;80(3):28-37. [Russian].
9. Dygai A, Goldberg E. Humoral mechanisms of regulation of erythropoiesis in hypoxia. *Bul of Experimental Biol and Med*. 2005;139(2):133-7. [Russian].
10. Divert G., Disregulatory pathology. Edited by. Kryzhanovsky G. Moscow: Medicine. 2002. [Russian].
11. Moiseenko E. The functional state of the human circulatory system for the transatlantic flight conditions. *Act Probl Transport Med*. 2007;3(9):47-52. [Ukrainian].
12. Moiseenko E, Lyaschuk A, Trushin O, Gershun N. The influence of infrasound on circulatory function of winterers in the Antarctic Station "Academician Vernadsky". Abstracts of the VII-th International Antarctic Conference "Antarctic research: new horizons and priorities." VII MAC 2015 - Kyiv, Ukraine. Kyiv: 2015. May; 14:176-8. [Ukrainian].
13. Vasilevsky N, Soroko S, Bogoslovsky M. Psychophysiological aspects of human adaptation in Antarctica. Leningrad: Medicine. 1978. [Russian].
14. Moiseenko E. Features adaptation rights for terms Antarctic. *Sci and educat*. 2014;8:133-37. [Ukrainian].
15. Moiseenko E, Kachalin I, Yashchuk A, Lastovchenko V, Pishnov G, Demchenko M. Peculiarities of adjustment of physiological functions of human in Antarctic conditions. Abstracts of symposium "Peculiarities of the formation and establishment of physiological functions in ontogenesis" Publisher of CSU. Kyiv, Cherkasy; 2003. [Ukrainian].
16. Chernouss S, Ilyin V, Milinevsky G, Moiseenko Y. Heart

- rate variability parameters in variations at geomagnetic disturbances in Arctic and Antarctic regions. Physics of Auroral Phenomena. Proc. XXV Annual Seminar, Apatity. 2002:157–60.
17. Soroko S. Redevelopment of integrative mechanisms of regulation of physiological functions of the human body in experimental and high-altitude hypoxia. Problems: molecular, physiological and medical aspects: Edited by Lukyanov D and Ushakov I. - Moscow, Voronezh: Publishing house "Istoki". 2004:201-44. [Russian].
 18. Cenni P, Peri A, Barbieri F, Suzzi E, Tuozzi G, Tonucci R, Berriozzi F, Zucconi S. The Psychophysiological Adaptation in Members of the 15th Italian Expedition in Antarctica. 2nd Italian workshop on "Human adaptation in Antarctica and extreme environments", Leghorn, Naval Academy. 2001 September 24:78–85.
 19. The analysis of heart rate variability using different electrocardiographic systems: Method. Recommendations. Baevsky R. et al. Moscow. 2002. [Russian].
 20. Zyuz'kov G, Iznak A, Zhurulevskaya S, Gorbachev N. EEG correlates of "soft" disorders of higher cortical functions. Hum physiol 2001;27(1):5-8. [Russian].
 21. Cochina M, Kaminsky A. Computer rhythmograph. Radio engineering. 2010;160:263-7. [Russian].
 22. Cochina M, Kaminsky A, Malenkin V. Information technology forecasting the functional state of the cardiovascular system. Cybernet and Compu Sci. 2012;170:15-27. [Russian].
 23. Baevsky R. Heart rate variability: theoretical aspects and practical application. Proc rep IV All-Russia Symp Executive Editor Shlyk N. UdSU. Izhevsk. 2008:344. [Russian].
 24. Lastovchenko V, Moiseenko E, Pishnov G. Psychophysiological indicators as criteria of fatigue in the professional activity of man in Antarctica. Labor hygiene: Anniversary Collection of the Institute of Occupational Medicine (the 75th anniversary). 2003;34(2):621-33. [Ukrainian].
 25. Breus T, Chibisov S, Baevsky R, Shebzukhov K. Chronostructure of heart rhythms and environmental factors. Monograph. Moscow. Publisher of Russian Nations Friendship University. Polygraph service. 2002:232. [Russian].

*Матеріал надійшов
до редакції 12.08.2015*

Зовнішньосекреторна функція печінки щурів при дії корвітину

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

¹Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, ²ЗАТ НВЦ «Бориспільський ХФЗ»,
e-mail: shtanova@ukr.net

У гострих дослідях на щурах з канюльованою жовчною протокою вивчали вплив корвітину – водорозчинного аналога кверцетину, на жовчосекреторну функцію печінки. Внутрішньопортальне введення досліджуваної сполуки в дозах 2,5; 5 і 10 мг/кг зумовлювало вірогідне порівняно з контролем збільшення об'єму секретованої жовчі на 20,9, 31,2 і 20,4% відповідно. Методом тонкошарової хроматографії встановлено помірний стимулювальний вплив корвітину на процеси кон'югації жовчних кислот з таурином і гліцином, особливо при введенні його в дозі 5 мг/кг. Цей флавоноїд не впливав на концентрацію глікохолової кислоти, проте збільшував вміст глікохенодезоксихолової і глікодезоксихолової кислот у суміші в усіх дослідних групах тварин від 15 до 35,1%. Щодо вільних жовчних кислот, то концентрація холової кислоти, хенодезоксихолової і дезоксихолової кислот у суміші збільшувалася відносно контролю лише після введення 10 мг/кг препарату. В першому випадку – від 17,9 до 29,8%, у другому – від 25,0 до 65,4%. У дозі 5 мг/кг корвітин вірогідно збільшував коефіцієнт кон'югації холатів жовчі (максимально – на 23,2%), тоді як при 10 мг/кг препарату цей показник зменшувався (до 27%). Коефіцієнт гідроксилювання децю відрізнявся від контролю при дозі препарату 5 і 10 мг/кг: лише в одній пробі було виявлено його зменшення відносно контролю на 14,0%. Отже, корвітин модулює зовнішньосекреторну функцію печінки, зумовлюючи збільшення секреції жовчі та концентрацію в ній різних холатів, залежно від дози збільшуючи чи зменшуючи ефективність роботи поліферментних систем, які забезпечують процеси кон'югації жовчних кислот у щурів.

Ключові слова: корвітин; печінка; жовч; секреція жовчі; жовчні кислоти; кон'югація і гідроксилювання холатів.

ВСТУП

Печінка – найбільша залоза нашого організму, яка відіграє провідну роль у забезпеченні метаболічних процесів. Більшість синтетичних процесів у ній відбувається за інтенсифікації тканинного дихання. Однією з основних функцій печінки є утворення жовчі з холестерину. Синтез жовчних кислот є одним із шляхів перетворення і виведення останнього з організму [1]. Жовчні кислоти і їх солі визначають основні властивості жовчі як травного секрету, який виконує низку важливих функцій, зокрема, активує ферменти підшлункового і кишкового соків, головним

чином ліпазу, емульгує жири, прискорюючи, таким чином, їх перетравлювання, сприяє розчиненню жирних кислот, зумовлюючи краще їх всмоктування, посилює моторну функцію кишечника, активує секрецію підшлункової залози, гальмує розвиток мікробів, затримуючи процеси гниття в кишечнику [1]. Незважаючи на здатність печінки до регенерації, тривалий вплив шкідливих факторів навколишнього середовища, стресів, алкоголю, тютюну, синтетичних ліків тощо може загальмувати, а можливо й значно ослабити її захисні механізми. Останнім часом спостерігається зацікавлення вчених та кліні-

цистів щодо пошуку гепатопротекторних властивостей різних натуральних сполук, фармакологічні властивості яких поєднувалися б із відсутністю токсичності, шкідливої побічної дії на організм та були відносно недорогими. Основою багатьох трав'яних екстрактів та настоїв, що традиційно використовуються для профілактики і лікування захворювань печінки, є природний біофлавоноїд кверцетин. Результати досліджень, проведених *in vitro*, свідчать про різні його біологічні ефекти, зокрема протизапальний, антиоксидантний та судинорозширювальний [2]. Завдяки таким властивостям кверцетин успішно застосовується при хворобах печінки, покращуючи біомаркери тканини цього органу при ураженнях різного характеру [3, 4], а його екстракти, одержані з лікарських рослин, мають виражену гепатопротекторну й жовчогінну дію та впливають на склад жовчі [5, 6]. Як і більшість флавоноїдів, кверцетин має низьку біодоступність для організму, що обмежує вивчення особливостей його ефектів *in vivo*. Проте, саме такі умови дають змогу з'ясувати механізми дії сполуки на макроорганному рівні [7]. У своїх попередніх дослідженнях ми використали водорозчинний аналог кверцетину – корвітин і виявили, що він при внутрішньопортальному введенні істотно збільшує швидкість тканинного кровотоку в печінці щурів [8].

Метою цієї роботи було дослідити дію корвітину на зовнішньосекреторну функцію печінки, зокрема на швидкість секреції жовчі та співвідношення в ній різних холатів.

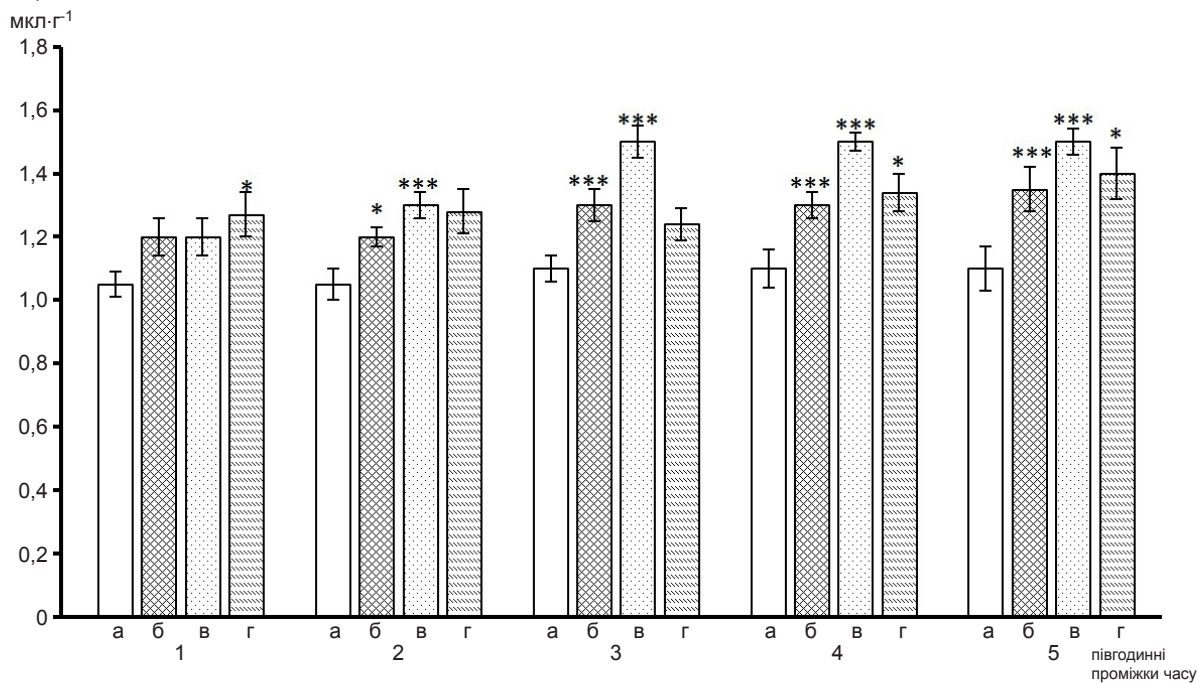
МЕТОДИКА

Дослідження проводили в гострих дослідах на білих щурах-самцях масою 186-280 г згідно з існуючими міжнародними вимогами і нормами гуманного ставлення до тварин (Страсбург, 1986 р., Закон України від 21.02.2006 р., №3447-IV). Перед дослідом щури голодували впродовж 18 год. Їх наркотизували внутрішньоочеревинним введенням

тіопенталу натрію (60 мг/кг). Тварин розподілили на чотири групи: I – контрольна, II, III і IV – дослідні. Після лапаротомії у відпрепаровану жовчну протоку через надріз її стінки вводили канюлю, яку з'єднували з мікропіпеткою. Реєстрацію об'ємної швидкості секреції жовчі розпочинали через 0,5 год після канюлювання загальної жовчної протоки і визначали кожні 10 хв впродовж 3 год досліду. За одиницю, що характеризує секреторну функцію печінки, вважали швидкість секреції жовчі, яку розраховували за об'ємом жовчі, що секретувалася протягом 1 хв відносно 1 г маси тіла. Після 1-ї півгодинної проби жовчі щурам у ворітну вену болюсно вводили: в групі I – фізіологічний розчин (1 мл/кг), а в групах II, III і IV – відповідний об'єм розчину корвітину в дозах 2,5; 5 і 10 мг/кг. У зібраних впродовж досліду 5-ти зразках печінкового секрету визначали вміст жовчних кислот: кон'юговані таурохолеву (ТХК), таурохенодезоксихолеву і тауродезоксихолеву в суміші (ТХДХК і ТДХК), глікохолеву (ГХК), глікохенодезоксихолеву і глікодезоксихолеву в суміші (ГХДХК і ГДХК), а також вільні – холеву (ХК) та хенодезоксихолеву і дезоксихолеву в суміші (ХДХК і ДХК) [9]. Чутливість методу – 1-3 мкг органічного компонента в пробі. Концентрацію кожного із зазначених холатів порівнювали зі значеннями вмісту відповідної жовчної кислоти у такій самій півгодинній пробі контрольної групи. Фракції жовчних кислот ідентифікували за допомогою відповідних стандартних препаратів та флуоресценції в ультрафіолетовому діапазоні при активації сірчаною кислотою. Холати розділялися таким чином: таурокон'югати, а саме ТХК, суміш ТХДХ і ТДХК; глікокон'югати, а саме ГХК, суміш ГХДХК і ГДХК; вільні холати, а саме ХК, суміш ХДХК і ДХК. Для кількісного визначення вмісту жовчних кислот хроматограми попередньо обпирскували фарбниками: 15 мл льодяної оцтової кислоти, 1 г фосфорномолібденової кислоти, 1 мл сірчаної кислоти 50%-го розчину трихлороцтової кислоти та

проявляли при 60-70°C впродовж 5 хв, а далі визначали вміст холатів на денситометрі ДО-1м ($\lambda=620\text{nm}$). Чутливість методу – 0,25-0,35 мкг жовчної кислоти в пробі. Коефіцієнт кон'югації розраховували як співвідношення сумарних кон'югованих (сума концентрацій ТХК, ТХДХК і ТДХК, ГХК, ГХДХК і ГДХК) до сумарних вільних жовчних кислот (сума концентрацій ХК, ХДХК і ДХК). Коефіцієнт гідроксилювання представлено як співвідношення сумарних триоксихоланових (сума концентрацій ТХК, ГХК, ХК) до сумарних диоксихоланових (ТХДХК і ТДХК, ГХДХК і ГДХК, ХДХК і ДХК) жовчних кислот.

Статистичну обробку результатів проводили за пакетом програм STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, США). Нормальність розподілу оцінювали за тестом Шапіро-Уїлка. Для оцінки значущих відмінностей між вибірками з нормальним розподілом результатів використовували критерій t Стьюдента для незалежних вибірок. Відмінності між групами вважали вірогідними при рівні значущості $P<0,05$.



Об'єм секретованої жовчі у щурів після внутрішньопортального введення корвітину; а – контроль (фізіологічний розчин); б, в, г – корвітин в дозі 2,5, 5,0 і 10 мг/кг відповідно. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ порівняно з контролем

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Внутрішньопортальне введення корвітину в дозах 2,5; 5 і 10 мг/кг викликало збільшення об'ємної швидкості секреції жовчі у щурів порівняно з контролем. Так, при дозі препарату 2,5 мг/кг цей показник вірогідно збільшувався в 2-й півгодинній пробі на 14,3, в 3-й – на 21,5, в 4-й – на 18,2 і в 5-й – на 22,7%. Подвоєння дози корвітину викликало ще більш інтенсивну, ніж у попередній групі, секрецію жовчі: в 2-й 30-хвилинній пробі секрету було вірогідно більше, ніж в контролі, на 23,8, в 3-й – на 40,2, в 4-й – на 36,4 і в 5-й – також на 36,4%. При введенні щурам корвітину в дозі 10 мг/кг кількість виділеної жовчі щодо контролю збільшувалася в 1-й пробі на 21,0, в 4-й – на 21,8 і в 5-й – на 27,3%. Загалом за 2,5 год спостережень у щурів, яким ввели корвітин в дозах 2,5; 5 і 10 мг/кг, секрету було виділено на 20,9, 31,2 і 20,4% відповідно більше, ніж в контрольній групі (рисунок).

Кверцетин має слабку розчинність у воді, що утруднює вивчення його ефектів у

дослідах *in vivo*, в тому числі й на жовчосекреторну функцію печінки. Проте спиртовий екстракт *Azadirachta indica*, до складу якого він входить, майже удвічі збільшував об'єм виділеної жовчі у щурів [6]. Секреція останньої відбувається завдяки осмотично залежному надходженню води в жовчні каналікули, за яке відповідає активний транспорт осмотично активних речовин. До таких, у першу чергу, відносять жовчні кислоти [10]. Оскільки внаслідок оперативного втручання ентерогепатична їх циркуляція порушується, можна припустити активацію синтезу. Однак, у групі тварин, яким замість розчину корвітину вводили фізіологічний розчин (контроль), не виявили збільшення концентрації холатів упродовж досліджу, а навпаки, спостерігали вірогідну різницю у бік зменшення. Зокрема це стосувалося таких жовчних кислот, як ТХК, ТХДХК і ТДХК, ГХК, ГХДХК і ГДХК. Разом з тим жодного разу не було відмічено зменшення концентрацій жовчних кислот упродовж усього періоду спостереження в групах тварин, яким вводили корвітин (табл. 1).

Застосування різних доз корвітину неоднаково вплинуло не лише на об'єм секретованої жовчі, а й на вміст окремих холатів у декалітрі останньої. Стосовно вільних жовчних кислот, концентрація ХК і суміші ДХК і ХДХК суттєво збільшувалася щодо контролю після введення корвітину в дозі 10 мг/кг. Так, за 1-й 30-хвилинний відрізок часу після введення препарату концентрація ХК зростала на 29,8, за 2-й – на 26,8, за 3-й – на 19 і за 5-й – на 17,9%. Вміст суміші ДХК і ХДХК збільшувався в пробах з 1-ї по 5-ту на 61,2, 65,4, 52,5, 41,3 і 25% відповідно. Такий результат свідчить про суттєву активацію альтернативного шляху синтезу первинних жовчних кислот з холестерину.

Поміж кон'югованих таурохолатів концентрація ТХК збільшилася відносно контрольних значень у всіх групах, де застосовували корвітин (див. табл. 1). Зокрема, у щурів 1-ї групи (доза препарату 2,5 мг/кг) протягом перших 1,5 год експерименту змін не спосте-

рігали, і лише в 4-й і 5-й пробах концентрація ТХК вірогідно збільшилася на 12,3 і 14,3% відповідно. При застосуванні корвітину в дозі 5 мг/кг цей показник підвищувався в усіх відібраних зразках жовчі – від 1-ї до 5-ї, на 9,9, 12,6, 12,6, 15 та 17,4% відповідно. У щурів останньої групи, де корвітин вводили в дозі 10 мг/кг, концентрація ТХК збільшувалася на 10,8%, 10,1, 15 та 18,3% з 2-ї проби по 5-ту відповідно (див. табл. 1). Концентрація таурокон'югатів дигідроксихоланових жовчних кислот в суміші (ТХДХК і ТДХК), впродовж усього часу спостереження не зазнала вірогідних змін відносно контрольних значень при введенні корвітину в дозі 2,5 мг/кг. У групі тварин, які одержали 5 мг/кг препарату, збільшення відносно контролю концентрації цих таурохолатів на 16, 23,6, 22,4 та 22,7% відмічалось в досліджуваних біопробах з 2-ї по 5-ту включно. При дозі корвітину 10 мг/кг збільшення цього показника порівняно з контролем в 4-й та 5-й пробах досягало 20,7 та 18,7% відповідно (див. табл. 1).

Дані літератури стверджують, що інтенсивність кон'югації жовчних кислот з таурином визначається активністю роботи тауринової транспортної системи в перипортальних гепатоцитах [11]. Отже, на підставі одержаних результатів, можна говорити що корвітин посилює роботу транспортерів таурину та збільшує інтенсивність надходження цієї амінокислоти до гепатоцитів. Порівняння вмісту в жовчі ГХК у контрольних та дослідних тварин не виявило відмінностей між показниками, тоді як концентрація суміші ГХДХК і ГДХК у щурів усіх груп була більшою, ніж у контролі. Зокрема, в II групі таке збільшення показника на 15% відмічалось лише в 2-й пробі жовчі, в III групі концентрація ГХДХК і ГДХК зростала з 3-ї проби по 5-ту на 20,9, 35,1 і 28,5% відповідно. В IV групі тварин у 2-й і 3-й пробах жовчі також виявили вірогідно підвищену щодо контролю концентрацію суміші ГХДХК і ГДХК: на 16,7 і на 14,7% відповідно (див. табл. 1). Для оцінки функціонального стану печінки,

зокрема якості секретованої жовчі, важливе значення має співвідношення між окремими групами жовчних кислот, у т.ч. між сумарними кон'югованими з таурином і гліцином та сумарними вільними – так званий коефіцієнт кон'югації, а також співвідношення між

вмістом тригідроксихолатів (ХК і її кон'югати з таурином та гліцином) і вмістом дигідроксихолатів (ХДХК і ДХК та їх кон'югати з таурином і гліцином) в жовчі, або коефіцієнт гідроксилування. Останній відбиває інтенсивність процесів гідроксилування в печінці.

Таблиця 1. Концентрація жовчних кислот (мг%) у жовчі щурів після внутрішньопортального введення корвітину (M±m)

Схема досліджу	Номер проби	Тауро-холева	Таурохеноде-зоксихолева і таурозедексихолева	Гліко-холева	Глікохеноде-зоксихолева і глікодедексихолева	Холева	Хенодедексихолева і дезоксихолева
Контроль (n=8)		166,75±4,5	95,5±2,2	144,0±3,1	25,2±0,9	20,5±1,2	8,5±0,3
Корвітин в дозі							
2,5 мг/кг (n=6)	1	177,55±6,0	93,8±4,3	150,8±3,1	26,2±1,2	24,0±1,5	8,4±0,3
5 мг/кг (n=6)		183,3±4,5*	101,1±5,0	142,25±3,0	25,1±1,2	23,0±1,0	7,9±0,3
10 мг/кг (n=6)		174,7±4,3	91,7±4,7	133,1±8,6	25,4±1,7	26,6±1,0**	13,7±1,1***
Контроль		162,6±4,6	90,7±2,4	139,5±3,0	23,3±1,0	19,8±1,2	8,1±0,3
Корвітин в дозі							
2,5 мг/кг	2	180,1±7,7	95,9±5,0	148,9±3,2	26,8±0,9*	22,0±1,5	8,0±0,2
5 мг/кг		183,1±5,6*	105,2±5,1*	144,4±3,0	26,5±1,3	22,0±1,1	7,9±0,2
10 мг/кг		180,2±5,3*	100,6±7,0	137,3±7,8	27,2±1,2*	25,1±1,5*	13,4±0,9***
Контроль		159,3±4,5	90,7±2,4	147,3±9,75	22,25±0,9	18,9±1,0	7,8±0,3
Корвітин в дозі							
2,5 мг/кг	3	177,1±7,5	96,2±5,9	146,2±3,4	24,4±1,0	20,7±1,4	7,65±0,2
5 мг/кг		179,45±5,3*	106,7±5,5**	140,2±3,6	27,2±0,5**	19,7±1,1	7,6±0,3
10 мг/кг		175,45±4,8*	100,9±7,6	134,3±7,0	25,8±0,5*	22,5±1,2*	11,9±0,8***
Контроль		152,4±4,3	90,7±2,4	128,6±4,7	20,8±0,9	18,5±1,0	7,5±0,3
Корвітин в дозі							
2,5 мг/кг	4	171,1±6,75*	92,3±5,4	141,9±3,3	23,5±0,8	19,4±1,5	7,2±0,2
5 мг/кг		175,2±5,1**	102,1±5,5**	136,9±3,5	28,1±2,0**	18,8±0,7	7,2±0,29
10 мг/кг		175,3±5,7**	100,7±7,5*	125,35±8,1	22,5±0,6	21,3±0,9	10,6±0,7***
Контроль		146,35±4,0	90,7±2,4	124,6±4,9	20,0±0,9	17,9±1,1	7,6±0,3
Корвітин в дозі							
2,5 мг/кг	5	167,3±6,3*	88,8±5,2	139,0±3,1	22,1±0,5	18,0±1,7	6,9±0,2
5 мг/кг		171,8±4,9**	98,4±5,1**	131,9±3,5	25,7±1,3**	17,1±0,6	7,1±0,2
10 мг/кг		171,2±4,6**	95,2±7,0*	115,5±8,25	21,5±1,3	21,1±0,6*	9,5±0,7*

Примітка: тут і в табл. 2 і 3 * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 порівняно з контролем

Як було встановлено, в жовчі щурів коефіцієнт кон'югації вірогідно збільшувався щодо контролю лише при застосуванні корвітину в дозі 5 мг/кг, тоді як при більшій дозі – 10 мг/кг цей показник зменшувався (див. табл. 2). Це свідчить про те, що залежно від дози,

досліджуваний препарат може по-різному впливати на ефективність роботи поліферментних систем, які забезпечують процеси кон'югації жовчних кислот у щурів.

У переважної більшості ссавців кон'югація вільних холатів з таурином і гліцином

є заключним етапом біосинтезу первинних жовчних кислот, а фізіологічне значення цього процесу полягає в тому, що він сприяє зменшенню токсичності і збільшенню розчинності холатів та прискоренню їх секреції з жовчю [12]. Видовою особливістю щурів є те, що в них близько 90% жовчних кислот перебуває в кон'югованому стані, а тауро-кон'югати переважають над глікокон'югатами [13]. Кон'юговані з таурином холати є більш полярними сполуками, ніж такі з гліцином [14]. В процесі кон'югації амінокислоти таурин та гліцин взаємодіють з КоА-ефіром відповідної жовчної кислоти. Каталізаторами цієї реакції є мікросомальна КоА-лігаза та цитозольна N-ацетилтрансфераза, які працюють із затратою енергії та за наявності НАД, АМФ, Mg^{2+} , КоА. Ефективність процесу захоплення жовчної кислоти гепатоцитом з крові синусоїда залежить від її структури. Інтенсивніше гепатоцит захоплює кон'югова-

ні і тригідроксихоланові, ніж некон'юговані і дигідроксихоланові жовчні кислоти [15]. Коефіцієнт кон'югації – це показник узгодженості функціонування систем метаболічних перетворень і транспорту холатів у гепатоцитах. Загалом, він характеризує сольобілізаційні властивості жовчі, а співвідношення вільних і кон'югованих фракцій холатів є одним із критеріїв оцінки її літогенності [16]. Оскільки від вмісту кон'югованих холатів залежить здатність жовчі емульгувати жири та сприяти їх всмоктуванню в кишечнику [17], можна стверджувати, що корвітин покращує ці її властивості. Кон'югація вільних холатів з таурином і гліцином забезпечує також більш високу міцелярну концентрацію холатів у порожнині кишечника, що, в свою чергу, сприяє поліпшенню абсорбції ліпідів і жиророзчинних вітамінів. Порушення біосинтезу жовчних кислот та їх кон'югації, наприклад, внаслідок вроджених метаболічних дефектів,

Таблиця 2. Коефіцієнт кон'югації жовчних кислот при внутрішньопортальному введенні фізіологічного розчину (контроль) та корвітину щурам (M±m)

Серія дослідів	Півгодинні проміжки часу	Концентрація жовчних кислот, мг%		Коефіцієнт кон'югації
		Сумарні кон'юговані	Сумарні вільні	
Контроль (n=8)	1	287,7±6,3	29,1±1,0	10,0±0,4
	2	277,5±7,1	27,8±1,0	10,0±0,7
	3	269,1±7,1	27,4±0,9	10,2±0,6
	4	259,3±6,0	26,0±0,9	10,0±0,5
	5	250,5±4,5	25,5±1,0	9,9±0,6
Корвітин в дозі 2,5 мг/кг (n=6)	1	299,35±9,5	32,4±1,7	9,4±0,6
	2	303,5±12,2	30,0±1,6	10,4±0,9
	3	297,8±12,7	28,3±1,6	10,8±1,0
	4	286,9±11,8*	26,6±1,6	10,8±1,1
	5	278,2±11,2*	25,0±1,8	11,25±1,3
5 мг/кг (n=6)	1	315,2±11,8*	30,85±1,1	10,3±0,4
	2	308,8±10,3*	29,8±1,1	10,55±0,7
	3	313,35±8,2**	27,3±1,0	11,6±0,6
	4	305,35±9,0***	25,95±0,65	11,8±0,5*
	5	295,8±8,7***	24,25±0,6	12,2±0,6**
10 мг/кг (n=6)	1	291,7±7,7	30,85±1,1	7,3±0,3***
	2	308,0±11,4*	29,5±1,1	8,1±0,4**
	3	302,2±9,7*	27,3±1,0	8,9±0,4*
	4	298,5±11,1**	26±0,7	9,4±0,3
	5	287,8±9,1**	24,25±0,6*	9,4±0,3

призводить до важких наслідків для здоров'я [18, 19]. Розлади процесів кон'югації холатів стають причиною малабсорбції жиророзчинних вітамінів і холестатичних уражень печінки [20] та вимагають подальших досліджень механізмів регуляції метаболічних перетворень холестерину й жовчних кислот. Одержані нами результати свідчать, що в дозі 5 мг/кг корвітин вірогідно посилює процеси біотрансформації останніх через кон'югацію, що є передумовою покращення солюбілізувальних властивостей жовчі та посилення її колоїдостійкості. Енергія, потрібна для здійснення жовчної секреції, утворюється за рахунок тканинного дихання печінки і спряженого з ним окисного фосфорилування [21]. Раніше ми показали, що корвітин суттєво збільшує швидкість тканин-

ного кровотоку в печінці щурів [10], що може сприяти покращенню тканинного дихання органа, а отже й кращому енергетичному забезпеченню синтетичних та метаболічних процесів у гепатоцитах.

Як відомо, жовчні кислоти утворюються гепатоцитами з холестерину двома шляхами: нейтральним (ХК та ХДХК у рівних частинах) і кислим (переважно ХДХК) [22]. За співвідношенням цих складових жовчі визначають коефіцієнт гідроксилювання жовчних кислот – ще один показник гідрофобності їх пулу, а отже й ступеня емульгації жирів у дванадцятипалій кишці. Після внутрішньопортального введення корвітину в дозах 2,5 і 5 мг/кг сумарна концентрація тригідроксхолатів у щурів дещо збільшувалася щодо контролю (див. табл. 3). Зокрема, в II групі,

Таблиця 3. Коефіцієнт гідроксилювання жовчних кислот у щурів після внутрішньопортального застосування фізіологічного розчину (контроль) та корвітину (M±m)

Серія дослідів	30-хв проміжки часу	Концентрація жовчних кислот, мг%	Концентрація жовчних кислот, мг%	Коефіцієнт гідроксилювання
		Сумарні тригідроксхоланові	Сумарні дигідроксхоланові	
Контроль (n=8)	1	331,3±6,1	129,4±4,0	2,6±0,09
	2	321,9±5,8	122,9±4,25	2,6±0,09
	3	325,45±8,7	112,8±4,2	2,8±0,1
	4	299,4±6,1	111,8±2,1	2,7±0,1
	5	288,9±6,7	128,4±4,4	2,6±0,07
Корвітин в дозі 2,5 мг/кг (n=6)	1	352,4±7,8	128,4±4,4	2,6±0,06
	2	350,9±7,2**	137,6±5,4	2,6±0,09
	3	344,0±7,2	128,3±3,8	2,8±0,02
	4	332,35±7,4**	123,05±3,6	2,7±0,03
	5	324,3±6,6**	117,8±4,0	2,6±0,07
5 мг/кг (n=6)	1	349,1±8,2	131,4±8,0	2,5±0,1
	2	349,4±6,35**	125,7±9,4	2,7±0,2
	3	339,3±6,2	133,9±5,7**	2,4±0,1*
	4	330,8±6,0**	130,2±6,2**	2,4±0,1
	5	320,9±6,2**	124,0±5,9**	2,5±0,08
10 мг/кг (n=6)	1	334,4±11,6	117,0±5,3	2,6±0,08
	2	342,6±11,6	127,8±7,6	2,45±0,1
	3	327,8±10,1	126,7±7,6	2,4±0,1*
	4	322,1±13,3	123,2±7,9	2,4±0,1
	5	307,7±11,4	116,7±7,9	2,45±0,1

в 2-й півгодинній пробі жовчі концентрація сумарних дигідроксихолатів вірогідно перевищила контрольні значення всього на 9, в 3-й – на 11, в 5-й – на 12,2%. В III групі таке перевищення в пробах 2, 4 і 5 становило 8,5, 10,5, 11,1% відповідно. Концентрація ж сумарних дигідроксихоланових жовчних кислот відносно контролю вірогідно збільшувалася лише при дозі корвітину 5 мг/кг, в пробах 3, 4 і 5 на 18,7, 16,5, 9,7% відповідно. В результаті такого співвідношення між сумарними тригідроксихолановими і сумарними дигідроксихолановими жовчними кислотами коефіцієнт гідроксилювання в усіх дослідних групах мало відрізнявся від контролю: при дозі препарату 5 і 10 мг/кг всього в одній пробі було виявлено зменшення його на 14% (див. табл. 3).

Це може свідчити про незначну перевагу кислого шляху біосинтезу холатів під впливом корвітину у певні короткі відрізки часу продукції жовчі впродовж експерименту.

ВИСНОВКИ

1. Корвітин збільшує об'єм секретованої жовчі та концентрацію в ній тауро- і глікокон'югатів холатів в усіх застосованих дозах, а вміст вільних жовчних кислот – лише в дозі 10 мг/кг.

2. При введенні корвітину в дозах 5 і 10 мг/кг на короткий період часу зменшується коефіцієнт гідроксилювання жовчних кислот, що вказує на зростання ефективності кислого шляху біосинтезу холатів в певні моменти дії препарату.

3. Досліджуваний флавоноїд залежно від дози може як посилювати, так і послаблювати ефективність роботи поліферментних систем, які забезпечують процеси кон'югації жовчних кислот у шурів.

4. Оптимальна доза корвітину для покращення стабільності колоїдної системи жовчі та її емульгуючих властивостей у щура не повинна перевищувати 5 мг/кг.

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

ВНЕШЕСЕКРЕТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ КОРВИТИНА

В острых опытах на крысах с канюлированным желчным протоком изучали влияние корвитина – водорастворимого аналога кверцетина, на желчсекреторную функцию печени. Внутривенное введение исследуемого соединения в дозах 2,5; 5 и 10 мг/кг вызывало статистически значимое увеличение объема секретированной желчи на 20,9, 31,2 и 20,4% соответственно по сравнению с контролем. Методом тонкослойной хроматографии установлено умеренное стимулирующее влияние корвитина на процессы конъюгации желчных кислот с таурином и глицином, особенно при введении его в дозе 5 мг/кг. Этот флавоноид не влиял на концентрацию гликохолевой кислоты, однако увеличивал содержание гликохенодезоксихолевого и гликодезоксихолевого кислот в смеси во всех опытных группах животных от 15 до 35,1%. Что касается свободных желчных кислот, то концентрация холевой кислоты и смеси хенодезоксихолевого и дезоксихолевого кислот увеличивалась относительно контроля лишь после введения 10 мг/кг препарата. В первом случае – от 17,9 до 29,8%, во втором – от 25 до 65,4%. В дозе 5 мг/кг корвитин достоверно увеличивал коэффициент конъюгации холатов желчи (максимально на 23,2%), тогда как при 10 мг/кг препарата этот показатель уменьшался (до 27%). Коэффициент гидроксирования после применения корвитина во всех опытных группах мало отличался от контроля: при дозе препарата 5 и 10 мг/кг лишь в одной пробе было обнаружено его уменьшение на 14%. Таким образом, корвитин модулирует внешнесекреторную функцию печени, вызывая увеличение секреции желчи и концентрации различных холатов, в зависимости от дозы увеличивая или уменьшая эффективность работы полиферментных систем, обеспечивающих процессы конъюгации желчных кислот у крыс.

Ключевые слова: корвитин; печень; желчь; секреция желчи; желчные кислоты; конъюгация и гидроксирование холатов

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

EXOCRINE FUNCTION OF THE LIVER IN RATS WITH EXPOSURE TO CORVITIN

In acute experiments on rats with cannulated bile duct we studied the effect of Corvitin, water-soluble analogue of quercetin, on secretion of bile. Intraportal administration of the test compound at doses of 2,5; 5 and 10 mg/kg resulted in a significant increase in the volume of secreted bile by 20,9, 31,2 and 20,4%, respectively, as compared with the control.

Using the method of thin layer chromatography it was established the mild stimulating effect of Corvitin on the processes of bile acids conjugation with taurine and glycine, especially when administered at a dose of 5 mg/kg. This flavonoid did not affect the concentration of glycocholic acid, however increased the content of glycochenodeoxycholic and glycodeoxycholic acids in the mixture between 15 to 35,1%. Regarding free bile acids, the concentration of cholic acid, chenodeoxycholic and deoxycholic acids in the mixture was increased significantly relative to control only after Corvitin application at dose 10 mg/kg. In the first case – from 17,9 to 29,8%, in the second – from 25 to 65,4%. At the dose of 5 mg/kg, Corvitin significantly increased the ratio of bile cholates conjugation (maximum by 23,2%), whereas 10 mg/kg of the drug decreased this index by 27,0%. After administration of Corvitin, the hydroxylation ratio in all experimental groups differed little from the control: at the dose of 5 and 10 mg/kg this parameter decreased by 14%. Thus, Corvitin modulates exocrine function of the liver, causing an increase in bile secretion and concentration of different cholates, dose-dependently increasing or decreasing the effectiveness of multienzyme systems providing processes of bile acids conjugation in rats.

Key words: Corvitin; liver; bile; secretion of bile; bile acids; conjugation and hydroxylation of cholates.

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv;

²PJSC SIC "Borshchahivskiy CPP"

REFERENCES

- Hofmann A. Bile Acids: Trying to Understand Their Chemistry and Biology with the Hope of Helping Patients. *Hepatology*. 2009;49:1403-18.
- Bischoff SC. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008;11(6):733-40.
- Lin SY, Wang YY, Chen WY, Chuang YH, Pan PH, Chen CJ. Beneficial effect of quercetin on cholestatic liver injury. *J Nutr Biochem*. 2014;25(11):1183-95.
- Wang J, Miao M, Zhang Y, Liu R, Li X, Cui Y, Qu L. Quercetin ameliorates liver injury induced with Tripterygium glycosides by reducing oxidative stress and inflammation. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015;93(6):427-33.
- Wang J, Zhang Y, Zhang Y, Cui Y, Liu J, Zhang B. Protective effect of *Lysimachia christinae* against acute alcohol-induced liver injury in mice. *BioScience Trends*. 2012;6(2):89-97.
- Ofem E, Ikpi DE, Essien NM. Increased bile flow rate and altered composition of bile induced by ethanolic leaf extract of *Azadirachta indica* (neem) in rats. *Nig J Exp and Clin Biosciences*. 2013;1(1):18-22.
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scaccocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *Int J Mol Sci*. 2010;11:1321-42.
- Vinogradova E, Pasichnichenko O, Vovkun T, Yanchuk P. Influence of corvitin on liver blood flow and serotonin on contractile activity of portal vein. *Bull of Kyiv National Taras Shevchenko Univ*. 2012;15:30-32. [Ukrainian].
- Veselskiy SP, Lyaschenko PS, Kostenko SI, Stepanov ZA, Kurovska LF. Pat. 99031324 Ukraine, MBN A61V5/14. Method of preparation of bioliquid samples for determination of lipid substances. №33564A; applications 05/10/1999; publ. 15.02.2001; Bull. №1 [Ukrainian].
- Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*. 2009;50(10):1955-66.
- Ikeda S, Tachikawa M, Akanuma S. Involvement of γ -aminobutyric acid transporter 2 in the hepatic uptake of taurine in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;303:291-297.
- Reshetnyak VI. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(42):7341-60.
- Kakiyama G, Iida T, Yoshimoto A, Goto T, Mano N, Goto J, Nambara T, Hagey LR, Hofmann AF. Chemical synthesis of (22E)-3 alpha, 6 beta, 7 beta-trihydroxy-5 beta-chol-22-en-24-oic acid and its taurine and glycine conjugates: a major bile acid in the rat. *J Lipid Res*. 2004;45:567-73.
- Hofmann AF, Hagey LR. Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades. *J Lipid Res*. 2014;55(8):1553-95.
- Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology*. 1997;26(6):1667-77.
- Sherlock W, Dooley J. Liver and biliary tract: A Practical Guide. M. GOETAR-Med, 2002;864 pp. [Russian].
- Hofmann AF, Mysels KJ. Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *J Lipid Res*. 1992;33(5):617-26.
- Clayton PT. Disorders of bile acid synthesis. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(3):593-604.
- Setchell KD, Heubi JE, Shah S. Genetic defects in bile acid conjugation cause fat-soluble vitamin deficiency. *Gastroenterology*. 2013;144(5):945-55.
- Heubi JE, Setchell KD, Jha P. Treatment of bile acid amidation defects with glycocholic acid. *Hepatology*. 2015;61(1):268-74.
- El-Desoky AE, Delpy DT, Davidson BR, Seifalian AM. Assessment of hepatic ischaemia reperfusion injury by measuring intracellular tissue oxygenation using near infrared spectroscopy. *Liver*. 2001;21(1):37-44.
- Ferdinandusse S, Houten SM. Peroxisomes and bile acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763:1427-40.

Матеріал надійшов
до редакції 10.12.2015

Влияние гипоксического preconditionирования на механизмы транспорта кислорода и окислительные повреждения при синдроме ишемии-реперфузии печени у кроликов

М.Н. Ходосовский

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь;
e-mail: hod_73@yahoo.com

Исследовали влияние гипоксического preconditionирования (ГП) на кислородсвязывающие свойства крови и степень окислительных повреждений при ишемии-реперфузии печени у кроликов. Животных рандомизированно разделили на 2 экспериментальные группы: в 1-й моделировали ишемию (30 мин, маневр Прингла) и реперфузию (120 мин) печени; во 2-й – предварительно перед ишемией-реперфузией проводили курс ГП (трехкратный «подъем» на высоту 3500 м в гипобарической камере в течение 1 ч в сутки). Изучали показатели кислородтранспортной функции (парциальное напряжение O_2 при насыщении им гемоглобина на 50%, парциальное напряжение CO_2 и O_2 , pH, бикарбонат плазмы, действительный избыток оснований и др.) крови, продукты перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, основания Шиффа), а также активность маркерных ферментов печени – аланин- и аспатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) в крови. Установлено, что у кроликов 1-й группы при ишемии-реперфузии происходит снижение сродства гемоглобина к кислороду, активация процессов перекисного окисления липидов и повышение активности АлАТ и АсАТ в крови. Применение ГП способствовало повышению сродства гемоглобина к кислороду, снижению активности процессов перекисного окисления липидов и АлАТ и АсАТ крови при ишемии-реперфузии. Таким образом, ГП оказывает протективный эффект на печень путем повышения сродства гемоглобина к кислороду, что снижает степень окислительных повреждений органа при ишемии-реперфузии.

Ключевые слова: кислород; гипоксия; preconditionирование; печень; ишемия; реперфузия; кролики.

ВВЕДЕНИЕ

Синдром ишемии-реперфузии печени часто встречается в клинической практике при выполнении резекций или трансплантации органа [1, 2]. Повышение устойчивости тканей к гипоксии является важным механизмом защиты органов от окислительного стресса при ишемии и последующей реперфузии. Индукция коротких периодов ишемии перед основным (ишемическое preconditionирование – ИП) оказывает выраженное протективное воздействие на постишемические ткани [3]. Установлено, что ИП печени способно снижать активность процессов перекисного

окисления липидов (ПОЛ), выраженность лейкоцитарной инфильтрации и апоптоза в реперфузионном периоде, что улучшает функционирование органа после ишемии. Предполагают, что механизм защитного эффекта данного способа связан с повышением продукции оксида азота (NO) и улучшением условий микроциркуляции в органе, активацией белков теплового шока, снижением продукции провоспалительных и проапоптотических цитокинов, увеличением синтеза гипоксией индуцируемого фактора 1 (ГИФ-1) [3, 4]. Общая природа механизмов адаптации к гипоксии в различных тканях объясняет успех еще одного вида preconditionирования

ния печени – дистантное, которое заключается во временном пережатии мезентериальных артериальных сосудов или брюшного отдела аорты для повышения устойчивости органа к реперфузионным повреждениям [2, 5]. Несмотря на экспериментальный характер данных исследований, авторы считают эффективным этот способ в борьбе с окислительным стрессом, увеличением содержания провоспалительных цитокинов и нарушением микроциркуляции в печени при реперфузии.

Успешное применение ИП и дистантного прекондиционирования привело исследователей к изучению возможности использования коротких периодов общей гипоксии организма (гипоксическое прекондиционирование – ГП) для повышения устойчивости к синдрому ишемии-реперфузии органов [1, 6–8]. Преимуществом метода считается его неинвазивность, что сокращает время оперативного вмешательства. Анализ способов проведения ГП печени показал, что существует значительная вариабельность по степени и кратности гипоксических воздействий на организм с целью повышения его устойчивости к ишемии и последующей реперфузии. Так Loi и соавт. [6] для коррекции реперфузионных повреждений печени у крыс использовали 2-недельную адаптацию животных по 15 ч/сут в гипобарической камере на высоте 5500 м. Другие авторы [1] ГП печени моделировали путем короткого 10-минутного периода дыхания 10% O₂ газовой смеси с последующим переходом на дыхание 21% O₂ (10 мин) перед основным ишемическим периодом. В обоих случаях исследователями получен протективный эффект, выразившийся в снижении активности трансаминаз и цитокинов крови, уменьшении активности процессов ПОЛ и морфологических нарушений при ишемии-реперфузии печени. Известно, что в адаптации организма к гипоксии важную роль играет изменение кислородсвязывающих свойств крови [9]. Вместе с тем изменение показателей кислородтранспортной функции крови может существенно влиять на степень

окислительных повреждений при реперфузии печени [10]. Так как вопрос о влиянии ГП на кислородсвязывающие свойства крови при ишемии-реперфузии печени не исследован, представляется важным изучить эффект ГП на состояние механизмов транспорта кислорода и окислительных повреждений печени у экспериментальных животных.

Цель нашей работы – изучить влияние ГП на параметры кислородтранспортной функции крови и ПОЛ при моделировании синдрома ишемии-реперфузии печени у кроликов.

МЕТОДИКА

Работа выполнена на 20 взрослых кроликах-самцах массой 3,5-4,5 кг, предварительно выдержанных в стандартных условиях вивария. Под комбинированным внутривенным наркозом (гексенал 30 мг/кг; калипсол 100 мг/кг) вводили катетеры: один - в *v.hepatica* для забора печёночной венозной крови, а другой - в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Ишемию печени вызывали маневром Прингла (Pringle maneuver) – наложением сосудистого зажима на печеночно-двенадцатиперстную связку в течение 30 мин. После снятия зажима реперфузионный период длился 120 мин. Забор образцов крови для оценки показателей кислородтранспортной функции и ПОЛ крови осуществляли до и после ишемии, а также в конце реперфузионного периода. Функциональное состояние печени оценивали по активности аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) кинетическим методом с помощью стандартного набора реактивов фирмы “Согмау” (Польша). Все оперативные вмешательства осуществляли в условиях адекватной анальгезии в соответствии с нормами, принятыми этической комиссией по гуманному обращению с животными Гродненского государственного медицинского университета.

Животных разделили на 2 экспериментальные группы: в 1-й группе (n=11) моде-

лировали ишемию-реперфузию печени; во 2-й группе (n=9) животных до эксперимента подвергали «подъему» на высоту 3500 м [11] в гипобарической камере, где они находились в течение 1 ч. Подъемы в гипобарической камере проводили через день, 3 раза на протяжении недели, ишемию-реперфузию моделировали через 70 ч после последнего подъема.

На микрогазоанализаторе Synthesis-15 (Instrumentation Laboratory Company) оценивали показатели кислородтранспортной функции крови: $p50_{\text{реал}}$, pO_2 , pCO_2 , pH, бикарбонат плазмы (HCO_3^-), общий CO_2 плазмы (TCO_2), действительный избыток оснований (ABE), стандартный избыток оснований (SBE), стандартный бикарбонат плазмы (SBC). Средство гемоглобина к кислороду (СГК) определяли по показателю $p50$ (pO_2 крови, соответствующее 50%-му насыщению ее кислородом). $p50_{\text{станд}}$ рассчитывали для стандартных условий (pH 7,4; $pCO_2 = 40$ мм рт. ст. и $t^\circ = 37^\circ C$), $p50_{\text{реал}}$ – для реальных значений этих факторов. Оценку активности процессов ПОЛ проводили по концентрации диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ) в плазме крови. Содержание ДК в плазме крови определяли методом ультрафиолетовой спектрофотометрии при длине волны 233 нм [12]. Содержание ОШ определяли по интенсивности флюоресценции хлороформного экстракта при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 и 440 нм соответственно [13].

Статистическую обработку результатов проводили в зависимости от нормальности распределения выборки (тест Колмогорова-Смирнова). При нормальном распределении достоверность отличий определяли с помощью критерия t Стьюдента, при отсутствии нормального распределения применяли: внутри каждой группы – критерий Вилкоксона, между группами – Манна-Уитни (U-тест). Достоверными считали различия при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение маркерных ферментов печени в печеночной и смешанной венозной крови при моделировании синдрома ишемии-реперфузии у кроликов представлено в табл. 1 и 2. Установлено, что у животных 1-й группы в конце ишемии активность АлАТ в плазме печеночной и смешанной венозной крови достоверно повышалась в 5,22 и 5,18 раза, а АсАТ - в 4,63 и 4,0 раза соответственно. В реперфузионном периоде рост активности трансаминаз продолжался и превышал исходный уровень АлАТ в 11,22 и 12,56 раза, а АсАТ – в 10,42 и 11,0 раз ($P < 0,001$) соответственно. Данные изменения указывают на развитие тяжелых реперфузионных повреждений гепатоцитов при моделировании синдрома ишемии-реперфузии. Проведение животным 2-й группы курса ГП сопровождалось ростом активности АлАТ и АсАТ в печеночной венозной крови в конце ишемического периода в 2,95 ($P < 0,001$) и 2,7 ($P < 0,001$) раза, что было на 40,4% ($P < 0,01$) и 38,6 % ($P < 0,05$) меньше по сравнению с показателям в 1-ой группе в печеночной венозной крови в соответствующем периоде. Схожая динамика изменения активности АлАТ и АсАТ наблюдалась в смешанной венозной крови (см. табл. 2). В конце реперфузии у кроликов 2-й группы эти показатели в печеночной венозной крови превосходили исходные в 3,4 ($P < 0,001$) и 3,2 ($P < 0,001$) раза, а в смешанной венозной крови - в 3,0 ($P < 0,001$) и 2,6 ($P < 0,001$) раза соответственно. Данная активность трансаминаз крови в конце реперфузии у кроликов 2-й группы была существенно ниже таковой по отношению к животным 1-й группы (см. табл. 1 и 2), что указывает на улучшение функционального состояния печени в реперфузионном периоде под влиянием ГП.

Изменения основных показателей кислородтранспортной функции печеночной и смешанной венозной крови у животных 1-й группы указывали на развитие нарушений

Таблица 1. Влияние гипоксического preconditionирования на показатели кислородтранспортной функции, перекисного окисления липидов и трансаминаз печеночной венозной крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов (Ме [25%; 75%])

Показатель	Ишемия-реперфузия печени (1-я группа, n=11)			Гипоксическое preconditionирование и ишемия-реперфузия (2-я группа, n=9)		
	Исходная	30 мин ишемии	120 мин ре- перфузии	Исходная	30 мин ишемии	120 мин реперфузии
Парциальное напряжение O ₂ при насыщении им гемоглобина на 50%, мм рт.ст. в реальных условиях (p50 _{реал}), .	32,6 [32,45; 34,5]	39,3* [37,97; 43,3]	42,3* [39,2; 43,6]	29,2** [28,16; 30,9]	33,6** [31,5; 36,2]	33,8*** [30,9; 35,1]
в стандартных условиях (p50 _{станд})	31,4 [30,7; 33,4]	27,9* [25,64; 29,52]	29,06* [27,46; 31,1]	32,29 [29,44; 32,9]	27,44* [25,8; 32,5]	31,65 [28,55; 33,3]
Гемоглобин (Hb), г/л	119,0 [103,0;139,0]	121,0 [104,0; 140,0]	126,0 [98,0; 133,0]	118,0 [107;145]	118,0 [111; 123]	118,0 [111; 131]
Парциальное напряжение O ₂ (pO ₂), мм рт. ст.	39,0 [37,0; 49,0]	21,0* [19,0; 33,0]	38,0 [32,0; 40,0]	40,0 [34,0; 43,0]	26,0* [20,0; 33,0]	29,0* [28,0; 33,0]
Показатель кислотности (pH), ед.	7,365 [7,349;7,41]	7,115* [7,059;7,229]	7,112* [7,07; 7,177]	7,473** [7,441; 7,49]	7,196* [7,072;7,387]	7,306*** [7,264;7,429]
Парциальное напряжение CO ₂ (pCO ₂), мм рт. ст.	48,0 [41,8; 53,5]	68,0* [52,3; 71,1]	55,7* [48,1; 74,3]	39,7 [34,3; 44,6]	44,6* [43,4; 68,7]	48,9* [43,2; 52,2]
Бикарбонат плазмы (HCO ₃ ⁻), ммоль/л	26,7 [25,4; 29,4]	20,5* [17,3; 23,4]	18,7* [14,6; 22,4]	29,4 [27,3; 31,2]	26,4* [20,2; 29,0]	28,2** [20,0; 29,7]
Общий CO ₂ (TCO ₂), ммоль/л	28,2 [26,8;30,6]	22,6* [19,4; 25,3]	20,8* [16,7; 24,2]	31,0 [29,1; 31,1]	27,7 [22,3; 30,7]	29,5** [21,3; 31,5]
Действительный избыток оснований (ABE), ммоль/л	1,3 [0,3; 5,4]	- 7,5* [-14,1; -3,6]	- 9,4* [-14,6; -5,0]	6,6 [0,5; 7,2]	- 0,9*** [-8,5; 1,7]	3,0*** [-6,2; 4,1]
Стандартный избыток оснований (SBE), ммоль/л	0,9 [-0,2; 5,5]	- 7,9* [-14,0; -3,7]	- 10,0* [-15,8; -5,9]	6,2 [0,4; 7,1]	- 1,6*** [-9,3; 1,7]	3,2** [-7,2; 3,7]
Стандартный бикарбонат (SBC), ммоль/л	25,0 [24,3; 28,7]	16,6* [12,7; 20,3]	16,6 * [12,0; 20,0]	28,7 [24,8; 29,9]	22,0*** [16,6; 24,8]	26,0*** [18,6; 27,2]
Диеновые конъюгаты, ΔE ₂₃₃ /мл	0,56 [0,52; 0,62]	1,28* [0,9; 1,48]	2,24* [2,08; 2,82]	0,46 [0,4; 0,52]	1,12* [0,9; 1,4]	0,58** [0,54; 0,62]
Основания Шиффа, ЕД/мл	7,64 [7,27; 8,34]	9,88* [8,96; 11,34]	11,84* [10,2; 14,65]	7,46 [7,04; 8,22]	9,25*** [8,96; 9,64]	8,12** [7,95; 8,77]
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	31,43 [26,19; 38,4]	164,12* [118,7; 230,5]	352,69* [307,3; 431,3]	33,17 [27,9; 40,16]	97,78*** [80,3; 106,5]	113,49*** [89,0; 111,7]
Аспаргатаминотрансфераза, Ед/л	33,17 [29,68; 41,9]	153,65* [108,3; 251,4]	345,71* [312,5; 370,2]	34,92 [31,4; 40,16]	94,28*** [85,6; 120,47]	111,74*** [85,55; 120,5]

* P < 0,05 к исходному уровню в своей группе; ** P < 0,05 по отношению к соответствующему периоду в 1-й группе.

Таблица 2. Влияние гипоксического preconditionирования на показатели кислородтранспортной функции, перекисного окисления липидов и трансаминаз смешанной венозной крови при ишемии-реперфузии печени у кроликов (Me [25%; 75%])

Показатель	Ишемия-реперфузия печени (1-я группа, n=11)			Гипоксическое preconditionирование и ишемия-реперфузия (2-я группа, n=9)		
	Исходная	30 мин ише- мии	120 мин реперфузии	Исходная	30 мин ишемии	120 мин реперфузии
Парциальное напряжение O ₂ при насыщении им гемоглобина на 50%, мм рт.ст.						
в реальных условиях (p50 _{реал})	32,6 [29,27; 36,2]	41,9* [34,3; 44,5]	40,78* [37,05; 43,2]	29,8 [28,72; 31,2]	35,8*** [33,56; 36,1]	33,4** [31,0; 36,3]
в стандартных условиях (p50 _{станд})	30,6 [28,2; 33,37]	28,4 [26,7; 30,0]	28,9 [27,29; 32,5]	31,8 [29,67; 32,5]	30,95 [29,2; 33,8]	31,2 [28,93; 33,5]
Гемоглобин (Hb), г/л	120,0 [106; 137,0]	111,0 [97,0; 138,0]	121,0 [92,0; 144,0]	113,0 [107; 133]	115,0 [106; 127]	123,0 [109; 134]
Парциальное напряжение O ₂ (pO ₂), мм рт. ст.	39,0 [36,0; 47,0]	34,0 [28,0; 39,0]	35,0 [29,0; 47,0]	38,0 [37,0; 39,0]	28,0 [25,0; 34,0]	35,0 [30,0; 38,0]
Показатель кислотности (рН), ед.	7,346 [7,334;7,42]	7,127* [7,060; 7,223]	7,132* [7,076; 7,180]	7,429 [7,346;7,46]	7,304*** [7,177;7,344]	7,346** [7,271;7,398]
Парциальное напряжение CO ₂ (pCO ₂), мм рт. ст.	47,1 [40,4; 49,1]	57,2* [48,3; 76,7]	51,0 [46,9; 73,8]	41,0 [40,0; 45,6]	50,9* [48,4; 53,6]	47,9* [43,1; 54,1]
Бикарбонат плазмы (HCO ₃ ⁻), ммоль/л	27,2 [22,1; 30,9]	19,2* [15,5; 23,9]	19,2* [14,5; 23,8]	27,3 [25,4; 29,6]	25,4* [20,2; 28,3]	25,7** [19,6; 28,9]
Общий CO ₂ (TCO ₂), ммоль/л	28,7 [23,3; 32,4]	20,7* [18,1; 26,3]	20,8* [16,8; 26,3]	28,8 [27,0; 31,0]	27,0* [21,8; 29,8]	27,3** [21,1; 30,4]
Действительный избыток оснований (ABE), ммоль/л	2,4 [-2,9; 7,1]	- 7,2* [-15,2; - 5,7]	- 8,8* [-15,1; -5,2]	2,9 [1,7; 5,4]	- 0,6*** [-7,9; 4,1]	- 0,2** [-7,1; 4,6]
Стандартный избыток оснований (SBE), ммоль/л	1,7 [-3,9; 6,8]	- 7,4* [- 16,6; - 6,0]	- 9,3* [-16,3; -6,4]	2,3 [1,3; 5,0]	- 1,1*** [- 8,4; 3,7]	- 0,9** [- 8,4; 4,3]
Стандартный бикарбонат (SBC), ммоль/л	25,4 [21,8; 29,7]	18,1* [12,6; 19,1]	17,2 * [11,7; 20,0]	26,3 [25,4; 28,5]	23,0*** [16,9; 26,6]	24,1** [17,9; 27,6]
Диеновые конъюгаты, ΔE ₂₃₃ /мл	0,54 [0,48; 0,6]	1,18* [0,82; 1,44]	2,18* [1,92; 2,78]	0,52 [0,44; 0,56]	1,22* [0,88; 1,42]	0,68*** [0,6; 0,78]
Основания Шиффа, ЕД/мл	7,65 [7,33; 8,21]	9,48* [8,89; 10,41]	11,33* [9,84; 12,31]	7,82 [7,26; 8,32]	8,87*** [7,91; 9,05]	8,96*** [8,24; 9,26]
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	27,94 [24,4; 36,67]	144,92* [120,5; 202,5]	350,95* [307,3; 427,7]	33,17 [26,19;36,67]	97,78*** [76,8; 110,0]	99,52*** [76,82; 111,7]
Аспаратаминотрансфераза, Ед/л	31,43 [27,94; 41,9]	125,7* [118,7; 181,6]	345,7* [309,0; 434,8]	34,92 [27,94; 38,4]	94,28*** [85,55; 111,7]	90,79*** [85,55; 110,0]

* P < 0,05 к исходному уровню в своей группе; ** P < 0,05 по отношению к соответствующему периоду в 1-й группе.

в механизмах транспорта кислорода (см. табл. 1 и 2). Так, у них ишемия печени приводила к достоверному уменьшению pO_2 на 46,15 % и к увеличению pCO_2 на 41,67 % по отношению к исходному уровню в крови, оттекающей от печени. В конце реперфузионного периода значение pO_2 не отличалось от исходного, тогда как pCO_2 оставалось выше на 8,28 % ($P < 0,05$). Показатели кислотно-основного состояния у кроликов 1-й группы на протяжении ишемии-реперфузии в обоих образцах крови снижались. Так на 30-й минуте ишемии в печеночной венозной крови значение HCO_3^- понизилось на 23,2 % ($P < 0,05$), TCO_2 – на 19,86 % ($P < 0,05$), а SBC – на 33,6 % ($P < 0,05$) по отношению к исходному уровню. В конце реперфузионного периода в печеночной венозной крови значения HCO_3^- , TCO_2 и SBC были достоверно ниже исходного уровня на 29,96, 26,24 и 33,6 % соответственно. В смешанной венозной крови на 120-й минуте реперфузии у животных 1-й группы значения pO_2 и pCO_2 не изменялись, тогда как pH , HCO_3^- , TCO_2 , ABE , SBE , SBC проявляли схожую динамику изменений как в печеночной венозной крови (см. табл. 2). В конце ишемического периода у кроликов 1-й группы наблюдалось увеличение $p50_{реал}$ на 20,55 и 28,53 % ($P < 0,05$) в печеночной и смешанной венозной крови соответственно (см. табл. 1). В конце реперфузии в печеночной и смешанной венозной крови снижение $СГК$ сохранялось: $p50_{реал}$ был выше исходного на 29,75 и 25,1 % ($P < 0,05$) соответственно. Данные изменения показателей кислородтранспортной функции крови в 1-й группе животных сопровождались ростом активности процессов ПОЛ и трансаминаз крови. Так, на 120-й минуте реперфузии в печеночной и смешанной венозной крови по отношению к исходному содержанию ДК повышалось в 4,0 и 4,04 раза, ОШ увеличивалось на 54,97 и 48,1% соответственно ($P < 0,05$; табл. 1, 2).

У животных, которым проводили курс ГП (2-я группа), наблюдалось улучшение показателей кислородтранспортной функ-

ции крови на протяжении ишемии-реперфузии печени (см. табл. 1, 2). Установлено, что он способствовал снижению исходного $p50_{реал}$ печеночной венозной крови на 10,4% ($P < 0,05$) по отношению к таковому в 1-й группе. В конце ишемического периода pO_2 печеночной венозной крови понизилось на 35,0% ($P < 0,05$), pH , HCO_3^- , ABE , SBE , SBC снижались, а $p50_{реал}$ и TCO_2 существенно не изменялись по отношению к исходным уровням, при этом $p50_{реал}$ был ниже, чем у животных 1-й группы на 14,5% ($P < 0,05$; табл. 1). В смешанной венозной крови на 30-й минуте ишемии у животных 2-й группы показатели $p50_{реал}$, pH , ABE , SBE , SBC были существенно лучше, чем у 1-й группы (табл. 2). На 120-й минуте реперфузии у кроликов группы ГП в смешанной венозной крови большинство показателей кислородтранспортной функции крови не отличались от исходного уровня, а показатели $p50_{реал}$, pH , HCO_3^- , TCO_2 , ABE , SBE , SBC были лучше, чем в 1-й группе (см. табл. 2). В печеночной венозной крови в конце реперфузионного периода наблюдалась схожая динамика показателей кислородтранспортной функции крови (см. табл. 1). ГП способствовало снижению содержания продуктов ПОЛ после ишемии. Так, у животных 2-й группы в конце реперфузионного периода в печеночной и смешанной венозной крови по отношению к значениям в 1-й группе содержание ДК понижалось в 3,9 и 3,2 раза ($P < 0,01$), содержание ОШ снизилось на 31,4 и 20,9% ($P < 0,01$) соответственно (см. табл. 1, 2).

Установлено, что ишемия печени, вызванная маневром Прингла, приводила к развитию метаболического ацидоза у кроликов 1-й группы (судя по показателям pH , ABE , SBE и SBC). Повышение pCO_2 могло быть следствием застойных явлений и нарушения микроциркуляции в печени. Снижение $СГК$ крови при ишемии (судя по росту $p50_{реал}$) носило адаптивный характер, способствуя снижению дефицита O_2 в тканях органа. Вместе с тем сохранение сниженного $СГК$ в реперфузион-

ном периоде могло приводить к избыточному потоку кислорода в ткани и созданию условий для «относительной гипероксии» и окислительного стресса [14]. Это предположение подтверждается повышением содержания ДК и ОШ в крови в конце реперфузии у кроликов 1-й группы. Рост активности ПОЛ сопровождался повреждением гепатоцитов (судя по активности АлАТ и АсАТ крови). Развитию окислительного стресса в печени могло способствовать истощение механизмов антиоксидантной защиты, которое наблюдали после ишемии органа у крыс вместе со снижением СГК при реперфузии [10]. Восстановление pO_2 в печеночной венозной крови в конце реперфузии у кроликов 1-й группы могло носить патофизиологический характер, усиливая, наряду со сниженным СГК, дисбаланс между способностью тканей к полноценному восстановлению кислорода и его поступлением. Повышение доли неполного восстановления кислорода (т.н. «утечки» электронов) в митохондриях гепатоцитов отображалось на последующем повреждении клеточных и субклеточных мембранных структур свободнорадикальными процессами ПОЛ.

Проведение курса ГП у кроликов приводило к улучшению показателей кислотно-основного равновесия на протяжении экспериментов. Так, несмотря на снижение рН, АВЕ, SBE и SBC после ишемии, к концу реперфузионного периода эти показатели не отличались от исходных значений в данной группе и были лучше, чем у животных 1-й группы. Очевидно, что ГП у кроликов приводило к меньшим метаболическим нарушениям в печени, возможно, за счет большей сопряженности процессов окислительного фосфорилирования, т.е. повышения эффективности тканевого дыхания снижает утечку электронов и интенсивность окислительного стресса при реперфузии [15]. Кроме того, трехкратное ГП способствует повышению экспрессии таких транскрипционных факторов, как ГИФ-1 α , c-Fos, NF- κ B и др., что

приводит к активации генов, продуцирующих проадаптивные белки, в частности, пептидные антиоксиданты, антиапоптотические белки семейства bcl-2, семейства стресс-белков HSP, эритропоэтин и другие, вовлекаемые в процессы выживания клеток при повреждающих воздействиях [8]. Выявленные изменения СГК после ГП у животных 2-й группы указывают на смещение кривой диссоциации оксигемоглобина влево на протяжении экспериментов в печеночной венозной крови и в конце реперфузии в смешанной венозной крови по отношению к результатам у кроликов 1-й группы (рис. 1). Важно отметить, что на фоне повышенного СГК печеночной венозной крови сохранялось снижение pO_2 при небольшом увеличении pCO_2 на 120-й минуте реперфузии у животных с ГП.

Факт повышения СГК, улучшение показателей кислотно-основного баланса и снижение содержания продуктов ПОЛ (судя по изменению ДК и ОШ) указывают на улучшение метаболических процессов и устранение условий для «относительной гипероксии» в печени в постишемическом периоде. Повышение СГК печеночной венозной крови с одновременным снижением в ней pO_2 при реперфузии печени может быть одним из

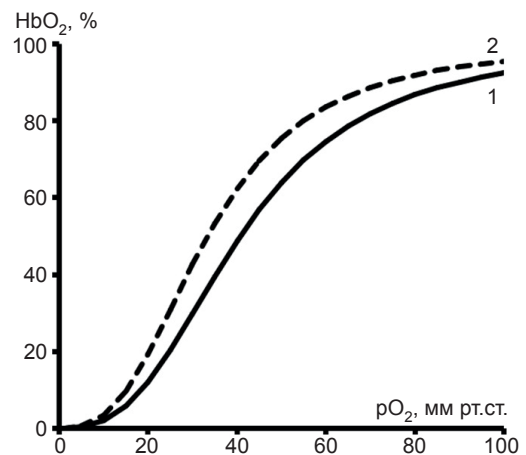


Рис. 1. Влияние гипоксического preconditionирования на положение кривых диссоциации оксигемоглобина, рассчитанных по значениям парциального напряжения O_2 при насыщении им гемоглобина на 50% в реальных условиях смешанной венозной крови, на 120-й минуте реперфузии у кроликов. 1- первая группа (n=11), 2 - вторая группа (n=9)

механизмов, препятствующих деградации ГИФ-1 α , с активностью которого связывают индукцию многих защитных эффектов при ишемии-реперфузии, таких, как противовоспалительный, антиапоптотический, антиокислительный и метаболический [16]. Показано, что ГИФ-1 α способен активировать синтез гемоксигеназы-1 (ГО-1), что улучшает функцию митохондрий гепатоцитов и снижает продукцию активных форм кислорода при ИРП [17]. Возможно, протективный эффект активации ГО-1 при ИРП связан с газотрансмиттерными свойствами монооксида углерода, который эндогенно образуется при активации данного фермента. Известно, что повышение СГК крови является одним из прямых эффектов СО на гемоглобин [18]. Однако вопрос об участии СО механизме протективного действия ГП при ИРП нуждается в дополнительных исследованиях.

Таким образом, ГП способствует повышению СГК крови, улучшает показатели кислотно-основного баланса и препятствует развитию окислительного стресса, что положительно влияет на функциональное состояние печени при ишемии-реперфузии у кроликов. Протективный эффект ГП в большой степени обусловлен коррекцией механизмов транспорта кислорода кровью, что положительно влияет на метаболические процессы при ИРП.

ВЫВОДЫ

1. Гипоксическое preconditionирование в отсроченном периоде у кроликов снижает степень окислительных повреждений печени при ишемии-реперфузии: снижает содержание диеновых конъюгатов, оснований Шиффа, активность маркерных ферментов повреждения печени (АлАТ и АсАТ).

2. Коррекция синдрома ишемии-реперфузии печени путем гипоксического preconditionирования у кроликов приводит к улучшению механизмов транспорта кислорода кровью, смещению кривой диссоциации оксигемогло-

бина влево, что способствует уменьшению степени окислительных повреждений.

M.N. Khodosovsky

INFLUENCE OF HYPOXIC PRECONDITIONING ON THE MECHANISMS OF BLOOD OXYGEN TRANSPORT AND OXIDATIVE DAMAGES DURING HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION IN RABBITS

The effect of hypoxic preconditioning (HP) on the blood oxygen-binding properties and liver oxidative damages was determined during hepatic ischemia-reperfusion (HIR) in rabbits. Animals were randomized into two experimental groups: 1st (HIR) - hepatic ischemia (30 min by Pringle maneuver) and reperfusion (120 min); 2nd (HP+HIR) - before HIR the rabbits were passed through hypoxic chamber at 3500 m altitude during 1 hr/day (3 times day after day). The parameters of blood oxygen transport (p50, pCO₂, pO₂, pH, HCO₃⁻, ABE and ect.), lipid peroxidation products (conjugated dienes, Schiff bases) and blood hepatic markers (ALT, AST) were detected. It's found that HIR leads to decline in hemoglobin oxygen affinity, activation of lipid peroxidation processes and elevation of ALT and AST activities in the 1st group. Hypoxic preconditioning (2nd group) markedly increased hemoglobin oxygen affinity, reduced the lipid peroxidation processes and ALT and AST activities in the blood during HIR. Thus, HP has a protective effect during HIR through elevation of hemoglobin oxygen affinity and declining hepatic oxidative damages.

Key words: oxygen; hypoxia; preconditioning; liver; ischemia; reperfusion; rabbits.

Grodno State Medical University, Belarus

М.М. Ходосовський

ВПЛИВ ГІПОКІСЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦІОНУВАННЯ НА МЕХАНІЗМИ ТРАНСПОРТУ КИСНЮ ТА ОКИСЛЮВАЛЬНІ ПОШКОДЖЕННЯ ПРИ СИНДРОМІ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ПЕЧІНКИ У КРОЛІВ

Досліджували вплив гіпоксичного preconditionування (ГП) на киснезв'язувальні властивості крові та ступінь окисних пошкоджень при ішемії-реперфузії печінки у кроликів. Тварин рандомізовано розділили на 2 групи: у 1-й моделювали ішемію (30 хв, маневр Прінгла) та реперфузію (120 хв) печінки; в 2-й – попередньо перед ішемією-реперфузією проводили курс ГП (триразовий «підйом» на висоту 3500 м у гіпобаричній камері протягом 1 год за добу). Вивчали показники киснетранспортної функції (p50, pCO₂, pO₂, pH, HCO₃⁻, АВЕ та ін.) крові, продукти перекисного окиснення ліпідів

(дієнові кон'югати, основи Шиффа), а також активність маркерних ферментів печінки - аланін- і аспатаміно-трансфераз (АЛТ і АСТ) у крові. Встановлено, що у кроликів 1-ї групи при ішемії-реперфузії знижується спорідненість гемоглобіну до кисню, активуються процеси перекисного окиснення ліпідів та підвищується активність АЛТ і АСТ. Застосування ГП сприяло підвищенню спорідненості гемоглобіну до кисню, зниженню активності процесів перекисного окиснення ліпідів та АЛТ і АСТ крові при ішемії-реперфузії. Таким чином, ГП чинить захисний ефект на печінку підвищенням спорідненості гемоглобіну до кисню, що знижує ступінь окисних пошкоджень органа при ішемії-реперфузії.

Ключові слова: кисень; гіпоксія; прекодиціонування; печінка; ішемія; реперфузія; кролики

УО «Гродненський державний медичний університет», Гродно, Білорусь,

REFERENCES

1. Choukèr A, Ohta A, Martignoni A, Lukashev D, Zacharia LC, Jackson EK, et al. In vivo hypoxic preconditioning protects from warm liver ischemia-reperfusion injury through the adenosine A2B receptor. *Transplantation*. 2012; 94(9):894-902.
2. Czigány Z, Turóczi Z, Ónody P, Harsányi L, Lotz G, Hegedüs V, et al. Remote ischemic preconditioning protects the liver from ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2013; 185(2):605-13.
3. Alchera E, Dal Ponte C, Imarisio C, Albano E, Carini R. Molecular mechanisms of liver preconditioning. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(48):6058-67.
4. Song X, Zhang N, Xu H, Cao L, Zhang H. Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury. *Int J Biol Sci*. 2012; 8(5):707-18.
5. Kageyama S, Hata K, Tanaka H, Hirao H, Kubota T, Okamura Y, et al. Intestinal ischemic preconditioning ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: role of heme oxygenase 1 in the second window of protection. *Liver Transpl*. 2015; 21(1):112-22.
6. Lai IR, Ma MC, Chen CF, Chang KJ. The protective role of heme oxygenase-1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats. *Transplantation*. 2004; 77(7):1004-8.
7. Maslov LN, Lishmanov Yu B, Kolar F, Portnichenko AG, Podoksenov Yu.K, Khaliulin I G, et al. Hypoxic preconditioning is a phenomenon increasing tolerance of cardiomyocytes to hypoxia-reoxygenation. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2010; 96(12):1170-89. [Russian].
8. Samoilov MO, Rybnikova EA, Churilova AV. Signal molecular and hormonal mechanisms of formation of the hypoxic preconditioning protective effects. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2012; (3): 3-10. [Russian].
9. Simonson TS, Wei G, Wagner HE, Wuren T, Bui A, Fine JM, et al. Increased blood-oxygen binding affinity in Tibetan and Han Chinese residents at 4200 m. *Exp Physiol*. 2014; 99(12):1624-35.
10. Khodosovskii MN, Zinchuk VV. Erythropoietin influence on the blood oxygen transport and prooxidant-antioxidant state during hepatic ischemia-reperfusion. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2014;100(5):592-601. [Russian]
11. Tin'kov A.N., Prokof'ev A.B., Grintsova M.V. Evaluation of indices of cardiac electrical instability in patients with myocardial infarction during out-patient stage of follow-up care using the altitude-chamber hypoxia technique. *Journal of Arrhythmology*. 2005; (39):31-4. [Russian].
12. Gavrillov VB, Gavrillova AR, Khmara NF. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. *Lab Delo*. 1988; (2):60-4. [Russian].
13. Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal Biochem*. 1973; 52(1): 1-9.
14. Bilenko M.V. Ischemic and reperfusion injuries of organs (molecular mechanisms and ways to prevention and treatment). Moscow: Medicine; 1989. [Russian]
15. Hummitzsch L, Zitta K, Bein B, Steinfath M, Albrecht M. Culture media from hypoxia conditioned endothelial cells protect human intestinal cells from hypoxia/reoxygenation injury. *Exp Cell Res*. 2014; 322(1):62-70.
16. Akhtar MZ, Sutherland AI, Huang H, Ploeg RJ, Pugh CW. The role of hypoxia-inducible factors in organ donation and transplantation: the current perspective and future opportunities. *Am J Transplant*. 2014; 14(7):1481-7.
17. Zhong Z, Ramshesh VK, Rehman H, Currin RT, Sridharan V, Theruvath TP, et al. Activation of the oxygen-sensing signal cascade prevents mitochondrial injury after mouse liver ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 295(4):G823-32.
18. Crocker GH, Toth B, Jones JH. Combined effects of inspired oxygen, carbon dioxide, and carbon monoxide on oxygen transport and aerobic capacity. *J Appl Physiol(1985)*. 2013; 115(5):643-52.

Матеріал посту́пил в редакцію 10.08.2015

Ремоделювання кісткової тканини після введення екзогенного мелатоніну в різні сезони року

І.Г.Літовка¹, В.Я.Березовський¹, С.П.Весельський², У.О.Жернокльов¹

¹Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ, ²Інститут фізіології ім. Петра Богача Київського національного університету ім. Тараса Шевченка; e-mail: litir@biph.kiev.ua

Досліджено 28-добовий вплив фармакологічної дози (5 мг/кг) мелатоніну на показники ремоделювання кісткової тканини 3-місячних щурів-самців лінії Вістар в осінній та весняний періоди. Восени введення мелатоніну викликало підвищення активності лужної фосфатази на 43,9%, гіалуронідазної активності на 15,4% та зниження концентрації глікозаміногліканів на 46,7% незалежно від інтенсивності споживання кисню. Концентрація загальних ліпідів і тригліцеридів знижувалася. Навесні введення щурам мелатоніну пригнічувало фізіологічне ремоделювання кісткової тканини, знижувало активність лужної фосфатази і підвищувало активність кислоти і тартратрезистентної кислоти фосфатази на 78 і 72% відповідно, незважаючи на рівень споживання кисню. Зростала концентрація глікозаміногліканів і вільних амінокислот. Такі зміни можуть порушувати цілісність органічного матриксу та послаблювати фіксацію неорганічного компонента сполучної тканини – кристалів гідроксіапатиту.

Ключові слова: мелатонін; ремоделювання кісткової тканини.

ВСТУП

У численних дослідженнях показано сезонні зміни характеру та інтенсивності фізіологічних процесів в організмі та їх біохімічних показників [1, 2]. Якщо циркадіанні (добові) ритми забезпечують термінову адаптацію функцій організму до зміни освітлення, то циркануальні (сезонні) – до зміни енергетичного метаболізму та процесів регенерації [3, 4]. Синтезу мелатоніну в організмі притаманна як добова, так і сезонна ритміка. Восени та взимку зі зменшенням освітлення концентрація гормону зростає, а весною та влітку, навпаки, знижується [5, 6]. Біоритмологічна структура метаболізму кісткової тканини (КТ) є достатньо пластичною і легко модифікується при змінах умов зовнішнього середовища: температури повітря, ступеня освітленості та режиму харчування [6]. У літературі існує точка зору, що мелатонін впливає на циркадіанні ритми метаболізму кістки. Однак дані щодо його дії на ремо-

делювання КТ нині є дискусійними. Серед головних ефектів цього гормону на КТ відзначають: стимуляцію диференціації та активації остеобластів, гальмування диференціації остеокластів, нейтралізацію утворених остеокластами вільних радикалів, посилення синтезу колагенових і неколагенових білків кісткового матриксу [7–9]. Тобто встановлена можливість циркадіанної інтенсивності фізіологічної регенерації КТ за допомогою зміни амплітуди та ритму добових флуктуацій концентрації мелатоніну в організмі. Щодо циркануальних впливів – такі дані неоднозначні.

Мета нашої роботи – порівняння ефектів дії екзогенного мелатоніну на ремоделювання КТ щурів лінії Вістар у різні сезони року.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 48 молодих (3 міс) щурах-самцях лінії Вістар у весняний період (березень-квітень) та восени (жовтень-листо-

пад). Тварин одержано із розплідника віварію Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України. Вони знаходилися під наглядом ветеринарного лікаря у стандартних умовах віварію при природному циклі світ/темрява.

Для зменшення ступеня дисперсії показників у кожній з груп контрольних і дослідних тварин їх додатково розділили на підгрупи із низьким та високим рівнем споживання кисню (РСК). Цей показник визначали методом непрямой калориметрії о 10.00 натщесерце три рази. Розраховували споживання кисню у мілілітрах O_2 за 1 год на 1 кг маси тіла. Дослідним щурам перорально у фармакологічній дозі 5 мг/кг протягом 28 днів вводили 1 мл водної суспензії мелатоніну («Unipharm Inc.», США) о 10.00. Контрольним щурам у той самий час вводили еквівалентну кількість дистильованої води. Через 28 днів щурів декапітували під рауш-наркозом із дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей.

Рівень руйнування та синтезу КТ визначали, вимірюючи активність найбільш специфічних ферментів остеокластів та остеобластів або інших речовин, які надходять у кров під час ремоделювання. У сироватці крові щурів за допомогою стандартних наборів реактивів визначали активність лужної фосфатази (ЛФ, «BioSystems», Іспанія) – як показник формування КТ та кислої фосфатази (КФ, «BioSystems», Іспанія), тартратрезистентної кислої фосфатази (ТРКФ, «BioSystems», Іспанія), глікозаміноглікани (ГАГ) – як показники резорбції [10]. В екстракті КТ вимірювали концентрацію уронових кислот [11], гіалуронідазну активність [12].

Методом тонкошарової хроматографії визначали концентрацію вільних амінокислот і ліпідів у КТ. Для цього стегнову кістку очищали від м'язів і відмивали від кісткового мозку. Наважку КТ (100 мг) знежирювали і зневоднювали в розчині спирт-ацетон (1:2) [13]. Потім його випарювали, а сухий

залишок ліпідів розчиняли в 100 мкл суміші хлороформ-бензол-ацетон (1:2:1) і наносили на розмічену хроматограму мікрошприцем. Хроматографічне розділення загальних ліпідів проводили на фабрично виготовлених пластинках Silufol (Чехія) розміром 15×15 см, попередньо активуючи їх впродовж години в термостаті при 110 °С. У цей самий час у хроматографічну камеру для кращого насичення вносили фільтрувальний папір і наливали суміш розчинників: гександіетиловий ефір-оцтова кислота (7:23:1) [14].

Для визначення амінокислотного складу КТ – знежирену і зневоднену стегнову кістку піддавали гідролізу при 100°C 20 хв у розчині 0,04 М CH_3COOH (1:10). Центрифугували 30 хв при 3000 об/хв. Супернатант випарювали при 40-60°C і розчиняли в 0,1 мл 50%-го C_2H_5OH . Наносили на розмічену хроматограму мікрошприцем по 20 мкл. Для розгонки використовували систему розчинників, яка включала ізоаміловий спирт-бутиловий спирт-оцтову кислоту-мурашину кислоту-воду (9:7:4:25:4) за об'ємом [15, 16].

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали на ПК із використанням програми OriginPro 8,5. Визначали середнє арифметичне (M) і стандартну похибку (m). Вірогідність різниці між контрольними і дослідними зразками оцінювали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Восени після перорального введення мелатоніну молодим тваринам активність ЛФ у сироватці крові щурів зросла на 43,9% ($P<0,05$). Ці результати узгоджуються з літературними даними щодо впливу мелатоніну у фармакологічних дозах на проліферацію остеобластів та активність ЛФ [9, 17]. Весною, навпаки, спостерігали лише зворотну тенденцію до зниження активності ЛФ на 8% порівняно з контрольними значеннями (рис. 1).

Активність КФ і ТРКФ у сироватці крові восени за тих самих експериментальних умов

проявляла тенденцію до зниження. У весняний період активність КФ вірогідно зросла на 78%, а ТРКФ – знизилася на 72% відносно контролю (рис.2). Припускаємо, що пригнічення фізіологічного ремоделювання КТ весною після введення екзогенного мелатоніну посилюється ендогенними ендокринними впливами, які здійснюються щитовидною залозою. Відомо, що фармакологічні дози мелатоніну пригнічують тиреоїдну активність, а зниження функції щитоподібної залози суттєво впливає на структурно-метаболічні показники стану КТ. За літературними даними при зменшенні концентрації тиреоїдних гормонів знижується активність як остеобластів, так і остеокластів. Це призводить до 2-3- кратного гальмування швидкості ремоделювання КТ [18, 19].

Концентрація ГАГ у сироватці крові восени знизилася на 46,7 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем (рис.3). Весною цей показник підвищився на 29 % ($P < 0,05$) щодо контролю. Відомо, що надлишок ГАГ змінює колоїдну структуру КТ, посилює її гідрофільність, що спричиняє набухання і розпушення колагенових волокон [20, 21]. Тобто у весняний період відбувається часткова деградація органічного матриксу КТ під впливом надлишку мелатоніну, що призводить до зниження консолідації колагенових волокон та їх зв'язку з кристалами мінералів. У досліджувані періоди ми не виявили вірогідних змін концентрації уронових кислот, які є у складі ГАГ.

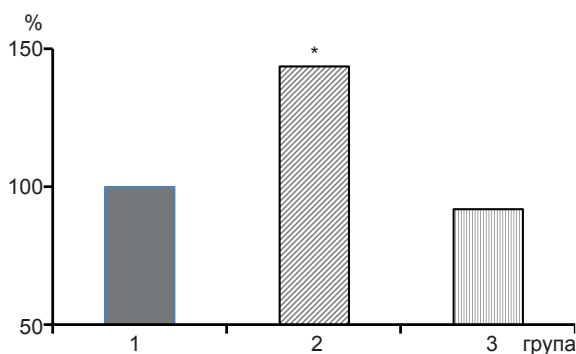


Рис. 1. Активність лужної фосфатази у сироватці крові молодих щурів контрольних (1) та після введення мелатоніну восени (2), весною (3).

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

Гіалуронідазна активність – це поєднана дія двох лізосомальних ферментів гіалуроноглюкозамінідази і гіалуроноглюкоронідази, які розщеплюють ГАГ у КТ. Восени вона вірогідно зросла на 15,4% у сироватці крові тварин дослідної групи (рис.4). У весняний період цей показник не змінювався.

Органічний та неорганічний матрикс безпосередньо сполучені між собою прямою хімічною взаємодією. Ліпідні компоненти – одна з ланок цього зв'язку. Після введення мелатоніну направленість змін концентрації загальних ліпідів у КТ була однаковою восени і весною. Восени вона вірогідно знизилася на 22,7%, а весною – на 13% порівняно з контролем. Восени з усіх ліпідних фракцій знижувалася тільки концентрація тригліцеридів (ТГ) на 27,2% ($P < 0,01$). Концентрація решти фракцій – ФЛ, загального, вільного та ефірів холестерину, вільних жирних кислот у дослідній групі не змінювалася відносно контролю.

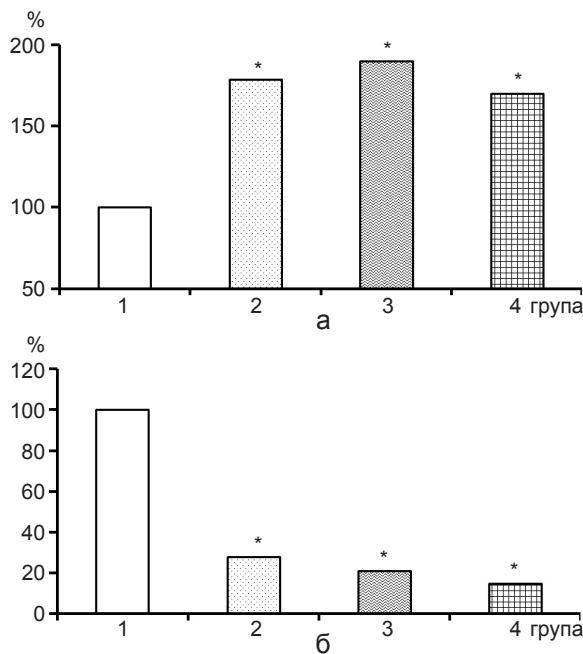


Рис.2. Активність кислої фосфатази (а) та тартратрезистентної кислої фосфатази (б) у сироватці крові молодих щурів після введення мелатоніну весною.

1 – контроль; 2 – дослід; 3 – високий рівень споживання кисню; 4 – низький рівень споживання кисню.

* $P < 0,001$ порівняно з контролем

Весною виявлено лише вірогідне зниження концентрації загальних ліпідів у КТ дослідної групи тварин. Суттєвих змін концентрації ліпідних фракцій у КТ шурів та їх розподілі у загальному пулі ліпідів після впливу екзогенного мелатоніну у фармакологічній дозі ми не спостерігали. Результати отримані восени відрізнялися від весняних підвищенням майже на 10% концентрації загальних фосфоліпідів і зниженням на 8% загального холестерину.

Концентрація більшості досліджуваних восени вільних амінокислот у КТ експериментальних шурів після прийому екзогенного мелатоніну знижувалася, тоді як навесні – зростала. В осінній період спостерігали вірогідне зниження концентрації проліну та оксипроліну на 22 %, лейцину – на 49%, фенілаланіну – на 35%, ізолейцину – на 15%, валіну та триптофану – на 26%, тирозину та глютамінової кислоти – на 26%, треоніну та ізоваліну – на 39%. Концентрація аргініну, гістидину і таурину зросла на 48% ($P<0,05$), гліцину та метіоніну – на 40% ($P<0,01$), серину і аспарагінової кислоти – на 150% ($P<0,01$), аланіну і глобуліну – на 124% ($P<0,001$) порівняно з контролем.

Навесні у дослідних шурів відмічено вірогідне збільшення концентрації проліну та оксипроліну на 80 %, лейцину – на 33%,

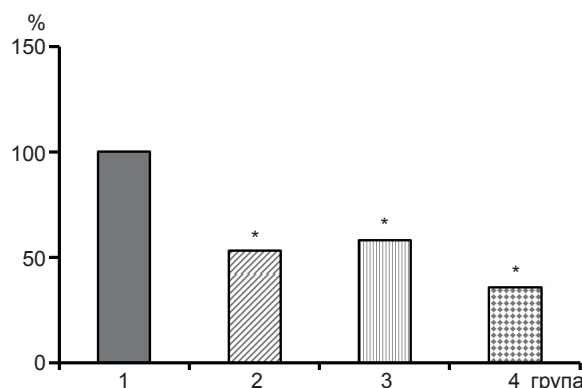


Рис.3. Активність глікозаміногліканів у сироватці крові молодих шурів після введення мелатоніну восени: 1 – контроль; 2 – дослід; 3 – високий рівень споживання кисню; 4 – низький рівень споживання кисню.

* $P<0,001$ порівняно з контролем

фенілаланіну – на 75%, ізолейцину – на 67% відносно контрольних значень. Зниження спостерігали лише концентрації валіну та триптофану на 57% ($P<0,01$) щодо контролю.

Зміни концентрації амінокислот, що безпосередньо беруть участь в синтезі колагену в КТ тварин, після впливу екзогенного мелатоніну весною були односпрямованими. У більшості випадків ці показники вірогідно зростали. Це може свідчити про пригнічення синтезу колагену органічного матриксу КТ. Отримані нами результати узгоджуються з наведеними вище щодо визначення концентрації ГАГ та свідчать про негативний сезонний вплив фармакологічної дози мелатоніну на ремоделювання КТ навесні. Можливо це пов'язано зі зміною температури середовища, весняним авітамінозом і зменшенням потреб високої теплопродукції.

Враховуючи індивідуальні варіації інтенсивності метаболізму в кожній з груп тварин ми визнали доцільним окремо проаналізувати показники реакції КТ особин із низьким та високим рівнем споживання кисню (РСК). Принцип такої диференціації описано в розділі «Методика».

Весною і восени активність ЛФ вірогідно не змінювалася у сироватці крові тварин із високим та низьким РСК порівняно з контролем. При визначенні восени активності

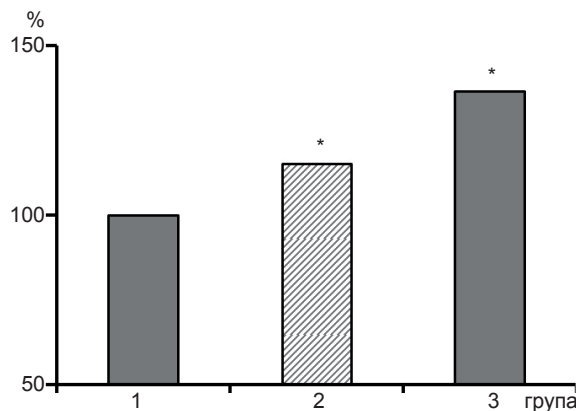


Рис.4. Гіалуронідазна активність у сироватці крові молодих шурів після введення мелатоніну восени: 1 – контроль; 2 – дослід; 3 – високий рівень споживання кисню.

* $P<0,01$ порівняно з контролем

КФ і ТРКФ у сироватці крові тварин із високим та низьким РСК вірогідних змін порівняно з контролем не виявлено. У весняний період цей показник вірогідно зростав у щурів із високим та низьким РСК на 92 і 72% відповідно відносно контролю (див.рис.2).

Восени у тварин із високим та низьким РСК концентрація ГАГ знижувалася на 41,6 і 64,1% відповідно ($P<0,05$; див.рис.3). У щурів із високим та низьким РСК весною спрямованість реакції була однаковою – тенденція до підвищення. Ми не виявили вірогідних змін концентрації уронових кислот у тварин із різним РСК. Восени гіалуронідазна активність зросла у щурів із високим РСК на 36,5% ($P<0,01$) щодо контролю (див.рис.4). У весняний період вона не змінювалася.

Весною та восени у представників із високим та низьким РСК вірогідно не змінювалася порівняно з контролем концентрація ФЛ, загального, вільного та ефірів холестерину, вільних жирних кислот і ТГ.

У особин із низьким РСК восени спостерігали вірогідне порівняно з контролем збільшення концентрації у 5 пар амінокислот і зниження у 7 пар із 14 досліджуваних. Не змінювалися лише концентрації лізину і аспарагіну та валіну і триптофану. У щурів із високим РСК восени знизилася концентрація треоніну та ізоваліну на 23% ($P<0,001$) і лейцину на 28% ($P<0,05$), збільшилася концентрація орнітину та глюкозаміну на 88% ($P<0,01$), серину і аспарагінової кислоти – на 140% ($P<0,001$), аланіну і глобуліну – на 87% ($P<0,01$) порівняно з контролем. Навесні у особин із високим РСК спостерігали зростання концентрації гліцину та метіоніну на 55% ($P<0,01$) і зниження валіну та триптофану на 50% ($P<0,05$) порівняно з контролем. У представників із низьким РСК вірогідно знизилася концентрація аланіну та глобуліну на 28%, підвищилася концентрація проліну та оксипроліну на 88%, лейцину – на 60%, фенілаланіну – на 75% та ізолейцину – на 66% порівняно з контролем.

Отримані нами результати свідчать про істотність впливу зовнішнього середовища на активність щитовидної залози та пов'язаних з ендокринним статусом процесів ремоделювання КТ. Вважаємо, що сезонні зміни чутливості рецепторів елементів КТ до екзогенних впливів (у тому числі фармакотерапевтичних) повинні плануватися з врахуванням реального рівня реактивності КТ.

ВИСНОВКИ

1. Введення восени екзогенного мелатоніну у дозі 5 мг/кг маси тіла впливає на процеси фізіологічного ремоделювання КТ молодих щурів лінії Вістар і призводить до підвищення активності ЛФ, зростання гіалуронідазної активності та зниження концентрації ГАГ незалежно від індивідуального споживання кисню.

2. Восени у КТ молодих щурів знижується концентрація загальних ліпідів і тригліцеридів, що може негативно вплинути на рівень її мінералізації.

3. Введення навесні молодим щурам мелатоніну пригнічувало фізіологічне ремоделювання КТ, сприяло зниженню активності остеобластів і зростанню активності остеокластів незалежно від рівня індивідуального енергетичного метаболізму, підвищенню концентрації глікозаміногліканів та вільних амінокислот. Це може свідчити про порушення цілісності органічного матриксу та послаблення фіксації неорганічного компоненту сполучної тканини – кристалів гідроксіапатиту.

И.Г.Литовка¹, В.А.Березовский¹,
С.П.Весельский², У.А.Жерноклев¹

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА В РАЗНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА

Исследовали 28-суточное влияние фармакологической дозы (5 мг/кг) мелатонина на показатели ремоделирования костной ткани 3-месячных крыс-самцов линии Вистар в осенний и весенний периоды. Осенью введение мелатонина вызывало повышение активности щелочной фосфатазы на 43,9%, гиалуронидазной активности на 15,4% и снижение концентрации гликозаминогликанов на 46,7%

независимо от интенсивности потребления кислорода. Концентрация общих липидов и триглицеридов снижалась. Весной введение крысам мелатонина угнетало физиологическое ремоделирование костной ткани, снижало активность щелочной фосфатазы и повышало активность кислой и тартратрезистентной кислой фосфатазы на 78 и 72% соответственно независимо от интенсивности потребления кислорода. Повышалась концентрация гликозаминогликанов и свободных аминокислот. Такие изменения могут нарушать целостность органического матрикса и ослаблять фиксацию неорганического компонента соединительной ткани – кристаллов гидроксиапатита. Ключевые слова: мелатонин, ремоделирование костной ткани.

¹Інститут фізіології ім.А.А.Богомольця НАН України;

²Інститут фізіології ім.Петра Богача Київського національного університету ім.Тараса Шевченка

I.G. Litovka¹, V.Ya. Berezovsky¹, S.P.Veselskiy², U.O.Zhernoklov¹

BONE TISSUE REMODELING AFTER THE INTRODUCTION OF EXOGENOUS MELATONIN IN DIFFERENT SEASONS

We studied the impact of pharmacological doses (5 mg / kg) of melatonin on the parameters of bone remodeling in 3 month-old male Wistar rats in autumn and spring. In autumn experiments, introduction of melatonin to young rats caused an increase of alkaline phosphatase by 43,9% and hyaluronidase activity by 15,4% and decreased the content of glycosaminoglycans by 46,7%. The concentration of total lipids and triglycerides was decreased. In spring, the introduction of melatonin to young rats inhibited the physiological remodeling of bone tissue, reduced the activity of alkaline phosphatase and increased the activity of acid on the 78% and tartrate resistant acid phosphatases by 72% regardless of the oxygen consumption level. The concentration of glycosaminoglycans and free amino acids increased. Such changes may disturb the integrity of the organic matrix and reduce the fixation of inorganic component of connective tissue – hydroxyapatite crystals.

Key words: melatonin, bone tissue.

¹*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;*

²*Petro Bogach Institute of Physiology of Kyiv National Taras Shevchenko University*

REFERENCES

1. Kalabukhov NI. Hibernation in mammals. Moscow: Nauka: 1985. [Russian].
2. Ivanter E, Ivanter T, Tumanov IL. Adaptive features of small mammals. Moscow: Nauka: 1985. [Russian].

3. Gwinner E. Annual rhythms: total prospect / In. Biological rhythms. Transl. from English. Ed. Yu.A.Ashoffa. Moscow: Mir: 1984; 2: P.44-54. [Russian].
4. Zamorskii II., Pishak VP. Functional organization of photoperiodic system of the brain. *Uspehi Fiziol Nauk.* 2003; 34 (4):37-53. [Russian].
5. Anisimov VN., Vinogradova IA., Bukalov AV. Light desynchronization risk of malignancies in humans: the state of the problem. *Problems of oncology.* 2013; 59 (3):302-13. [Russian].
6. Ostrowska Z, Wolkowska-Pokrywa K, Kos-Kudla B, Swietochowska E, Marek B, Kajdaniuk D. Melatonin and bone status. *Pol Merkur Lekarski.* 2006; 21(124):389-93.
7. Anisimov VN. Role of melatonin in the body, the application in clinic. St. Petersburg: Publisher "System": 2007. [Russian].
8. Roth JA., Kim BG., Lin WL., Cho M. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem.* 1999; 274 (31): 22041-47.
9. Nakade O., Koyama H., Arijji HYajima., A., Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res.* 1999; 27 (2): 106-110.
10. Klyatskin SA, Lifshitz RI. Determination of glycosaminoglycans by ortsin method in patients' blood. *Lab Work.* 1989; 10:51-53. [Russian].
11. Leontiev VK, Petrovich VK. *Biochemical Methods in Clinical and Experimental Dentistry.* Omsk: 1976. [Russian].
12. Sharaev PN, Strelkov NS, Guncha VV, Sosulina LL. Determination of hyaluronidase activity in biological fluids. *Clin Lab Diagnost.* 1996; 3:21-22. [Russian].
13. Petrovskiy VI, Regerand TI, Lysenko EI. Extraction, separation and quantification of lipid fractions of blood serum. *Lab Business.* 1986; 6:339. [Russian].
14. Veselskiy SP, Lyaschenko PS, Kostenko S.I., Gorenko ZA, Kurovska LF. Way of sample preparation of bioliquids detecting in lipids determination. *Pryroda.* Patent for invention №33564A, 15.02.2001. [Ukraine], stated 11.03.1999 -Bull.№1, In Registration 15.02.2001. [Ukrainian].
15. Kaznacheeva AI, Sinister NC. The content of free amino acids in healthy blood plasma, erythrocytes and urine. *Lab Work.* 1976; 8:479-80 [Russian].
16. Korobeinikova EM, Meshcheriakova GV. Determination of free amino acids in the serum and urine of healthy children. *Labor.work.* 1981; 4:221-24. [Russian].
17. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res.* 2007; 42(3): P.231-39.
18. Greenspan SL, Greenspan FS. Effect of thyroid hormone on bone. *Mezhdunar Zh Med Prakt (International magazine of medical practice).* 2001;1:47-55. [Russian].
19. Danilova LI. Thyroid hormones and bone metabolism. *Med Novosti (Medical News).* 2001; (9):3-7. [Russian].
20. Serov VV, Palcev MA. *Pathological anatomy.* Moscow: Medicina: 1998.
21. Ohanian AV. Clinical and morphological changes in dental system with hypothyroidism: abstract of research for the degree of candidate of medical sciences: specialty 14.00.21 "Dentistry", 14.03.02 "Pathological anatomy". Stavropol: 2010. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 03.09.2015

Порушення регуляторних механізмів ремоделювання кісткової тканини в умовах експериментальної хронічної хвороби нирок

С.Б. Павлов, М.В. Кумечко, О.Б. Літвінова, Н.М. Бабенко, А.В. Гончарова

Харківська медична академія післядипломної освіти; e-mail: marina_sash@mail.ru

Метою нашої роботи було вивчення ролі міжклітинних медіаторів – рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1 (ІЛ-1 РА), інтерлейкіну-17 (ІЛ-17), ліганду активатора рецептора ядерного фактора кВ (RANKL) та остеопротегерину в механізмах регуляції метаболізму ниркової та кісткової тканин на моделі порушення ремоделювання кісткової тканини при хронічній хворобі нирок (ХХН). Було виявлено вірогідне збільшення вмісту цитокінів ІЛ-1 РА ($4,207 \pm 0,546$ пг/мл), ІЛ-17 ($33,944 \pm 0,938$ пг/мл), остеопротегерину ($28,338 \pm 1,223$ пг/мл) і RANKL ($0,184 \pm 0,018$ пмоль/л) у сироватці крові тварин з порушенням кісткового ремоделювання при ХХН порівняно зі вмістом досліджуваних цитокінів у тварин контрольної групи ($2,529 \pm 0,132$ пг/мл, $28,166 \pm 0,526$ пг/мл, $21,588 \pm 0,763$ пг/мл і $0,131 \pm 0,006$ пмоль/л відповідно; $P < 0,05$). Кореляції, виявлені під час дослідження, відображають взаємозв'язки в системі регуляції ремоделювання кісткової тканини і розвитку запалення при хворобі нирок. Порушення балансу між про- та протизапальними цитокінами має велике значення як у розвитку ХХН, так і в процесах ремоделювання кісткової тканини.

Ключові слова: ремоделювання кісткової тканини; хронічна хвороба нирок; про- та протизапальні цитокіни.

ВСТУП

Хронічне захворювання нирок (ХХН), незалежно від етіології, характеризується тривалим прогресуючим перебігом з поступовим зниженням і втратою ниркових функцій. Ступінь зниження функції нирок при цій хворобі пов'язана з мірою пошкодження тубулоінтерстицію, фіброзування якого визначає прогресію ниркової дисфункції [1]. Ключову роль у формуванні тубулоінтерстиціальних змін відіграють тубулярні клітини, пошкодження яких супроводжується синтезом цитокінів і факторів росту, що беруть участь у формуванні клітинного інфільтрату в інтерстиції [2]. Ці міжклітинні медіатори можуть бути маркерами проліферативних змін у тубулоінтерстиціальній тканині.

Водночас патологія нирок є одним з чинників порушення ремоделювання кісткової тканини, які виникають внаслідок зміни

балансу між активністю остеокластів, що резорбують кісткову тканину, і остеобластів, що забезпечують утворення кістки [3]. Ці процеси, так само як і етапи тубулоінтерстиціального ушкодження, опосередковані впливом безлічі цитокінів і факторів росту. Важливе значення має група чинників, що об'єднуються в систему остеопротегерин, активатор рецептора ядерного фактора кВ (RANK) та його ліганд (RANKL). Останній, що експресується на поверхні остеобластів, зв'язується з RANK-рецептором, розташованим на клітинах-попередниках остеокластів, і індукує диференціювання та активацію остеокластів. Остеопротегерин діє як природний рецептор-пастка для RANKL, блокуючи його взаємодію з рецептором RANK, і інгібує формування зрілих остеокластів, знижуючи активність резорбції кісткової тканини [4].

© С.Б.Павлов, М.В.Кумечко, О.Б.Літвінова, Н.М.Бабенко, А.В.Гончарова

Важливу роль у метаболізмі кісткової тканини і розвитку запалення відіграють рецепторний антагоніст інтерлейкіну-1 (ІЛ-1 РА) і інтерлейкін-17 (ІЛ-17). Перший є одним з найважливіших протизапальних цитокінів. Він пригнічує діяльність ІЛ-1 α і ІЛ-1 β та модулює різні імунні і запальні реакції, що пов'язані з ІЛ-1, а також бере безпосередню участь у синтезі та активації остеокластів.

ІЛ-17 проявляє виражену прозапальну активність і здатний індукувати синтез різних медіаторів запалення, тим самим сприяючи розвитку аутоімунних патологічних реакцій [5]. Крім того, він діє на остеобласти і індукує експресію RANKL, що має головне значення для остеокластогенезу [6]. Можна припустити, що між порушеннями кісткового ремоделювання і фіброзом нирки існує зв'язок, що реалізується за допомогою цитокінів, котрі одночасно впливають на кісткову тканину і тканину нирок.

Мета нашої роботи – вивчення ролі міжклітинних медіаторів ІЛ-1 РА, ІЛ-17, RANKL і остеопротегерину в механізмах регуляції метаболізму ниркової та кісткової тканин на моделі порушення ремоделювання кісткової тканини при ХХН.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на білих щурах самиць віком 9 міс і масою 210 ± 30 г. Тварини були розділені на дві групи по 50 у кожній. До 1-ї контрольної групи ввійшли інтактні щури, до 2-ї – тварини з експериментальною ХХН. Модель порушення ремоделювання кісткової тканини при ХХН, що розвилася з плином часу після одноразового впливу, який викликав гостру ниркову недостатність, здійснювали одноразовим введенням 50%-го розчину гліцерину в дозі 10 мл/кг [7]. Зразки нирок щурів підлягали гістологічному дослідженню. Матеріал забирали через 12 тиж після ін'єкції гліцерину, фіксували в 10%-му нейтральному формаліні, зневоднювали в спиртах зростаючої міцності, в спирті з хло-

роформом, хлороформі, заливали у парафін [8]. Виготовлені зрізи товщиною 5-7 мкм фарбували гематоксилином і еозином за Ван Гізоном, аналізували в полі зору мікроскопа «Біолам-І». Мікрофотографії препаратів виконували за допомогою цифрової камери Microocular.

Порушення ремоделювання кісткової тканини контролювали за допомогою прямого вимірювання щільності кістки, яку розраховували як відношення маси кістки (грами) до її об'єму (сантиметри кубічні) [9].

Дослідження цитокінового профілю проводили через 12 тиж після ін'єкції гліцериним методом імуноферментного аналізу в сироватці крові. Кров для дослідження тварин брали з серця.

Вміст ІЛ-17 і ІЛ-1 РА визначали за допомогою наборів реагентів «Вектор-Бест» (Росія), ampli-sRANKL – «Biomedica» (Австрія), остеопротегерину – «eBioscience» (Австрія).

Математичну обробку результатів проводили із застосуванням пакета статистичного аналізу Statistica 6.0. Відмінності вважали вірогідними при $P < 0,05\%$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При гістологічному дослідженні нирок щурів з експериментальною ХХН виявлені істотні структурні зміни, що свідчать про порушення видільної функції органа. Так, у всіх зразках відзначається дифузне венозно-капілярне повнокров'я, в розширених судинах спостерігаються еритростази, поділ крові на плазму і формені елементи, крайове стояння лейкоцитів, що є проявом порушень кровонаповнення органа та реологічних властивостей крові. Набряк інтерстицію слабкий або помірний (рис. 1).

Будова більшості ниркових клубочків збережена, але на деяких ділянках вони мають неправильну полігональну форму (ознаки набряку) або знаходяться в стані атрофії. Також у кірковій речовині відзначаються

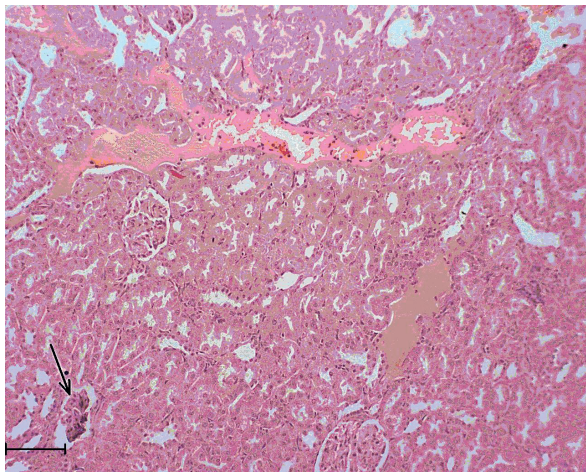


Рис. 1. Мікрофотографія тканини нирки щура. Переповнена кров'ю вена. Розшарування крові на плазму і формені елементи. Помірний набряк інтерстицію. Атрофія клубочка (стрілка). Фарбування гематоксилином та еозином. Лінійний масштаб 90 мкм. Збільшення у 100 разів

осередки нефросклерозу, де в деструктивно змінений нирковий епітелій, поступово його замінюючи, проростає сполучна тканина з численними фібробластими з великими, яскраво забарвленими функціонально активними ядрами. У фіброзно змінених ділянках зустрічаються відкладення уробіліну жовтого або бурого кольору (рис. 2).

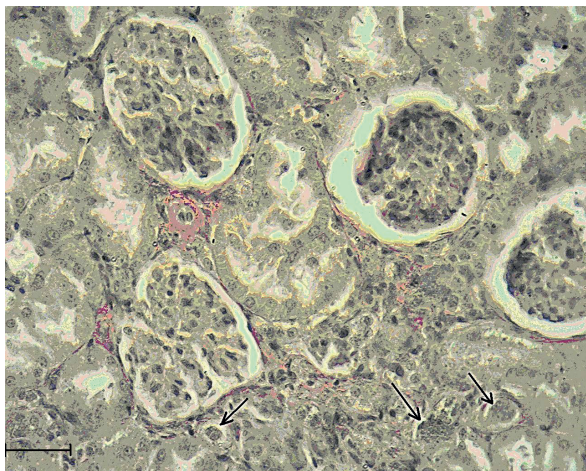


Рис. 2. Мікрофотографія тканини нирки щура. Осередок нефросклерозу. Сполучна тканина з високою щільністю фіброblastів. Відкладення уробіліну (стрілка). Фарбування за Ван Гізеном. Лінійний масштаб 40 мкм. Збільшення у 100 разів

Таким чином, гістологічне дослідження підтверджує, що одноразове введення розчину гліцерину щурам порушує видільну функцію нирок і формує ХХН.

При дослідженні щільності кістки було відзначено її достовірне зниження в групі тварин з ХХН ($1,431 \pm 0,038$ г/см³) порівняно з інтактними тваринами ($1,618 \pm 0,038$ г/см³), що підтверджує порушення ремоделювання кістки в цій групі.

Як видно з рис. 3, у тварин дослідної групи вміст у крові цитокінів ІЛ-1 РА ($4,207 \pm 0,546$ пг/мл) та ІЛ-17 ($33,944 \pm 0,938$ пг/мл) був вірогідно вищим, ніж у інтактних тварин ($2,529 \pm 0,132$ і $28,166 \pm 0,526$ пг/мл відповідно; $P < 0,05$). Також вміст остеопротегерину ($28,338 \pm 1,223$ пг/мл) і RANKL ($0,184 \pm 0,018$ пмоль/л) були достовірно вище від значень контрольної групи ($21,588 \pm 0,763$ і $0,131 \pm 0,006$ пмоль/л відповідно; $P < 0,05$). Вміст ІЛ-1 РА підвищувався на 66%, RANKL – на 40%, остеопротегерину – на 31%, ІЛ-17 – на 21%.

Найбільш значним було збільшення вмісту протизапального цитокіну ІЛ-1 РА, що є компенсаторною реакцією на підвищення концентрації ІЛ-1. Одночасно з цим зростала концентрація прозапального ІЛ-17, який стимулює продукцію багатьох цитокінів, у тому числі і ІЛ-1. Такий дисбаланс у вмісті про- та протизапальних цитокінів у групі тварин із ХХН є характерним для зрушень у системі Т-клітинної імунної відповіді, що свідчить про розвиток хронічного запалення [10]. При цьому збільшувався вміст RANKL у сироватці крові і його природного антагоніста остеопротегерину. RANKL є основним стимульовальним фактором в утворенні зрілих остеокластів, і збільшення експресії RANKL призводить до резорбції кісткової тканини, що відповідає зниженню щільності кістки в групі тварин з порушенням її ремоделювання. Це підтверджує дані дослідників про те, що запальні процеси спричиняють втрату кісткової маси, що, в свою чергу, свідчить про головну роль таких запальних цитокінів, як

ІЛ-1, у формуванні остеокластів [11]. ІЛ-1, активуючи експресію RANKL на поверхні остеобластів, регулює метаболізм кісткової тканини за рахунок стимуляції остеокластогенезу. Водночас він може пригнічувати утворення остеокластів за допомогою збільшення виробництва остеопротегерину [12, 13]. Таким чином, збільшення вмісту останнього у групі тварин з ХХН, у якій підтверджено зниження мінеральної щільності кістки, можна розглядати як компенсаторну реакцію на підвищення активності остеокластів. Крім того, підвищення вмісту остеопротегерину у цих тварин може свідчити про активацію Т-клітин, що являє собою гомеостатичну відповідь на запалення при ХХН. Ці припущення підтверджуються дослідженнями низки авторів, які надали докази зв'язку між

остеопротегерином і кістковими порушеннями за умов хронічного запалення [14, 15], а також негативною кореляцією вмісту остеопротегерину зі вмістом протизапального цитокіну ІЛ-1 РА у тварин із ХХН (таблиця).

У нашому дослідженні збільшення вмісту прозапального цитокіну ІЛ-17 було найменш значимим. Імовірно, що і його вплив на експресію RANKL та остеопротегерину неістотний. Таке припущення знаходить підтвердження в літературних даних, де дефіцит ІЛ-17 не знижує кісткову резорбцію [16]. Водночас у групі тварин із ХХН була виявлена позитивна кореляція між RANKL та ІЛ-17, це може пояснюватися тим, що останній індукує експресію RANKL у цій групі.

Можна припустити, що зміна напрямів кореляцій між вмістом цитокінів ІЛ-1 РА

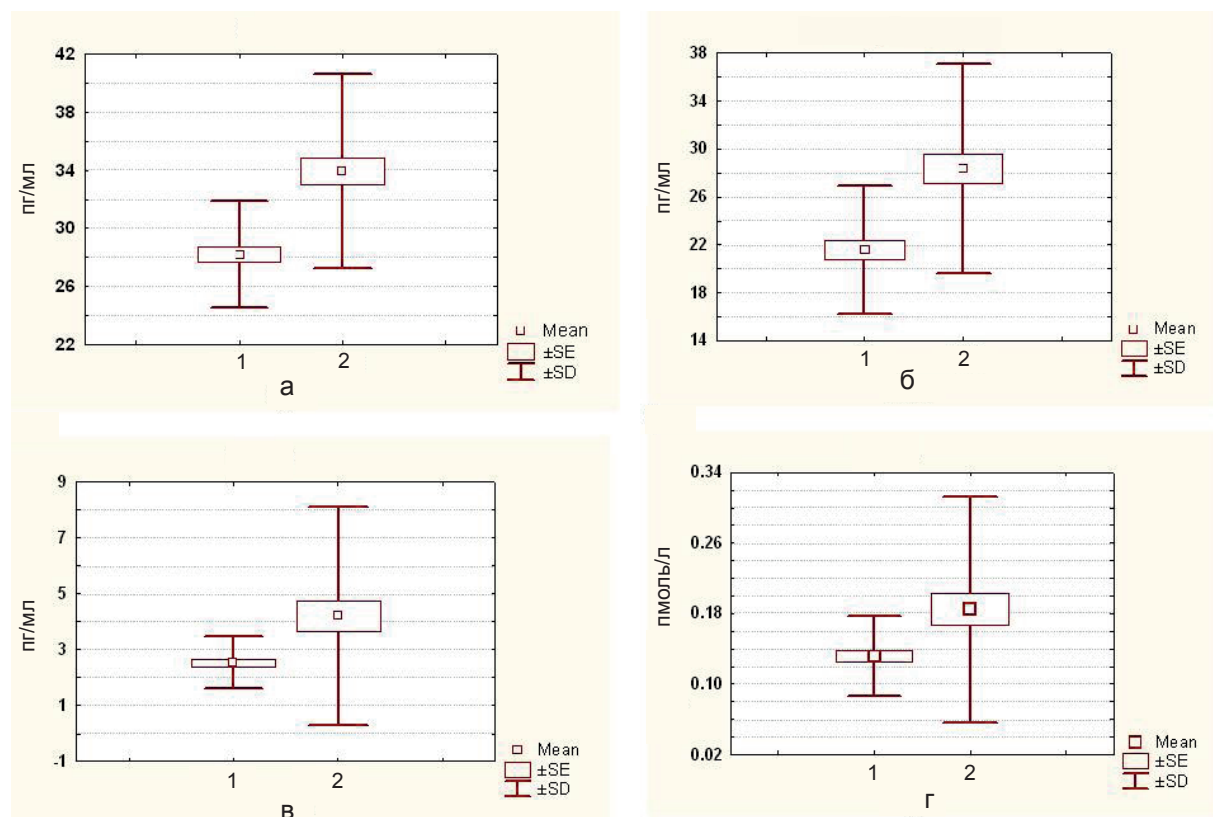


Рис. 3. Вміст цитокінів:

1 – контрольна група; 2 – група з моделлю порушення ремоделювання кісткової тканини при хронічній хворобі нирок (ХХН); а – вміст інтерлейкіну-17, б – вміст остеопротегерину, в – вміст рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1, г – вміст ліганду активатора рецептора ядерного фактора κВ

Кореляції показників між собою в групах тварин

Дослідження	Контрольна група			Група з моделлю порушення ремоделювання кісткової тканини при хронічній хворобі нирок		
	Інтерлейкін-17	Рецепторний антагоніст інтерлейкіну-1	Остеопротегерин	Інтерлейкін-17	Рецепторний антагоніст інтерлейкіну-1	Остеопротегерин
Рецепторний антагоніст інтерлейкіну-1	0.41*	-	-	-0.58*	-	-
Остеопротегерин	0.02	-0.25	-	0.08	-0.31*	-
Ліганд активатора рецептора ядерного фактора κВ	-0.003	-0.37*	-0.09	0.51*	0.59*	-0.29*

* P < 0,05

та ІЛ-17 у контрольній та дослідній групах відображає порушення балансу регуляторних механізмів при розвитку хронічного запалення, яке характеризується активністю прозапальних цитокінів і недостатньою дією їх інгібіторів і антагоністів. Це знаходить підтвердження в нашому дослідженні, де була негативна кореляція між прозапальним ІЛ-17 і протизапальним ІЛ-1 РА. Водночас середні значення вмісту даних цитокінів у дослідній групі зростають. Дисбаланс у вмісті про- та протизапальних цитокінів також відображається на зміні напрямку кореляції між вмістом RANKL та ІЛ-1 РА зі зворотною в контрольній групі на пряму в групі тварин із ХХН при зростанні середніх значень вмісту цитокінів.

Було виявлено слабку негативну кореляцію між RANKL і остеопротегерином. Незначний зв'язок може свідчити про те, що в регуляції їх синтезу задіяно безліч різних процесів, вплив яких не завжди відображає вміст цих цитокінів у сироватці крові. Хоча виявлених кореляцій недостатньо для встановлення причинно-наслідкових зв'язків, вони є важливим індикатором змін у системі регуляції ремоделювання кісткової тканини і розвитку запалення. Поява нових зв'язків і зміна їх напрямів між парами міжклітинних медіаторів може бути проявом одного з механізмів ремоделювання кісткової тканини при ХХН. Порушення балансу між про- та проти-

запальними цитокінами відіграє значну роль як у ремоделюванні кісткової тканини, так і в фіброзуванні тканини нирки. Міжклітинні медіатори є сполучною ланкою між порушеннями кісткового метаболізму і нирковою патологією.

С.Б.Павлов, М.В.Кумечко, О.Б.Литвинова, Н.М.Бабенко, А.В.Гончарова

НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

Целью нашей работы было изучение роли межклеточных медиаторов – рецепторного антагониста интерлейкина-1 (ИЛ-1 РА), интерлейкина-17 (ИЛ-17), лиганда активатора рецептора ядерного фактора κВ (RANKL) и остеопротегерина в механизмах регуляции метаболизма почечной и костной тканей на модели нарушения ремоделирования костной ткани при хронической болезни почек (ХБП). Было обнаружено достоверное увеличение содержания цитокинов ИЛ-1 РА ($4,207 \pm 0,546$ пг/мл), ИЛ-17 ($33,944 \pm 0,938$ пг/мл), остеопротегерина ($28,338 \pm 1,223$ пг/мл) и RANKL ($0,184 \pm 0,018$ пмоль/л) в сыворотке крови животных с нарушением костного ремоделирования при ХБП по сравнению с содержанием исследуемых цитокинов у животных контрольной группы ($2,529 \pm 0,132$ пг/мл, $28,166 \pm 0,526$ пг/мл, $21,588 \pm 0,763$ пг/мл и $0,131 \pm 0,006$ пмоль/л соответственно; $P < 0,05$). Корреляции, обнаруженные в ходе исследования, отражают взаимосвязи в системе регуляции ремоделирования костной ткани и развития воспаления при ХБП. Нарушение баланса между про- и противовоспалительными цитокинами имеет большое

значение как в развитии ХБП, так и в процессах ремоделирования костной ткани.

Ключевые слова: ремоделирование костной ткани; хроническая болезнь почек; про- и противовоспалительные цитокины.

**S.B.Pavlov, M.V.Kumechko, O.B.Litvinova,
N.M.Babenko, A.V.Goncharova**

BONE REGULATORY MECHANISMS DESTRUCTION IN EXPERIMENTAL CHRONIC KIDNEY DISEASE

The aim of our study was to investigate the role of intercellular mediators – interleukin-1 receptor antagonist (IL-1 RA), interleukin-17 (IL-17), receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in the mechanisms of metabolic regulation of renal and bone tissue on model of violations of bone remodeling in chronic kidney disease (CKD). It was found a significant increase in the content of cytokines IL-1 RA ($4,207 \pm 0,546$ pg/ml), IL-17 ($33,944 \pm 0,938$ pg/ml), osteoprotegerin ($28,338 \pm 1,223$ pg/ml) and RANKL ($0,184 \pm 0,018$ pmol/l) in the serum of animals in violation of bone remodeling in CKD compared with the contents of the studied cytokines in animals in the control group ($2,529 \pm 0,132$ pg/ml, $28,166 \pm 0,526$ pg/ml, $21,588 \pm 0,763$ pg/ml and $0,131 \pm 0,006$ pmol/l, respectively) ($P < 0.05$). The obtained correlations reflect the relationship between regulation of bone remodeling and the development of inflammation in CKD. The imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokine plays an important role both in the development of CKD and in processes of bone remodeling.

Key words: bone remodeling; chronic kidney disease; pro- and anti-inflammatory cytokines.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

REFERENCES

1. Kraydashenko OV, Dolinnaya MA. The role of biomarkers in the assessment of the nature of kidney damage in patients with hypertension. *Clin Nephrol* 2014; 3: 23–5. [Russian].
2. Kairaitis LK, Harris DC. Tubular-interstitial interactions in proteinuric renal diseases. *Nephrology*. 2001; 6: 198–207.
3. Gal-Moscovici A, Sprague SM. Bone health in chronic kidney disease mineral and bone disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2007; 14 (1): 27–36.
4. Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Orthop*. 2012; 3 (11): 175–81.
5. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441: 235–8.
6. Zwerina K, Koenders M, Hueber A, Marijnissen RJ, Baum W, Heiland GR, Zaiss M, McLInnes I, Joosten L, van den Berg W, Zwerina J, Schett G. Anti IL-17A therapy inhibits bone loss in TNF- α -mediated murine arthritis by modulation of the T-cell balance. *Eur J Immunol*. 2012; 42 (2): 413–23.
7. Kondakov II, Topchii II, Kirienko OM. Influence of glycerol on functional-morphological indicators of kidneys at modelling renal insufficiency in rats. *Ukr J Nephrol Dialysis*. 2013; 3 (39): 14–20. [Ukrainian].
8. Sarkisov D.S., Perova J.L. Microscopic technique. M: Medicine; 1996. [Russian].
9. Podkovkin V.G., Ivanov D.G., Ivanov G.A. The effect of magnetic field on the bone tissue status in rats with high level bone resorption. *Adv Curr Nat Sci*. 2008; 7: 13–6. [Russian].
10. Moss RB, Moll T, El-Kalay M, Kohne C, Soo Hoo W, Encinas J, Carlo DJ. Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. *Expert Opin Biol Ther*. 2004; 4 (12): 1887–96.
11. Kim JH, Jin HM, Kim K, Song I, Youn BU, Matsuo K, Kim N. The Mechanism of Osteoclast Differentiation Induced by IL-1. *The Journal of Immunology*. 2009; 183 (3): 1862–70.
12. Lambert C, Oury C, Dejardin E, Chariot A, Piette J, Malaise M, Merville MP, Franchimont N. Further Insights in the Mechanisms of Interleukin-1 β Stimulation of Osteoprotegerin in Osteoblast-Like Cells. *Journal Of Bone And Mineral Research*. 2007; 22 (9): 1350–61.
13. Lee YM, Fujikado N, Manaka H, Yasuda H, Iwakura Y. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *International Immunology*. 2010; 22 (10): 805–16.
14. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Ludwiczek O, Gabriel M, Obrist P, Wolf AM, Tilg H. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. *Gut*. 2005; 54 (4): 479–87.
15. Nascimento M.M., Hayashi S.Y., Riella M.C., Lindholm B. Elevated levels of plasma osteoprotegerin are associated with all-cause mortality risk and atherosclerosis in patients with stages 3 to 5 chronic kidney disease. *Braz J Med Biol Res*. 2014; 47 (11): 995–1002.
16. Tunyogi-Csapo M, Kis-Toth K, Radacs M, Farkas B, Jacobs JJ, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. Cytokine-controlled RANKL and osteoprotegerin expression by human and mouse synovial fibroblasts: fibroblast-mediated pathologic bone resorption. *Arthritis Rheum*. 2008; 58 (8): 2397–408.

*Матеріал надійшов
до редакції 10.12.2015*

Особливості лімбіко-неокортикальних і моноамінергічних взаємодій у формуванні синдрому відміни інгаляцій парів органічного розчинника «646» у щурів

Н.О. Левічева, А.М. Тіткова

ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», Харків,
e-mail: nati-ki@mail.ru

Метою роботи було вивчення лімбіко-неокортикальних і моноамінергічних взаємодій у формуванні синдрому відміни інгаляцій легких органічних сполук (ЛОС) у щурів. Дослідження виконані на безпородних щурах-самцях 3-місячного віку із залежністю від інгаляцій парів розчинника «646», що містить до 50 % суміші толуолу і ацетону. Показано, що стан відміни інгалянта характеризується підвищеною збудливістю та такими поведінковими проявами еквівалентів судомних реакцій, як оральні гіперкінези та струшування голови, а також змінами частотно-амплітудного спектра біопотенціалів структур лімбіко-неокортикальної системи мозку з ініціацією в медіальній нюховій ділянці і гіпокампі. На рівні гіпоталамуса відміна інгаляцій ЛОС чинила виснажуючий вплив на катехоламінергічні структури, який, певно, більшою мірою стосувався закінчень нейронів, що містять адреналін як нейромедіатор. У щурів, що початково надавали перевагу інгаляціям парів розчинника «646», відміна впливу інгалянта виявила вірогідне зниження вмісту дофаміну на 61 %, норадреналіну на 77 % та адреналіну на 92 % в гіпоталамусі та підвищення концентрації серотоніну в сироватці крові на 16 %. У щурів, що початково не надавали перевагу парам ЛОС, в гіпоталамусі знижувався тільки вміст адреналіну на 77 %.

Ключові слова: синдром відміни інгаляцій легких органічних сполук; електрична активність мозку; катехоламіни; серотонін.

ВСТУП

Вживання хімічних речовин, спрямованих на стимуляцію та підтримку високого рівня позитивних емоцій, призводить до формування адиктивної поведінки, для якої характерні прагнення до пошуку психоактивної речовини, ейфорія, толерантність і синдром відміни [1-3]. Останній за своїми психологічними, нейрофізіологічними і нейрохімічними критеріями являє собою складний психофізіологічний феномен, який визначається специфічними фармакологічними властивостями споживаної психоактивної речовини [4-7]. Такі фактори, як вік, стать, спадкова схильність мають першочергове значення у механізмах

розвитку синдрому відміни [8-9]. При цьому зміни в центральних нейромедіаторних системах і насамперед - моноамінергічних, ГАМК-ергічних з залученням і периферичної ланки симпатoadреналової системи призводять до порушень сну, пам'яті, емоцій, потягів [10, 11]. Водночас емоціогенна лімбіко-неокортикальна система мозку та її нейрохімічне забезпечення при формуванні синдрому відміни інгаляцій парів легких органічних сполук (ЛОС) мало вивчені, незважаючи на те, що ці питання є надзвичайно актуальними у зв'язку з високим поширенням вживання серед підлітків.

Метою цього дослідження було вивчення нейрофізіологічних і моноамінергічних взає-

модій у формуванні синдрому відміни інгаляцій органічного розчинника «646» у щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 23 безпородних щурах-самцях зі сформованою залежністю від ЛОС (дослідна група) і 7 інтактних тваринах (контрольна група). На початку інгаляцій вік щурів становив 3 міс, а маса – від 180 до 200 г.

Формування інгаляційної залежності у щурів проводили щодобово (протягом 40 діб) примусовим диханням парами розчинника «646», що містить до 50% суміші толуолу і ацетону. Примусову інгаляцію щурів, які перебували в умовах вільної поведінки, здійснювали в герметичному ексікаторі об'ємом 5 л протягом 10 хв.

Поведінковий компонент ступеня залежності від ЛОС оцінювали в лабіринтовій установці, яка дала змогу виявити перевагу інгаляцій парів органічного розчинника «646» або ласої їжі щурами в стані харчової депривації. Щура поміщали в центральний сектор лабіринту. Це забезпечувало тварині вільний вибір парів інгалянта або їжі (хліб, який був змочений соняшниковою олією), що знаходилися в бічних відсіках лабіринту. Протягом 10 хв оцінювали латентний період першого входу у відсіки з інгалянтом або їжею, кількість перебіжок і час перебування у відсіку, враховували кількість рухових і орієнтовно-дослідних реакцій. Стан відміни моделювали позбавленням тварин інгаляцій парів ЛОС упродовж 7 діб.

Щурам зі сформованою інгалянтною залежністю від розчинника «646», вік яких в процесі експерименту був уже 4,5 міс, імплантували під кетаміновим наркозом (100 мг/кг) ніхромові електроди у скляній ізоляції (діаметр неізолізованого кінчика 100 мк) у структури лімбіко-неокортикальної системи мозку: неокортекс, гіпокамп, гіпоталамус, мигдалеподібний комплекс, медіальну нюхову ділянку мозку, – з використанням атласу Фіфкової та Маршала [12].

Реєстрацію електричної активності мозку (ЕЕГ) здійснювали за допомогою діагностичного комплексу «Нейрон-спектр +» у стані позбавлення тварин парів інгалянта і після прийому ЛОС. Аналізували ЕЕГ з використанням програмного забезпечення «Нейрон-Спектр.NET», що дало змогу провести спектральний аналіз з графічною побудовою спектрограм. Оцінювали абсолютну спектральну щільність потужності сигналу ритмів наступних частотних діапазонів: δ (0,5-4,0 Гц), θ (4,0-8,0 Гц), α (8,0-14,0 Гц), β 1 (14,0-20,0 Гц), β 2 (20-35 Гц).

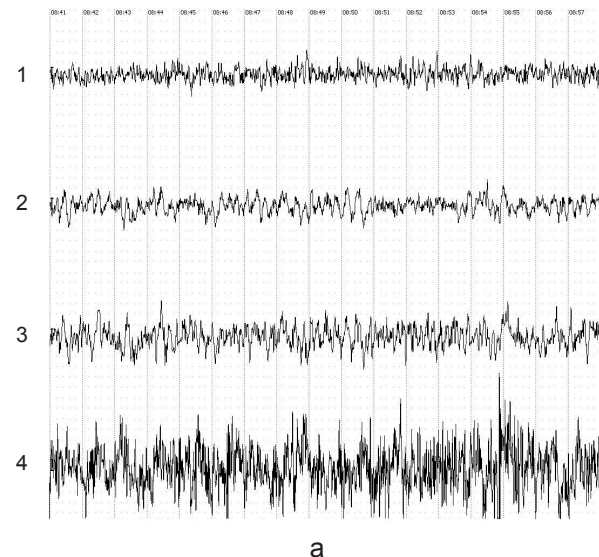
Самостимуляцію позитивних емоціогенних зон вентролатерального гіпоталамуса (струм 50-100 мкА, частота 50 Гц, тривалість імпульсу 0,5 мс) здійснювали протягом 60 хв у камері Скінера з використанням загальноприйнятої методики [13]. Пороги ноцицептивних реакцій оцінювали при подразненні кінцівок тварин у камері з електрифікованою підлогою (змінний електричний струм 50 Гц, напруга від 10 до 35 В).

Вміст адреналіну, норадреналіну, дофаміну у гіпоталамусі і серотоніну у сироватці крові визначали на 7-му добу відміни інгалянта твердофазним конкурентним імуноферментним методом на мікропланшетах за допомогою тест-систем 3 Cat ELISA та Serotonin ELISA (IBL International, Німеччина). Оптичну щільність в зразках вимірювали на ІФА-аналізаторі (Stat Fax 2100, США) при довжині хвилі 405 нм. Цільний гіпоталамус масою від 29 до 42 мг гомогенізували в 1,6 мл бідистильованої води і центрифугували при 8000 об/хв протягом 15 хв. Супернатант (500 мкл) відбирали для екстракції катехоламінів та подальшого імуноферментного аналізу відповідно до інструкції до набору. Кінцеву концентрацію катехоламінів розраховували, виходячи з маси тканини, взятої на дослідження, в наномолях на 1 г тканини.

Статистичну обробку результатів здійснювали із застосуванням пакету статистичних програм Statistica 6.0., використовуючи непараметричний критерій Вілкоксона і критерій Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Формування поведінки, яка залежить від інгаляцій легкого органічного розчинника «646», у щурів, судячи зі змін поведінкових реакцій, електрографічних характеристик активності структур лімбіко-неокортикальної системи мозку і особливостей перебігу реакцій самостимуляції, відбувалося протягом 40 діб щоденного впливу інгалянта [14]. У всіх тварин відзначалося вірогідне збільшення кількості перебіжок в камеру з інгалянтом і часу перебування в ній ($3,7 \pm 0,6$ та $58,8 \pm 10,3$ с відповідно) порівняно з показниками у контролі ($1,0 \pm 0,5$ та $8,8 \pm 5,3$ с; $P < 0,05$). Пороги ноцицептивних реакцій при електрошкірному подразненні кінцівок тварин на фоні інгаляцій ЛОС були підвищеними ($22,2 \pm 2,6$ В) порівняно з контрольними значеннями ($16,0 \pm 0,9$ В; $P < 0,05$). Стан відміни інгаляцій ЛОС у цих тварин характеризувався хаотичністю рухів і внутрішньогруповою агресією, проявами еквівалентів судомних реакцій: струшування голови, оральні автоматизми; пароксизмальним диханням, а також зниженням порогів ноцицептивних реакцій при електрошкірному подразненні кінцівок тварини ($19,0 \pm 0,9$ В).



На ЕЕГ структур лімбіко-неокортикальної системи мозку в стані відміни інгаляцій ЛОС рееструвалися прояви судомної активності з домінуванням у медіальній нюховій ділянці і гіпокампі (рис. 1, а). Аналіз середньої спектральної потужності біопотенціалів ЕЕГ показав достовірне підвищення абсолютної спектральної потужності біопотенціалів δ -діапазону в неокортексі, гіпокампі, та медіальній нюховій ділянці, а також θ -ритму у гіпокампі та гіпоталамусі порівняно з контрольною групою (рис. 2, а, в, д). Спектральна потужність α -ритму зростала лише в гіпокампі (див. рис. 2, б).

Частота реакції самостимуляції позитивних емоціогенних зон вентролатерального гіпоталамуса в стані відміни інгаляцій органічного розчинника «646» була $238,5 \pm 1,2$ натискань на педаль за 5 хв. Прийом чергової дози інгалянта призводив до її вірогідного зниження до $207,5 \pm 2,5$ натискань.

Відновлення інгаляцій парів органічного розчинника «646» призводило також до гальмування рухової гіперактивності у щурів, до купірування судомних проявів у поведінці тварин та на ЕЕГ структур лімбіко-неокортикальної системи мозку; знижувалась

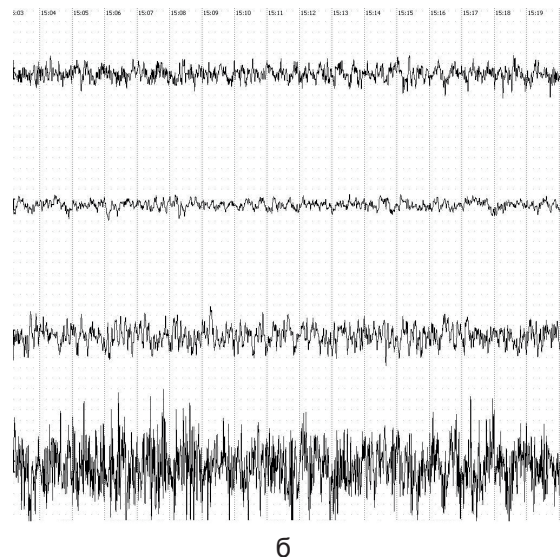


Рис. 1 Динаміка електричної активності мозку щура №16 під впливом парів органічного розчинника «646:

а – у стані відміни прийому інгаляцій, б – після прийому інгаляцій; 1 – неокортекс, 2 – гіпоталамус, 3 – гіпокамп, 4 – медіальна нюхова ділянка

абсолютна спектральна потужність біопотенціалів θ -діапазону в медіальній нюховій ділянці та гіпокампі, а також δ -діапазону – у неокортексі і гіпокампі (див. рис. 1, б; 2). Абсолютна спектральна потужність коливань α -ритму збільшувалася в гіпоталамусі ($P < 0,05$; див. рис. 2, в).

Таким чином, синдром відміни інгаляцій парів органічного розчинника «646» у щурів характеризується підвищеною збудливістю і судомними проявами в поведінці і на ЕЕГ структур лімбіко-неокортикальної системи мозку. Провідними структурами у формуванні судомної активності є медіальна нюхова ділянка і гіпокамп, що свідчить про їх ключове значення у формуванні синдрому відміни інгалянта. При цьому рівень активації системи позитивного емоційного підкріплення може бути чинником оцінки ступеня потягу до інгаляцій ЛОС.

Біохімічні дослідження, що були проведені на 7-му добу відміни інгаляцій парів органічного розчинника «646», не виявили виражених змін концентрації серотоніну в крові загальної групи тварин при відміні інгалянта, але відмічено підвищення у щурів,

що початково віддавали перевагу інгаляціям ЛОС (таблиця).

Дослідження концентрацій катехоламінів у гіпоталамусі щурів продемонструвало зниження вмісту адреналіну на 84 % порівняно з контрольною групою тварин. Розподіл тварин на групи залежно від рівня потягу до інгаляцій ЛОС при першій інгаляції виявив вірогідні відмінності у вмісті КА у щурів, що початково віддають або не віддають перевагу інгаляціям парів розчинника «646». У тварин з низьким рівнем потягу до інгаляцій ЛОС у стані відміни виявлено зниження концентрації адреналіну на 77 % порівняно з контролем при збереженні вмісту дофаміну і норадреналіну. У щурів з початковим високим рівнем потягу до ЛОС - зниження вмісту всіх катехоламінів: дофаміну – на 61 %, норадреналіну – на 74 %, адреналіну – на 92 %.

У дослідженні Rodriguez і співавт. [15] показано, що щоденні інгаляції парами толуолу протягом 30 діб підвищують вміст дофаміну і норадреналіну в середньому мозку і стріатумі щурів. Ці дані свідчать про те, що інгаляції ЛОС призводять до активації обміну

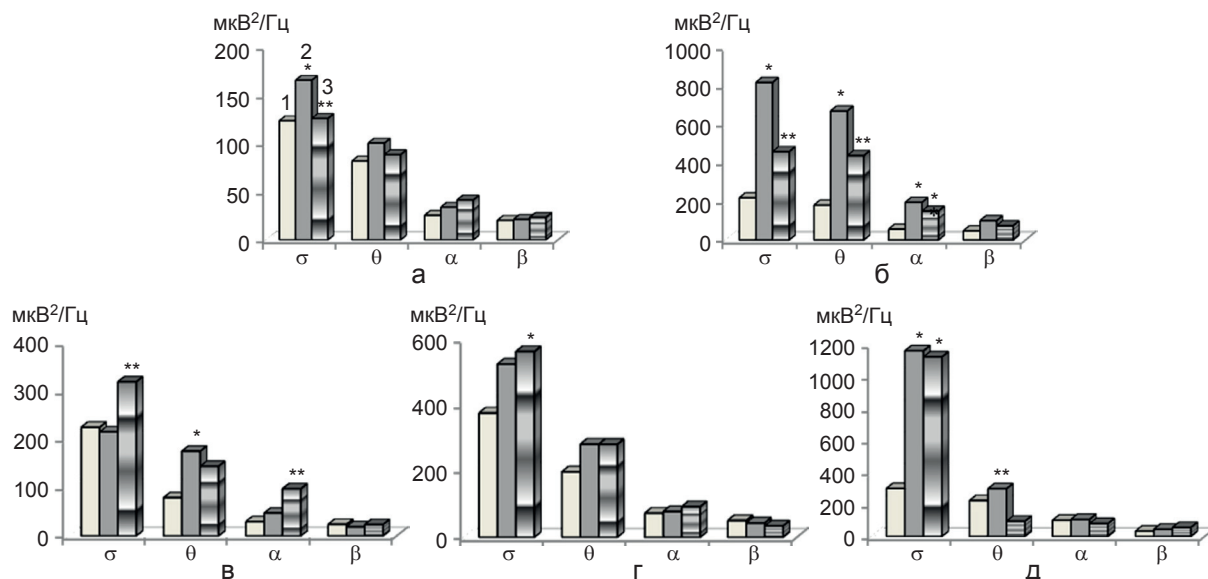


Рис. 2. Динаміка абсолютної спектральної потужності біопотенціалів електричної активності мозку щурів в стані відміни інгаляцій летких органічних сполук та після їх прийому:

1 – контроль, 2 – у стані відміни прийому інгаляцій, 3 – після прийому інгаляцій; а – неокортекс, б – гіпокамп, в – гіпоталамус, г – мигдалеподібний комплекс, д – медіальна нюхова ділянка; за всією абсцис – біопотенціали мозку щурів у діапазоні частот δ , θ , α , β ; * $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** $P < 0,05$ порівняно зі станом відміни інгаляцій

Вміст катехоламінів у гіпоталамусі та серотоніну в сироватці крові інтактних щурів і тварин, що початково віддавали або не віддавали перевагу інгаляціям летких органічних сполук (ЛОС), у стані відміни інгаляцій парів розчинника «646» (M±m)

Показник	Контроль (n=4-10)	Загальна група (n=8)	Початкова перевага ЛОС (n=4)	Без початкової переваги ЛОС (n=4)
Дофамін, нмоль / г тканини	53,60±8,60	39,30±7,70	20,79±1,91 *, **	53,13±7,63
Норадреналін, нмоль / г тканини	5,90±3,90	4,20±1,10	1,56±0,09 *, **	6,12±1,26
Адреналін, нмоль / г тканини	3,10±1,60	0,50±0,10*	0,24±0,14 *	0,71±0,12 *
Серотонін, мкмоль/л	9,50±0,30	9,80±0,40	10,96±0,23 *, **	8,93±0,62

*P < 0,05 порівняно з контролем, ** порівняно з групою тварин без початкової переваги ЛОС.

і підвищення вмісту катехоламінів у головному мозку. У наших попередніх дослідженнях виявлено значне уповільнення їх обміну і більш ніж дворазове підвищення концентрації серотоніну в крові щурів у першу добу відміни інгаляцій ацетоном [16].

У стані відміни інгалянта відсутність стимуляції катехоламінергічної системи парами розчинника «646», що містить у своєму складі і толуол, і ацетон, призводить до уповільнення обміну катехоламінів у гіпоталамусі. Щури, котрі спочатку віддавали перевагу ЛОС, виявилися більшою мірою схильними до цього впливу, що виражалось різною мірою виснаження вмісту катехоламінів у гіпоталамусі.

Особливо слід відмітити значне зниження вмісту адреналіну в гіпоталамусі у всіх тварин, що піддавалися відміні інгаляцій ЛОС. Враховуючи той факт, що адренергічні нейрони, основним нейромедіатором яких є адреналін, мають власне представництво в стовбурі головного мозку і досить щільно іннервують структури гіпоталамуса [17], можна припустити, що у разі тривалого впливу парів органічного розчинника «646» піддаються ураженню функції саме цих нейронів. І відбувається це не залежно від початкового рівня переваги інгаляцій ЛОС, який здебільшого визначається інтенсивністю обміну дофаміну і норадреналіну.

ВИСНОВКИ

1. Провідними структурами лімбіко-неокортикальної системи мозку у формуванні син-

дрому відміни інгаляцій парів органічного розчинника «646» виступають медіальна нюхова ділянка і гіпокамп.

2. На рівні гіпоталамуса відміна інгаляцій ЛОС чинить виснажувальний вплив на катехоламінергічні структури, який, певно, більшою мірою стосується закінчень нейронів, що містять адреналін як нейромедіатор. У щурів, що початково віддають перевагу інгаляціям розчинника «646», відміна впливу парів інгалянта виявила недостатність дофамін- і норадренергічної ланок регуляції гіпоталамічних функцій і більш високі компенсаторні можливості периферичної серотонінергічної системи.

Н.А. Левичева, А.М. Титкова

ОСОБЕННОСТИ ЛИМБИКО-НЕОКОРТИКАЛЬНЫХ И МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ В ФОРМИРОВАНИИ СИНДРОМА ОТМЕНЫ ИНГАЛЯЦИЙ ПАРОВ ОРГАНИЧЕСКОГО РАСТВОРИТЕЛЯ «646» У КРЫС

Целью работы явилось изучение лимбико-неокортикальных и моноаминергических взаимосвязей в формировании синдрома отмены ингаляций летучих органических соединений (ЛОС) у крыс. Исследования выполнены на беспородных крысах-самцах 3-месячного возраста с зависимостью от ингаляций паров растворителя «646», содержащего до 50 % смеси толуола и ацетона. Показано, что состояние отмены ингалянта характеризуется повышенной возбудимостью и такими поведенческими проявлениями эквивалентов судорожных реакций, как оральные гиперкинезы, встряхивание головы, а также изменениями частотно-амплитудного спектра биопотенциалов структур лимбико-неокортикальной системы мозга с инициацией в медиальной обонятельной области и гиппокампе. На уровне гипоталамуса отмена ингаляций ЛОС оказывает

истожающее влияние на катехоламинергические структуры, вероятно, в большей степени затрагивая окончания нейронов, содержащих адреналин в качестве нейромедиатора. У крыс, исходно предпочитающих ингаляции растворителя «646», отмена воздействия паров ингалянта выявила достоверное снижение содержания дофамина на 61 %, норадреналина на 77 % и адреналина на 92 % в гипоталамусе и повышение концентрации серотонина в сыворотке крови на 16 %. У крыс, исходно не предпочитающих ингаляции паров ЛОС, в гипоталамусе отмечалось снижение только содержания адреналина на 77 %.

Ключевые слова: синдром отмены ингаляций летучих органических соединений; электрическая активность мозга; катехоламины; серотонин.

N.A. Levicheva, A.M. Titkova

FEATURES OF LIMBIC-NEOCORTICAL AND MONOAMINERGIC CORRELATIONS IN THE DEVELOPMENT OF WITHDRAWAL SYNDROME OF INHALATIONS OF VAPORS OF ORGANIC SOLVENT «646» IN RATS

The aim of the work was to study the limbic-neocortical and monoaminergic features of the development of withdrawal syndrome of volatile organic compounds (VOC) inhalations in rats. The study was carried out in 30 three months old male rats with dependence on inhalations of organic solvent «646» which contains up to 50 % mix of toluene and acetone. It has been shown that the withdrawal syndrome of inhalant is characterized by increased excitability and behavioral manifestations of equivalents of convulsive reactions such as oral hyperkinesis, head shaking and changes in the frequency-amplitude spectrum of the biopotentials in structures of the brain limbic-neocortical system with the initiation in the medial olfactory region and hippocampus. At the hypothalamus level, withdrawal of VOC inhalations produces the depleting impact on the catecholaminergic structures with a stronger effect in neuronal endings with adrenaline as neurotransmitter. Withdrawal syndrome evokes a significant decrease in dopamine content by 61 %, noradrenaline by 77 % and adrenaline by 92 % in the hypothalamus and increase in serotonin concentration in blood serum by 16 % in rats with initial preference to inhalations of organic solvent «646». In rats with the absence of initial preference to inhalations of organic solvent «646» a decrease in adrenaline level in the hypothalamus by 77 % was detected.

Key words: withdrawal syndrome of volatile organic compounds inhalations; electrical activity of the brain; catecholamines; serotonin.

SI "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of NAMS of Ukraine", Kharkiv

REFERENCES

1. Vorobjova TM. Chaotic neurodynamics of the brain positive reinforcement and its importance in the mechanisms of secondary acquired motivations. *Narcology*. 2010; 7: 48-54. [Russian].
2. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35 (1): 217-38.
3. Artemchuk AF, Sosin IK, Chernobrovkina TV. Ecological bases comorbidity addictive diseases. *Kharkiv: Collegium*. 2013: 1152. [Ukrainian].
4. Berchenko OG. EEG correlates of formation of dependence on glue "Moment" vapour inhalations in rats. *Narcology*. 2004; 10: 24-26. [Russian].
5. Beckley JT, Woodward JJ. Volatile solvents as drugs of abuse: focus on the cortico-mesolimbic circuitry. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38: 2555-67.
6. Melnikov MYe, Shubina OS. Contemporary electroencephalographic research on addictive disorders. *Adv of Physiol Sci*. 2013; 44 (3): 16-32.
7. Vandrey RG, Budney AJ, Hughes JR, Liguori A. A within-subject comparison of withdrawal symptoms during abstinence from cannabis, tobacco, and both substances. *Drug and Alcohol Dependence*. 2008; 92: 48-54.
8. Batis JC, Hannigan JH, Bowen SE. Differential effects of inhaled toluene on locomotor activity in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010; 96: 438-48.
9. Kaurin AV, Bulycheva OS. Criteria for prediction of neonatal abstinence syndrome in mothers of drug addicts. *Int J Appl Fund Res*. 2012; 1: 55-6.
10. Sulzer D. How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron*. 2011 Feb; 69 (4): 628-49.
11. Win-Shwe TT, Fujimaki H. Neurotoxicity of toluene. *Toxicol. Lett*. 2010; 198 (2): 93-99.
12. Bures J, Petranov M, Zahar I. Electrophysiological methods. Translation from Polish. Moscow: Publishing House of Foreign Literature. 1962: 456.
13. Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*. 1954; 47: 419-27.
14. Levicheva NA; Berchenko OG. Brain electrical activity and peculiarities of the self-stimulation reaction in pubertate rats with addiction to inhalation of organic solvent vapors. *Neurophysiology*. 2014; 6(46): 587-90. [Ukrainian].
15. Rodriguez AA, Nava AB, Piña RG, e. a. Chronic exposure to toluene changes the sleep-wake pattern and brain monoamine content in rats. *Acta Neurobiol Exp*. 2011; 71: 183-92.
16. Titkova AM, Kharitonova SM. Acetylcholinesterase activity in brain structures and content of biogenic monoamines in blood in rats under long-term acetone vapor intoxication. *Narcology*. 2003; 9: 2-6. [Russian].
17. Mefford IN. Epinephrine in mammalian brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiat*. 1988; 12: 365-88.

Матеріал надійшов до редакції 07.08.2015

Перспективи застосування C₆₀-фулерену як засобу профілактики і корекції ішемічно-реперфузійних порушень у скелетній м'язовій тканині

С.Ю. Зай¹, Д.О. Заводовський², К.І. Богуцька², Д.М. Ноздренко², Ю.І. Прилуцький²

¹Східноєвропейський національний університет ім. Лесі Українки, Луцьк,

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ; e-mail: prylut@ukr.net

Нині актуальною проблемою залишається відсутність точних діагностичних тестів для швидкого виявлення рівня ішемічної травми, що має важливе значення для ефективності подальшої її терапії. У цьому контексті триває пошук специфічних маркерів ішемії, а також нових терапевтичних агентів для попередження, профілактики і лікування ішемічної травми. Водорозчинні нанорозмірні C₆₀-фулерени як потужні антиоксиданти можуть виступати перспективними засобами для корекції різних станів м'язової системи, в основі розвитку яких лежить деструктивна дія вільнорадикальних процесів.

Ключові слова: C₆₀-фулерен; ішемія; м'язове скорочення; скелетні м'язи.

Серед патологій, які розвиваються у скелетних м'язах за різних травм, ішемічні порушення становлять понад 35% [1]. Вони є однією з основних причин післяопераційних ускладнень та можуть після гострої артеріальної оклюзії призвести до ампутації кінцівок і навіть смертності [2, 3]. Нині вкрай актуальною є проблема відсутності точних діагностичних тестів для швидкого встановлення рівня ішемічної травми, що має вирішальне значення для ефективності подальшої її терапії [4], адже це патологічний процес з швидким розвитком у часі: так, уже після першої години ішемізації сила скорочення ушкодженого м'яза зменшується до 40% від вихідного рівня, а після двох годин – на 90%, після чого, навіть за проведення необхідних терапевтичних заходів, відновлення скорочувальної відповіді спостерігається лише на третій тиждень після реперфузії [5].

Патогенез розвитку ішемії зумовлений зниженням припливу артеріальної крові і значним збільшенням споживання тканинами кисню та субстратів обміну речовин. Причинами такого порушення можуть бути різні

природні, патогенні чинники і несприятливі умови, вплив яких призводить до зменшення просвіту артеріальних судин і утруднення руху крові по ним. Якщо ішемія розвивається в окремому скелетному м'язі, вона вважається локальною; якщо ж виникає одночасно в різних м'язах, як це часто відбувається за політравм після дорожньо-транспортних пригод або внаслідок шлуночкової недостатності, тоді мова йде про генералізовану. Проте з фізіологічної точки зору в основі розвитку всіх різновидів ішемії скелетних м'язів лежать чотири основні шляхи патогенезу (або їх поєднання):

1) обтураційний – характеризується зменшенням просвіту артеріальних судин внаслідок повної або часткової їх закупорки тромбом, емболом, потовщення їх стінок завдяки набряку, розвитку атеросклеротичної бляшки або розростання сполучної тканини;

2) компресійний – відбувається внаслідок стискання стінки судини ззовні наростаючою пухлиною, сполучно-тканинним рубцем, стороннім тілом, джгутом (в експериментальних дослідженнях моделювання компресійної ішемії називають «турнікетною ішемією»);

© С.Ю. Зай, Д.О. Заводовський, К.І. Богуцька, Д.М. Ноздренко, Ю.І. Прилуцький

3) ангіоспастичний – нейрогенний рефлекторний спазм артерій;

4) гуморальний – ішемія зумовлена надмірним утворенням в ендотелії судин або в інших клітинно-тканинних структурах вазоконстрикторних гуморальних речовин (катехоламінів, простагландинів, тромбоксану А₂, ангіотензину-2, вазопресину, серотоніну) чи підвищенням чутливості до них м'язів артеріальних судин, а також недостатнім синтезом і активністю деяких з них (гістаміну, простагландинів Е, І, А тощо).

З функціональної точки зору ішемія скелетних м'язів буває двох видів: фізіологічна і патологічна. Перший – тимчасовий та оборотний, має пристосувальне значення. Типовий приклад – та, що виникає у скелетних м'язах під час і після фізичних тренувань. Другий вид – біологічно недоцільний, не відповідає метаболічним і функціональним потребам м'яза, становить загрозу її девіталізації [5, 6]. Незалежно від шляху розвитку ішемії ішемічноушкоджені м'язи мають спільні ознаки, до яких можна віднести: збліднення, зміну лінійної і об'ємної швидкості кровотоку в мікросудинах, зниження пульсації артеріальних судин, а також тиску них, зменшення кількості функціонуючих кровоносних і лімфатичних мікросудин, підвищення проникності їхніх стінок, зниження тургору м'яза та парціального тиску кисню (pO_2) у крові, тканині, органі (розвиток гіпоксемії крові та тканинної гіпоксії), наростання ацидозу в тканині, активація анаеробних і пригнічення аеробних процесів, порушення трофіки і зниження температури тканини або органа, зміну чутливості тканин (парестезія, біль), зниження функціональної активності як окремих міоцитів, так і тканини загалом.

Внаслідок зниження припливу крові по артеріальних судинах зменшується доставка до м'яза кисню, поживних і регуляторних речовин. Це може призвести до прогресуючого розладу в ньому метаболічних, морфологічних і фізіологічних процесів. Найбільш чутливою до ішемії є нервова тканина (гине

вже через 5-6 хв), м'язова виявляє більшу толерантність і може переносити тривалу ішемію (більше ніж 6 год), а кісткова є найбільш резистентною до ішемії [5, 7].

Отже, наслідки ішемії скелетного м'яза залежать від ступеня ушкодження мікроциркуляторного русла, рівня тканинної гіпоксії, кількості та співвідношення продуктів метаболізму, Na^+ , K^+ , H^+ , рівня механічних ушкоджень м'яза тощо [3, 8, 9].

За неповної ішемії скелетного м'яза можуть розвиватись ішемічний стаз, дистрофія, гіпотрофія та атрофія, за прогресуючої та повної – спочатку виникає некробіоз, некроз (м'язовий інфаркт) і надалі відбувається формування рубця. Наслідки порушень залежать від таких факторів: локалізації і різної чутливості тканини або органа до гіпоксії (доведена особливо висока чутливість до нестачі кисню нервової тканини і міокарда), ступеня розвитку колатерального кровообігу (добре розвинений у м'язах кінцівок; відносно недостатність відзначають у серцевому м'язі), тривалості ішемії та гіпоксії тканин, діаметра ураженої артеріальної судини, що васкуляризує м'яз (при закритті просвіту більш великої судини виникають значні некротичні ураження тканин) тощо.

Анатомо-фізіологічні аспекти патогенезу ішемічної травми скелетних м'язів. Найбільш часто ішемічна травма скелетних м'язів зустрічається при багатоуламкових переломах, тупих травмах кінцівок з ушкодженням та розчавленням м'язів, політравмах, опіках, укусах отруйних змій. Описані випадки розвитку цього ушкодження через довгочасне перебування у вимушеному положенні на операційному столі при урологічних операціях, тривалій ходьбі, за повторних операцій на тромбованих судинах, стиснутих гіпсовою пов'язкою [10-12].

Багато фасціальних перегородок у м'язах межують з довгими кістками, які не дають змоги їм розширюватися за збільшення внутрішньотканинного тиску, що часто супроводжує ішемічну травму з перших хвилин пато-

генезу. Підвищення тиску в м'язі призводить до його збільшення і в міжперегородковому просторі, що зумовлює зменшення, а іноді і повне припинення артеріального притоку крові. Ішемія, яка розвивається при цьому, з часом призводить до необоротних некротичних змін у м'язах, судинах і нервах.

Усі морфологічні фактори, які сприяють розвитку м'язового ішемічного гіпертензійного синдрому, поділяють на детерміновані та індивідуальні. До першої групи належать особливості анатомічної будови м'якого остову ділянки передпліччя, а саме наявність щільних фасціальних футлярів і вузлів апо-невротичного типу, ступінь розвитку м'язів тощо. Індивідуальні фактори можуть бути зумовлені напрямом зміщення кісткових уламків, типами первинних і вторинних уражень м'язів та судинно-нервових пучків.

Встановлено, що різноманітним кістково-фасціальним перегородкам, які обмежують скелетні м'язи, властивий відносно постійний тиск. Нормальний клітинний метаболізм відбувається за рО₂ 5-7 мм рт. ст., капілярного тиску перфузії більше ніж 25 мм рт. ст. та внутрішньотканинного тиску 4-6 мм рт. ст. Накопичення понаднормової кількості рідини в інтерстиціальному просторі чи зменшення об'єму перегородки внаслідок зовнішнього (травматичного) впливу призводить до зростання внутрішньоперегородкового тиску. Але до певного рівня це компенсується підвищенням тиску перфузії (збільшення тиску в судинах, які кровопостачають тканини перегородки), що розглядають як фізіологічну компенсаторну реакцію. Його прогресуюче зростання може призвести до пригнічення аутогенних механізмів і розвитку внутрішньотканинних ушкоджень. Так, доведено, що за підвищення внутрішньоперегородкового тиску зростає також і венозний [13]. Коли він стає вищим за тиск перфузії, настає колапс капілярів, наслідком чого є порушення периферичного кровотоку. Постачання кисню тканинам припиняється. Гіпоксія призводить до накопичення у тканинах вазоактивних

субстанцій, зокрема гістаміну та серотоніну, які збільшують проникність ендотелію судин. Рідина переміщується з просвіту судин в інтерстиціальний простір, внаслідок чого підвищується внутрішньоклітинний тиск, викликаючи ушкодження тканин. Провідність по нервових волокнах порушується, рН тканин зменшується під впливом накопичення анаеробних метаболітів. Розвивається некроз м'язової тканини, що може привести до втрати кінцівки або навіть життя травмованим. Значення внутрішньоперегородкового тиску, яке призводить до колапсу капілярів, достовірно не відоме, але у клінічній практиці його вважають близько 30 мм рт. ст. і за цією межею виконують невідкладну медичну інвазивну корекцію, без якої за тривалості ішемії 2-3 год відбуваються як м'язові некротичні зміни, так і нервова деградація, а кількість некротизованої тканини в ураженому м'язі становить до 60% [1, 13].

За ішемічної травми скелетного м'яза спостерігається кореляція між внутрішньом'язовим та внутрішньокістковим тиском. Так, в експериментах на кроликах зі штучною турнікетною ішемією показано, що вона викликає підвищення підфасціального тиску, яке, у свою чергу, призводить до зменшення внутрішньокісткового [14]. Такий зв'язок спостерігається за збільшення першого з 20-30 до 60-70 мм рт. ст., а за подальшого збільшення до 80-90 мм рт. ст. кров'яний тиск зменшується. Таке зниження свідчить про перекриття кровотоку по артеріям. Однак за припинення ішемізації значення внутрішньокісткового тиску у проксимальному метафізі великогомілкової кістки збільшується і перевищує тканинний тиск. Це говорить про відновлення кровообігу в кістковому мозку.

За ішемічної травми скелетного м'яза спостерігається висока кореляція між тривалістю ішемізації та подальшою життєздатністю м'язового волокна [4]. Незважаючи на те, що різні типи волокон виявляють значні метаболічні та функціональні відмінності, це не впливає істотно на їхню толерантність до

травм від ішемії-реперфузії [5].

На клітинному рівні для ішемічної травми скелетного м'яза характерною є міграція нейтрофілів у ендомізій, а потім у перимізій через 24 год після 2 год ішемії і подальшої реперфузії [5]. Для відновлення функціональності м'яза після ішемічного ушкодження важливу роль відіграє імунна система. Зокрема, виявлено кореляцію часу відновлення скелетних м'язів після ішемічної травми з активністю макрофагів (саме з цим пов'язана поява макрофагосфокусованого напрямку терапії ішемічної травми) [15]. Проте структурний процес відновлення починається лише в кінці першого тижня після 2 год ішемізації. Отже, існують функціональні і морфологічні докази ішемічного та реперфузійного ушкодження м'язових тканин навіть через тиждень після реперфузії. А затримка часу початку терапевтичних заходів, особливо в перші години ішемізації, значно гальмує подальші процеси регенерації та зменшує рівень функціонального відновлення травмованого м'яза [5].

Біохімічні аспекти патогенезу ішемічної травми скелетних м'язів. На біохімічному рівні ішемічне ушкодження скелетного м'яза являє собою послідовність біохімічних реакцій, які ініціюються за умов гіпоксії вже після декількох хвилин ішемізації, незалежно від етіологічних особливостей тканини, і є наслідком недостатнього кровопостачання [1]. Більшість клітин гинуть внаслідок активації хімічних речовин, які продукуються під час та після ішемізації і можуть утворитись упродовж декількох днів навіть після відновлення нормального кровотоку. Подальша розробка адекватної біохімічної моделі ішемічного процесу є актуальною як з фундаментальної точки зору, так і для пошуку та ідентифікації специфічних біохімічних маркерів для швидкого встановлення рівня ішемічного ушкодження скелетних м'язів, оскільки це має вирішальне значення для його наступного лікування. Однак досі відсутні точні діагностичні тести, доступні для досягнення цієї мети [4].

Встановлено, що після 2 год ішемії скелетного м'яза та подальшої реперфузії суттєво знижується концентрація АТФ одночасно зі значним збільшенням вмісту лактату (з 25 до 114 ммоль/кг сухої маси). А вже після 3 год розвитку процесу внутрішньом'язовий запас АТФ становить близько 5% від вихідного рівня, а пул глікогену вичерпаний на 88% [7]. З функціональної точки зору ці дані вказують на те, що значна кількість високоенергетичних фосфатних сполук витрачається ішемічноушкодженою м'язовою клітиною на підтримку гомеостазу, особливо під час першої години ішемізації, і, як наслідок, порушення обміну речовин призводить до значного зростання втомлюваності ішемізованого м'яза [16].

Найхарактернішими біохімічними сполуками, які, з одного боку, легко ідентифікувати у клінічних дослідженнях за ішемічної травми, а, з іншого, вміст яких значно змінюється у бік зростання, є фермент креатинфосфокіназа і міоглобін у сироватці крові та міоглобін у сечі. На лабораторних тваринах (свинях) була змодельована ішемічна травма задніх кінцівок, викликана оклюзією зовнішньої та внутрішньої клубової артерії упродовж 5 год з подальшим відновленням регіонарного кровотоку. У сироватці крові цих тварин визначали концентрацію креатинкінази, гістаміну, міоглобіну, активності моноаміноксидази та діаміноксидази. Встановлено важливу роль гістаміну в генезі набряку м'язової тканини у реперфузійний період та підтверджено значне підвищення у плазмі крові вмісту міоглобіну та креатинкінази, що добре узгоджується з даними Kostler з співавт. [17].

Якщо узагальнити основні біохімічні шляхи розвитку патологічних змін за ішемічної травми скелетного м'яза, можна виділити такі аспекти:

1) нестача кисню в ішемізованому міоциті знижує вміст необхідної АТФ;

2) міоцити беруть участь в анаеробному метаболізмі, виробляючи молочну кислоту; внаслідок різкої зміни внутрішньоклітинного рН відбувається збій у роботі іонних насосів і клітини стають деполаризованими, що сприяє

проникненню Ca²⁺ всередину;

3) іонні насоси не можуть впоратися з перенесенням кальцію з клітини і його внутрішньоклітинний вміст стає занадто високим;

4) надлишок цих іонів призводить до генерації патогенних хімічних речовин, зокрема вільних радикалів і кальційзалежних ферментів (кальпаїн, ендонуклеази, АТФази і фосфоліпази);

5) мембрана міоцита при надлишковій кількості фосфоліпаз стає більш проникною, внаслідок чого більше іонів і патогенних хімічних речовин потрапляють всередину клітини; відбувається руйнування мітохондрій, продукуються додаткові токсини і фактори;

6) у разі некротичної загибелі ішемічно-ушкодженої клітини токсичні речовини потрапляють у міжклітинний простір; активується каскад відповіді на запальний процес і фагоцитарні клітини поглинають такі тканини;

7) формується набряк тканин через витік макромолекул (альбуміни) з ушкоджених кровоносних судин внаслідок їх вазоконстрикції [3, 5, 6, 8, 16].

Загалом усі ці процеси є вкрай небезпечними для самої ушкодженої тканини, адже вона втрачає 75% міоглобіну, 70% креатиніну, 66% калію і 75% фосфору. Після механічного чи хірургічного відновлення кровопостачання попередньо ішемізованого м'яза ці речовини надходять у кровеносне русло, розвивається ацидоз, тяжкі загальні і, в першу чергу, гемодинамічні розлади [18].

Не меншу загрозу для організму становлять і вільні радикали, які інтенсивно утворюються за ішемічної травми м'яза. Зокрема, супероксид- і гідроксид-радикали є основним патогенним чинником у процесі ішемічно-реперфузійних ушкоджень м'язової тканини. Вони включають ініціацію перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), пряме інгібування мітохондріальних ферментів дихального ланцюга, інактивацію гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, інгібування АТФ-азної активності, інактивацію мембранних натрієвих

каналів та деякі інші патофізіологічні процеси [9, 19]. Особливістю появи значної кількості супероксид-радикала є те, що він з'являється у набагато більших кількостях вже на етапах реперфузії, наступних за самою ішемізацією, і швидко реагує з оксидом азоту (NO) [20].

Отже, у скелетному м'язі за ішемічної травми функціонують три основні джерела утворення вільних радикалів:

1) під час реперфузії кисень, який надходить у тканини, ініціює окиснення ксантину і гіпоксантину ксантиноксидазою, що призводить до утворення значної кількості радикала супероксид-аніона і пероксиду водню;

2) ушкоджені ішемією мітохондрії здатні продукувати більшу кількість електронів завдяки їх "витоку" з електронно-транспортного ланцюга. Ці електрони беруть участь в утворенні радикала супероксид-аніона;

3) тканини підвищують кількість хемоатрактантів для нейтрофілів, зокрема лейкотрієну В₄ та тромбоцитарного фактора. Крім того, за ішемічної реперфузії збільшується експресія адгезивних молекул на ендотелії. Притягнені у вогнище ушкодження активовані нейтрофіли також вивільняють вільні радикали. Останні провокують вазоконстрикцію, яка є характерним проявом ішемічних ушкоджень [1].

Одним з механізмів, за допомогою яких вільні радикали викликають ушкодження тканин, є взаємодія гідроксильного радикала з атомами водню метильних груп поліненасичених жирних кислот. Цей процес ініціює перекисне окиснення мембранних ліпідів, яке, у свою чергу, призводить до підвищення проникності клітинних мембран.

Початкові патологічні ефекти після тривалої ішемії-реперфузії можуть бути неповними, тим самим продовжуючи каскад ішемічно-реперфузійних змін до кількох діб. Відновлення механокінетичних характеристик скелетних м'язів починається лише у кінці першого тижня після 2 год ішемізації [21]. Збільшення часу ішемії від 1 до 2 год значно затримує процеси регенерації [5].

Використання C_{60} -фулеренів для попередження, профілактики і лікування ішемічної травми скелетних м'язів. Значну зацікавленість викликає новий клас вуглецевих наноструктур – C_{60} -фулерен, якому притаманні унікальні фізико-хімічні властивості та біологічна активність [22-32]. Завдяки майже сферичній формі, малому розміру (0,72 нм у діаметрі) та гідрофобним властивостям молекула C_{60} здатна локалізуватися у клітинній мембрані та проникати всередину клітин [33-36], а завдяки наявності кон'югованої системи подвійних міжвуглецевих зв'язків – взаємодіяти з вільними радикалами та нейтралізувати їх [37-39]. Крім того, відзначають також антибактеріальні та антивірусні ефекти, вплив на сигнальні системи клітини, активність окремих ензимів та процеси ПОЛ [37, 40].

Як зазначалося вище, саме вільні радикали (зокрема, супероксид- і гідроксид-радикали) є основним патогенним чинником у процесі ішемічно-реперфузійних ушкоджень м'язової тканини. Вони ініціюють ПОЛ, інгібують мітохондріальні ферменти дихального ланцюга та АТФ-азну активність, інактивують гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу, мембранні натрієві канали тощо [9]. Антиоксидантами, які використовують у терапії гіперактивації ПОЛ мембран, є вітаміни А, К, Е, С та мікроелементи цинк, мідь, залізо, селен і марганець як кофактори ферментів системи антиоксидантного захисту [41].

Здатність C_{60} -фулеренів та їх похідних інактивувати вільні радикали кисню вперше було продемонстровано Krustic зі співавт. [42]. Показано, що водорозчинний C_{60} -фулерен є кращим антиоксидантом, ніж природний вітамін Е [37]. Одна молекула C_{60} здатна вловлювати 34 метильних радикали, а також інактивувати супероксид- та пероксид-аніони як *in vivo*, так і *in vitro* [38, 42, 43]. Хімічна функціоналізація C_{60} -фулерену супроводжується зниженням електронно-акцепторних і антиоксидантних властивостей каркасу. У дослідженнях *in vitro* та *in vivo* показано, що ці наноструктури та їх похідні не виявляють

гострої токсичності [44-47].

Основною перевагою використання C_{60} -фулеренів як потужних антиоксидантів є їхня здатність локалізуватися всередині клітини у мітохондріях та інших органелах, саме у яких за патологічних станів відбувається утворення вільних радикалів [48, 49]. C_{60} -фулерени та їх похідні здатні захищати клітини (наприклад, нейрони, клітини гепатоми, епітеліальні клітини) від різноманітних токсинів [50-54].

Monti та співавт. [55] виявили захисну активність модифікованих C_{60} -фулеренів проти окисного стресу, індукованого апоптозом у мононуклеарних клітинах периферичної крові людини. За попередньої обробки мишей метамфетаміном та морфієм вони сприяють ефективному зниженню летальності клітин головного мозку, яка є наслідком окисного стресу [56].

Показано, що крім нейропротекторної активності C_{60} -фулерени проявляють і гепатопротекторну: їх водні суспензії, приготовлені без використання полярних органічних розчинників, не лише не є токсичними для щурів, але і захищають їх печінку від вільних радикалів [43]. Інтوکсикацію щурів здійснювали за допомогою тетрахлоретану (CCl_4), що призводило до утворення радикалів трихлорметилу – CCl_2 , які викликали серйозні ушкодження печінки за реакції з киснем. Ці радикали швидко ініціюють ланцюгову реакцію ПОЛ. У щурів, яким попередньо вводили C_{60} -фулерени за інтоксикації CCl_4 , ушкодження печінки не виявлено. Показано, що інгаляції водних суспензій немодифікованого C_{60} -фулерену не викликали жодних токсичних проявів у легеневій тканині, а навпаки, знижували надмірний рівень ПОЛ [57]. Ці наноструктури також здатні впливати на перебіг запального процесу не лише внаслідок зниження активності ПОЛ, але й через ланку макрофагів. В експериментах *in vitro* продемонстровано, що похідні C_{60} -фулерену, захоплені макрофагами, спричинюють викид протизапальних цитокінів [58]. Встановлено антигістамінну і антиоксидантну дію полігід-

роксипохідних C₆₀-фулеренів, що, на думку авторів, є перспективним для застосування у терапії таких захворювань, як астма, поліартрити, хвороби серця і розсіяний склероз [59].

Захисний ефект фулерену C₆₀(OH)₂₄ вивчали *in vivo* у дозах 25, 50 і 100 мг/кг після хронічної доксорубіциніндукованої кардіо- та гепатотоксичності у щурів з колоректальним раком порівняно з добре відомим антиоксидантом – вітаміном С (100 мг/кг) [60]. За допомогою різних біохімічних і фізіологічних методик показано, що фулеренол виявляє протекторну активність у тканинах серця і печінки. Причому для низьких доз характерний більший захисний ефект. Це, ймовірно, зумовлено тим, що високі дози повільніше всмоктуються з кишечника. Отже, похідні C₆₀-фулеренів здатні виявляти захисний ефект проти окисноопосередкованої травми і він значно залежить від дози.

Встановлено більш ефективний захисний ефект водорозчинного фулерену від іонізуючого опромінення порівняно з традиційним радіпротектором – аміфостином [61]. Радіопротекторний ефект першого був найбільш виражений в селезінці, тонкому кишечнику і легнях за внутрішньоочеревинного введення щурам у дозі 100 мг/кг. Фулеренол краще від аміфостину сприяє зниженню індукованого радіацією ушкодження лейкоцитів (гранулоцитів і лімфоцитів), особливо упродовж перших 7 днів після опромінення.

Показано ефективність впливу C₆₀-фулерену на кількість вільних радикалів і процеси руйнування на моделі ад'ювантного артриту у щурів [62]. Виявлено захисний ефект препарату, який проявлявся у збільшенні активності антиоксидантних ферментів, супероксиддисмутази (СОД) в печінці і нирках, каталази у нирках порівняно з контрольною групою. Також зазначено, що захисна дія C₆₀-фулерену спрямована на пригнічення деструктивних процесів у сполучній тканині. Встановлено, що деякі похідні C₆₀-фулерену, діючи як каталізатори, здатні імітувати дію СОД – ферменту, який бере участь у нейтра-

лізації радикала супероксид-аніона.

Доведено, що активні форми кисню (АФК) відіграють ключову роль у запуску біохімічного каскаду індукції запрограмованої загибелі клітини та, поєднуючись між собою, викликають значні токсичні ушкодження [63]. Водночас введення молекул, здатних адсорбувати супероксидний аніон-радикал ($\cdot\text{O}_2^-$) та гідроксид-радикал, протектує такі внутрішньоклітинні макромолекули, як білки, ліпіди і ДНК від ушкоджень, захищаючи клітини від апоптозу [64]. Крім того, деякі композити на основі C₆₀-фулерену і білка достатньо ефективно поглинають $\cdot\text{O}_2^-$ [65]. Враховуючи, що за ішемічного ушкодження скелетного м'яза найбільшу деструктивну небезпеку становлять АФК, використання C₆₀-фулеренів має значно покращити толерантність м'яза до ішемії і прискорити його післятравматичне відновлення [9]. На користь перспективності цього медико-біологічного застосування C₆₀-фулеренів вказують деякі дослідження, де ці наночастинки проявили себе як ефективні поглиначі вільних радикалів, джерелами яких були ішемічні ушкодження травматичного походження тонкої кишки, а також легень ішемічно-реперфузійного генезу [54, 66, 67]. Про таку потенційну можливість застосування C₆₀-фулеренів свідчить також нещодавно клінічно доведена здатність інших наночастинок вуглецю, відомих як гідрофільні вуглецеві кластери, покращувати кровотік і нормалізувати вміст супероксиду та оксиду азоту (NO) за ішемічного ушкодження головного мозку травматичного генезу [68].

Показано, що при внутрішньовенному введенні C₆₀(FC₄S) за 15 хв до оклюзії у дозах 10 і 100 мкг/кг значно знижується рівень фокальної церебральної ішемії [69]. Не було зафіксовано змін рН, газового складу крові, частоти серцевих скорочень та артеріального тиску, що дає змогу використати цей розчин C₆₀-фулеренів як захисний агент за ішемічних ушкоджень тканин.

Відомо, що різні типи антиоксидантів здатні послаблювати ішемічно-реперфузійне

ушкодження легень. La1 та співавт. [66] оцінювали здатність водорозчинного похідного C₆₀-фулерену – C₆₀(ONO₂)_{7±2} – знижувати прояв ішемічно-реперфузійного ушкодження ізольованих легень щура. Показано, що він має антиоксидантні властивості і здатний вивільнювати оксид азоту, проявляючи ефекти, подібні до дії нітроглицерину. Експериментальний протокол включав 10 хв стабілізації, 45 хв ішемії і 60 хв реперфузії. Легені вентильовали газовою сумішшю, яка містила 95% O₂ і 5% CO₂. Ішемія викликала підвищення тиску в легеневій артерії, збільшення маси легень і коефіцієнта фільтрації у контролі, проте C₆₀(ONO₂)_{7±2} обмежував їх зростання, що розглядали як зменшення ішемічно-реперфузійного ушкодження легень.

Системне застосування карбоксифулерену сприяло зменшенню частоти розладів моторики і смертності мишей на моделі сімейного бічного аміотрофічного склерозу. Lin зі співавт. [53] досліджували нейропротекторний ефект водорозчинного карбоксифулерену за ішемічно-реперфузійної травми головного мозку щурів. Карбоксифулерен вводили тваринам внутрішньовенно (6 мг/кг) або інтрацеребровентрикулярно (0,1 і 0,3 мг/кг) за 30 хв перед ішемією-реперфузією. При внутрішньовенному введенні зменшення розміру інфаркту не спостерігали, що, можливо, пов'язано з нездатністю досліджуваних наночастинок долати гематоенцефалічний бар'єр. Водночас місцева попередня обробка карбоксифулереном у дозі 0,3 мг призводила до захисного ефекту, який проявлявся у зменшенні ділянки інфаркту, зниженні ПОЛ і підвищенні вмісту відновленого глутатіону, що є наслідками ішемічно-реперфузійної травми.

Для ефективного відновлення функціонування скелетного м'яза після ішемічного ушкодження одну з вирішальних ролей відіграє збереження стану іннервуючого м'яз нерва. Нещодавно була доведена захисна роль водорозчинних похідних C₆₀-фулеренів за нейродегенерації різноманітної етіології та значне збільшення толерантності нерво-

вої тканини до гіпоксії за їх терапевтичного застосування за допомогою впливу на гени, відповідальні за збільшення експресії глутаматних метаболічних рецепторів та аденозину (має нейропротекторну властивість завдяки інгібуванню вивільнення глутамату, який є нейромедіатором, пов'язаним з ексайтотоксичністю та індукованою загибеллю клітин) [70, 71].

Дослідження також вказують на ефективність C₆₀-фулеренів у боротьбі із запальним заміщенням сполучною тканиною – фіброзною дегенерацією міжхребцевих дисків, де дія цих наночастинок виявляється не лише у поглинанні вільних радикалів, а і у вираженому протизапальному ефекті [72].

Важливим показником при вивченні патогенезу ішемічного ушкодження м'язової тканини є кінетика розвитку втоми, яка викликається безрелаксаційними пулами стимуляцій. За нормальних умов її зміни у динаміці скорочення *muscle soleus* виявляються лише після 5-6 год стимуляції [73]. За умов ішемізації вже після 30-40 хв *muscle soleus* не спроможний відповідати генерацією сили на сигнал стимуляції [74]. Лінійне зниження силової відповіді ішемізованого м'яза проявлялось упродовж усього часу експерименту. Виявлено захисний ефект водорозчинних C₆₀-фулеренів на розвиток м'язової втоми на рівні 15 і 20-23% за його внутрішньовенного і внутрішньом'язового введення щурам у дозі 1-1,5 мг/кг, відповідно [75]. Важливо відзначити, що за першого варіанту введення C₆₀-фулерену зменшення силової відповіді *muscle soleus* припинялось і утримувалося на досягнутому рівні упродовж 2 год безрелаксаційної стимуляції.

Зміна швидкості досягнення силою свого стаціонарного рівня при скороченні є одним з найважливіших показників кінетики скорочення скелетних м'язів [76]. Цей компонент м'язової динаміки особливо важливий при контролі точнісного позиціонування [77]. Ішемічне ушкодження м'язової тканини призводить до зменшення цієї швидкості, що

ускладнює, а в деяких випадках і повністю блокує можливість точнісного позиціонування суглоба таким м'язом. Проведений біомеханічний експеримент з вивчення швидкості досягнення силою свого стаціонарного рівня виявив значний захисний ефект на кінетику скорочення C₆₀-фулеренів, внутрішньовенне введення яких сприяло максимальному збільшенню швидкості скорочення на 25% від контролю порівняно з 15%-м захисним ефектом за внутрішньом'язового введення [78].

Оцінювався вплив водного розчину немодифікованого C₆₀-фулерену на динаміку перебігу процесів розвитку силової відповіді на стимуляційне подразнення м'яза (*muscle soleus*) на фоні ішемічних порушень, які виникають за перші 5 год та впродовж 5 дб після 2 год ішемізації і наступної реперфузії. Захисна дія препарату (порівняно зі змінами у рівнях генерації сили між початком і кінцем стимуляційних пулів) становила 15% в перші 5 год після ішемізації і зростала до 90% за 5-ту добу експерименту. У цьому разі його внутрішньовенне введення було найбільш оптимальним – 92%-й захисний ефект при 63%-му за внутрішньом'язового введення [74].

Таким чином, подальший розвиток медичних нанотехнологій із застосуванням водорозчинних C₆₀-фулеренів (у вигляді ін'єкції їх колоїдного розчину) з урахуванням виражених у них антиоксидантних властивостей та відсутності даних про викликані гострі та хронічні інтоксикації відкриває нові можливості у профілактиці і корекції скоротливої активності ішемічноушкодженого м'яза.

**С.Ю. Зай¹, Д.А. Заводовский², Е.И. Богуцкая²,
Д.Н. Ноздренко², Ю.И. Прилуцкий²**

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ C₆₀- ФУЛЛЕРЕНА КАК СПОСОБА ПРОФИЛАКТИКИ И КОРРЕКЦИИ ИШЕМИЧНО-РЕПЕРФУЗИОННЫХ НАРУШЕНИЙ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Актуальной проблемой на сегодня остается отсутствие точных диагностических тестов для быстрого выявления ишемической травмы, что имеет важное значение для

эффективности ее дальнейшей терапии. В этой связи продолжается поиск специфических маркеров ишемии, а также новых терапевтических агентов для предупреждения, профилактики и лечения ишемической травмы. Водорастворимые наноразмерные C₆₀-фуллерены как мощные антиоксиданты могут выступать перспективными средствами для коррекции разных состояний мышечной системы, в основе развития которых лежит деструктивное действие свободных радикалов.

Ключевые слова: C₆₀-фуллерен; ишемия-реперфузия; мышечное сокращение; скелетные мышцы.

**S.Yu. Zay¹, D.A. Zavadovsky², K.I. Bogutskaya²,
D.N. Nozdrenko², Yu.I. Prylutsky²**

PROSPECTS OF C₆₀ FULLERENE APPLICATION AS A MEAN OF PREVENTION AND CORRECTION OF ISCHEMIC-REPERFUSION INJURY IN THE SKELETAL MUSCLE TISSUE

A lack of accurate diagnostic tests for the rapid detection of ischemic injury remains an urgent problem. In this context, a search for specific markers of ischemia as well as new therapeutic agents for prevention and treatment of ischemic injury continues. Water-soluble nano-sized C₆₀ fullerenes, as powerful antioxidants, can act as promising means for correction of various muscle system states, in the base of which lie the destructive effects of free radicals.

Key words: C₆₀ fullerene; ischemia-reperfusion; muscle contraction; skeletal muscles.

¹Lesya Ukrainka Eastern European National University, Lutsk;

²Taras Shevchenko National University of Kyiv

REFERENCES

1. Murdock M, Murdoch MM. Compartment syndrome: a review of the literature. *Clin Podiatr Med Surg.* 2012; 29(2): 301-10.
2. Bortolotto SK, Morrison WA, Messina A. The role of mast cells and fibre type in ischaemia reperfusion injury of murine skeletal muscles. *J Inflamm (Lond).* 2004; 1(1): 2-8.
3. Erkut B, Özyazıcıoğlu A, Karapolat BS et al. Effects of ascorbic acid, alpha-tocopherol and allopurinol on ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle: an experimental study. *Drug Target Insights.* 2007; 2: 249-58.
4. Turóczy Z, Arányi P, Lukáts Á et al. Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats. *PLoS One.* 2014; 9(1): e84783.
5. Rácz IB, Illyés G, Sarkadi L, Hamar J. The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. *Eur Surg Res.* 1997; 29(4): 254-63.
6. Tidball JG. Mechanisms of muscle injury, repair, and

- regeneration. *Compr Physiol*. 2011; 1(4): 2029-62.
7. Carvalho AJ, McKee NH, Green HJ. Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. *Plast Reconstr Surg*. 1997; 99(1): 163-71.
 8. Vignaud A, Hourde C, Medja F, Agbulut O, Butler-Browne G, Ferry A. Impaired skeletal muscle repair after ischemia-reperfusion injury in mice. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010: 724914.
 9. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*. 2001; 53(1): 135-59.
 10. Ghobrial TF, Egleseder WA Jr, Bleckner SA. Proximal ulna shaft fractures and associated compartment syndromes. *Am J Orthop*. 2001; 30(9): 703-7.
 11. Mendelson S, Mendelson A, Holmes J. Compartment syndrome after acute rupture of the peroneus longus in a high school football player: a case report. *Am J Orthop*. 2003; 32(10): 510-2.
 12. Suzuki T, Moirmura N, Kawai K, Sugiyama M. Arterial injury associated with acute compartment syndrome of the thigh following blunt trauma. *Injury*. 2005; 36(1): 151-9.
 13. Matsen FA. *Compartment syndrome*. New York, 1980.
 14. Strafun SS, Dolgoplov OV, Nozdrenko DM. The influence of the acute ischemia on the contractive function and strength of skeletal muscle in experiment. *J Orthoped, Traumatol, Prosthetics*. 2010; 1: 56-60. [Ukrainian].
 15. Hammers DW, Rybalko V, Merscham-Banda M, Hsieh PL, Suggs LJ, Farrar RP. Anti-inflammatory macrophages improve skeletal muscle recovery from ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol*. 2015; 118(8): 1067-74.
 16. Khoma OM, Zavadovskiy DA, Nozdrenko DM, Dolhoplov OV, Miroshnichenko MS, Motuzjuk OP. Dynamics of ischemic skeletal *soleus muscle* contraction in rats. *Fiziol Zh*. 2014; 60(1): 34-40. [Ukrainian].
 17. Kostler W, Strohm PC, Sudkamp NP. Acute compartment syndrome of the limb. *Injury*. 2005; 36(8): 992-8.
 18. Sever MS, Vanholder R. Crush syndrome: a case report and review of the literature. *J Emerg Med*. 2015; 48(6): 730-1.
 19. Wang XT, Tian Y, Xu WX, Cui LH, Xiang SY, Lü SC. Protective effects of modeled superoxide dismutase coordination compound (MSODa) against ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 37(2): 465-76.
 20. Matheis G, Sherman MP, Buckberg GD, Habron DM, Young HH, Ignarro LJ. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am J Physiol*. 1992; 262(Pt 2): H616-20.
 21. Loerakker S, Oomens CW, Manders E et al. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle assessed with T2-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI. *Magn Reson Med*. 2011; 66(2): 528-37.
 22. Prylutsky YuI, Durov SS, Bulavin LA et al. Structure and thermophysical properties of fullerene C₆₀ aqueous solutions. *Int J Thermophys*. 2001; 22(3): 943-55.
 23. Prylutsky YuI, Yashchuk VM, Kushnir KM et al. Bio-physical studies of fullerene-based composite for biotechnology. *Mater Sci Engineer C*. 2003; 23(1-2): 109-11.
 24. Golub A, Matyshevska O, Prylutska S et al. Fullerenes immobilized at silica surface: topology, structure and bioactivity. *J Mol Liq*. 2003; 105(2-3): 141-7.
 25. Scharff P, Carta-Abelmann L, Siegmund C et al. Effect of X-ray and UV irradiation of the C₆₀ fullerene aqueous solution on biological samples. *Carbon*. 2004; 42(5-6): 1199-201.
 26. Prylutska SV, Burlaka AP, Klymenko PP, Grynyuk II, Prylutsky YuI, Schuetze Ch, Ritter U. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy. *Cancer Nanotechnol*. 2011; 2(1): 105-10.
 27. Prylutsky YuI, Buchelnikov AS, Voronin DP, Kostjukov VV, Ritter U, Parkinson JA, Evstigneev MP. C₆₀ fullerene aggregation in aqueous solution. *Phys Chem Chem Phys*. 2013; 15(23): 9351-60.
 28. Prylutsky YuI, Petrenko VI, Ivankov OI et al. On the origin of C₆₀ fullerene solubility in aqueous solution. *Langmuir*. 2014; 30: 3967-70.
 29. Skamrova GB, Laponogov IV, Buchelnikov AS et al. Interceptor effect of C₆₀ fullerene on the *in vitro* action of aromatic drug molecules. *Eur Biophys J*. 2014; 43(6-7): 265-76.
 30. Astefanei A, Núñez O, Galceran MT. Characterisation and determination of fullerenes: a critical review. *Anal Chim Acta*. 2015; 882: 1-21.
 31. Kumar A. Fullerenes for biomedical applications. *J Environ Appl Biores*. 2015; 3(4): 175-91.
 32. Ritter U, Prylutsky YuI, Evstigneev MP et al. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct*. 2015; 23(6): 530-4.
 33. Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, Larroque C. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 294(1): 116-9.
 34. Schuetze C, Ritter U, Scharff P, Bychko A, Prylutska S, Rybalchenko V, Prylutsky Yu. Interaction of N-fluorescein-5-isothiocyanate pyrrolidine-C₆₀ compound with a model bimolecular lipid membrane. *Mater Sci Engineer C*. 2011; 31(5): 1148-50.
 35. Prylutska SV, Matyshevska OP, Grynyuk II, Prylutsky YuI, Ritter U, Scharff P. Biological effects of C₆₀ fullerenes *in vitro* and in a model system. *Mol Cryst Liq Cryst*. 2007; 468: 265-74.
 36. Montellano A, Da Ros T, Bianco A, Prato M. Fullerene C₆₀ as a multifunctional system for drug and gene delivery. *Nanoscale*. 2011; 3(10): 4035-41.
 37. Wang IC, Tai LA, Lee DD. C₆₀ and water-soluble derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation. *J Med Chem*. 1999; 42(22): 4614-20.
 38. Prylutska SV, Grynyuk II, Matyshevska OP, Prylutsky YuI, Ritter U, Scharff P. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro*. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct*. 2008; 16(5-6): 698-705.

39. Scharff P, Ritter U, Matyshevska OP et al. Therapeutic reactive oxygen generation. *Tumori*. 2008; 94(2): 278-83.
40. Injac R, Prijatelj M, Strukelj B. Fullerene nanoparticles: toxicity and antioxidant activity. *Methods Mol Biol*. 2013; 1028: 75-100.
41. Chen JR, Weng CN, Ho TJ, Chang IC, Lai SS. Identification of the copper-zinc superoxide dismutase activity in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol*. 2000; 73(4): 301-10.
42. Krustic PJ, Wasserman E, Keizer PN, Morton JR, Preston KF. Radical reactions of C₆₀. *Science*. 1991; 254(5035): 1183-5.
43. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F. C₆₀ fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett*. 2005; 5(12): 2578-85.
44. Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D et al. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett*. 2004; 4(10): 1881-7.
45. Prylutska SV, Matyshevska OP, Golub AA, Prylutsky YuI, Potebnya GP, Ritter U, Scharff P. Study of C₆₀ fullerenes and C₆₀-containing composites cytotoxicity *in vitro*. *Mater Sci Eng C*. 2007; 27(5-8): 1121-4.
46. Prylutska SV, Grynjuk II, Grebinyk SM et al. Comparative study of biological action of fullerenes C₆₀ and carbon nanotubes in thymus cells. *Mat-wiss u Werkstofftech*. 2009; 40(4): 238-41.
47. Didenko G, Prylutska S, Kichmarenko Y et al. Evaluation of the antitumor immune response to C₆₀ fullerene. *Mat-wiss u Werkstofftech*. 2013; 44(2-3): 124-8.
48. Tsai MC, Chen YH, Chiang LY. Polyhydroxylated C₆₀ fullerene, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus *in-vitro*. *J Pharm Pharmacol*. 1997; 49(4): 438-45.
49. Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 1999; 19(4): 1284-93.
50. Huang SS, Mashino T, Mochizuki M. Effect of hexa sulfolbutylated C₆₀ on the isolated aortic ring of guinea pig. *Pharmacology*. 2000; 64(2): 91-7.
51. Bisaglia M, Natalini B, Pellicciari R, Straface E, Malorni W, Monti D, Franceschi C, Schettini G. C3-fullerene-tris-methanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis. *J Neurochem*. 2000; 74(3): 1197-204.
52. Straface E, Natalini B, Monti D et al. C3-fullerene-tris-methanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoikis by influencing cell adhesion ability. *FEBS Lett*. 1999; 454(3): 335-40.
53. Lin AM, Fang SF, Lin SZ, Chou CK, Luh TY, Ho LT. Local carboxyfullerene protects cortical infarction in rat brain. *Neurosci Res*. 2002; 43(4): 317-21.
54. Chen YW, Hwang KC, Yen CC, Lai YL. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 287(1): R21-6.
55. Monti D, Moretti L, Salvioli S et al. C₆₀ carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 277(3): 711-7.
56. Mori T, Ito S, Matsubayashi K, Sawaguchi T. Comparison of nitric oxide synthase inhibitors, phospholipase A2 inhibitor and free radical scavengers as attenuators of opioid withdrawal syndrome. *Behav Pharmacol*. 2007; 18(8): 725-9.
57. Sayes CM, Marchione AA, Reed KL, Warheit DB. Comparative pulmonary toxicity assessments of C₆₀ water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity *in vivo* in contrast to *in vitro* profiles. *Nano Lett*. 2007; 7(8): 2399-406.
58. Baierl T, Seidel A. *In vitro* effects of fullerene C₆₀ and fullerene black on immunofunctions of macrophages. *Full Sci Technol*. 1996; 4: 1073-85.
59. Ryan JJ, Bateman HR, Stover A, Gomez G et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J Immunol*. 2007; 179(1): 665-72.
60. Injac R, Perse M, Cerne M, Potocnik N, Radic N, Govedarica B, Djordjevic A, Cerar A, Strukelj B. Protective effects of fullerene C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. *Biomaterials*. 2009; 30(6): 1184-96.
61. Trajkovic S, Dobric S, Jacevic V, Dragojevic-Simic V, Milovanovic Z, Dordevic A. Tissue-protective effects of fullerene C₆₀(OH)₂₄ and amifostine in irradiated rats. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007; 58(1): 39-43.
62. Ye S, Zhou T, Cheng K, Chen M, Wang Y, Jiang Y, Yang P. Carboxylic acid fullerene (C60) derivatives attenuated neuroinflammatory responses by modulating mitochondrial dynamics. *Nanoscale Res Lett*. 2015; 10(1): 953.
63. Paradise WA, Vesper BJ, Goel A, Waltonen JD, Altman KW, Haines GK, Radosevich JA. Nitric oxide: perspectives and emerging studies of a well known cytotoxin. *Int J Mol Sci*. 2010; 11(7): 2715-45.
64. Hur J, Pak SC, Koo BS, Jeon S. Borneol alleviates oxidative stress via upregulation of Nrf2 and Bcl-2 in SH-SY5Y cells. *Pharm Biol*. 2013; 51(1): 30-5.
65. Higashi N, Shosu T, Koga T, Niwa M, Tanigawa T. pH-responsive, self-assembling nanoparticle from a fullerene-tagged poly(L-glutamic acid) and its superoxide dismutase mimetic property. *J Colloid Interface Sci*. 2006; 298(1): 118-23.
66. Lai HS, Chen WJ, Chiang LY. Free radical scavenging activity of fullerene C₆₀ in the ischemia-reperfusion intestine in dogs. *World J Surg*. 2000; 24(4): 450-4.
67. Lai YL, Murugan P, Hwang KC. Fullerene derivative attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Life Sci*. 2003; 72(11): 1271-8.
68. Bitner BR, Marciano DC, Berlin JM, Fabian RH. Antioxidant carbon particles improve cerebrovascular dysfunction following traumatic brain injury. *ACS Nano*. 2012; 6(9): 8007-14.
69. Huang SS, Tsai SK, Chih CL, Chiang LY, Hsieh HM, Teng CM, Tsai MC. Neuroprotective effect of hexa sulfolbutyl-

- ated C₆₀ on rats subjected to focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30(6): 643-9.
70. Giust D, Da Ros T, Martín M, Albasanz JL. [60]Fullerene derivative modulates adenosine and metabotropic glutamate receptors gene expression: a possible protective effect against hypoxia. *J Nanobiotechnol.* 2014; 12: 27-32.
71. Giust D, León D, Ballesteros-Yañez I, Da Ros T, Albasanz JL. Modulation of adenosine receptors by [60]fullerene hydrosoluble derivative in SK-N-MC cells. *ACS Chem Neurosci.* 2011; 2(7): 363-9.
72. Liu Q, Cui Q, Li XJ, Jin L. The applications of buckminsterfullerene C₆₀ and derivatives in orthopaedic research. *Connect Tissue Res.* 2014; 55(2): 71-9.
73. Kalezic I, Bugaychenko LA, Kostyukov AI, Pilyavskii AI, Ljubisavljevic M, Windhorst U, Johansson H. Fatigue-related depression of the feline monosynaptic gastrocnemius-soleus reflex. *J Physiol (Gr Brit).* 2004; 556(Pt1): 283-96.
74. Nozdrenko DM, Bogutska KI, Prylutskyi YuI, Ritter U, Scharff P. C₆₀ fullerene effect on the dynamics of fatigue processes in rat *soleus muscle* after ischemia-reperfusion. *Biotechnol Acta.* 2014; 7(3): 43-51.
75. Nozdrenko D, Prylutskyi Yu, Ritter U, Scharff P. Protective effect of water-soluble pristine C₆₀ fullerene in ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. *Int J Phys Pathophys.* 2014; 5(2): 97-110.
76. Kostyukov I. Muscle hysteresis and movement control: a theoretical study. *Neurosci.* 1998; 83(1): 303-20.
77. Nozdrenko DN, Bogutska KI. About molecular mechanisms of fiber muscle contraction at transition to new equilibrium state: analysis of experimental data using three-componential electrical stimulating signal. *Biopolymers and Cell.* 2005; 21(3): 283-6. [Russian].
78. Nozdrenko DM, Bogutska KI, Prylutskyi YI, Korolovych VF, Evstigneev MP, Ritter U, Scharff P. Impact of C₆₀ fullerene on the dynamics of force-speed changes in *soleus muscle* of rat at ischemia-reperfusion injury. *Fiziol Zh.* 2015; 61(2): 48-59. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов
до редакції 16.12.2015*

Fitness and therapeutic potential of intermittent hypoxia training: a matter of dose

T.V. Serebrovska¹, Z.O. Serebrovska¹, E. Egorov²

¹Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine, e-mail: sereb@biph.kiev.ua;

²CELLGYM Technologies GmbH, Berlin, Germany

The introduction of different methods of intermittent hypoxic training (IHT) into fitness, sports, military and medical practice has raised a lot of questions about the most beneficial regimens of such treatment and their optimal instrumental implementation. Low doses of hypoxia might not be sufficient stimuli to mobilize adaptive mechanisms, while severe or prolonged hypoxia may provoke dangerous pathological processes. In this review, we pay attention to narrow practical question of the most effective and convenient technology of IHT implementation, notably the inhalation of hypoxic gas mixtures. Data strongly suggest that in humans the training with 15-13% inhaled oxygen (FiO₂) at various time characteristics does not provide marked positive changes. Short-term daily sessions consisting 3-4 bouts of 5-7 min exposures to 12-10% FiO₂ alternating with equal durations of normoxia for 2-3 weeks have been shown as a most beneficial without maladaptive consequences for fitness and treatment of some diseases. More severe or longer intermittent hypoxia protocols must be accompanied by strict monitoring of blood oxygen saturation (SpO₂), electrocardiogram, breathing pattern and arterial blood pressure in order to avoid unexpected undesirable individual reactions. For sports purposes, the reduction of oxygen content to individually tolerable level for some minutes is justified as far as it maximizes benefits. However, such regimen requires preliminary diagnostics of individual hypoxic tolerance and cardio-respiratory reactivity as well as rigorous monitoring of vital functions during IHT and good feedback device. The use of oxygen concentrations below 12% for treatment of diseases, especially in children and the elderly, are required substantial additional research. Recently, a new mode of adaptive training was explored, which combines periods of hypoxia (12-10% FiO₂) and hyperoxia (30-35% FiO₂). Limited evidences suggest that such regime can reduce the time of recovery periods, that is shorten the duration of sessions. However, there is still no strong comparative evidence for humans that this method is much more efficient than hypoxic-normoxic mode. We appeal to all scientists working in the field of IHT not to hide their negative results but publish all observations in the open press. It will make a significant contribution in developing of common guidelines for IHT implementation to improve public health of our Planet.

Key words: intermittent hypoxia training; mode of IHT; hypoxic-hyperoxic training; hemoglobin oxygen saturation; adaptation to hypoxia

INTRODUCTION

The proliferation of intermittent hypoxic training/treatment (IHT) methods in fitness, sports, military and medical practice during recent decades has caused debate about the most beneficial regimens of hypoxic training and methods of their instrumental implementation. Intermittent hypoxia (periodic, interval, cyclic hypoxia, hypoxic preconditioning – diff. terminology) is drug-free method that has

been routinely used by about 2 million patients in the last 30 years and revealed good and satisfactory results in 75 – 95% of cases [1, 2]. Beneficial results of IHT application were obtained for enhancement of physical and mental operability, the prevention of premature aging, the achievement of high results in sports, increased tolerance to adverse environmental factors, for altitude pre-acclimatization, as well as for the treatment and prevention of various diseases.

© T.V. Serebrovska, Z.O. Serebrovska, E. Egorov

The mechanisms underlying the effects of hypoxic training at all levels - from systemic physiological reactions to the genome - are widely debated. This topic is the subject of many articles, reviews and monographs. To avoid repetition we refer readers to the most recent reviews [3-10].

The biological responses to intermittent hypoxia may be adaptive or maladaptive, depending on the severity of the hypoxemia, its frequency of occurrence, its duration, and, importantly, the “pattern” and timing of each of the HbO₂ desaturation/ resaturation cycles [7, 11]. Many types of protocol with different numbers of hypoxia episodes, severity, and total exposure duration have been used by investigators, and these combinations may have resulted in various physiological responses. Mode of hypoxic influence (depth, duration, and intermittence) is critical for the determination of beneficial or detrimental effects of IHT. Low doses of hypoxia might not be sufficient stimuli to mobilize adaptive mechanisms, while severe or prolonged hypoxia may provoke dangerous pathological processes.

The question arises: what is the concentration of inhaled oxygen and temporal characteristics of hypoxic pattern that may be relatively safe and useful, and what level of hypoxia requires unconditional monitoring of functional parameters and clear alarm-service. In this review, we will pay attention to narrow practical question of IHT application in human practice and provide unbiased analysis of hypoxia training protocols that use the most effective and convenient technology - the inhalation of hypoxic gas mixtures.

Regimes of IHT with hypoxic gas mixtures inhalation: recommended doses and potential adverse effects

Traditional treatment protocols for IHT comprises repeated exposures to low oxygen atmosphere breathing, altered with breathing ambient air. However, hypoxic regimens which are used for IHT implementation in human practice vary broadly in terms of severity of

hypoxia (from 2% to 18% inspired oxygen), duration of hypoxic and normoxic episodes (from 15–30 s to 12 h), the number of cycles per day (from 3 to 25 sessions), the duration of IHT course (2-90 days), etc. Such diversity is largely dependent on a contingent designed for this training: for athletes of varying skill, mountain hikers, soldiers of alpine troops, pregnant women, elderly people who want to extend their active life, or patients for the prevention or treatment of various diseases.

Some characteristics of different regimes are described in recent reviews [4, 5, 7, 8, 12, 13]. Historically, first methodical recommendations for IHT implementation in human practice were published by the Russian Health Ministry in 1988 which recommended the inhalation of 10-12% O₂ during 5- min periods with 5 min rest, 1 h per session, 1-4 weeks per course for the treatment of various diseases. The evidence base was represented by the investigations of R.Strelkov, A. Chizhov, H.Gurvich, A.Kolchinskaya, N. Geppe and many others (look the review [14]). Most achievements in IHT practical implementation were based on a thorough study of the mechanisms of both positive and negative IHT actions in sport practice and clinical pilot studies. Unfortunately, serious research on the use of IHT in rejuvenation practice and fitness is still not presented in the medical literature.

In the Table we presented the most typical literature data concerning the use of IHT in human practice during last 2 years, as well as some classical works of the past. Data are ranked in order of decreasing oxygen concentration in the inspired gas. Human investigations strongly suggest that the training with 15-13% inhaled oxygen (FiO₂) at various time characteristics do not provide any positive changes [15-24]. 12-10% FiO₂ is the most common concentration caused a positive effect [25-39, 48, 49]. None of the articles that use such concentrations describe adverse effects. There are few papers which documented adverse effects, but starting with 8-9% FiO₂ [40-47]. All study results cited in the Table as well as other known papers

Regimens of IHT that use the inhalation of gas mixtures for humans
(The papers presented in order of decreasing inspired oxygen concentration that used for research)

Authors	Subjects	Regimen of IHT	Results
[15]	12 healthy participan	18-15 % FiO ₂ , 10 min, ergometer at 20% peak VO ₂	Hypoxia has no effects on cognitive function
[16]	9 male games players	17 % FiO ₂ at 40 min cycling intermittent 5 s sprint protocol	Peak and mean power output and total work done reduced, Heart rate was higher and SaO ₂ lower during HYP. The results suggest athletes will be at a disadvantage when performing intermittent sprinting at moderate altitude
[17]	22 subjects age 17-25 yr	16.4-14.5 % FiO ₂ , exercises at 6-h hypoxia weekly, 4 weeks	Weight loss, improvement of blood pressure, no effect on brachial-ankle pulse wave velocity
[18]	10 untrained men	15% FiO ₂ , five sets of 15 repetitions of squat exercise	No significant differences in blood lactate, growth hormone, total testosterone and cortisol under normixia and hypoxia, i.e. low-intensity resistance exercise performed under mild hypoxia does not induce greater anabolic hormonal responses
[19]	18 male trained triathletes	14.5 - 15% FiO ₂ , two 60-min sessions per week during 7 weeks	Hemoglobin and erythrocytes values increased, aerobic performance and physiological variables did not increase
[20]	9 physically active men	14,5% FiO ₂ , 25 min training sessions, 3 wk	No effect on time-to-exhaustion during incremental exercise and muscle metabolite concentrations, i.e. IHT does not alter muscle metabolic responses
[21]	10 trained male team sport athletes	14.5% FiO ₂ , repeat-sprint training session comprised 3 sets of 9 × 5 s maximal sprints commencing every 25s	No post-exercise inflammation, little effect on oxidative stress
[22]	16 highly trained footballers	14.3% FiO ₂ , 60 min per sprint training, 2 d·wk, 5 weeks	Maximal aerobic speed, lower-limb explosive power and sprint decrement remained unchanged; repeated-sprint times and repeated-agility improved
[23]	16 heathy subjects	13.8% FiO ₂ , three 10-hour exposures	SOD, GPX and catalase activities, advanced oxidation protein products increased
[24]	18 male cyclists	~13-14% FiO ₂ , 5 training sessions (75 min hypoxic period) per week during 3 weeks.	Peak power output increased but VO ₂ max did not; no differences in monocarboxylate lactate transporter protein content. There are no additional benefits of IHT compared to normoxic training
[25]	55 children 6 to 17 yr with symptoms of bronchospasm	12 % FiO ₂ , three 15-min sessions per day with 10-min breaks during 7-14 days	Lung vital capacity and breath-holding time increased, bronchial obstruction and heart rate decreased
[26]	8 healthy male subjects	12% O ₂ for 5 min followed by 5 min of normoxia for 1 h/d during 10 days	Ventilatory response to hypoxia increased, cerebrovascular sensitivity to CO ₂ remained unchanged

[27]	48 children 6-17 yr from radioactive territories	12 % FiO ₂ , three 15-min sessions per day with 10-min breaks during 7-14 days	Latent period of complex visual-motor response to one of three colors reduced, personal anxiety decreased
[28]	14 healthy, 60- to 74-yr-old men	12 % FiO ₂ , 3-5 min, with 5 min breaks, 4/day during 10 days	No changes in hemodynamic indices and work capacity in routinely daily exercised subjects and increased submaximal work and anaerobic threshold in untrained men
[29]	45 elderly patients with stable angina	12 % FiO ₂ , 5-7 min, with 5 min breaks, 4/day, 10-12 days	Reduction in clinical symptoms of angina and duration of daily myocardial ischemia, normalization of lipid metabolism and increase exercise tolerance, normalization of microcirculation
[30]	16 children aged 9–13 yr with bronchial asthma	12 % FiO ₂ , 3-5 min, with 5 min breaks, 3/day during 2 weeks	Decline in breath shortness and feelings of chest congestion, diminishing of cough and sputum, attacks of asphyxia disappeared or became less frequent, increased HVR, no changes in airway conductance
[31]	20 endurance-trained men	11% FiO ₂ on days 1-7 and 10% O ₂ on days 8-15; 10 bouts during 15 days	No effect on aerobic or anaerobic performance
[32]	15 athletes with overtraining syndrome	10 % FiO ₂ with hyperoxic breaks (30% O ₂), 6-8 cycles, three times a week over 4 weeks	Exercise performance and sympatho-parasympathetic index improved, hematological parameters were unchanged
[33]	8 young non-smokers	10 % FiO ₂ , five to ten 5-6-min sessions per day with 4-min breaks during 14 days	IH exposures significantly diminish variations of cerebral perfusion in response to hypercapnia and hypocapnia without compromising cerebral tissue oxygenation. No adverse effects
[34]	patients with stage 1 arterial hypertension	10 % FiO ₂ , four to ten 3-min sessions per day with 3-min breaks during 14 days	Increased nitric oxide synthesis and decreased blood pressure
[35]	42 patients with BA and 14 patients with COB	10 % FiO ₂ , 5 min, with 5 min breaks, 20-25 sessions	Positive effect is obtained in 76% of patients with BA and 92.8% of patients with COB
[36]	8 young non-smokers	10 % FiO ₂ , five to ten 5-6-min sessions per day with 4-min breaks during 14 days	A rightward shift in the oxyhemoglobin equilibrium response, attenuated tachycardiac response to hypoxia while significantly enhancing normoxic R-R interval variability in low-frequency and high-frequency spectra without changes in arterial blood pressure at rest or during hypoxia, i.e. the enhancement of arterial O ₂ delivery and improvement of vagal control of HR.

[37]	123 patients with hypertension stage I and II.	10% FiO ₂ , 2-6 min + 3-8 min normoxia, 5-12 cycles/d, 15-30 d	Reduction of the arterial pressure, rise of physical performance A pronounced depressor effect persisted for – 6 months in 63 patients
[38]	41 patients with hypertonic disease	10% FiO ₂ , 13-25 sessions	Arterial pressure and emotional tension decreased, oxygen consumption and transport normalized.
[39]	10 healthy subjects	10% FiO ₂ , four 5-min bouts/day during 2 wk	Enhancement of innate immunity by mobilizing circulating hematopoietic stem and progenitor cells, activating neutrophils, and increasing circulating complement and immunoglobulins.
[40]	19 subjects with chronic incomplete spinal cord injury	9 % FiO ₂ , 90-sec with 60-sec normoxic breaks, 15 exposures during 5 days	Improved walking speed and distance.
[41, 42]	13 individuals with chronic, incomplete spinal cord injury	9 % FiO ₂ , 15 exposures with 1-min intervals	Plantar flexion torque and ankle plantar flexor electromyogram activity increased, i.e. elicits sustained increases in volitional somatic motor output. IHT was not accompanied by increases in blood pressure or changes in heart rate variability
[43]	26 participants with OSA	8-9% FiO ₂ , twelve 4-min episodes followed by a single breath of 100% O ₂	Chemoreflex sensitivity to hypoxia increased promoting apneic events and ultimately exacerbating breathing instability
[44]	12 healthy males	8-12% FiO ₂ (PETO ₂ =45Torr), 6 h on three occasions	Increased resting ventilation and the HVR, TNF- α was decreased with only selective COX-2 inhibition, i.e. inflammation does not contribute to human intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity
[45]	One 55-year-old female with a C4 chronic, incomplete spinal cord injury	8% O ₂ , eight 2 min exposures with 2 min normoxia during 10 days	Significant improvements in airflow generated in response to applied inspiratory resistive load. No significant changes in the respiratory perceptual sensitivity to inspiratory resistive loads.
[46]	8 individuals with incomplete spinal cord injury	8% O ₂ , eight 2 min exposures with 2 min normoxia during 10 days	Minute ventilation increased, FVC and FEV-1 improved, but the magnitude of ventilatory long-term facilitation was not enhanced
[47]	8 healthy adult men	5% FiO ₂ until SaO ₂ dropped to 85% (25 hypoxic events/h), five hours	Two fold up-regulation of the pro-inflammatory gene toll receptor 2 that may lead to systemic inflammation, insulin resistance and atherosclerosis
		Rebreathing technique:	
[48]	29 residents of Chernobyl	A decrease from 20,9 to 9 % FiO ₂ during 5 min, three daily sessions with 15 min breaks, 10 days	normalizing effect on free radical processes; a decrease in spontaneous and initiated blood chemiluminescence and MDA
[49]	18 patients with idiopathic parkinsonism	A decrease from 20,9 to 9 % FiO ₂ during 5 min, three daily sessions with 10 min breaks, 14 days	Increase in hypoxic ventilatory response, no changes in hypercapnic ventilatory response, decrease in DOPA blood concentration, improvement of respiratory system functioning

show that there have been no reported adverse physiological effects when users have followed the recommendations [12]: “a few minutes of targeted SpO₂ 75–88% at rest, alternated with reoxygenation”.

In a recent review [5], it was also suggested that modest levels of hypoxia (9–16% O₂) and a relatively low number of exposures (3–15 episodes per day) seem to elicit beneficial effects without pathology, whereas severe hypoxia (2–8% O₂) characterized by an extensive amount of episodes (48–2,400 exposures per day) elicits progressively greater pathology. In the latest review Astorino [8] analyzing the efficacy of acute intermittent hypoxia on physical function and health status in humans with spinal cord injury comes to the conclusion that 2min exposures to intermittent hypoxia equivalent to 8-9 % O₂ interspersed with 2min normoxic exposures during 10 days can be successfully used to treat such patients.

Thus, according to numerous data, short exposures to 12-10% O₂ are harmless in most cases.

One could see the correspondence between such data distribution and the critical points of oxyhemoglobin dissociation curve. It is known [50-52] that during the decline of oxygen partial pressure in arterial blood from ~ 95 mm Hg (corresponding to 20,9 % FiO₂) to 80 mmHg, hemoglobin oxygen saturation decreases insignificantly, only by 5%. Then, from 80 to 50 mm Hg (corresponding to ~10-12 % FiO₂), oxygen saturation falls by 15%. After 50 mm Hg the concentration of oxyhemoglobin in arterial blood falls rapidly. In this part of the curve the gradient of a few mm Hg in the inhaled air can cause significant changes in oxygen supply slowing down ATP synthesis that is a direct destructive effect. As Dempsey and Morgan [6] have written in their last review, the sigmoid shape of the HbO₂ disassociation curve permits substantial (up to one-third) reductions from the normal arterial PO₂ before serious reductions occur in arterial O₂ saturation and content and therefore in O₂ transport. In the range of 80 to

50 mm Hg, there is such a degree of hypoxia when the supply of reduced coenzymes in the electron transport chain of mitochondria slows down. This in no way affects the rate of ATP synthesis, but increases the concentration of superoxide anion which activates numerous intracellular adaptation mechanisms [53, 54]. Thus, the data obtained by various authors about IHT therapeutic effects under the inhalation of 12% O₂ and less fits into this picture.

However, further reduction of inspired oxygen concentration in weak individuals and patients with different pathology may result in adverse changes. Besides oxyhemoglobin dissociation curve, there are other factors affecting the tissue oxygenation. For example, during blood acidification that can occur at different pathologies, critical points at oxyhemoglobin dissociation curve shift toward higher oxygen concentrations (not 50 but 60 mmHg). During anemia blood oxygen capacity is reduced, thus tissue hypoxia develops faster. Intoxication alters the zeta potential of red blood cells and decreases their functionality. This also reduces the degree of tissue oxygenation. The data presented in the table suggest that for healthy subjects the short-term inhalation of 10% O₂ is not dangerous, and such training does not require constant medical supervision. As for the patients and older people, the use of 12-10% FiO₂ can be considered effective and safe just only if the monitoring of the most important physiological functions takes place. The biological costs of many types of hypoxic adaptations can sometimes outweigh their benefits [12].

Regarding the optimization of the duration of hypoxic exposures and the length of IHT course, it worth to mention the results of earlier work of Foster et al. [55]. Authors provided the comparison of two protocols of normobaric, isocapnic, intermittent hypoxia: short-duration intermittent hypoxia with 12% O₂ separated by 5 min of normoxia for 1 h, or long-duration intermittent hypoxia 30 min of 12% O₂. Both groups had 10 exposures over a 12 day period. Measuring hypoxic ventilatory response (HVR),

blood pressure, heart rate, arterial oxyhemoglobin saturation and cerebral tissue oxygen saturation, authors concluded that both short- and long-duration intermittent hypoxia had similar effects on the ventilatory and cardiovascular responses, thus the long-term hypoxic exposures can be successfully replaced by short-term impacts with the same result. These investigations also show that the break in training for one or two days do not significantly affect the outcome of the IHT course. These conclusions were also expressed by Katayama et al. [56, 57], Koehle et al. [58] and others. Later on, Katayama et al. [59] conducted a study using the hypoxic tent, which was supported by 12.3% O₂, one and 3 hours during the week. HVR growth in the group which trained 1 hour was no less than in the group that trained 3 hours. Thus, short-term regime impacts may have the same result as longer regime.

Experiments on animals also confirm that short cycles of hypoxic exposures alternating with normoxic periods are more effective than longer bouts or continuous daily hypoxic exposures [13, 60-61]. Powerful hypoxic-induced gene transcription factors (HIF-1/HIF-2 alpha) are activated very early upon hypoxic exposure, guaranteeing time-dependent up-regulation of cardiorespiratory and hematological responses aimed at limiting deficits in O₂ transport [62]. As Dempsey and Morgan [6] have written, on the adaptive side, short-term exposures (via manipulation of FiO₂) to a few weeks of daily sessions consisting of 10–15 1- to 2-min bouts of moderate isocapnic hypoxemia (SpO₂ 75–80%) alternating with equal durations of normoxia have been shown to yield several benefits without maladaptive consequence.

The use of IHT in pediatrics requires special attention. Major achievements in this direction were made by scientists from the former Soviet Union [9]. Here we just briefly mention some papers to illustrate the mode of IHT for children.

A study of Anokhin and co-authors [63] applied IHT with a normobaric hypoxic stimulation with four sessions of 5 min 12-15% O₂,

followed by 5 min normoxic interval, for 10 days in 200 children aged 4 to 14 years who suffered from bronchial asthma. Researchers from Brazil studied 48 adolescents (12-14 years of age) under three conditions: mild intermittent asthma; mild persistent asthma; and control [64]. They concluded that adolescents with mild persistent asthma have a greater capacity to adapt to hypoxia than do those with other types of asthma. In addition, Serebrovskaya et al. [30] used IHT for treatment of children (aged 9-13 years) with persistent atopic bronchial asthma in moderate form without the signs of respiratory insufficiency. Normobaric hypoxia was administered with a portable device “Hypoxytron”, a modified closed spirometer with CO₂ absorption [65]. The initial inspired gas had 20.9% O₂ that fell to 12% during first 60-90 seconds of rebreathing, and then O₂ was added gradually to the device to maintain inspired O₂ at 12% for the remaining 3.5-4 min with a final arterial O₂ saturation typically 89-92%. All children easily tolerated the hypoxia periods without any untoward effects. Each IHT session consisted of four 5-7 min hypoxic periods, followed by 5 min interval with room air inspiration. Heart rate response to hypoxia became less pronounced and SpO₂ fell less at 12% O₂ after the course, indicating IHT improved efficiency of cardiovascular system in supporting oxygen supply during hypoxia.

Thus, IHT represents a promising approach in prevention and treatment of bronchial asthma in childhood. The proper choice of the hypoxic dosage depending on individual's reactivity to hypoxia must be titrated for each patient to avoid negative effects of hypoxia and to augment the favorable ones.

Hypoxic-hyperoxic exposures

Recently, a new mode of adaptive training was explored, which combines periods of hypoxia and hyperoxia [66-69]. A novel principle of short-term periodic adaptive training by varying the oxygen level from hypo- to hyperoxia is substantiated both theoretically and experimentally. Studies supports the viewpoint

that moderate periodic generation of free radical signal during hypoxic/hyperoxic bouts causes better induction of antioxidant enzyme protein synthesis than hypoxic/normoxic exposures, that may be an important trigger for specific adaptations.

Currently, this method is just beginning to enter the practice, so at this moment there are only a few papers in medical literature describing the results of such training in humans. Traditional protocols include alternating of breathing hypoxic gas mixtures (10-12% FiO₂) and periods of breathing hyperoxic mixture (about 30-35 % O₂).

Combined hypoxic-hyperoxic training was used in the treatment of the metabolic syndrome [70]. The use of hypo-hyperoxic exposures leads to a significant reduction in body weight. It was achieved mainly by reducing fat mass accompanied by a reduction of total cholesterol, low-density lipoproteins, fasting plasma glucose, optimization of blood pressure, increased hypoxic stability, physical endurance, improved mental status.

In more recent publication, Glazachev & Dudnik [67] provided the hypoxic test (10 min breathing with 10% FiO₂ followed by 30% FiO₂) in 30 healthy young men and described two different types of microcirculatory reactions: among the subjects sensitive to hypoxia such test led to a significant reduction in SpO₂ in the absence of changes in the microcirculation regulation; among the subjects resistant to hypoxia the test leads to the nutritive blood flow activation by increasing the initially lower endothelium-dependent and neurogenic sympathetic components in regulation of microhaemodynamics activity, reduction of blood shunting.

Susta et al [32] investigated sportsmen with overtraining syndrome with application a conditioning program consisting of repeated exposures to hypoxia (10% FiO₂) and hyperoxia (30% FiO₂), 6-8 cycles (total time 45 min -1 h), three times a week, delivered 1.5-2 h after a low-intensity exercise session over 4 weeks.

This pilot study showed that such training can facilitate functional recovery among athletes with overtraining syndrome in a relatively short time.

Potential Side Effects

The maladaptive side of intermittent hypoxia of pathological origin is mainly considered in the context of obstructive sleep apnea (OSA). Mechanisms of maladaptive responses are very good described in recent reviews [6, 54, 62, 71, 72, and many others]. Studies in this field have led to the view that intermittent hypoxia is the principal, if not the only, risk factor for the development of a number of detrimental cardiovascular, respiratory, metabolic, and cognitive outcomes [7]. The authors having analyzed a large number of studies concluded that protocols that were employed to establish the link between intermittent hypoxia and detrimental outcomes were typically severe in regards to intensity, duration, or both. The role of pattern, intensity, and duration of hypoxic application were largely ignored and the beneficial effects linked to milder forms of intermittent hypoxia were generally overlooked.

The balance between benefits and injury appears to primarily depend on the ability of the organism to activate adaptive mechanisms to IHT. In this context, the adaptive or maladaptive responses can be generally predicted by the frequency, severity, and duration of intermittent hypoxia [11]. However, the presence of underlying conditions such as hypertension or obesity, as well as age, sex, or genotypic variance, may be important factors tilting the balance between an appropriate homeostatic response and decompensation. Thus, careful monitoring for major functional performance during hypoxic sessions required when using the oxygen concentrations below 10% for fitness and sports, but for patients with various diseases as well as older people such medical monitoring must be carried out starting with 12% O₂. The duration and number of hypoxic episodes must be individually selected.

Individual prescription of hypoxic regimes

Individual variability to breathing the same hypoxia air is remarkable. Although all individuals respond and their respiration and heart rate increase according to the drop in arterial oxygen saturation, the pattern and magnitude of the response significantly varies from person to person which was mentioned in early works [74 - 76]. To determine individual sensitivity to hypoxic exposure investigators use different hypoxic stress-tests (spiroergometer test, breathing with hypoxic mixture with certain oxygen concentration, rebreathing test, breathing through an additional dead space, breath-holding tests).

In order to establish an individual's type of hypoxia reaction it is advisable to complete a test for each person before they start a course of IHT. The literature describes just a few practical approaches to solving this problem [77 - 79].

Russian authors proposed to use the hypoxic test consisting of short term (several minutes) breathing of hypoxic air of known oxygen concentration (conventionally $FiO_2 = 11\%$), followed by a recovery period, when the person takes the mask off and reverts to normal (ambient) air breathing [80, 81]. But still now we could not find out how to use in practice the resulting test information for selecting a specific training mode.

Bassovitch & Serebrovskaya [78] offered to analyze the shape of the SpO_2 curve under breathing with 11% FiO_2 hypoxic mixture. When SpO_2 reaches the targeted baseline of 85%, the patient is instructed to take the mask off and revert to ambient air breathing. The person remains sitting until the arterial oxygen saturation recovers back to the normal level of 95%. The specific methodology to use the results of this test for individual IHT mode selection has been described. However, in the later works, data validation of this technique in clinical or sport practice has not been published. The situation with the specific description of the principles of biofeedback control during the training session is also highly deplorable.

We know the only one laboratory where the study of individual reactions to hypoxia is given serious consideration and the proposed method of IHT mode selection was good described for older people with accelerated aging and patients with cardiovascular disorders and widely used in practice. This is the laboratory headed by Prof. O.Korkushko in the Institute of Gerontology, Kiev, Ukraine [28, 29, 77, 79].

During the past few years numerous debates about the ethical evaluation of diagnostic and therapeutic use of hypoxia in humans are raised. Although the works devoted to this problem obtained the approval from the Human Investigation Ethics Committees, there is the lack of evidences about strong evaluation of risk/benefit ratio. The analysis of such ratio and the creation of standardized guidelines for hypoxic treatment/training application are complicated due to the differences in criteria for individual dosage and utilized methods.

CONCLUSION

Collectively, the results suggest that short episodes of normobaric intermittent hypoxia leads to a variety of physiological benefits with minimal risk. Three to 5 exposures to reduced inspired oxygen up to 12-10 %, 5-7 min each during 2 to 3 weeks can be used for fitness and treatment of various diseases. More severe or longer intermittent hypoxia protocols must be accompanied by strict monitoring of respiratory and cardiovascular functions in order to avoid side effects. The reduction of oxygen content to individually tolerable level is justified for sports training and fitness as far as it effectively includes adaptation mechanisms and maximizes benefits. However, such regimen requires preliminary diagnostics of individual hypoxic tolerance and cardio-respiratory reactivity as well as rigorous monitoring of vital functions and good feedback device. The use of oxygen concentrations below 12% for treatment of diseases, especially in children and the elderly, are required substantial additional research.

We appeal to all scientists working in this field not to hide their negative results but publish all observations in the open press. It will help a lot in developing common guidelines for IHT implementation to improve public health of our Planet.

**Т.В.Серебровская¹, З.А.Серебровская¹,
Е. Егоров²**

ТРЕНИРОВОЧНЫЙ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ИНТЕРВАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ: ВОПРОС ДОЗЫ

Распространение в последнее десятилетие методов интервальной гипоксической тренировки (ИГТ) в фитнесе, спорте, военной и медицинской практике вызвало дискуссию о наиболее эффективных режимах гипоксической тренировки и методах ее инструментальной реализации. Низкие дозы гипоксии могут быть недостаточным стимулом для мобилизации адаптивных механизмов, в то время как глубокая или продолжительная гипоксия способна провоцировать опасные патологические процессы. В этом обзоре мы касаемся узкого практического вопроса о наиболее эффективной и удобной технологии реализации ИГТ, а именно методов, основанных на вдыхании человеком гипоксических газовых смесей. Данные, полученные при исследовании людей, убедительно свидетельствуют о том, что использование смесей с 15-13% кислорода во вдыхаемом воздухе (FiO₂) при различных временных характеристиках не вызывает выраженных положительных изменений. Кратковременные ежедневные сеансы, состоящие из 5-7-минутных выдыханий 12-10% O₂, чередующихся с равными интервалами нормоксии, в течение 2-3 нед, считаются наиболее эффективными и безвредными как для фитнеса, так и лечения некоторых заболеваний. Протоколы с более жесткой или более длительной гипоксией должны сопровождаться строгим мониторингом жизненно важных функций для избежания побочных эффектов. Снижение на несколько минут содержания кислорода до индивидуально переносимого предела оправдано в спортивной практике, поскольку это максимизирует положительный эффект. Тем не менее, такой режим требует предварительной диагностики индивидуальной переносимости гипоксии и реактивности респираторно-гемодинамической системы, а также строгого контроля жизненно важных функций и хорошей обратной связи пациента с прибором. Использование концентрации кислорода ниже 12% для лечения заболеваний, особенно у детей и пожилых людей, требует серьезных дополнительных исследований. Недавно был предложен новый режим гипоксическо-гипероксической тренировки, сочетающий в себе периоды дыхания гипоксической (12-10% FiO₂) и гипероксической (30-35% FiO₂) смесью. Немногочисленные данные свидетельствуют, что такой режим может сократить время реоксигенации, т.е.

уменьшить продолжительность тренировочных сессий. Однако, до сих пор нет достаточной сравнительной базы для доказательства, что этот метод является более эффективным, чем гипоксически-нормоксические режимы. Мы обращаемся ко всем ученым, работающим в области ИГТ, не скрывать свои негативные результаты, а публиковать все наблюдения в открытой печати. Это внесет значительный вклад в разработку общих методических принципов осуществления ИГТ для улучшения здоровья населения нашей планеты.

¹ *Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, Киев,* ² *CELLGYM Technologies GmbH, Берлин, Германия*

**Т.В.Серебровська¹, З.О.Серебровська¹,
Є. Єгоров²**

ТРЕНУВАЛЬНИЙ І ТЕРАПЕВТИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ІНТЕРВАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ: ПИТАННЯ ДОЗИ

Поширення в останнє десятиліття методів інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ) у фітнесі, спорті, військовій та медичній практиці викликало дискусію про найбільш ефективні режими гіпоксичного тренування і методи їх інструментальної реалізації. Низькі дози гіпоксії можуть бути недостатнім стимулом для мобілізації адаптивних механізмів, у той час як глибока або тривала гіпоксія здатна провокувати небезпечні патологічні процеси. У цьому огляді ми торкаємося вузького практичного питання про найбільш ефективну і зручну технологію реалізації ІГТ, а саме методів, заснованих на вдиханні людиною гіпоксичних газових сумішей. Дані, отримані при дослідженні людей, переконливо свідчать про те, що використання сумішей з 15-13% кисню у вдихуваному повітрі (FiO₂) при різних часових характеристиках не викликає виражених позитивних змін. Короткочасні щоденні сеанси, що складаються з 5-7-хвилинних вдихань 12-10% O₂, що чергуються з рівними інтервалами нормоксії, протягом 2-3 тиж, вважаються найбільш ефективними і нешкідливими як для фітнесу, так і лікування деяких захворювань. Протоколи з жорсткішою або більш тривалою гіпоксією повинні супроводжуватися суворим моніторингом життєво важливих функцій для уникнення побічних ефектів. Зниження на кілька хвилин вмісту кисню до межі, яка індивідуально переноситься, виправдано в спортивній практиці, оскільки це максимізує позитивний ефект. Тим не менше такий режим вимагає попередньої діагностики індивідуальної переносимості гіпоксії і реактивності респираторно-гемодинамічної системи, а також суворого контролю життєво важливих функцій і хорошого зворотного зв'язку пацієнта з приладом. Використання концентрації кисню нижче за 12% для лікування захворювань, особливо у дітей і літніх людей, вимагає серйозних додаткових досліджень. Нещодавно був запропонований новий метод гіпоксично-гіпероксичного тренування, що

поєднує в собі періоди дихання гіпоксичною (12-10% FiO₂) і гіпероксичною (30-35% FiO₂) сумішшю. Обмежені дані свідчать, що такий режим може скоротити час реоксигенації, тобто зменшити тривалість тренувальних сесій. Проте, до цих пір немає достатньої порівняльної бази для доказу, що цей метод є більш ефективним, ніж гіпоксично-нормоксичні режими. Ми звертаємося до всіх вченим, які працюють в галузі ІГТ, не приховувати свої негативні результати, а публікувати всі спостереження у відкритій пресі. Це зробіть значний внесок у розробку загальних методичних принципів здійснення ІГТ для поліпшення здоров'я населення нашої планети.

¹ Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, ² CELLGYM Technologies GmbH, Берлін, Німеччина

REFERENCES

1. Prokopov AF. Intermittent Hypoxia and Health: From Evolutionary Aspects to Mitochondria Rejuvenation. In: Lei Xi & Tatiana V. Serebrovskaya (Eds). Intermittent Hypoxia and Human Diseases / Springer, UK, 2012, Chapter 21, p. 253-69.
2. Gonzalez-Rothi EJ, Lee KZ, Dale EA, Reier PJ, Mitchell GS, Fuller DD. Intermittent hypoxia and neurorehabilitation. *J Appl Physiol* (1985). 2015 Dec 15; 119(12):1455-65.
3. Basovich SN. Trends in the use of preconditioning to hypoxia for early prevention of future life diseases. *Biosci Trends*. 2013 Feb; 7(1):23-32.
4. Dale EA, Ben Mabrouk F, Mitchell GS. Unexpected benefits of intermittent hypoxia: enhanced respiratory and nonrespiratory motor function. *Physiology* (Bethesda). 2014 Jan;29(1):39-48.
5. Navarrete-Opazo A, Mitchell GS. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Nov 15;307(10):R1181-97.
6. Dempsey JA, Morgan BJ. Humans In Hypoxia: A Conspiracy Of Maladaptation?! *Physiology* (Bethesda). 2015 Jul; 30(4):304-16.
7. Mateika JH, El-Chami M, Shaheen D, Ivers B. Intermittent hypoxia: a low-risk research tool with therapeutic value in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2015 Mar 1;118(5):520-32.
8. Astorino TA, Harness ET, White AC. Efficacy of Acute Intermittent Hypoxia on Physical Function and Health Status in Humans with Spinal Cord Injury: A Brief Review. *Neural Plast*. 2015; 2015:409625.
9. Serebrovskaya TV, Xi L. Intermittent hypoxia in childhood: the harmful consequences versus potential benefits of therapeutic uses. *Front Pediatr*. 2015 May 19;3:44. doi: 10.3389/fped.2015.00044. eCollection 2015.
10. Serebrovska TV, Shatilo VB. Remote Ischemic Preconditioning versus Intermittent Hypoxia Training: a Comparative Analysis for Cardioprotection. *Fiziol Zh*. 2015, 61(3): 99-117.
11. Almendros I, Wang Y, Gozal D. The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Jul 15;307(2):L129-40.
12. Bassovitch O. Intermittent hypoxic training: risks versus benefits. A biomedical engineering point of view. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Oct;110(3):659-60.
13. Serebrovskaya TV, Nosar VI, Bratus LV, Gavenauskas BL, Mankovska IM. Tissue oxygenation and mitochondrial respiration under different modes of intermittent hypoxia. *High Alt Med Biol*. 2013 Sep;14(3):280-88.
14. Serebrovskaya TV. Intermittent Hypoxia Research in the Former Soviet Union and the Commonwealth of Independent States (CIS): History and Review of the Concept and Selected Applications. *High Alt Med Biol*. 2002 Summer;3(2):205-21.
15. Ando S, Hatamoto Y, Sudo M, Kiyonaga A, Tanaka H, Higaki Y. The effects of exercise under hypoxia on cognitive function. *PLoS One*. 2013 May 10; 8(5):e63630.
16. Turner G, Gibson OR, Maxwell NS. Simulated moderate hypoxia reduces intermittent sprint performance in games players. *J Sports Med Phys Fitness*. 2014 Oct;54(5):566-74.
17. Kong Z, Zang Y, Hu Y. Normobaric hypoxia training causes more weight loss than normoxia training after a 4-week residential camp for obese young adults. *Sleep Breath*. 2014 Sep;18(3):591-7.
18. Ho JY, Huang TY, Chien YC, Chen YC, Liu SY. Effects of acute exposure to mild simulated hypoxia on hormonal responses to low-intensity resistance exercise in untrained men. *Res Sports Med*. 2014;22(3):240-52.
19. Ramos-Campo DJ, Martínez-Sánchez F, Esteban-García P, Rubio-Arias JA, Clemente-Suarez VJ, Jiménez-Díaz JF. The effects of intermittent hypoxia training on hematological and aerobic performance in triathletes. *Acta Physiol Hung*. 2015 Dec;102(4):409-18.
20. Holliss BA, Fulford J, Vanhatalo A, Pedlar CR, Jones AM. Influence of intermittent hypoxic training on muscle energetics and exercise tolerance. *J Appl Physiol* (1985). 2013 Mar 1;114(5):611-9.
21. Goods P SR, Dawson BT, Landers GJ, Gore CJ, Peeling P. Effect of different simulated altitudes on repeat-sprint performance in team-sport athletes. *Int J Sports Physiol Perform*. 2014 Sep;9(5):857-62.
22. Brocherie F, Girard O, Faiss R, Millet GP. High-intensity intermittent training in hypoxia: a double-blinded, placebo-controlled field study in youth football players. *J Strength Cond Res*. 2015 Jan;29(1):226-37.
23. Ribon A, Pialoux V, Saugy JJ, Rupp T, Faiss R, Debevec T & Millet GP. Exposure to hypobaric hypoxia results in higher oxidative stress compared to normobaric hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2016 Mar;223:23-7.
24. Millet GP, Roels B, Schmitt L, Woorons X, Richalet JP. Combining hypoxic methods for peak performance. *Sports Med*. 2010 Jan 1;40(1):1-25.
25. Berezovskyi VA, Lisukha LM, Stepanova YI, Kolpacov IY. The influence of the normobaric hypoxia for the breathing indexes of the children lived in radioactive contaminated territories. *Fiziol Zh*. 2015;61(3):35-43. [Ukrainian].

26. Querido JS, Welch JF, Ayas NT, Sheel AW. Cerebrovascular Response to CO₂ Following 10 Days of Intermittent Hypoxia in Humans. *Aerosp Med Hum Perform.* 2015 Sep;86(9):782-6.
27. Lisukha LM, Berezovskiy VA. Influence of the normobaric hypoxia on visual-motor children's response lived in radioactively contaminated territories. *Fiziol Zh.* 2015;61(2):40-7. [Ukrainian].
28. Shatilo VB, Korkushko OV, Ischuk VA, Downey HF, Serebrovskaia TV. Effects of intermittent hypoxia training on exercise performance, hemodynamics, and ventilation in healthy senior men. *High Alt Med Biol.* 2008 Spring;9(1):43-52.
29. Korkushko OV, Shatilo VB, Ishchuk VA. [Effectiveness of intermittent normobaric hypoxic trainings in elderly patients with coronary artery disease]. *Adv Gerontol.* 2010;23(3):476-82.
30. Serebrovskaia T.V., A.N. Bakunovsky, K.V. Nesvitailova, I. Mankovska. Intermittent hypoxia in treatment of bronchial asthma in childhood. *Intermittent Hypoxia and Human Diseases*, Springer, London, 2012, pp. 135-43.
31. Tadibi V, Dehnert C, Menold E, Bärtch P. Unchanged anaerobic and aerobic performance after short-term intermittent hypoxia. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 May;39(5):858-64.
32. Susta D, Dudnik E, Glazachev OS. A programme based on repeated hypoxia-hyperoxia exposure and light exercise enhances performance in athletes with overtraining syndrome: a pilot study. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2015 Oct 7 [Epub ahead of print].
33. Zhang P, Shi X, Downey HF. Two-week normobaric intermittent-hypoxic exposures stabilize cerebral perfusion during hypocapnia and hypercapnia. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015 Jul; 240(7):961-8.
34. Lyamina NP, Lyamina SV, Senchiknin VN, Mallet RT, Downey HF, Manukhina EB. Normobaric hypoxia conditioning reduces blood pressure and normalizes nitric oxide synthesis in patients with arterial hypertension. *J Hypertens.* 2011 Nov;29(11):2265-72.
35. Redzhebova OK, Chizhov AI. Results of utilization of intermittent normobaric hypoxia in patients with bronchial asthma and chronic obstructive bronchitis. *Fiziol Zh.* 1992;38:39-42. [Russian].
36. Zhang P, Downey HF, Chen S, Shi X. Two-week normobaric intermittent hypoxia exposures enhance oxyhemoglobin equilibrium and cardiac responses during hypoxemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014 Sep 15;307(6):R721-30.
37. Vorob'ev LP, Chizhov AIa, Potievskai VI. The possibilities of using intermittent normobaric hypoxia for treating hypertension patients. *Ter Arkh.* 1994;66(8):12-5. [Russian].
38. Potievskai VI, Chizhov AIa. Effect of intermittent normobaric hypoxia on dynamics of disease state in patients with hypertension. *Fiziol Zh.* 1992;38(5):53-7. [Russian].
39. Serebrovskaia TV, Nikolsky IS, Nikolska VV, Mallet RT, Ishchuk VA. Intermittent hypoxia mobilizes hemopoietic progenitors and augments cellular and humoral elements of innate immunity in adult men. *High Alt Med Biol.* 2011 Fall;12(3):243-52.
40. Hayes H. B., A. Jayaraman, M. Herrmann, G. S. Mitchell, W. Z. Rymer, and R. D. Trumbower. Daily intermittent hypoxia enhances walking after chronic spinal cord injury: a randomized trial. *Neurology.* 2014; 82(2):104-13.
41. Hayes HB, Chavtal S, Ting LH, Rymer WZ, Mitchell GS, Trumbower RD. Effect of single-day acute intermittent hypoxia on overground walking speed and muscle coordination in persons with incomplete spinal cord injury. *Soc Neurosci.* 2012; Abstract: 252.17/M16.
42. Trumbower RD, Jayaraman A, Mitchell GS, Rymer WZ. Exposure to acute intermittent hypoxia augments somatic motor function in humans with incomplete spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair.* 2012; 26: 163-72.
43. Yokhana SS, Gerst DG III, Lee DS, Badr MS, Qureshi T, Mateika JH. Impact of repeated daily exposure to intermittent hypoxia and mild sustained hypercapnia on apnea severity. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Feb;112(3):367-77.
44. Beaudin AE, Waltz X, Pun M, Wynne-Edwards KE, Ahmed SB, Anderson TJ, Hanly PJ, Poulin MJ. Human intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity is not caused by inflammation. *Eur Respir J.* 2015 Oct;46(4):1072-83.
45. Jaiswal PB, Tester NJ, Davenport PW. Effect of acute intermittent hypoxia treatment on ventilatory load compensation and magnitude estimation of inspiratory resistive loads in an individual with chronic incomplete cervical spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2016 Jan;39(1):103-10.
46. Tester NJ, Fuller DD, Fromm JS, Spiess MR, Behrman AL, Mateika JH. Long-term facilitation of ventilation in humans with chronic spinal cord injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Jan 1;189(1):57-65.
47. Polotsky VY, Bevans-Fonti S, Grigoryev DN, Punjabi NM. Intermittent Hypoxia Alters Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Healthy Volunteers. *PLoS One.* 2015 Dec 14;10(12):e0144725.
48. Serebrovskaia ZA, Serebrovskaia TV, Afonina GB. Chemiluminescence, blood lipid peroxidation and neutrophil activity during the hypoxic training of persons subjected to ionizing radiation exposure. *Radiats Biol Radioecol.* 1996 May-Jun;36(3):394-9.
49. Serebrovs'ka TV, Kolesnikova IeE, Karaban' IM. Respiratory regulation during adaptation to intermittent hypoxia in patients with Parkinson disease. *Fiziol Zh.* 2003;49(3):95-103.
50. Roe PG, Jones JG. Analysis of factors which affect the relationship between inspired oxygen partial pressure and arterial oxygen saturation. *Br J Anaesth.* 1993 Oct;71(4):488-94.
51. Skjodt NM, Ritz C, Vethanayagam D. The pulse oxygen saturation: inspired oxygen pressure (SpO₂:P_IO₂) diagram: application in the ambulatory assessment of pulmonary vascular disease. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 605:492-6.

52. Sanz F, Dean N, Dickerson J, Jones B, Knox D, Fernández-Fabrellas E, Chiner E, Briones ML, Cervera Á, Aguar MC, Blanquer J. Accuracy of PaO₂/FiO₂ calculated from SpO₂ for severity assessment in ED patients with pneumonia. *Respirology*. 2015 Jul; 20(5):813-8.
53. Lukyanova LD, Kirova YI. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Front Neurosci*. 2015 Oct 1;9:320.
54. Yin F, Cadenas E. Mitochondria: the cellular hub of the dynamic coordinated network. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Apr 20;22(12):961-4.
55. Foster GE, McKenzie DC, Milsom WK, Sheel AW. Effects of two protocols of intermittent hypoxia on human ventilatory, cardiovascular and cerebral responses to hypoxia. *J Physiol*. 2005 Sep 1;567(Pt 2):689-99.
56. Katayama K, Sato Y, Morotome Y, Shima N, Ishida K, Mori S, Miyamura M. Intermittent hypoxia increases ventilation and SpO₂ during hypoxic exercise and hypoxic chemosensitivity. *J Appl Physiol* 2001, 90: 1431-40.
57. Katayama K, Sato Y, Shima N, Qiu JC, Ishida K, Mori S, Miyamura M. Enhanced chemosensitivity after intermittent hypoxic exposure does not affect exercise ventilation at sea level. *Eur J Appl Physiol*. 2002; 87: 187-91.
58. Koehle M, Sheel W, Milsom W, McKenzie D. The effect of two different intermittent hypoxia protocols on ventilatory responses to hypoxia and carbon dioxide at rest. *Adv Exp Med Biol*. 2008, 605:218-23.
59. Katayama K, Ishida K, Iwasaki KI, Miyamura M. Effect of two durations of short-term intermittent hypoxia on ventilatory chemosensitivity in humans. *Eur J Appl Physiol*. 2009 Mar;105(5):815-21.
60. Mitchell GS, Terada J. Should we standardize protocols and preparations used to study respiratory plasticity? *Respir Physiol Neurobiol*. 2011 Jul 31;177(2):93-7.
61. Peng YJ, Prabhakar NR. Effect of two paradigms of chronic intermittent hypoxia on carotid body sensory activity. *J Appl Physiol* (1985). 2004 Mar;96(3):1236-42.
62. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev*. 2012 Jul;92(3):967-1003.
63. Anokhin II, Geppe NA, Dairova PA, Zhupikova NI, Melnikova EV, Selezneva IN, Urbakh VA. [Effects of hypoxic stimulation in experimental animals and in children with bronchial asthma]. *Fiziol. Zh.* 38 (1992) 33-9. [Russian].
64. Maldonado M, Portela LO. Analysis of physiological variables during acute hypoxia and maximal stress test in adolescents clinically diagnosed with mild intermittent or mild persistent asthma. *J Bras Pneumol*. 2011 Nov-Dec;37(6):712-9.
65. Lopata VA, Serebrovskaya TV. Hypoxicators: review of the operating principles and constructions. *Intermittent Hypoxia and Human Diseases*, Springer, London, 2012, pp. 291-302.
66. Arkhipenko YV, Sazontova TG, Zhukova AG. Adaptation to periodic hypoxia and hyperoxia improves resistance of membrane structures in heart, liver, and brain. *Bull Exp Biol Med*. 2005 Sep;140(3):278-81.
67. Glazachev OS, Dudnik EN. Microcirculatory reactivity features in almost healthy people during acute moderate hypoxia and hyperoxia modeling. *Fiziol Cheloveka*. 2013 Jul-Aug;39(4):74-81. [Russian].
68. Sazontova TG, Bolotova AV, Bedareva IV, Kostina NV, and Arkhipenko YuV. Adaptation to intermittent hypoxia/hyperoxia enhances efficiency of exercise training. In: Lei Xi & Tatiana V. Serebrovskaya (Eds). *Intermittent Hypoxia and Human Diseases* / Springer, UK, 2012, Chapter 16, p. 191-205.
69. Gonchar O, Mankovska I. Moderate hypoxia/hyperoxia attenuates acute hypoxia-induced oxidative damage and improves antioxidant defense in lung mitochondria. *Acta Physiol Hung*. 2012 Dec;99(4):436-46.
70. Glazachev OS, Zvenigorodskaya LA, Dudnik EN, Iartseva LA, Mishchenkova TV, Platonenko AV, Spirina GK. Interval hypoxic-hyperoxic training in the treatment of the metabolic syndrome. *Eksp Klin Gastroenterol*. 2010;(7):51-6.
71. Drager LF, Polotsky VY, O'Donnell CP, Cravo SL, Lorenzi-Filho G, Machado BH. Translational approaches to understanding metabolic dysfunction and cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Oct;309(7):H1101-11.
72. Eisele HJ, Markart P, Schulz R. Obstructive Sleep Apnea, Oxidative Stress, and Cardiovascular Disease: Evidence from Human Studies. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:608438.
73. Weiss MD, Tamisier R, Boucher J, Lynch M, Gilmartin G, Weiss JW, Thomas RJ. A pilot study of sleep, cognition, and respiration under 4 weeks of intermittent nocturnal hypoxia in adult humans. *Sleep Med*. 2009 Aug;10(7):739-45.
74. Berezovskii VA, Serebrovskaya TV, Lipskii Plu. [Study of external respiratory function in twins with different gas mixtures] *Fiziol Zh*. 1981 Jan-Feb;27(1):20-5 [Ukrainian].
75. Berezovskii VA, Serebrovskaya TV. [Individual reactivity of the human respiratory system and its evaluation]. *Fiziol Zh*. 1988 Nov-Dec;34(6):3-7 [Ukrainian].
76. Tsvetkova A.M. and Tkatchouk E.N. ["Hypoxia User": the opportunity of individual programming of interval hypoxic training]. In: *Hypoxia: Mechanisms, Adaptation, Correction*. Moscow, BEBIM, 1999; pp.83-4. [Russian].
77. Korkushko OV, Shatilo VB, Ishchuk VA, Tourta MI. Use of intermittent normobaric hypoxia trainings in elderly people. In: Xi L, Serebrovskaya TV (Eds). *Intermittent hypoxia: from molecular mechanisms to clinical applications*. Nova Science Publishers, Inc, New York, 2009; Chapter 28, p. 537-48.
78. **Bassovitch O. and Serebrovskaya T.** Equipment and Regimes for Intermittent Hypoxia Therapy. In: *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications*. Editors: Lei Xi & Tatiana V. Serebrovskaya/ Nova Science Publishers, 2009, Chapter 30 : 539-601.
79. Shatylo VB, Serebrovskaya TV, Gavalko AV, Egorov E, and Korkushko OV. Acute hypoxic test in patients with

-
- prediabetes. High Alt Med Biol. 2016 (in press).
80. Strelkov RB. (Ed.) Normobaric Hypoxytherapy: Methodological Recommendations. Ministry of Public Health. Moscow, 1988, 24 p. [Russian].
81. Tsyganova TN, Egorova EB (Eds.). Interval Hypoxic Training in Obstetrics and Gynaecology. Methodological Recommendations. Ministry of Public Health. Moscow, 1993, 18 p. [Russian].

Received 28.01.2016

Дві долі видатних жінок-дослідників

(До 100-річчя від дня народження професора І.В.Торської та 106-річчя професора Р. Леві-Монтальчини)

В.Я.Березовський

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України; e-mail: vadber@biph.kiev.ua

Описано життєвий шлях та наукові розробки І.В.Торської за період її навчання у Москві (1934-1940 рр.) та під час Другої світової війни (1941-1945 рр.). Особливу увагу приділено київському періоду наукової діяльності, зокрема, дослідженням стану клітин центральної нервової системи (ЦНС) у період реанімації після клінічної смерті та подальшого життя. Вона вперше показала можливість амітотичного поділу нейронів та висунула гіпотезу про наявність нейросекреторних факторів, що стимулюють проліферацію клітин (1956 р.). Результати її роботи було поставлено під сумнів. Значно пізніше (1986 р.) за аналогічні дослідження Р.Леві-Монтальчині та С.Коен отримали Нобелівську премію.

Ключові слова: амітотичний поділ нейронів ЦНС; проліферація клітин; фактор росту нервової тканини.

З давніх давен дослідництво вважалося суто чоловічою професією. Доля жінок була важливою для забезпечення життя на планеті, а проблеми філософії, астрономії, математики, навіть медицини вирішували лише чоловіки. Тільки у XII сторіччі медикам стало відомим ім'я дочки Київського князя Мстислава Володимировича Євпраксії, манускрипт якої на грецькій мові досі зберігається у Флорентійській бібліотеці. Він називається «Алімма», що в перекладі означає – медичні мазі. Це перша монографія, створена розумом однієї з видатних жінок Київської Русі. Лише в XIX столітті з'являються історичні дослідження Марії Складовської-Кюрі, яка відкрила радіоактивні елементи. У XX столітті стало відомим ім'я Розалінди Франклін, яка зуміла зробити рентгенівське зображення ДНК.

З цього часу жінки в багатьох країнах отримали доступ до вищої освіти і почали суттєво впливати на дослідницьку роботу в усіх галузях науки. Не виключенням стали і слов'янські народи. Серед них варто пригадати і видатну дослідницю - Юю Володимирівну

Торську, доктора медичних наук, професора, непересічну особистість, видатного вченого. Її життєвий шлях був надзвичайно насиченим як позитивними, так і негативними подіями. Народилася вона у 1916 р. у місті Севастополі в сім'ї революціонерів. У віці трьох років лишилась без батька, який був комісаром 11-ї південної армії і загинув у 1919 р. Мати і до і після Жовтневої революції 1917 р. виконувала спочатку нелегальну, потім легальну партійну роботу. У 1937 р. під час чергової «чистки» партійних рядів більшовиків була репресована. Умови позбавлення волі переносила тяжко, пішла з життя у 1939 р. Ія залишилася повною сиротою, але їй надали можливість закінчити сім класів середньої школи та пройти дворічне навчання на робітничому факультеті. У 1934 р. вона здала екзамени на біологічний факультет Першого московського державного університету. Спеціалізувалася на кафедрі гістології під керівництвом професора Роскіна. Ще за часів студентського навчання почала працювати в Московському Інституті фізіоло-



Фото професора І.В. Тороскої

логії АН СРСР. Вивчала структуру і функції капілярної системи прижиттєвими методами. У 1940 р. успішно закінчила університет. Цього ж року, паралельно з основною роботою, отримала додаткову посаду завідувача музею патолого-анатомічних препаратів Інституту патологічної анатомії.

За комсомольською путівкою у 1940 р. закінчила курси військово-польової хірургії при Центральному інституті вдосконалення лікарів. У 1941 р. на самому початку війни мобілізована до Московського ополчення. Працювала на посаді молодшого полкового лікаря 18-ї дивізії. Влітку 1942 р. призначена начальником санітарної служби Московського військового округу. З першого жовтня 1944 р. вступила до аспірантури кафедри гістології та ембріології Першого московського медичного інституту до професора М.А.Барона. Працювала над проблемою іннервації легеневої плеври ссавців та людини. Після закінчення аспірантури була переведена на посаду молодшого наукового співробітника лабораторії гістології Інституту нормальної і патологічної анатомії Академії медичних наук. Диплом кандидата біологічних наук отримала у 1951 р.

На запрошення директора Інституту



Фото професора Р. Леві-Монтальчині

клінічної фізіології АН УРСР переїхала до Києва і 15 лютого 1949 р. була атестована Президією Академії наук Української РСР на посаду молодшого наукового співробітника лабораторії трофічних функцій нервової системи відділу вищої нервової діяльності. Відділ очолював академік Г.В.Фольборт. З 15 травня 1953 р. затверджена на посаді старшого наукового співробітника лабораторії морфології нервової системи Інституту фізіології АН УРСР.

Перші публікації результатів наукових досліджень її Володимирівни стосувалися прижиттєвого вивчення кровоносних капілярів (1940 р.) та іннервації легеневої плеври ссавців та людини. Ці матеріали увійшли до її кандидатської дисертації. Після переїзду до Києва більшість її досліджень було спрямовано на вивчення структури нервових елементів у нормі та при регенерації тканин після пошкоджень. При цьому вона використовувала власну модифікацію методики А.С.Догеля з суправітальним забарвленням тканин метиленовим синім [1].

Після сумно відомої сесії ВСГАНІЛ СРСР, очолюваної академіком Лисенко Т.Д. (1952 р.) та Павловської сесії АН СРСР дослі-

дження будь-яких тканин крім нервової стали не актуальними. Центральна нервова система опинилася на вістрі партійної науки і всі дослідження були спрямовані на цей об'єкт. Мабуть саме тому вже в 1954 р. з'явилися перші публікації Ії Володимирівни, присвячені морфологічним дослідженням іннервації навколонирикових тканин і жирових відкладень, впливу препаратів аденозинтрифосфату на розвиток експериментальної міодистрофії [1]. За декілька років вона виконала значний обсяг досліджень, що дало змогу накопичити матеріали для майбутньої докторської дисертації.

З 1960 по 1966 рр. І.В.Торська працювала на посаді старшого наукового співробітника відділу космічної біології (керівник – академік АМН СРСР проф. М.М.Сиротинін). Вона входила в групу оживлення після клінічної смерті (керівник – проф. В.Д.Янковський), що розробляла інноваційні методики реанімації після клінічної смерті. Морфологічні характеристики стану різних ділянок головного мозку тварин оцінювала Ія Володимирівна. Дослідження нервових клітин вона почала ще раніше, у період своєї роботи у відділі академіка АН УРСР Г.В.Фольборта [2].

В 1956 р. вона опублікувала перші дані морфологічного аналізу реакції клітин головного мозку свавців та особливостей трофічного впливу нервової системи на регуляцію метаболізму клітин [2]. Цей період наукової діяльності І.В.Торської характеризувався концентрацією уваги на дослідженнях стану клітинних елементів ЦНС собак, що піддавалися знекровлюванню, короткий час перебували у стані клінічної смерті, після чого поверталися до життя за методом проф. Янковського. Розробка нових технологій повернення до життя після клінічної смерті були основною тематикою лабораторії. Результати цих досліджень опубліковані у збірці тез конференції в Москві [2], Ленінграді [3] та на Пленумі Всесоюзного товариства анатомів, гістологів та ембріологів (1961 р.) в Іркутську [4].

Досліджуючи морфологію нейронів го-

ловного мозку на тваринах, що перенесли знекровлювання, зупинку серця та повну клінічну смерть з наступним відновленням життя, Ія Володимирівна звернула увагу на факти, що суперечили загальноприйнятим твердженням. Всі попередні дослідники відстоювали точку зору, що клітини ЦНС не регенерують [5-7]. Вважалося, що після короточасної смерті можливе часткове відновлення будь-яких органів, окрім специфічних клітин ЦНС [6]. Всі підручники, на яких виховувалися попередні покоління дослідників, включаючи і радянські видання до 70-х років ХХ століття, містять твердження про неможливість регенерації нейронів ЦНС [7-9].

Публікація Ії Володимирівни під назвою «Стан нервових клітин ЦНС тварин, оживлених і тривало живучих після смерті від крововтрати» [10], яка надрукована у збірці «Головной мозг и его функции», викликала недовіру та скептицизм. Цього ж року в «Фізіологічному журналі» АН УРСР була опублікована стаття І.В.Торської, яка стверджувала, що у собак, які були оживлені після клінічної смерті і прожили після цього кілька років, в корі мозку, в ядрах підкірки та в довгастому мозку виявлені явища аміотичного поділу диференційованих нервових клітин і проліферації нейробластичних елементів [11].

Варто нагадати, що існують два істотно різних шляхи проліферації клітин. За звичайних умов здебільшого розвиваються процеси міотичного поділу клітин у кількості, потрібній для забезпечення повноцінного функціонування органа. При цьому в клітині відбувається спіралізація хромосом, утворення веретина поділу та біфуркація інтерфазного ядра клітини з наступним розмежуванням цитоплазми. Аміотична проліферація характеризується тим, що соматична клітина, без спіралізації хромосом і утворення веретина поділу, видовжує і перешнуровує ядерце. На наступному етапі аналогічні процеси відбуваються і з ядром. Його дуплікація супроводжується наступним поділом цитоплазми. Амітоз – це своєрідний

тип проліферації, що рідко спостерігається при нормальній життєдіяльності клітин, а здебільшого – при екстремальних впливах (опромінення, інтоксикації, аноксія). Він властивий високодиференційованим клітинам, до яких належать і дефінітивні нейрони головного мозку [9].

У 1963 р. Ія Володимирівна опублікувала результати своїх досліджень в Україні [12] і зробила доповідь на конференції анатомів, гістологів та ембріологів у Москві [13]. На науковій конференції реакція вчених була стримано недовірливою до фактичного матеріалу та висновків доповіді. Проте автор була настирною. Протягом найближчих років вона оприлюднила 17 публікацій на конференціях у Москві, Баку та Києві. У тому числі на ІХ Міжнародному конгресі анатомів, що проходив у Ленінграді у серпні 1970 р. [14-21].

На жаль, у ті часи всі дослідники були зобов'язані вперше опублікувати свої роботи у російських виданнях, лише після цього вони мали право надати їх до іноземних видань. Для цього потрібно було отримати від служби з охорони державних таємниць у друкованих виданнях спеціальний дозвіл на публікацію за кордоном. Такий дозвіл видавався за кількома підписами і отримували його не усі бажаючі.

Тривалі дослідження структури різних тканин лабораторних тварин за допомогою світлової та електронної мікроскопії дали змогу І.В.Торській підготувати матеріали докторської дисертації. Під час внутрішнього захисту виникли деякі ускладнення. Вони були пов'язані з тим, що керівництво наукової ради Інституту обережно поставилося до відкриття І.В.Торською незрозумілих для багатьох явищ проліферації нейробластів ЦНС після впливів жорсткої гіпоксії та знекровлювання. Щоб не виглядати в очах московських експертів ВАКу єретиками, керівництво рекомендувало вилучити з її докторської дисертації розділ, який містив морфологічні докази наявності регенерації нервових клітин головного мозку тварин, оживлених після клінічної смерті. Сили сторін були нерівними.

Завідувач лабораторії доводила своє право на власну інтерпретацію одержаних нею фактів. Їй протистояв авторитет старших дослідників та партійного бюро Інституту. Майже рік вона мужньо намагалася довести свою правоту, але ... мусила здатися.

На офіційний захист Ія Володимирівна подала скорочений опис своїх досліджень, вилучивши з нього всі ілюстрації та текст «єретичного» розділу про можливість регенерації нервових клітин головного мозку. У списку своїх публікацій вона не цитувала праць, що стосувалися секреторного впливу нервових елементів ЦНС на процеси регенерації клітин [15,19]. Захист (03.06.1966 р.) пройшов успішно. Дисертант отримала звання доктора біологічних наук, але вважала себе несправедливо скривдженою. Ія Володимирівна була впевнена у тому, що нервові клітини ЦНС здатні регенерувати.

Після негативного сприйняття результатів її досліджень вона втратила ентузіазм експериментатора-пошуковця і вирішила за краще відійти від науково-дослідної роботи. Ія Володимирівна Торська подала заяву на звільнення 16.02.1978 р. і пішла з Інституту не дочекавшись визнання свого відкриття.

А у 1986 р. Нобелівський комітет присудив премію у галузі фізіології і медицини – італійському професору Риті Леві-Монтальчині та професору Стенлі Коену за ідентифікацію фактору росту нервової тканини. Результати їх досліджень експерти комітету одноставно визначили «Як ознаку визнання відкриття, що має фундаментальне значення для розуміння механізмів регуляції росту клітин та органів». Встановлення цими авторами наявності факторів росту нервової тканини було названо «дивовижним прикладом того, як досвідчені дослідники можуть створити концепцію із уявного хаосу». Єдина зарубіжна публікація Ії Володимирівни Торської [21], на жаль, пройшла поза увагою експертів комітету. А професор Леві-Монтальчині окрім Нобелівської премії отримала чималу кількість почесних звань Колумбійського

Університету, Американської академії наук і мистецтв, Бельгійської королівської академії медицини, Європейської академії наук та багатьох інших гонорових відзнак.

Ці нагороди стали заслуженою компенсацією італійському фахівцю за тяжкий життєвий шлях та поневір'яння молодих років. Народилася вона 22 квітня 1909 р. в Італії, в патріархальній іудейській сім'ї, що не визнавала за жінками права на вищу освіту та громадську діяльність. Всупереч сімейним традиціям і настановам батька вона вступила до медичної школи Туринського університету. У 1936 р. отримала перший медичний ступінь, а у 1940 р. – остаточну спеціалізацію з неврології та психіатрії. Деякий час працювала асистентом у відомого гістолога і ембріолога неврологічної клініки Туринського університету проф. Джузеппе Леві. Власне саме в цій лабораторії в неї виникла цілеспрямованість до нейроембріологічних досліджень.

З початком другої імперіалістичної війни в Італії поширилися антисемітські закони, які забороняли іудеям працювати в університетах. Рита залишилася без роботи, а після того як німці окупували північну Італію, переїхала до Флоренції, де продовжувала наукові дослідження у своїй власній невеличкій квартирі. В 1944 р., коли армія союзників почала звільнення Італії, вона працювала медичною сестрою у таборі для італійських біженців. Лише у 1945 р. повернулася до лабораторної роботи на посаді асистента Інституту анатомії Туринського університету. Як бачимо, повоєнні роки і в першій, і в другій дослідниці проходили в тяжких умовах, які не сприяли їх творчому розвитку.

Маючи вільний доступ до наукових публікацій з усіх країн світу Рита Монтальчині зацікавилася дослідженнями лабораторії ембріології Вашингтонського університету у Сент-Луїсі. В неї виникла ідея, що запрограмована загибель нервових клітин головного мозку має регульовальний вплив для нормального розвитку нервової системи. Переїхавши в Сент-Луїс для співпраці з Віктором Хамбур-

гером у зоологічному відділенні Вашингтонського університету вона отримала можливість перевірки своєї ідеї. Дослідження показали, що ембріональні нервові клітини здатні швидко проростати в тканини пухлини [22]. Ці спостереження підтверджували, що темпи росту нейронів змінюються під впливом невідомого стимулятора, який локалізувався у пухлинній тканині [23]. В експериментах на клітинних культурах вона впевнилася в тому, що екстракти пухлин не менш ефективно стимулюють темпи росту нервових клітин, ніж самі пухлини. Існування речовини, що прискорює проліферацію нервових клітин, вона вважала доведеним і дала йому назву «фактор росту нервової тканини» (ФРНТ). Виникла необхідність біохімічної ідентифікації цієї речовини.

У лабораторії біохімії Вашингтонського університету сумісно з біохіміком і зоологом Стенлі Коеном розпочалося нове спільне дослідження. Було встановлено, що ФРНТ – це білкова речовина, також, що зміїна отрута та слинні залози дорослих самців мишей є більш ефективними джерелами ФРНТ, ніж пухлини [24-27]. У 1969 р. Рита організувала лабораторію клітинної біології у Італійській Національній дослідницькій Раді у Римі. Подальші дослідження показали, що ФРНТ не є гормоном, який викликає тимчасову метаболічну реакцію. Він виявився раніше невідомим видом молекулярної речовини, необхідної для розвитку та виживання високодиференційованих клітин [28-31]. У наступні роки було винайдено і інші фактори росту, у тому числі епідермальний фактор росту, фактори-стимулятори колоній, фактор росту тромбоцитарного походження, фактор росту фібробластів та інтерлікіни (1 та 2) [32-39]. Було виявлено також фактори росту різних видів нервових клітин та розроблені технології їх терапевтичного використання. Зараз ФРНТ використовують для прискорення відновлення травмованих нервових провідників, а епідермальний фактор росту – для поліпшення ефективності пересадок шкіри [32-34,39-41].

Порівняння життєвих шляхів двох різних жінок розділених «залізною» завісою надає яскравий доказ того, що будь-які штучні соціальні перепони у розвитку наукової спільноти світу знецінюють досягнення особистості у розвитку науки і можливий прогрес соціальних та економічних досягнень людства, притаманний вільному спілкуванню всіх членів наукової інтелектуальної еліти.

В.А.Березовский

ДВЕ СУДЬБЫ ВЫДАЮЩИХСЯ ЖЕНЩИН-ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ. (К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ПРОФЕССОРА И.В.ТОРСКОЙ И 106-ЛЕТИЮ ПРОФЕССОРА Р.ЛЕВИ-МОНТАЛЬЧИНИ)

Описан жизненный путь и научные разработки И.В.Торской за период обучения в Москве (1934-1940 гг.) и во время Второй мировой войны (1941-1945 гг.). Особое внимание уделено киевскому периоду научной деятельности И.В.Торской, в частности, ее исследованиям состояния клеток центральной нервной системы в период реанимации после клинической смерти и последующей жизни. Она впервые показала возможность amitotического деления нейронов ЦНС (1956 г.) и выдвинула гипотезу о наличии нейросекреторных факторов, стимулирующих пролиферацию клеток ЦНС. Результаты ее исследований в Украине были поставлены под сомнение. Много позже (1986 г.) за аналогичные исследования Р.Леви-Монтальчини и С.Козен получили Нобелевскую премию. Результаты их исследований широко используются в современной цитологии и клинической медицине.

Ключевые слова: amitotическое деление нейронов ЦНС; пролиферация клеток; фактор роста нервной ткани.

V. Berezovskyi

TWO FATES OF OUTSTANDING WOMEN RESEARCHERS. (THE 100TH ANNIVERSARY OF PROF. I.V.TORSKAYA AND 106 ANNIVERSARY OF PROF. R.LEVI-MONTALCINI)

It is described a way of life and scientific development of I.V.Torskaya during the period of study in Moscow (1934-1940 years) and during the Second World War (1941-1945 years). Particular attention is paid to the Kiev period of the I.V.Torskaya scientific activities, in particular, the study of cells of the central nervous system (CNS) during resuscitation after clinical death and later life. She first showed the possibility of amitotyc division of CNS neurons (1956) and hypothesized the existence of neurosecretory factors that stimulate cell pro-

liferation. The results of her research have been questioned. Much later (1986) for similar studies R.Levi-Montalcini and S.Koen received the Nobel Prize.

Key words: amitotyc division CNS neurons; cell proliferation; growth factor of nerve tissue.

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

REFERENCES

1. Torskaya IV. The innervation of perinephric fat. Questions Phys. 1954: 7. [Russian].
2. Torskaya IV. On the state of the nerve cells of the central nervous system of dogs, revival after clinical death from exsanguination. Proceedings of the jubilee session of the Inst. surgical equipment and instruments. Moscow, 1956. [Russian].
3. Torskaya IV. On the regeneration possibility of in the neurons of the spinal sites of mammals and human postnatal. Conf. Abstr. "Determination probl. and tissues. plasticity. Leningrad, 1959. [Russian].
4. Torskaya IV. Status of the nerve cells of animals busy and long live after clinical death from exsanguination. Proc. Plenum of the All-Union. an on-anatomist, gistol. Irkutsk, 1961. [Russian].
5. Bilić GL, Katinas GS, Nazarova LV. Cytology. St. Petersburg, 1999. [Russian].
6. Frolkis VV. Aging of the brain. Nauka Publ. Hous. Leningr., 1991: 280. [Russian].
7. Bykov KM, Vladimirov GE, Delov VE, Conradi GP, Slonim AD. Physiology textbook. State Med Publ 1954: 892. [Russian].
8. Chentsov Yu.S. Introduction in the cell biology. Moscow, 2004. [Russian].
9. Zhegunov GP. Cytological basis of life. Charkov, 2000. [Ukrainian].
10. Torskaya IV. The CNS nerve cells status in animals, revival and long living after the death of the hemorrhage. In Proc. "The brain and its functions", Kiev, 1962. [Ukrainian].
11. Torskaya IV. The structural changes evolution that occur in the brain reanimated animals. Phys J Ukr Akad Sci 1962: VIII; 8. [Ukrainian].
12. Torskaya IV. The nerve cells of the central nervous system of adult dogs amitotyc dividing phenomena. Phys J Ukr Akad Sci 1963: IX: [Ukrainian].
13. Torskaya IV. The phenomenon of amitotyc fission nerve cells of the central nervous system of adult dogs. Conf. Abstracts of Anat, gistol embriol Agrical. Inst. Moscow, 1963. [Russian].
14. Torskaya IV. Amitotical division brain nerve cells dogs. Proceed Sci pedag inst Lugansk, 1964. [Ukrainian].
15. Torskaya IV. The two functions of the nerve fiber - conduction of excitation and elimination of active substances. Proceed. Symp about probl Neyrosection: Liningrad, 1964. [Russian].
16. Torskaya IV. Patterns of evolution of changes in the nerve

- cells in the central nervous system of animals the revival after extreme impacts. Proc. "High. nervous activity in normal and pathol." Kiev, 1965. [Ukrainian].
17. Torskaya IV. Morphological manifestations of the dogs brain nerve cells reactivity through 8,9 years after the extreme impacts. Proc Conf "Morph exp reagent nerve system standart and pathol conditions". Baku, 1967. [Russian].
 18. Torskaya IV. The destructive and regenerative processes in the hippocampus. Reactive and regenerative processes in the nervous system. Proc. II Meeting. Tbilisi, 1968; 58-61. [Russian].
 19. Torskaya IV. Some results of the revival animals brain neutosecretion. In: Proc. "The rehabilitation period after reanimation". Moscow, 1970; 251-4. [Russian].
 20. Torskaya IV. Properties of neurons of the freshwater gastropod mollusk. J. Neuro Tran 1969; (7): 743-3.
 21. Torskaya IV. The regular polyploidy mammalian hippocampal neurons. International Congress of Anatomists 1970.
 22. Levi-Montalcini R., Hamburger V. (1953). A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. J Exp Zool 123, 233-88.
 23. Cohen S., Levi-Montalcini R., Hamburger V. (1954). A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. Proc Natl Acad Sci USA. 40, 1014-18.
 24. Garaci E, Caroleo MC, Aloe L, Aquaro S, Piacentini M, Costa N, Amendola A, Micera A, Calìò R, Perno CF, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor is an autocrine factor essential for the survival of macrophages infected with HIV. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 23;96(24):14013-8.
 25. Levi-Montalcini R. Progr. Brain Res. 1964; 4: 1-29.
 26. Levi-Montalcini R., in The Neurosciences: Path of Discovery. MIT Press, 1975.
 27. Levi-Montalcini R., Aloe L., Adv.Bijchem. Psychopharmacol, 25, 3-16, 1980.
 28. Colangelo AM, Finotti N, Ceriani M, Alberghina L, Martegani E, Aloe L, Lenzi L, Levi-Montalcini R. Recombinant human nerve growth factor with a marked activity in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 20;102(51):18658-63.
 29. Lambiase A, Aloe L, Centofanti M, Parisi V, Bào SN, Mantelli F, Colafrancesco V, Manni GL, Bucci MG, Bonini S, Levi-Montalcini R. Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 11;106(32):13469-74.
 30. Levi-Montalcini R, Aloe L. Differentiating effects of murine nerve growth factor in the peripheral and central nervous systems of *Xenopus laevis* tadpoles. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Oct;82(20):7111-5.
 31. Calza L, Giardino L, Giuliani A, Aloe L, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 27;98(7):4160-5.
 32. Levi-Montalcini R. The Nerve growth factor: thirty-five years later. Nobel Lecture; 1986.
 33. Levi-Montalcini R. «Polypeptide growth factors» with special emphasis on wound healing. Introduction. Cell Biol Int. 1995 May;19(5):355.
 34. Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. Trends Neurosci. 1996 Nov;19(11):514-20.
 35. Levi-Montalcini R. From a home-made laboratory to the Nobel Prize: an interview with Rita Levi Montalcini. Int J Dev Biol. 2000;44(6):563-6.
 36. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor and the neuroscience chess board. Arch Ital Biol. 2003 Mar 141(2-3):85-8.
 37. Luppi P, Levi-Montalcini R, Bracci-Laudiero L, Bertolini A, Arletti R, Tavernari D, Vigneti E, Aloe L. NGF is released into plasma during human pregnancy: an oxytocin-mediated response? Neuroreport. 1993 Aug;4(8):1063-5.
 38. Manca A, Capsoni S, Di Luzio A, Vignone D, Malerba F, Paoletti F, Brandi R, Arisi I, Cattaneo A, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor regulates axial rotation during early stages of chick embryo development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 7;109(6):2009-14.
 39. Spillantini MG, Aloe L, Alleva E, De Simone R, Goedert M, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor mRNA and protein increase in hypothalamus in a mouse model of aggression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Nov;86(21):8555-9.
 40. Aloe L, Cozzari C, Levi-Montalcini R. Cycloctidine-induced release of nerve growth factor from mouse submandibular glands enhances regeneration of sympathetic fibers in adult mice. Brain Res. 1985 Apr 22;332(2):259-65.
 41. Aloe L, Skaper SD, Leon A, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor and autoimmune diseases. Autoim 1994;19(2):141-50.

*Матеріал надійшов
до редакції 03.02.2016*

CONTENTS

O. Pavlyk, O. Iemets, D. Stroy, O. Volosovets, S. Kryvopustov, V. Dosenko. Single-nucleotide polymorphism (rs11204981) in filaggrin gene and its functional significance for asthma among children with eczema	3
O.V. Kalinichenko, T. M. Myshunina, M. D. Tron'ko. Nitric oxide synthase activity and its concentration in the tissues of human thyroid carcinomas	9
V.V. Kalnish, G. Yu. Pyshnov, E.V. Moiseyenko, V.V. Opanasenko, L.M. Alekseyeva, L.G. Vysotska. Heart rate regulation during adaptation to conditions in antarctica	20
T.V. Vovkun, P.I. Yanchuk, L.Y. Shtanova, S.P. Veselsky, E.N. Reshetnik, A.S. Shalamay, V.A. Baranovsky. Exocrine function of the liver in rats with exposure to Corvitin	30
M.N. Khodosovsky. Influence of hypoxic preconditioning on the mechanisms of blood oxygen transport and oxidative damages during hepatic ischemia-reperfusion in rabbits	39
I.G. Litovka, V.Ya. Berezovsky, S.P.Veselsky, U.O.Zhernoklov. Bone tissue remodeling after the introduction of exogenous melatonin in different seasons	48
S.B.Pavlov, M.V.Kumechko, O.B.Litvinova, N.M.Babenko, A.V.Goncharova. Bone regulatory mechanisms destruction in experimental chronic kidney disease	54
N.A. Levicheva, A.M. Titkova. Features of limbic-neocortical and monoaminergic correlations in the development of withdrawal syndrome of inhalations of vapors of organic solvent «646» in rats	60
S.Yu. Zay, D.A. Zavodovsky, K.I. Bogutska, D.N. Nozdrenko, Yu.I. Prylutsky. Prospects of C ₆₀ fullerene application as a mean of prevention and correction of ischemic-reperfusion injury in the skeletal muscle tissue	66
T.V. Serebrovska, Z.O. Serebrovska, E. Egorov. Fitness and therapeutic potential of intermittent hypoxia training: a matter of dose	78
V. Berezovsky. Two Fates of outstanding women researchers. (The 100th anniversary of prof. I.V.Torskaya and 106 anniversary of prof. R.Levi-Montalcini)	92