

# Фізіологічний журнал

ТОМ 61 № 3 2015

---

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

---

Виходить 1 раз на 2 місяці

---

## Зміст

<i>Дорофєєва Н.О., Коцюруба А.В., Сагач В.Ф.</i> Неспряження конститутивних NO-синтаз викликає окисний стрес та порушення кардіогемодинаміки при гіпертензії (частина I) . . . . .	3
<i>Дорофєєва Н.О., Коцюруба А.В., Могильницька Л.А., Корнелюк О.І., Сагач В.Ф.</i> Ендотеліальний моноцитактивуючий фактор II відмінняє окисний стрес та неспряжений стан конститутивних NO-синтаз і викликане ними порушення кардіогемодинаміки при гіпертензії (частина II) . . . . .	11
<i>Яворський В.А., Лук'янець О.О.</i> Використання послідовних ремп-реєстрацій для експрес-діагностики генераторної здатності імпульсної активності ізольованих нейронів гіпокампа . . . . .	19
<i>Янчук П.І., Слободяник Л.О.</i> Роль сірководню у регуляції кровообігу в печінці . . . . .	28
<i>Березовський В.Я., Лісуха Л.М., Степанова Є.І., Колтаков І.С.</i> Вплив нормобаричної гіпоксії на показники зовнішнього дихання дітей, які мешкають на радіоактивно забруднених територіях . . . . .	35
<i>Єфіменко О.Ю., Савченко Ю.О., Фалалєєва Т.М., Берегова Т.В., Жолобак Н.М., Щербаков О.Б., Малюкин Ю.В., Співак М.Я.</i> Вплив нанодисперсного діоксиду церію на онтогенетичні зміни антиоксидантної системи в слизовій оболонці шлунка та кишечника щурів . . . . .	44
<i>Шевченко Ю.С., Весніна Л.Е., Кайдашев І.П.</i> Особливості харчової поведінки у осіб з нормальною та підвищеною масою тіла . . . . .	51
<i>Ковальова В.А., Шелест Д.В., Остапченко Л.І.</i> Вміст ліпідів і продуктів їх пероксидації в тимоцитах щурів за умов експериментального ульцерогенезу . . . . .	59
<i>Березовський В.Я., Літовка І.Г., Весельський С.П., Янко Р.В., Жернокльов У.О.</i> Вплив екзогенного мелатоніну на показники ремоделювання кісткової тканини . . . . .	64

<i>Виноградова О.О., Янчук П.І., Пасічніченко О.М.</i> Роль тромбоксану та лейкотрієнів у реалізації скоротливих реакцій ворітної вени, викликаних дією ацетилхоліну та норадреналіну .....	70
<i>Шпакова Н.М., Орлова Н.В., Ніпот О.Є., Александрова Д.І.</i> Порівняльне вивчення дії механічного стресу на еритроцити людини і тварин .....	75
<i>Мельничук О.А., Мотузюк О.П., Швайко С.Є.</i> Зміна параметрів тетанічного скорочення m. Soleus в алкоголізованих щурів за умов унілатеральної васкулярної ішемії м'язів задніх кінцівок .....	81
<i>Редька І.В., Майоров О.Ю.</i> Нелінійні електроенцефалографічні кореляти слухово-моторної інтеграції у хлопчиків з набутими зоровими дисфункціями .....	90
<b>ОГЛЯДИ</b>	
<i>Serebrovska T.V. and Shatilo V.B.</i> Remote ischemic preconditioning versus intermittent hypoxia training: a comparative analysis for cardioprotection .....	99
<b>ХРОНІКА</b>	
Пам'яті О.О.Мойбенка .....	118
<b>Додаткові тези до 19-го з'їзду українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка (24-26 травня 2015 р.)</b> .....	120

# Неспряження конститутивних NO-синтаз викликає окисний стрес та порушення кардіогемодинаміки при гіпертензії (частина I)

А.В. Коцюруба, Н.О. Дорофєєва, В.Ф. Сагач

Інститут фізіолології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; E-mail: toliko49@ukr.net

*Порівняли показники кардіогемодинаміки й окисдативного та нітрозативного стресу в серці й аорті у щурів лінії Вістар і у щурів зі спонтанною гіпертензією. На основі експериментально визначених показників розрахували індекс спряження конститутивних NO-синтаз (сNOS) і біохімічний індекс функції в цих органах серцево-судинної системи. Як у серці, так і, особливо, в аорті щурів зі спонтанною гіпертензією розвивається окисдативний і нітрозативний окисний стрес при яких значно знижуються обидва індекси і погіршуються показники кардіогемодинаміки. Встановили, що у щурів зі спонтанною гіпертензією порівняно з контролем серце працює менш ефективно із більшим споживанням кисню. При цьому виявлено збільшення жорсткості артеріальних судин, вірогідне зниження показників насосної функції, зменшення ефективності механізму Франка–Старлінга і порушення процесу релаксації серця. Зроблено припущення про існування в органах серцево-судинної системи щурів зі спонтанною гіпертензією замкнутого кола взаємодіяння окисного стресу і роз'єднання сNOS унаслідок надлишкової генерації супероксиду, яке може бути причиною погіршення показників кардіогемодинаміки.*

*Ключові слова: серце; аорта; неспряження сNOS; гіпертензія; окисний стрес.*

## ВСТУП

Незважаючи на багаторічні інтенсивні дослідження, артеріальна гіпертензія та її ускладнення залишаються серед головних причин смертності в усьому світі. Останніми роками з'явилося достатньо фактів, що свідчать про центральну роль у розвитку артеріальної гіпертензії як окисдативного, так і нітрозативного стресу [1-4]. Останній викликається значним одночасним підвищенням продукції нетоксичних супероксидного радикала ( $\text{O}_2^-$ ) і оксиду азоту (NO), кожний з яких зумовлює утворення токсичних гідроксильного аніон-радикала ( $\text{OH}^\bullet$ ) і пероксинітриду ( $\text{ONOO}^-$ ), та суттєвим зменшенням утворення NO ендотеліальною NO-синтазою (eNOS) [5,6]. Саме синтезований цим ізоферментом NO є основним регулятором тонуусу та інших процесів у су-

динній стінці. Крім регуляторного, в серці й аорті може утворюватися надлишковий NO, який викликає нітрозативний стрес. Він може утворюватися за допомогою de novo синтезу індукцйбельною NO-синтазою (iNOS), внаслідок реутилізації стабільних метаболітів NO нітрат- і нітрит-аніонів відповідними редуцтазами чи декомпозиції нітрозотіолів, що є депо NO, в судинній стінці [7-10]. Серед механізмів виникнення окисдативного стресу крім зниження активності ферментів антиоксидантної системи та сполук, що нейтралізують вільні радикали, перевага останнім часом надається збільшенню генерації  $\text{O}_2^-$  неспряженою eNOS [11-15], а не лише, як раніше вважалося, його надходженням з таких джерел, як мітохондрії [16], НАДФН-оксидаза [17-19], ксантинооксидаза [20] чи ліпо- та циклооксигенази [21].

Мета нашої роботи - намагання оцінити різні джерела утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  і NO та їх роль у розвитку оксидативного і нітрозативного стресу, а також впливу останніх на порушення кардіогемодинаміки у тварин зі спонтанною гіпертензією.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах-самцях віком 6 міс лінії Вістар та зі спонтанною гіпертензією. Всі експериментальні процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986р. (86/609/ЕЕС). Щурів наркотизували за допомогою уретану (1,25 г/кг, внутрішньоочеревинно). Функціональні показники кардіогемодинаміки у щурів *in vivo* реєстрували за допомогою ультрамініатюрного катетера 2F і Pressure-Volume System («Millar Instruments», США). Катетер вводили через сонну артерію ретроградно у лівий шлуночок (ЛШ), що давало змогу одночасно реєструвати сигнали тиску й об'єму з візуалізацією кривих залежності цих показників протягом серцевого циклу [24]. Співвідношення тиску й об'єму ЛШ визначали за допомогою програми PVAN 3,6 («Millar Instruments», США). Кінцево-діастолічну жорсткість (для оцінки здатності міокарда до розтягнення) вивчали під час оклюзії черевної порожнистої вени в умовах зниженого притоку крові до серця. Артеріальну жорсткість, розраховували як відношення кінцево-систоличного тиску до ударного об'єму. У цільних свіжоприготовлених гомогенатах серця й аорти щурів визначали біохімічні показники, які тестують наявність комбінованого окисного стресу та надлишкового синтезу  $\cdot\text{O}_2^-$ , NO і пероксинітриту і характеризують причини його виникнення. Показники оксидативного стресу (швидкість генерації супероксидного ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) і гідроксильного ( $\cdot\text{OH}$ ) радикалів, пули стабільного пероксиду водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ейкозаноїдів тромбоксану  $\text{V}_2$  ( $\text{TxB}_2$ ) та пептидолейкотрієну  $\text{C}_4$  ( $\text{LTC}_4$ ),

сечової кислоти й маркера перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) дієнових кон'югатів (ДК) визначали як описано раніше [23]. Визначали показники нітрозативного стресу: кальційзалежну активність cNOS, як суму ендотеліальної (eNOS) і нейрональної (nNOS) NOS, кальційнезалежну активність iNOS, НАДН-залежну активність нітратредуктази, пули стабільних метаболітів NO - нітрит ( $\text{NO}_2^-$ )- і нітрат ( $\text{NO}_3^-$ ) -аніонів, низькомолекулярних (НМНТ) і високомолекулярних (ВМНТ) нітрозотіолів, вміст регулятора активності cNOS сірководню ( $\text{H}_2\text{S}$ ) [24]. Індекс спряження (coupling) cNOS розраховували як відношення активності cNOS до швидкості генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  за наявності її інгібітора L-NAME. Цей індекс характеризує наявність субстратів (L-аргінін,  $\text{O}_2$ ) і кофактора тетрагідробіоптерину ( $\text{BH}_4$ ) для утворення NO, а не  $\cdot\text{O}_2^-$  при окисному метаболізмі L-аргініну. Вважається [25], що будь-яке підвищення генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  (мітохондріями, ксантинооксидазою чи НАДФН-оксидазою) спричиняє неспряження (uncoupling) eNOS. Більше того, неспряжена eNOS не лише сама стає потужним генератором  $\cdot\text{O}_2^-$ , але одночасно активує інші згадані джерела його утворення, тим самим утворюючи свого роду замкнуте коло взаємопідсилення окисного стресу і неспряження eNOS. Розраховували також умовний біохімічний індекс функції (БІФ) в серці і аорті за формулою:  $\text{БІФ} = \frac{\text{вміст нітриту}}{\text{вміст нітрату} + \text{вміст нітриту}} \times \text{індекс спряження cNOS}$ . Перший компонент формули відображає частку нітриту в сумі нітрит- і нітрат-аніонів і, таким чином, відображає рівень оксигенації в органах серцево-судинної системи. Відомо, що  $\text{NO}_2^-$  спонтанно утворюється при окисненні NO лише в оксигенованих розчинах, в той час як  $\text{NO}_3^-$  лише в умовах інтегрального окисного стресу при нерадикальному розпаді пероксинітриту. Другий компонент формули відображає рівень неспряження cNOS, який зростає в умовах стресу. Отже, БІФ відображає ступінь оксидативного

і нітрозативного стресу та синтезовані cNOS пули NO, важливі для нормального функціонування серця й аорти. Вміст загального білка визначали методом Лоурі. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), Student (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Зміни фізіологічних показників за гіпертензії.* У щурів зі спонтанною гіпертензією кінцево-систолічний і кінцево-діастолічний тиск був вищим, ніж у контрольній групі, тоді як показники насосної функції серця - ударний і хвилинний об'єм, навпаки, нижчими (рис.1,а). Водночас ударна робота серця вірогідно не відрізнялася від контролю, тобто, їх серце перекачувало менший об'єм крові. Це може вказувати на менш

ефективну роботу серця. Споживання кисню міокардом у цих тварин було на 58,7 % більшим порівняно з контролем (див. рис. 1,б). Можливо, менш ефективна робота серця щурів зі спонтанною гіпертензією пов'язана зі значним збільшенням постнавантаження міокарда внаслідок збільшення артеріальної жорсткості. Цей показник був збільшеним майже в 2 рази, що може свідчити про підвищення периферичного опору судин і призводити до погіршення скоротливої активності міокарда.

Показано, що максимальна швидкість наростання тиску ЛШ була більшою в серці щурів зі спонтанною гіпертензією, ніж у тварин контрольної групи (10414± 206,74 та 9742 ± 245,35 мм рт.ст./с відповідно, P<0,05). Крім того, у них виявлено збільшення в 2,6 рази жорсткості камери ЛШ, яка визначає наповнення шлуночка в період пізньої діастолі. Збільшення кінцево-діас-

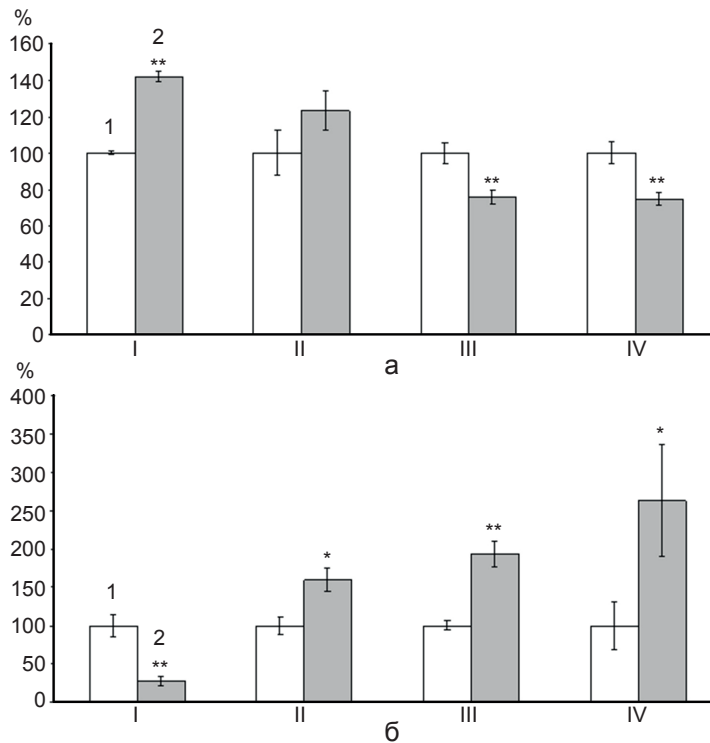


Рис. 1. Відносні зміни показників кардіогемодинаміки (а) та функціонального стану (б) серця й аорти у щурів лінії Вістар (1) та зі спонтанною гіпертензією (2): а: I - кінцево-систолічний тиск, II - кінцево-діастолічний тиск, III - ударний об'єм, IV - хвилинний об'єм крові; б: I - ефективність механізму Франка-Старлінга, II - споживання кисню серцем, III - артеріальна жорсткість, IV - кінцево-діастолічна жорсткість міокарда. \*P<0,05, \*\*P<0,01 відносно контролю

толічної жорсткості міокарда свідчить про порушення процесів релаксації серця щурів. Більш інтенсивна і менш ефективна робота серця може негативно позначатися на адаптації до навантаження. Для підтвердження цього припущення та оцінки функціональних резервів серця ми проводили тест навантаження об'ємом. Виявлено, що ефективність механізму Франка-Старлінга у цих щурів була в 4 рази нижчою ( $P < 0,01$ ), ніж у контрольній групі (див. рис. 1,б) тобто реалізація цього механізму пригнічена. Відомо, що енергетично механізм Франка-Старлінга економніший, ніж гомеометрична регуляція скоротливої функції серця, і тому його пригнічення свідчить про енерговитратну роботу серця з більшим споживанням кисню у щурів зі спонтанною гіпертензією.

Таким чином, у щурів зі спонтанною гіпертензією серце працює менш ефективно з більшим споживанням кисню. Виявлено також зниження показників насосної функції, збільшення скоротливої активності і порушення процесу релаксації серця, а також збільшення артеріальної жорсткості порівняно з контрольною групою тварин. При навантаженні об'ємом у щурів зі спонтанною гіпертензією відмічалось зменшення ефективності реалізації механізму Франка-Старлінга.

*Зміни біохімічних показників за гіпертензії.* Для встановлення можливих біохімічних механізмів, що призводять до виявлених нами змін показників функціонального стану серця і судин у щурів зі спонтанною гіпертензією, ми визначили ступінь окисдативного і нітрозативного стресу, який може зумовлювати неспряження cNOS. Майже всі показники окисдативного стресу як у серці (рис.2,а), так і в аорті (рис. 2,б) щурів зі спонтанною гіпертензією були вищими від контрольних значень, що неспростовно засвідчує його розвиток. Вірогідно не відрізнялися від контролю лише пули  $\text{TxB}_2$ , які характеризують активність циклооксигеназного генератора  $\cdot\text{O}_2^-$

в серці (див. рис. 2,а) та пули сечової кислоти, які характеризують активність ксантинооксидази (див. рис. 2,б) в аорті. Нітрозативний стрес (надлишковий синтез NO) у щурів зі спонтанною гіпертензією також розвивається в обох досліджених органах серцево-судинної системи (рис. 3). Так, у серці зростає активність iNOS (кальційнезалежний de novo синтез NO) та нітратредуктази (реутилізаційний синтез NO) і пули  $\text{NO}_3^-$ , але, навпаки, знижується активність cNOS (кальційзалежний de novo синтез NO) і пули  $\text{NO}_2^-$  та НМНТ (див. рис.

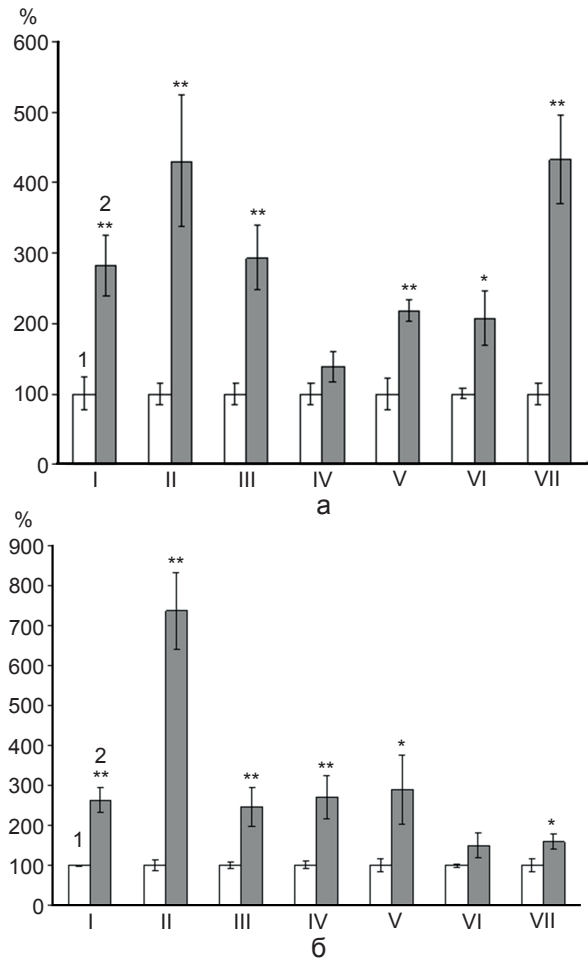


Рис. 2. Відносні показники окисдативного стресу в серці (а) і в аорті (б) щурів лінії Вістар (1) та зі спонтанною гіпертензією (2): I - швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ , II - швидкість генерації  $\cdot\text{OH}$ , III - вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$ , IV - вміст тромбоксану  $\text{B}_2$ , V. - вміст пептидолейкотрієну  $\text{C}_4$ , VI - вміст сечової кислоти, VII - вміст дієнових кон'югатів. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  відносно контролю



3,а). Пули НМНТ включають три компоненти: нітрозильовану амінокислоту L-цистеїн, що є попередником *de novo* синтезу H<sub>2</sub>S, нітрозоглутатіон (GSNO), що містить у своєму складі L- цистеїн і так званий «мінімальний» нітрозотіол – нітрозильований сірководень (HSNO). Натомість більші пули ВМНТ складають нітрозильовані білки, що мають у своєму складі L-цистеїн. Нітрозилювання здійснюється переважно пероксинітридом, який утворюється при взаємодії  $\cdot\text{O}_2^-$  і NO. НМНТ мають функцію транспортування і депонування NO, причому останній може бути звільнений через процес декомпозиції. Отже, пули НМНТ характеризують інтенсивність процесів нітрозилювання (включення NO) і декомпозиції ( звільнення NO). На відміну від цього, пули ВМНТ відображають інтенсивність нітрозилювання

білків пероксинітридом і тому вважаються маркерами нітрозативного стресу. В аорті (див. рис. 3,б) щурів зі спонтанною гіпертензією значно підвищуються активність іNOS і нітратредуктази та пули ВМНТ. При цьому активність сNOS, пули NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та НМНТ, навпаки, знижуються, пули NO<sub>3</sub><sup>-</sup> і H<sub>2</sub>S не змінювалися. Внаслідок таких змін у серці і аорті цих щурів суттєво (P<0,01) знижуються значення обох розрахованих індексів (рис. 4). Отже, спільним для обох досліджених органів серцево-судинної системи у щурів зі спонтанною гіпертензією є наявність інтегрального окисного стресу який спричиняє неспряжений стан сNOS. При цьому ізоферменти конститутивного *de novo* синтезу NO (eNOS та/чи pNOS) замість NO продукують  $\cdot\text{O}_2^-$ , тим самим утворюючи замкнуте коло взаємопідсилення

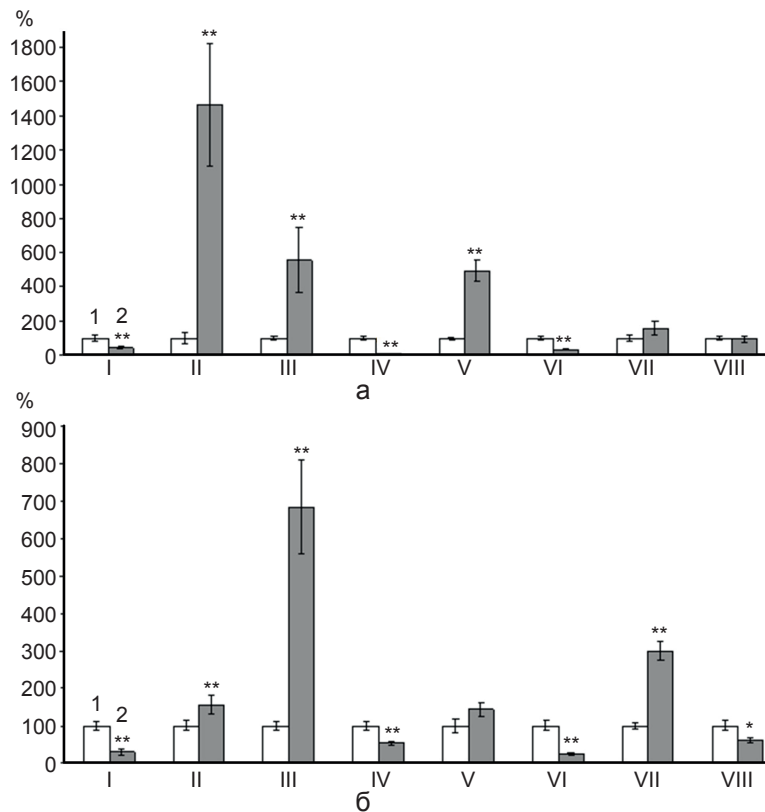


Рис. 3. Відносні показники нітрозативного стресу в серці (а) і в аорті (б) щурів лінії Вістар (1) та зі спонтанною гіпертензією (2): 1 - активність конститутивних NO-синтаз, 2 - активність індукційної NO-синтази, 3 - нітратредуктазна активність, 4 - вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 5 - вміст NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 6 - вміст низькомолекулярних нітрозотіолів, 7 - вміст високомолекулярних нітрозотіолів, 8 - вміст H<sub>2</sub>S, \*P<0,05, \*\*P<0,01 відносно контролю

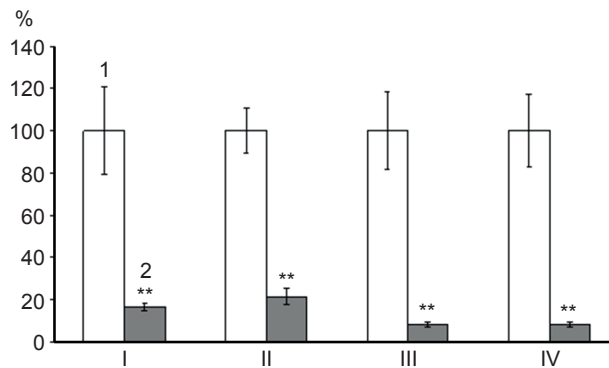


Рис. 4. Відносні значення індексів спряження конститутивних NO-синтаз (IC) і біохімічний індекс функції (БІФ) у серці і в аорті щурів лінії Вістар (1) та зі спонтанною гіпертензією (2): I - IC в серці, II - IC в аорті, III - БІФ в серці, IV - БІФ в аорті, \*\*\* $P < 0,01$  відносно контролю

рівня окисного стресу і неспряженості cNOS. За цього стану помірний окисний стрес започатковує незначний неспряжений стан cNOS, внаслідок чого окисний стрес посилюється і спричиняє більший рівень неспряженості, і т.д. Розірвати це коло адаптивним системам серцево-судинної системи у щурів зі спонтанною гіпертензією самостійно не вдається, що і призводить до спостережених нами функційних порушень на кшталт збільшення споживання кисню і скоротливої активності серця та підвищення артеріальної жорсткості одночасно зі зниженням показників насосної функції, порушенням процесу релаксації та зменшенням ефективності реалізації механізму Франка–Старлінга в серці. Варто зазначити, що погіршення фізіологічних показників кардіогемодинаміки, які вказують на кардіальну і ендотеліальну дисфункцію у щурів зі спонтанною гіпертензією, корелюють із зниженням значень біохімічних індексів спряження cNOS та БІФ у цих органах.

Очевидно, для нормалізації функційних показників у серцево-судинній системі за гіпертензії потрібний якийсь зовнішній чинник, здатний відмінити неспряжений стан cNOS і, тим самим, розірвати вказане замкнене коло його взаємопідсилення. Які саме властивості повинен мати цей чинник? Як було показано нами (див. рис. 2,а), у серці щурів зі спонтанною гіпертензією максимально

зростали два показники окисативного стресу - швидкість генерації  $\cdot\text{OH}$  (у реакції Фентона або при розпаді пероксинітриту) і вміст ДК (маркер вільнорадикального ПОЛ). При цьому максимальними були підвищення таких показників нітрозативного стресу (див. рис. 3,а), як активність iNOS (активується прозапальними цитокінами, а  $\cdot\text{O}_2^-$  дуже підсилює цю індукцію), активність нітратредуктази (в основному нітрат- і нітритредуктазної активності ксантиноксидази, яка активується за гіпоксії) і  $\text{NO}_3^-$ , що утворюється при розпаді пероксинітриту, будучи маркером утворення останнього. Водночас за гіпертензії в серці пули  $\text{NO}_2^-$  (утворюється за нормальної оксигенації органа), НМНТ і, головне, активність cNOS (лише ферменти конститутивного синтезу NO продукують його регуляторні, а не токсичні пули) знижувались. Останнє, на нашу думку, зумовлено зростанням її неспряженого стану (див. рис.4). Таким чином, для ліквідації кардіальної, як і, особливо, ендотеліальної дисфункції, що виникає за гіпертензії, необхідним є відновлення спряженого стану cNOS одночасним максимальним послабленням окисного стресу і підвищенням активності cNOS, що дасть змогу розірвати замкнене коло взаємопідсилення окисного стресу і неспряженого стану cNOS у серці й аорті щурів зі спонтанною гіпертензією.



## ВИСНОВКИ

1. Як у серці, так і, особливо, в аорті щурів зі спонтанною гіпертензією розвивається оксидативний і нітрозативний стрес, наслідком якого є неспряжений стан cNOS, за якого замість синтезу NO кальційзалежні NOS генерують  $\cdot\text{O}_2^-$ , і утворення замкнутого кола взаємопідсилення рівнів оксидативного стресу і неспряженості cNOS за рахунок його додаткової генерації.

2. Внаслідок неспряження cNOS, у щурів зі спонтанною гіпертензією серце працює менш ефективно, із більшим споживанням кисню, порівняно з контролем, коли вони знаходяться у спряженому стані і поповнюють регуляторні пули NO.

3. За неспряженого стану cNOS у щурів зі спонтанною гіпертензією збільшується жорсткість артеріальних судин, знижуються показники насосної функції, зменшується ефективність механізму Франка–Старлінга і порушується процес релаксації серця.

**А.В.Коцюруба, Н.А.Дорофеева, В.Ф.Сагач**

### НЕСОПРЯЖЕНИЕ КОНСТИТУТИВНЫХ NO-СИНТАЗ ВЫЗЫВАЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И НАРУШЕНИЕ КАРДИОГЕМОДИНАМИКИ ПРИ ГИПЕРТЕНЗИИ (ЧАСТЬ I)

Сравнили показатели кардиогемодинамики, оксидативного и нитрозативного стресса в сердце и аорте у контрольных крыс линии Вистар и со спонтанной гипертензией. На основе экспериментально определенных биохимических показателей рассчитали значение индексов сопряжения конститутивных изоферментов NO-синтаз (cNOS=eNOS+nNOS) и биохимического индекса функции (БИФ) у этих животных. Как в сердце, так и, особенно, в аорте крыс со спонтанной гипертензией развивается оксидативный и нитрозативный окислительный стресс, вызывая значительные изменения значений БИФ, степени несопряжения cNOS и показателей кардиогемодинамики. Установили, что у них по сравнению с контролем сердце работает менее эффективно и с большим потреблением кислорода. При этом выявлено увеличение артериальной жесткости, достоверное снижение показателей насосной функции, уменьшение эффективности механизма Франка–Старлинга и нарушение процесса релаксации сердца. Сделано предположение о существовании в органах

сердечно-сосудистой системы крыс со спонтанной гипертензией механизма усиления окислительного стресса за счет дополнительной генерации супероксида изоферментами cNOS в состоянии несопряжения.

Ключевые слова: сердце; аорта; сопряжение cNOS; спонтанная гипертензия; окислительный стресс.

**A.V.Kotsuruba, N.A.Dorofeyeva, V.F.Sagach**

### NOS UNCOUPLING IS ACCOMPANIED WITH INDUCTION OF THE OXIDATIVE STRESS AND THE CARDIOHEMODYNAMICS DISTURBANCES IN HYPERTENSION

We compared the performance of cardiohemodynamics and indicators of oxidative and nitrosative stress in the heart and aorta in normotensive Wistar rats (WKR) and spontaneously hypertensive rats (SHR). On the basis of experimentally determined parameters to calculate cNOS uncoupling index and biochemical index of function (BIF) in these organs of the cardiovascular system. In the heart, and especially in the aorta of SHR develop a combined oxidative and nitrosative stress that leads to cNOS uncoupling, BIF lowering that correlate with lowering of systolic and diastolic functions, inhibition of the efficiency Frank-Starling mechanism, oxygen consumption of the heart and increasing arterial stiffness. We made the assumption of the existence of the vicious circle of enhancing oxidative stress in organs of the cardiovascular system due to additional superoxide generation by uncoupling cNOS.

Key words: heart; aorta; uncoupling cNOS; hypertension; oxidative stress.

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

## REFERENCES

1. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch.* 2010;459(6):923-39.
2. Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5(6):338-49.
3. Escobales N, Crespo MJ. Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005;3(3):231-46.
4. Schulz E1, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(6):1115-26.
5. Thomas SR, Chen K, Keaney JF Jr. Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5(2):181-94.
6. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(6):1115-26.
7. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Inducible nitric oxide synthase as a possible target in hypertension. *Curr Drug Targets.* 2014;15(2):164-74.

8. Shumilova TE, Nozdrachev AD, Fedorova MA. Role of inorganic nitrite and nitric oxide in the function of cardiovascular system. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2014 ;100(3):301-17 [Russian].
9. Pellegrino D, Parisella ML. Nitrite as a physiological source of nitric oxide and a signalling molecule in the regulation of the cardiovascular system in both mammalian and non-mammalian vertebrates. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. 2010;5(2):91-6.
10. Jansson EA, Huang L, Malkey R, Govoni M, Nihlén C, et al. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nat Chem Biol*. 2008 ;4(7):411-7
11. Mitchell BM, Cook LG, Danchuk S, Puschett JB. Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2007;20(12):1297-304.
12. Chen CA, Lin CH, Druhan LJ, Wang TY, Chen YR, Zweier JL. Superoxide induces endothelial nitric-oxide synthase protein thyl radical formation, a novel mechanism regulating eNOS function and coupling. *JBiol Chem*. 2011;286:29098–107.
13. Crabtree MJ, Brixey R, Batchelor H, Hale AB, Channon KM. Integrated redox sensor and effector functions for tetrahydrobiopterin- and glutathionylation-dependent endothelial nitric-oxide synthase uncoupling. *J Biol Chem*. 2013;288:561–9.
14. Roe ND, Ren J. Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol*. 2012;57(5):168–72.
15. Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des*. 2014;20(22):3579-94.
16. Dikalov S, Ungvari Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(10):H1417-27.
17. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(17):2794-814.
18. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S170-80.
19. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Griever DJ, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(5-6):691-728.
20. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*. 2004;555(Pt 3):589-606.
21. Hernanz R, Briones AM, Salaices M, Alonso MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126(2):111-21.
22. Pacher P, T.Nagayama, P. Mukhopadhyay , S.Batkai , D. A. Kass Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat. Protoc*:2008,3, № 9:1422–1434.
23. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *Fiziol Zh*. 2014; 60(3):11-7. (Ukrainian).
24. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone. *Fiziol Zh*. 2014; 60(5):3-13. (Ukrainian).
25. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2006 ;71(2):247-58.

*Матеріал надійшов до редакції 10.04.2015*

## Ендотеліальний моноцитаактивуючий фактор II відмінняє окисний стрес та неспряжений стан конститутивних NO-синтаз і викликане ними порушення кардіогемодинаміки при гіпертензії (частина II)

Н.О.Дорофєєва<sup>1</sup>, А.В.Коцюрuba<sup>1</sup>, Л.А.Могильницька<sup>2</sup>, А.Е.Малина<sup>3</sup>, О.І.Корнелюк<sup>3</sup>, В.Ф.Сагач<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіолології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; <sup>2</sup>Хмельницька обласна лікарня, Хмельницький; <sup>3</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;  
E-mail: dorofeyva@mail.ru

*Метою роботи було перевірити здатність ендотеліального моноцитаактивуючого фактора II (EMAP II) впливати на вільнорадикальний стан серця і судин, на відновлення спряженого стану конститутивних ізоформ NO-синтаз (eNOS) та кардіогемодинаміку у щурів зі спонтанною гіпертензією. Встановлено, що унаслідок інгібування окислативного і нітрозативного окисного стресу EMAP II швидко нормалізує порушений за гіпертензії конститутивний de novo синтез оксиду азоту (NO) в серці й аорті щурів завдяки відновленню спряженого стану eNOS. Це сприяло поліпшенню показників насосної функції серця (ударний об'єм збільшувався на 18,2 %, хвилинний об'єм крові - на 22 %), зниженню на 23,2 % артеріальної жорсткості, поліпшенню процесу релаксації лівого шлуночка внаслідок зниження в 4,7 раза кінцево-діастолічної жорсткості міокарда.  
Ключові слова: артеріальна гіпертензія; окисний стрес; неспряження eNOS; серце; аорта; EMAP II*

### ВСТУП

В частині I ми показали, що одним із механізмів розвитку порушень редокс-статусу клітин серця і судинної стінки, що зумовлюють дисфункцію цих органів за гіпертензії, може бути індукція неспряженого стану конститутивних NO-синтаз (eNOS і/чи pNOS), яка супроводжується зниженням конститутивного синтезу оксиду азоту (NO) і зростанням утворення супероксид-аніона ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) і його токсичних похідних – пероксинітриду ( $\text{ONOO}^-$ ) та гідроксильного аніон-радикала ( $\cdot\text{OH}$ ). В умовах окисного стресу відбувається глутатіонування SH-груп цистеїну в молекулі ендотеліальної NOS (eNOS) окисненням глутатіоном, що і спричиняє її неспряження [1-3]. Дані останніх дос-

ліджень свідчать, що неспряження eNOS може бути також результатом впливу активованих при запаленні моноцитів [4]. Саме здатність активувати ендотеліальні клітини і моноцити спонукала авторів, які вперше описали ендотеліальний моноцитаактивуючий фактор II (EMAP II), назвати його таким чином [5]. Крім того, було показано, що він відіграє важливу роль у розвитку запалення, апоптозу та ангіогенезу [6], а також здатен збільшувати проникність кровотканинного бар'єра [7]. Ці властивості EMAP II спонукали дослідників до вивчення його як можливого протипухлинного агента [8] чи застосування його блокади для активації ангіогенезу та покращення функції серця при експериментальному інфаркті міокарда [9]. З

© Н.О.Дорофєєва, А.В.Коцюрuba, Л.А.Могильницька, А.Е.Малина, О.І.Корнелюк, В.Ф.Сагач

іншого боку, була показана здатність ЕМАР II стимулювати експресію індуцибельної NOS (iNOS) та збільшувати ендотелій- та NO-залежну дилатацію легеневої артерії [10], тобто збільшувати синтез NO, з нашого погляду, ймовірно, внаслідок здатності відновлювати спряжений стан неспряженої cNOS.

Мета нашої роботи – перевірити здатність ЕМАР II впливати на вільнорадикальний стан серця і судин, на відновлення спряженого стану cNOS та кардіогемодинаміки у щурів зі спонтанною гіпертензією.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 6-місячних щурах-самцях лінії Вістар та зі спонтанною гіпертензією. Всі експериментальні процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986р. (86/609/ЕЕС). Щурів наркотизували за допомогою уретану (1,25 г/кг, внутрішньоочередово). ЕМАР II вводили одночасно (внутрішньовенно по 10 мкл розчину, що містив 0,85 мкг цього фактора в 0,5 мл 0,9%-го NaCl). Застосовували стабілізований 1,5%-м декстраном-70 ліофілізований рекомбінантний білок ЕМАР II людини (169 амінокислотних залишків, молекулярна маса 18535 Да), отриманий у відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (керівник - член-кор. НАН України А.І. Корнелюк) методом бактеріальної експресії. Після введення ЕМАР II негайно визначали фізіологічні показники, а через 30 хв тварин декапітували, відбирали серце та аорту і на холоді готували їх гомогенати для визначення біохімічних показників. Фізіологічні і біохімічні методи дослідження проводили як описано в частині I цієї роботи. Отримані результати представлено у відсотках відносно контролю, значення в якому приймали за 100 %.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення ЕМАР II сприяло поліпшенню показників насосної функції серця у щурів зі спонтанною гіпертензією: ударний об'єм збільшився на 18,2 %, хвилиний об'єм крові - на 22 % (рис. 1,а). При цьому кінцево-сistolічний і кінцево-діастолічний тиск у них достовірно не змінювалися, проте на 23,2 % знижувалась артеріальна жорсткість (див. рис. 1,б), що може бути причиною погіршення скорочувальної активності міокарда і свідчить про зниження периферичного опору судин. Так, максимальна швидкість наростання тиску лівого шлуночка (dP/dt max) після введення ЕМАР II збільшилася на 14,8 %, у той час як максимальна і кінцево-сistolічна жорсткість міокарда, які були підвищені у щурів зі спонтанною гіпертензією у 2,2 і 1,9 раза відповідно порівняно з показниками контрольної групи, зменшилися в 1,9 і 2,2 раза відповідно і, таким чином, після введення ЕМАР II ці показники достовірно не відрізнялися від контролю.

Після введення ЕМАР II у щурів зі спонтанною гіпертензією в 4,7 раза знижувалась кінцево-діастолічна жорсткість міокарда, яка визначає наповнення шлуночка в період пізньої діастолі, що може вказувати на поліпшення релаксації серця (див. рис. 1,б). Максимальна швидкість зниження тиску і константа активного розслаблення при цьому достовірно не змінювалися.

Таким чином, при гіпертензії введення ЕМАР II сприяло зниженню артеріальної, кінцево-сistolічної і максимальної жорсткості міокарда, збільшенню показників насосної функції серця, поліпшенню процесу релаксації лівого шлуночка унаслідок зниження в 4,7 раза кінцево-діастолічної жорсткості міокарда.

Як нами показано в частині I цієї роботи, одним із механізмів розвитку порушень редокс-статусу клітин серця і судинної стінки, що зумовлюють дисфункцію цих

органів за гіпертензії, може бути неспряження cNOS, яке супроводжується зниженням конститутивного *de novo* синтезу NO і зростанням утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  і його токсичних похідних ONOO<sup>-</sup> та  $\cdot\text{OH}$ . Для запобігання неспряженості cNOS, яке має таке велике значення в розвитку кардіальної і ендотеліальної дисфункції за гіпертензії, варто насамперед усунути його першопричину – оксидативний і нітрозативний стрес. Щодо оксидативного стресу, превалює думка, що ключовим ініціатором реверсного (reversible) неспряження eNOS і утворення нею в цьому стані  $\cdot\text{O}_2^-$ , який відіграє не лише токсичну, але і регуляторну роль у серцево-судинній системі, є активована ангіотензином II НАДФН-оксидаза. Генерований нею  $\cdot\text{O}_2^-$  окиснює глутатіон, а вже останній здійснює реверсне глутаніонування димерної молекули eNOS за залишками цистеїну [11, 12]. Отже, фізіологічна роль механізму неспряження (uncoupling) cNOS (як eNOS, так і/чи nNOS)

на наш погляд, полягає в тому, що цей процес – один із механізмів адаптації органів серцево-судинної системи, а саме механізм швидкого реагування на потребу підвищення генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  задля регуляції багатьох фізіологічних процесів [13]. Дійсно, інші джерела  $\cdot\text{O}_2^-$ , як то мітохондрії, нуклеотидні ксантин- і НАДФН-оксидази, чи ліпідні цикло- та ліпооксигенази, для своєї активації потребують спеціальних (пато)фізіологічних умов. Так, для активації мітохондріального джерела  $\cdot\text{O}_2^-$ , треба значно збільшити утилізацію кисню для потреб синтезу АТФ і, навпаки, для активації ксантинооксидази – запроваджувати гіпоксичний стан [14]. Активація НАДФН-оксидази потребує підвищення вмісту ключового її активатора ангіотензину II і активації протеїнкінази С. Не менших «жертв» потребує і активація ліпідного генератора, як мінімум, підвищення внутрішньоклітинного кальцію, активації фосфоліпази  $A_2$  і гідролізу мембранних

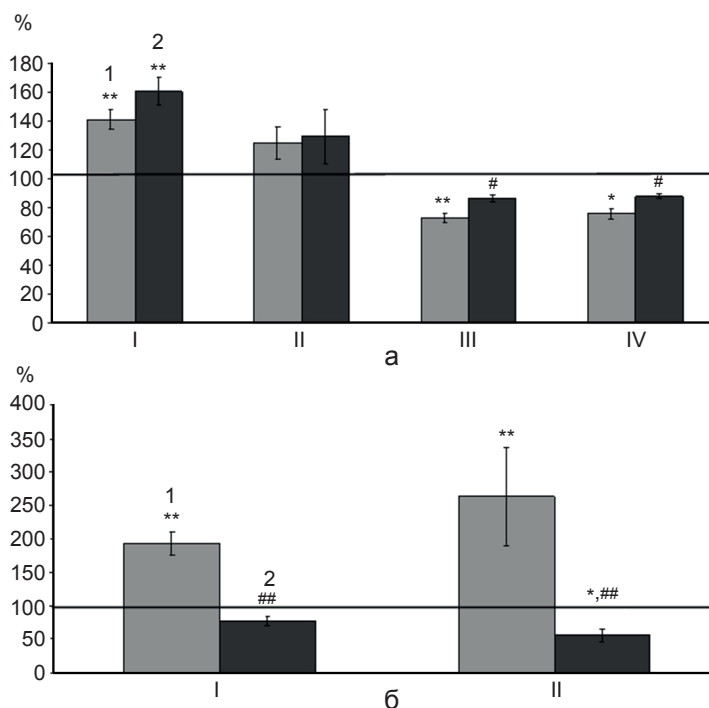


Рис.1. Відносні значення показників кардіогемодинаміки (а) та жорсткості міокарда (б) у щурів зі спонтанною гіпертензією перед (1) та після короткочасної дії ЕМАР II (2): на а: I - кінцево-систолічний тиск, II - кінцево-діастолічний тиск, III - ударний об'єм, IV - хвилинний об'єм крові; на б: I - артеріальна жорсткість міокарда, II - кінцево-діастолічна жорсткість міокарда. \*P<0,05, \*\*P<0,01 відносно контролю (100 %), #P<0,05, ##P<0,01 відносно значень за спонтанної гіпертензії.



фосфоліпідів для звільнення арахідонової кислоти. Водночас видаються найбільш оптимальними для швидкого підвищення генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  саме швидкі механізми реверсного неспряження cNOS унаслідок регуляції різними сигнальними каскадами процесів фосфорилювання, нітрозилування чи глутатіонування певних амінокислотних залишків у молекулах eNOS і/чи pNOS, які регулюють конститутивний кальційзалежний *de novo* синтез NO (за спряженого (coupling) стану) чи  $\cdot\text{O}_2^-$  (у неспряженому (uncoupling) стані) цими ферментами. До речі, НАДФН- і пероксинітризалежний механізм S-глутатіонування давно відомі як регулятори різних процесів у серцево-судинній системі [15–17]. Для адаптації цей механізм одночасної модуляції утворення двох ключових регуляторів – NO (зниження при неспряженні cNOS) і  $\cdot\text{O}_2^-$  (підвищення при неспряженні cNOS) може бути дуже важливим для адаптації

органів серцево-судинної системи до різних (пато)фізіологічних станів. Аналогічно реверсному спряженому (*de novo* синтез NO)/ неспряженому (генерація  $\cdot\text{O}_2^-$ ) стану cNOS, працює ще один потужний генератор як синтезу NO так і  $\cdot\text{O}_2^-$  – реверсний фермент ксантинооксидаза, він же одночасно нітрат- і нітритредуктаза. Давно відкритий цей феномен ксантинооксидази останнім часом став широко досліджуватися саме в цьому аспекті [18-21]. Неважко припустити, що і реверсний процес неспряження cNOS, за якого також дуже швидко можна підвищити вміст NO і, навпаки, зменшити утворення  $\cdot\text{O}_2^-$ , теж має бути доступним для багатьох фізіологічних біорегуляторів. Одним із них, можливо, є ЕМАР II, що ми і перевіряли в цій роботі.

Короткочасне введення ЕМАР II повністю нормалізувало швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  в серці та аорті щурів зі спонтанною гіпертензією, причому якщо в серці (рис. 2,а) механізм дії

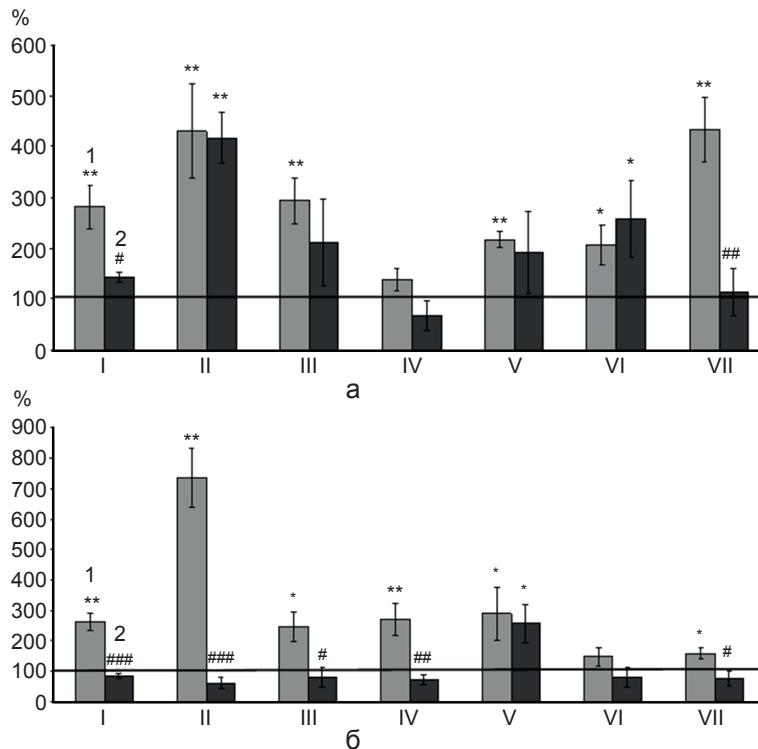


Рис.2. Відносні значення показників окисативного стресу в серці (а) й аорті (б) щурів зі спонтанною гіпертензією перед (1) та після короткочасної дії ЕМАР II (2): I – швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ , II – швидкість генерації  $\cdot\text{OH}$ , III – вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$ , IV – вміст тромбоксану  $\text{B}_2$ , V – вміст пептидолейкотрієну  $\text{C}_4$ , VI – вміст сечової кислоти, VII – вміст дієнових кон'югатів. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  відносно контролю (100%); # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  відносно значень за спонтанної гіпертензії



фактора невідомий (не зреагували ні обидві ліпідні оксигенази, ні ксантинооксидаза), то в аорті (див. рис. 2,б) на короткочасну дію ЕМАР II відреагувала швидким зниженням активності циклооксигеназа (про що свідчить зниження пулів тромбоксану  $B_2$ ) і ксантинооксидаза (про що свідчить зниження пулів сечової кислоти). Генерація токсичного  $\bullet\text{OH}$ -радикала в серці цих щурів залишалася за дії фактора на високому рівні. В умовах зниження генерації  $\bullet\text{O}_2^-$  це свідчить, що токсичний  $\bullet\text{OH}$ -радикал за гіпертензії в серці утворюється в основному внаслідок вільнорадикального розпаду пероксинітриту, а не в класичній реакції Фентона із  $\text{H}_2\text{O}_2$  за наявності  $\text{Fe}^{2+}$ . В аорті щурів зі спонтанною гіпертензією (див. рис. 2,б) швидкість генерації  $\bullet\text{OH}$  за дії фактора швидко знижувалася, як і пули  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Це свідчить про те, що за гіпертензії

в аорті джерелом токсичного  $\bullet\text{OH}$  може бути якраз класична реакція Фентона, яка потребує не лише наявності  $\text{Fe}^{2+}$ , але і активності супероксиддисмутази для утворення  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Швидке зниження пулів останнього в аорті за дії фактора (див. рис. 2,б) і відсутність такого в серці (див. рис. 2,а) підтверджує це припущення.

Як показано в частині I нашої роботи, важливим механізмом неспряження cNOS є розвиток нітрозативного стресу унаслідок активації надлишкового синтезу оксиду азоту трьома можливими шляхами – за активації iNOS, реутилізації нітрат- і нітрит-аніонів відповідними редуктазами або при декомпозиції (звільненні NO) нітрозотіолів. Причиною інгібування нітрозативного стресу за короткочасної дії ЕМАР II в серці щурів зі спонтанною гіпертензією може бути зафіксоване нами (рис.3,а) інгібування декомпозиції нітрозоглутатіону, про що

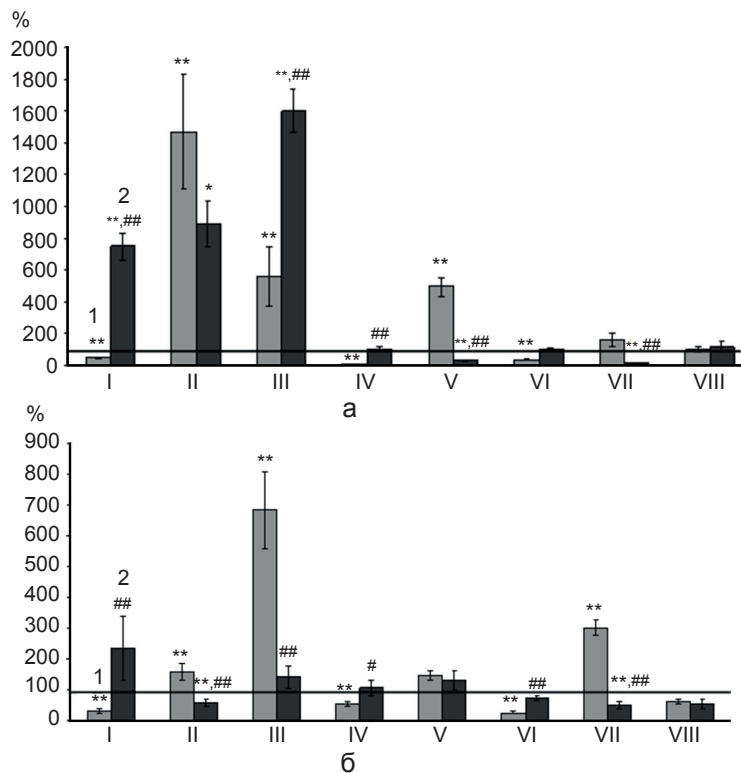


Рис.3. Відносні значення показників нітрозативного стресу в серці (а) й аорті (б) щурів зі спонтанною гіпертензією перед (1) та після короткочасної дії ЕМАР II (2): I – активність cNOS, II – активність iNOS, III – нітратредуктазна активність, IV – вміст  $\text{NO}_2^-$ , V – вміст  $\text{NO}_3^-$ , VI – вміст низькомолекулярних нітрозотіолів, VII – вміст високомолекулярних нітрозотіолів, VIII – вміст  $\text{H}_2\text{S}$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  відносно контролю (100 %); # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  відносно значень за спонтанної гіпертензії

свідчить підвищення пулів НМНТ. Водночас в аорті (див. рис.3,б) спостерігалось інгібування утворення надлишкового NO de novo (про що свідчить зниження активності iNOS), і завдяки реутилізації (знижується активність нітратредуктази), але не внаслідок декомпозиції нітрозоглутатіону (пули НМНТ підвищуються). Одночасне зниження і генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  (див. рис.2), і надлишкового NO (див. рис.3) свідчить про швидке інгібування за короточасної дії ЕМАР II і оксидативного, і нітрозативного компонентів окисного стресу в серці й аорті щурів зі спонтанною гіпертензією. При цьому створюються умови для швидкого відновлення конститутивного de novo синтезу NO (на це вказує зростання активності cNOS і пулів нітрит-аніона (див. рис.3) внаслідок відміни неспряження cNOS (див. рис.4) Це в свою чергу нормалізує значення біохімічного індексу функції (БІФ), який, як і індекс спряження cNOS (рис.4) корелює із фізіологічними показниками (див. рис.1), які свідчать про розвиток кардіальної і ендотеліальної дисфункції в цих органах серцево-судинної системи щурів зі спонтанною гіпертензією. Отже, ЕМАР II виявився потужним «відновлювачем» спряженого стану cNOS і, як наслідок, короточасним «ліквідатором» кардіальної й ендотеліальної дисфункції за гіпертензії.

На основі отриманих результатів можна припустити біохімічний механізм швидкої

ліквідації неспряження cNOS за дії ЕМАР II. Він полягає у підвищенні нітрозилування глутатіону (на що вказує підвищення пулів НМНТ в серці і аорті за дії фактора). Позаяк одним із механізмів неспряження є глутатіонування SH-груп цистеїну в молекулі cNOS окисненим глутатіоном (GSSG), утворення нітрозоглутатіону (GSNO) унеможливує утворення GSSG, а, отже, і глутатіонування молекули cNOS, тим самим унеможливаючи її неспряжений стан. Додатково на можливість такого механізму регуляції співвідношення спряженого/неспряженого стану cNOS внаслідок зміни співвідношення відновлений/окиснений глутатіон (GSH/GSSG), або нітрозильований/окиснений глутатіон (GSNO/GSSG), вказує виняткова стабільність пулів сірководню ( $\text{H}_2\text{S}$ ) у всіх досліджених групах щурів. Пули  $\text{H}_2\text{S}$ , який є регулятором системи NO [22] в серці і в аорті (див. рис.3а,б) залишалися стабільними як за превалювання неспряженого (переважаюча генерація  $\cdot\text{O}_2^-$ ) стану cNOS за гіпертензії, так і за превалювання спряженого (переважаючий синтез NO) стану в контролі й швидкого повернення до цього стану за дії ЕМАР II у щурів зі спонтанною гіпертензією. Це можна пояснити тим, що у всіх випадках важливим є підтримання необхідних високих концентрацій глутатіону в цих органах серцево-судинної системи, який синтезується de novo з використанням

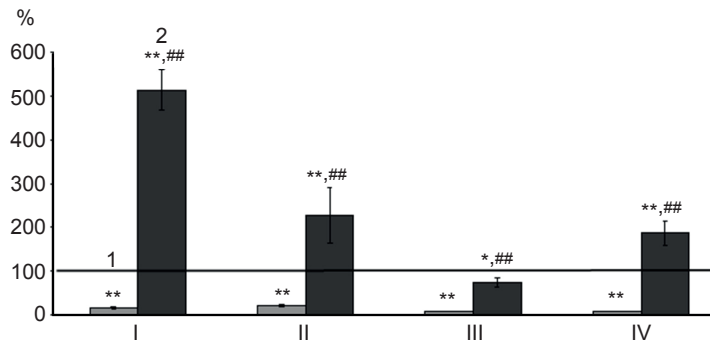


Рис. 4. Відносні значення індексу спряження cNOS та біохімічного індексу функції в серці й аорті щурів зі спонтанною гіпертензією перед (1) та після короточасної дії ЕМАР II (2): I – індекс спряження в серці, II – індекс спряження в аорті, III – біохімічний індекс функції в серці, IV – біохімічний індекс функції в аорті. \*\*P<0,01, \*P<0,05 відносно контролю (100 %); ##P<0,01 відносно значень за спонтанної гіпертензії

L- цистеїну, тобто в конкуренції за нього із двома індукційними ферментами *de novo* синтезу H<sub>2</sub>S – цистатіонінсинтазою і цистатіонінліазою. Факт, що пули H<sub>2</sub>S не змінювалися ні за гіпертензії, ні за дії фактора, вказує на те, що вони могли бути за цих станів мінімальними задля максимальної утилізації L-цистеїну для синтезу *de novo* відновленого глутатіону.

Для відновлення спряженого стану eNOS, тобто відновлення конститутивного *de novo* синтезу NO, використовували безліч речовин [23], але завжди досягали лише короткочасного ефекту. Продовжити цей ефект могли б, на наш погляд, речовини, здатні одночасно пригнічувати активність аргінази (що забезпечувало б збереження L-аргініну для синтезу NO) й інгібувати деградацію гуанозинтрифосфату (що забезпечувало б збереження субстрату для синтезу важливого кофактора спряженого стану cNOS тетрагідробіоптерину (BH<sub>4</sub>)) [24]. Можливими довготривалими «ліквідаторами» неспряження cNOS можуть бути інгібітори індукційного синтезу H<sub>2</sub>S, наприклад, пропаргілгліцин [25].

## ВИСНОВКИ

1. У серці й аорті щурів зі спонтанною гіпертензією ендотеліальний моноцит-активуючий фактор відмінняє оксидативний і нітрозативний стрес в основному внаслідок зниження генерації супероксиду неспряженою cNOS та надлишкового синтезу оксиду азоту iNOS.

2. Відміна окисного стресу за дії фактора швидко відновлює конститутивний *de novo* синтез оксиду азоту спряженою cNOS в серці й аорті щурів зі спонтанною гіпертензією.

3. Відновлення конститутивного синтезу оксиду азоту швидко нормалізує фізіологічні показники кардіогемодинаміки у щурів зі спонтанною гіпертензією: знижується артеріальна, кінцево-систолічна і максимальна жорсткість міокарда, збільшу-

ються показники насосної функції серця, покращується процес релаксації лівого шлуночка внаслідок зниження кінцево-діастолічної жорсткості міокарда.

**Н.А.Дорофеева, А.В.Коцюруба, Л.А.Могильницькая, А.Э.Малина, А.И.Корнелюк, В.Ф.Сагач**

## ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ МОНОЦИТАКТИВИРУЮЩИЙ ФАКТОР II ОТМЕНЯЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, НЕСОПРЯЖЕНИЕ КОНСТИТУТИВНЫХ NO-СИНТАЗ И ИНДУЦИРОВАННОЕ ИМИ НАРУШЕНИЕ КАРДИОГЕМОДИНАМИКИ ПРИ ГИПЕРТЕНЗИИ (ЧАСТЬ II)

Целью данной работы было проверить способность эндотелиального моноцитактивирующего фактора II (EMAP II) влиять на свободнорадикальное состояние сердца и сосудов, на восстановление сопряжения конститутивных NO-синтаз и кардиогемодинамики у крыс со спонтанной гипертонией. Установлено, что вследствие ингибирования оксидативного и нитрозативного стресса EMAP II быстро восстанавливает нарушенный при гипертонии конститутивный *de novo* синтез NO за счет восстановления сопряжения cNOS. Последнее быстро отменяло кардиальную и эндотелиальную дисфункцию у крыс со спонтанной гипертонией. Это способствовало улучшению показателей насосной функции сердца (ударный объем увеличился на 18,2 %, минутный объем крови - на 22 %), снижению на 23,2 % артериальной жесткости, улучшению процесса релаксации левого желудочка за счет уменьшения в 4,7 раза конечно-диастолической жесткости миокарда.

Ключевые слова: артериальная гипертония; оксидативный и нитрозативный окислительный стресс; сопряжение cNOS; сердце; аорта; EMAP II.

**N.A.Dorofeyeva, A.V.Kotsuruba, L.A.Mogilnitskaya, A.E.Malyina, A.I.Kornelyuk, V.F.Sagach**

## ENDOTHELIAL MONOCYTEACTIVATING FACTOR II CANCELS OXIDATIVE STRESS, CONSTITUTIVE NOS UNCOUPLING AND INDUCED VIOLATIONS OF CARDIAC HEMODYNAMICS IN HYPERTENSION (PART II)

The purpose of this study was to investigate the effect of EMAP II on free radical state of the heart and blood vessels, to restore cNOS coupling and cardiac hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. It was found that, due to the combined inhibition of oxidative and nitrosative stress, EMAP II quickly restores impaired in hypertension constitutive *de novo* synthe-

sis of NO by restoring cNOS coupling. Restoration by EMAP II of constitutive de novo synthesis NO abolished cardiac and endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. In hypertension, the introduction of EMAP II helped to improve the performance of the pumping function of the heart (stroke volume increased by 18.2 %, cardiac output – 22 %), an arterial stiffness decreased by 23.2 %, process of relaxation of the left ventricle improved, due to decreased in 4,7 times myocardial end-diastolic stiffness.

Key words: hypertension; oxidative and nitrosative stress; cNOS uncoupling; heart; aorta; EMAP II.

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

## REFERENCES

- Hill BG, Bhatnagar A. Protein S-glutathiolation: redox-sensitive regulation of protein function. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(3):559-67.
- Chen C-A, Wang T-Y, Varadharaj S, Reyes L.R, Hemann C, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature.* 2010;468(7327):1115-4.
- Zweier JL, Chen CA, Druhan LJ. S-glutathionylation reshapes our understanding of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and nitric oxide/reactive oxygen species-mediated signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:1769-75.
- Kossmann S, Hu H, Steven S, Schönfelder T, Fraccarollo D, Mikhed Y, et al. Inflammatory Monocytes Determine Endothelial Nitric-oxide Synthase Uncoupling and Nitro-oxidative Stress Induced by Angiotensin II. *J Biol Chem.* 2014;289(40):27540-50.
- Kao J, Ryan J, Brett G, Chen J, Shen H, Fan Y, et al. Endothelial monocyte activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem.* 1992;267(28):20239-47.
- Berger AC, Alexander HR, Tang G, Wu PS, Hewitt SM, Turner E, et al. Endothelial monocyte activating polypeptide II induces endothelial cell apoptosis and may inhibit tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* 2000;60(1):70-80.
- Li Z, Liu Y, Xue Y, Liu L, Xie H. Mechanisms for endothelial monocyte-activating polypeptide-II-induced opening of the blood-tumor barrier. *J Mol Neurosci.* 2012;47(2):408-17.
- Reznikov O, Chaikovsk' ka L, Poliakova L, Sachyns' ka O. Effects of cytokine-like polypeptide EMAP II and flutamide on the testosterone-stimulated prostate of castrated rats. *Fiziol. Z.* 1994. 2011;57(4):1-12 [Ukrainian].
- Yuan C, Yan L, Solanki P, Vatner SF, Vatner DE, Schwarz MA. Blockade of EMAP II protects cardiac function after chronic myocardial infarction by inducing angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;79:224-31.
- Tsai BM, Wang M, Clauss M, Sun P, Meldrum DR. Endothelial monocyte-activating polypeptide II causes NOS-dependent pulmonary artery vasodilation: a novel effect for a proinflammatory cytokine. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(4):R767-71.
- Crabtree MJ, Brixey R, Batchelor H, Hale AB, Channon KM. Integrated redox sensor and effector functions for tetrahydrobiopterin- and glutathionylation-dependent endothelial nitric-oxide synthase uncoupling. *J Biol Chem.* 2013;288(1):561-9.
- Galougahi KK, Liu C-C, Gentile C, Kok C, Nunez A, et al. Glutathionylation Mediates Angiotensin II-Induced eNOS Uncoupling, Amplifying NADPH Oxidase-Dependent Endothelial Dysfunction. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(1):1-11.
- Hill BG, Bhatnagar A. Protein S-glutathiolation: redox-sensitive regulation of protein function. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(3):559-67.
- Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* 1998;427(2):225-8.
- Sanchez G, Pedrozo Z, Domenech RJ, Hidalgo C, Donoso P. Tachycardia increases NADPH oxidase activity and RyR2 S-glutathionylation in ventricular muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39(6):982-91.
- Liu CC, Karimi Galougahi K, Weisbrod RM, Hansen T, Ravaie R, et al. Oxidative inhibition of the vascular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump via NADPH oxidase-dependent b1 subunit glutathionylation: implications for angiotensin II-induced vascular dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2013;65(3):563-72.
- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, et al. S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* 2004;10(11):1200-7.
- Weidert ER, Schoenborn SO, Cantu-Medellin N, Choughule KV, Jones JP, Kelley EE. Inhibition of xanthine oxidase by the aldehyde oxidase inhibitor raloxifene: implications for identifying molybdopterin nitrite reductases. *Nitric Oxide.* 2014;37:41-5.
- Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. Mechanisms of nitrite bioactivation. *Nitric Oxide.* 2014;38:58-68.
- Rassaf T, Ferdinandy P, Schulz R. Nitrite in organ protection. *Br J Pharmacol.* 2014 ;171(1):1-11.
- Omar SA, Webb AJ. Nitrite reduction and cardiovascular protection. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;73:57-69.
- Cortese-Krott MM, Fernandez BO, Kelm M, Butler AR, Feelisch M. On the chemical biology of the nitrite/sulfide interaction. *Nitric Oxide.* 2015;46:14-24.
- Li H, Forstermann U. Pharmacological prevention of eNOS uncoupling. *Curr Pharm Des.* 2014;20(22):3595-606.
- Schulz E1, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(6):1115-26.
- Beltowski J. Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine - An update. *Pharmacol. Rep.* 2015;67(3):647-58.

*Матеріал надійшов до редакції 10.04.2015*

# Використання послідовних пилкоподібних стимулів для експрес-діагностики імпульсної активності ізольованих нейронів гіпокампа

В.А. Яворський, О.О. Лук'янець

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

*Досліджували зміни імпульсної активності нейронів гіпокампа із застосуванням пилкоподібної форми стимуляції. Описано використання серійних реєстрацій електричної активності нейронів для експрес-діагностики генераторної здатності ізольованих клітин. Встановлено, що запропонований протокол дає можливість визначати додаткові характеристики імпульсної активності нейрона – поріг ініціації і пригнічення генерації, форму та амплітуду залежностей між імпульсними інтервалами при різній деполаризації нейрона. Запропоновані нами протоколи стимуляції та відповідний аналіз є інструментами, що можуть ефективно використовуватися для обґрунтування достовірності впливу хімічних сполук або інших експериментальних факторів на імпульсну активність нейронів під час фази «стабільної» активності тривалістю до 30 хв.*

*Ключові слова: нейрони гіпокампа; перфорований patch-clamp; потенціал дії; гіпокамп; акомодация; міжімпульсний інтервал; ремп.*

## ВСТУП

Ремп-протокол, в якому тестовий сигнал лінійно зростає та окреслює трикутник (англ. ramp) після перемикання на базовий рівень, є найбільш застосованим базовим варіантом електрофізіологічної стимуляції збудливих клітин після степ-тестування із формою „сходинки”. В умовах фіксації потенціалу, сигнал ремп (“voltage ramp”) може бути використано для миттєвого тесту збудливих клітин на вольт-амперну залежність резистивної та неінергічної компонент трансмембранного струму [1]. Маніпуляція швидкістю наростання потенціалу (від 0,2 до 1,2 мВ/мс) дала змогу вирахувати дві компоненти струму через натрієвий канал типу  $Na_v1.3$  [2]. Було показано, що повільний ремп-сигнал може зменшити нефіксований натрієвий струм і запобігти активації швидких натрієвих каналів [3].

В умовах фіксації струму, ремп-тестування (“current ramp”) є основним інструментом

для визначення збудливості та гіперчутливості нейронів, залежності генерації від зміни трансмембранних струмів. Також ремп-сигнал використовували для визначення внеску в імпульсну генерацію нейронів інергізованої [4] та неінергізованої [5,6] компонент натрієвого струму [7,8], фосфорилування натрієвих каналів [9], низькопорогового кальцієвого струму [10], калієвого струму [11], Н- і TRP-струмів [12], М-струму [13], кальцій- залежного калієвого SK-струму [14]. Різновидом згаданого вище ремп- протоколу є зворотній ремп (reverse ramp) із від’ємним приростом сигналу, який може слугувати для визначення генераційної адаптації або для зменшення ємнісних артефактів реєстрації [15].

В останній час ремп-протокол використовується особливим чином як ефективний метод дослідження для виявлення тонких особливостей та „аномалій” генерації, що не можуть бути отримані степ-протоколом із прямокутним імпульсом струму [15]. Систе-

© В.А. Яворський, О.О. Лук'янець



матичне ремп-тестування слугує для вивчення змін активності в умовах біляпорогового збудження, визначення залежності частотного кодування від попередньої активності, зокрема швидкості акомодатії. Ремп-протокол використовувався також як „екзаменатор” математичної моделі генерації нейрона [16], оскільки якісно інша форма сигналу сприяла уникненню явища „перенавчання” моделі за записами потенціалу із степ-деполяризацією нейронів.

Із ремп-записів потенціалу переважно обліковують комплекс показників реакції нейронів на стимул. Так, ефективність ремп-деполяризації [12] була визначена за трьома показниками: часу початку генерації серії потенціалів дій (ПД), середнього нахилу потенціалу до початку генерації, тривалості серії ПД. Аналіз порогового потенціалу виникнення ПД застосували для визначення змін генерації після ініціації LTP в умовах ремп-протоколу із нахилом 250 пА/с [17]. Із ремп-записів вираховують підпороговий вхідний опір нейронів [14,18], міжімпульсні інтервали між викликаними ПД або миттєву частоту генерації залежно від амплітуди вхідного струму [13]. Важливим показником може бути початкова частота генерації (або відповідно перший міжпіковий інтервал), яка не залежить від нахилу ремп-сигналу [12]. Порівняння збудливості нейронів [11] ґрунтувалося на обрахунку амплітуд та тривалості ПД, кількості ПД у відповідь на ремп із тривалістю 1 с, а також побудові тахограм – послідовностей міжпікових інтервалів залежно від часу генерації.

Ремп-сигнал має застосування в широкому колі досліджень практичного і теоретичного значення. Наприклад, для з’ясування впливу мутацій каналів на пороговий струм і збільшення збудливості ноцицептивних нейронів [19], оцінки дії препаратів на генерацію ПД [3,12], визначення нелінійної трансформації нейроном вхідного сигналу у вихідний, впливу попередньої активності на генерацію.

Від якості та стабільності відведень імпульсної активності залежить надійність висновків досліджень, з огляду на ендогенні зрушення генеративної здатності нейронів у часі. Тому важливим чинником при проведенні ремп-тестування є додаткові методичні умови, які допомагають нормувати та контролювати базовий рівень активності. Це може бути відбір клітин за ознаками стабільності мембранного потенціалу в межах 2 мВ за 10 хв [11] або незмінності кількості викликаних ПД за цей час [20]. Можливий попередній відбір „здорових” нейронів за комплексним критерієм стабільного потенціалу спокою не вище ніж -35 мВ і варіації потенціалу менше як 10%, овершуту ПД і амплітуди натрієвого струму понад 1 нА [19]. Інший спосіб підвищення якості вимірювань – це зменшення тривалості тестування, у тому числі обмеження часу контрольної реєстрації до 3 хв [21] для мінімізації самовільних змін активності нейронів за час експериментального відведення. Введення прекодиційного етапу деполяризації мембрани клітин та застосування фізіологічних концентрацій іонів також має на меті отримання сталої активності нейронів [22].

У попередніх роботах ми дослідили властивості імпульсної активності ізольованих нейронів гіпокампа [23] та її часові зміни в умовах степ-деполяризації. Нами були виділені [24] три фази зміни імпульсної активності ізольованих нейронів в процесі експериментальної реєстрації в режимі перфорований patch-clamp: «посилення» активності, «стабільної» активності і «згасання» активності нейрона. Ми показали, що застосування серійних тахограм дає змогу зменшити внесок випадкових подій при аналізі реєстрацій електричної активності нейронів.

У цій роботі пропонується методичний підхід із використанням послідовних ремп-реєстрацій для контролю і порівняння генераторної активності ізольованих нейронів гіпокампа в конфігурації перфорований patch-clamp.



## МЕТОДИКА

Методика отримання ізольованих нейронів гіпокампа шурів в цілому відповідає такій, що описана у наших попередніх працях [23, 25, 26]. Тварин (30 шурів 14-добового віку) декапітували після анестезії ефіром; мозок швидко витягували і переносили в холодний (4 °С) розчин А. Зрізи гіпокампа товщиною 0,4–0,5 мм нарізали за допомогою леза і потім витримували 60 хв у розчині Б при кімнатній температурі (21–25 °С), розміщували їх на нейлоновій сіточці в камері; аерацію середовища забезпечували карбогеном. Ферментативна обробка в розчині-Б з 0,1% пронази (тип 23) і 0,1% трипсину («Sigma», США) тривала 20–35 хв без зміни температури середовища. Диспергування зрізів гіпокампа давало змогу отримувати ізольовані нейрони необхідної зони, які зберігали невеликі частини апікальних і базальних дендритів і мали сому діаметром 15–20 мкм і довжиною 30–50 мкм.

Розчин-А містив (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 5, NEPES – 10, MgCl<sub>2</sub> – 1, CaCl<sub>2</sub> – 2, глюкозу – 25. Розчин-Б: NaCl – 125, KCl – 5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,25, NaHCO<sub>3</sub> – 25, MgCl<sub>2</sub> – 1, CaCl<sub>2</sub> – 2, глюкозу – 10. Склад піпеткового розчину був наступним: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>K<sub>3</sub> (трикалієва сіль лимонної кислоти) – 60, KCl – 20, NEPES – 10, MgCl<sub>2</sub> – 5; амфотерицин-В попередньо розчиняли в DMSO із розрахунку 1 мг на 5 мкл і додавали до піпеткового розчину (1 мг/мл). Всі речовини отримані від фірми «Sigma-Aldrich» (США).

Трансмембранні струми і потенціали вимірювали з використанням стандартної методики patch-clamp в умовах перфорації ділянки мембрани під дією амфотерицину-В [26]. Позаклітинний розчин замінювали в робочій камері через апікаційну піпетку з одночасним відкачуванням надлишку рідини перистальтичним насосом з іншого боку камери. Використовувалося програмне забезпечення «NewProg» (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України) і підсилювача

(«Dagan Corp», США); мікропіпетки виробляли на пулері P97 («Sutter Instruments», США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У наших експериментах ми використовували ремп-тестування тривалістю 10 с як експрес-аналіз генеративної активності нейронів, утримуваних при мембранному потенціалі -80 мВ. Побудова графіків імпульсної генерації відбувалася у вигляді залежностей значень міжімпульсного інтервалу (МІ) від вхідного струму (рис. 1 а,б,в).

На основі графіків активності ми визначали поріг ініціації генерації (ПІГ) – як найменшу амплітуду вхідного струму, при якій починається імпульсація. Інша характеристика імпульсної активності – поріг пригнічення генерації (ПІГ), була визначена нами як найбільша амплітуда вхідного струму, вище якої генерація не відбувалася. Ми також аналізували початкові та кінцеві значення МІ, яких визначають при ПІГ та ПІГ відповідно.

На старті експериментального відведення ізольовані нейрони мали початкову генерацію при вхідному струмі від 3,7 до 27,4 пА, в середньому 12,5±7,9 пА (n=18). Міжімпульсний інтервал зменшувався від початкового 168±48 до 61±25 мс із пригніченням генерації при вхідному струмі у середньому 67±37 пА. При цьому для 4 клітин нами було враховано поріг ПІГ у +110 пА, оскільки при такому максимальному подразненні здатність до генерації не втрачалася.

Значні коливання ПІГ виявляються як при порівнянні активності нейронів на початку тестування, так і в повторних реєстраціях ремп-стимулом при відведенні активності від окремих клітин. Спеціальна перевірка ПІГ на одному нейроні виявила суттєву дисперсію у 7,4 пА при середньому значенні ПІГ 44,7 пА (19 послідовних ремп-записів). Це якісно контрастує із дисперсією у 1,3 пА порога ПІГ при середньому значенні 13,4 пА, де відхилення початку генерації має рівень одного міжімпульсного інтервалу.

Між порогами ініціації та пригнічення генерації нами виявлена значима позитивна кореляція на рівні 0,01 (коефіцієнт Спірмена  $\rho = 0,664$ ,  $n = 17$ ), а також встановлена значима від'ємна кореляція ППГ та кінцевого міжімпульсного інтервалу ( $\rho = -0,685$ ).

При перевірці взаємозалежності значень ППГ та ППГ та відповідних ним МІ, метод головних компонент факторного аналізу виділяє дві основні компоненти (приховані фактори), які пояснюють 83% дисперсії значень 4-х змінних. Найбільший внесок у першу компоненту дають ППГ та ППГ, тоді як друга переважно пов'язана з початковим значенням МІ.

Класифікаційний аналіз показав три кластери нейронів: найбільший складався із 10 клітин (55,6%) та характеризувався високим ППГ ( $17,4 \pm 7,1$  пА) та ППГ ( $90 \pm 19$  пА) при високій частоті генерації. Інший кластер із 4 нейронів (22,2%) відрізнявся повільною генерацією за будь-якої інтенсивності деполяризації, ще 4 нейрони (22,2%) мали найнижчий ППГ одночасно із високочастотною імпульсацією.

Методом повторних ремп-тестувань із інтервалом 10 хв були виявлені загальні ефекти посилення і зменшення імпульсної реакції 7 нейронів у часі експериментального відведення. Подібно до змін генерації при степ-тестуванні, нами виділено фази «посилення», «стабільності» та «згасан-

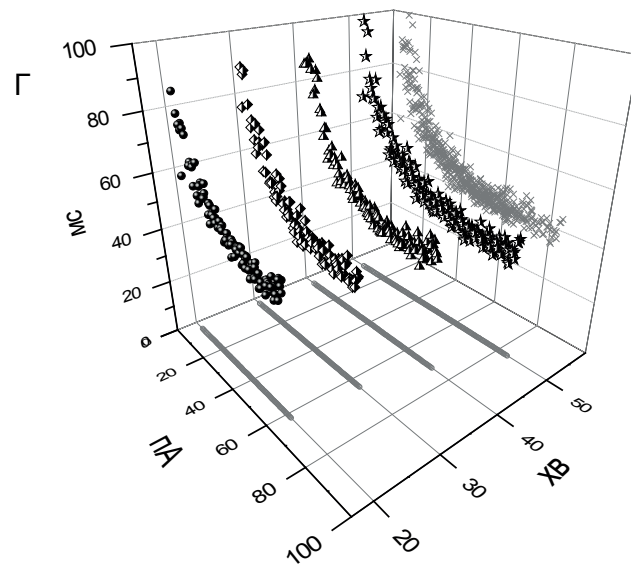
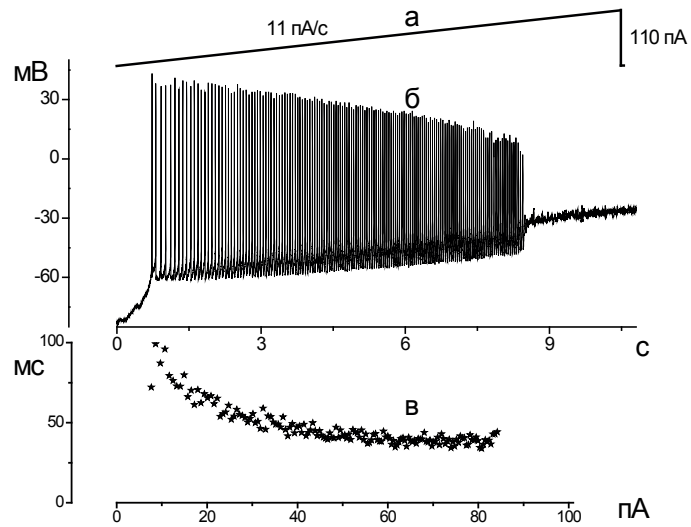


Рис. 1. Реєстрація послідовностей міжімпульсного інтервалу (МІ) та побудова тахограм: а – ремп-протокол зміни вхідного струму від 0 до 110 пА зі швидкістю 11 пА/с; б – реєстрація мембранного потенціалу нейрона під впливом ремп-сигналу; в – графік імпульсної генерації (тахограма), за віссю ординат – тривалість МІ; за віссю абсцис – середня амплітуда вхідного струму на відповідних інтервалах, пА; г – тривимірний графік імпульсної генерації, представлені послідовності МІ у фазі «стабільної» активності на 20-й (○), 30-й (◇), 40-й (△) і 50-й (☆) хвилині після початку відведення від клітини, сірим кольором позначені проєкції значень у площинах XY (°) та YZ (×)

ня» генераційної активності [24].

Ознакою фази «стабільності» або стабільної активності є сталі ремп-залежності, з незмінною формою та рівнем значень генеральної послідовності МІ (рис. 1, г). Тривалість фази становила від 10 до 60 хв; впродовж цього періоду ППГ істотно не змінювався, на відміну від підвищення значень ППГ на 20–50%. Наведений на рисунку приклад демонструє 34%-ву зміну ППГ з 65 пА на 20-й хвилині відведення до 87 пА на 50-й хвилині. Дисперсія значень у генеральній послідовності МІ є найменшою в фазі «стабільності», і може слугувати критерієм для визначення часових рамок фази. Ріст дисперсії на 30% від мінімального рівня ми обирали як порогове значення, яке визначає умовний поділ фаз активності. Подібний характер активності в контрольних умовах мали і інші нейрони.

Імпульсна генерація нейронів характерно зростає на початку експериментального відведення в умовах ремп-потокору, чим може бути обґрунтоване виділення відповідної фази «посилення» – збільшення активності нейрона. Основні зміни відбуваються в спроможності нейрона генерувати ПД при деполяризації струмом в діапазоні від 40 до 80 пА, та конкретно в поступовому збільшенні ППГ (рис. 2, а). Наведений на рисунку запис вказує на двократне зростання ППГ із 35 пА на початку відведення до 65 пА на 20-й хвилині. Разом із незначними змінами ППГ, значно розширювався діапазон амплітуд вхідного струму, де нейрони генерували ПД.

Найбільші порушення генерації в умовах ремп-протоколу ми визначили у фазі «згасання» – зменшення активності нейрона, в якій суттєвих змін зазнають форми залежностей і амплітуди МІ. Характерною ознакою фази було поступове збільшення дисперсії значень МІ у 3–10 разів та підвищення ППГ до 20–60 пА. На рис. 2, б наведені тахограми генерації ПД ізолюваного нейрона у фазі «згасання» – зменшення активності впродовж 20 хв. Поріг ППГ підвищився з 8 до 23 пА, за 10 хв змінювався нахил тахограми, значно зростали

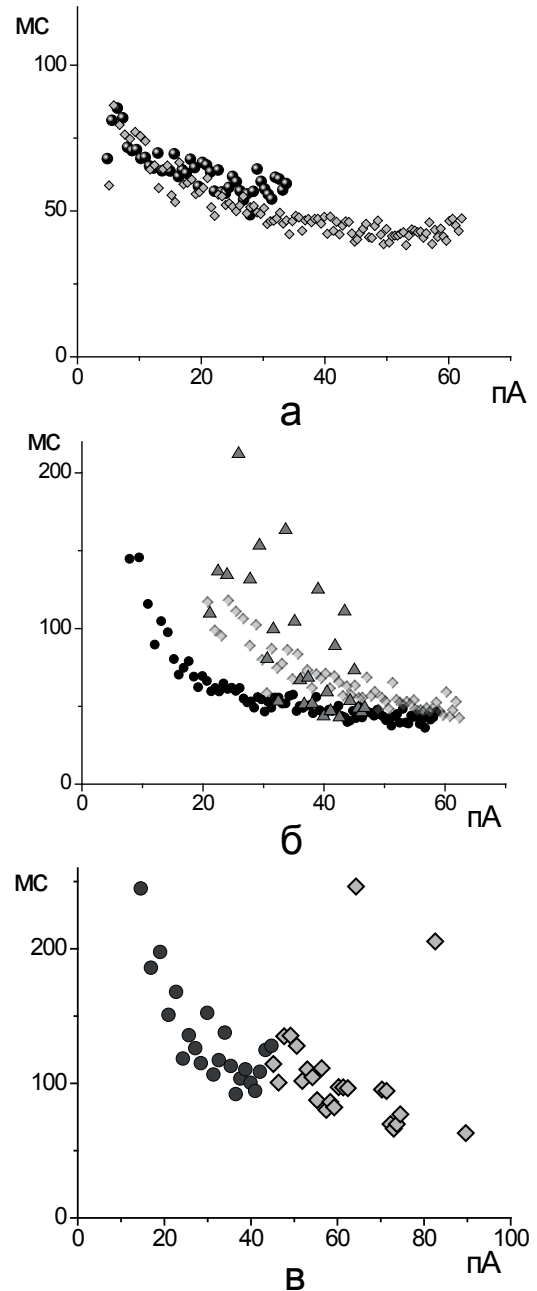


Рис. 2. Порівняння тахограм в фазах «посилення» і «згасання» імпульсної активності: а – графік тахограм у фазі «посилення» активності на початку відведення (●) та через 20 хв (◆); б – тахограми у фазі «згасання» імпульсної активності при реєстрації на 10-й (●), 20-й (◆) та 30-й (▲) хвилинах після початку відведення; в – порівняння тахограм в фазах «посилення» і «згасання» імпульсної активності на початку відведення (●) та на 50-й хвилині (◆) відповідно. Тахограми на окремих графіках відображають активність різних нейронів

амплітуди і дисперсія МІ у відповідь на струм 20–40 пА. Хоча ППГ тимчасово збільшувався на 5 пА, однак в цілому діапазон генерації звузився з 50 до 43 пА. Надалі відбувалося ще більше його звуження до 25 пА, через 10 хв фіксували порушення ритмічної генерації нейрона та трикратне відхилення значень МІ. Усі тестовані нейрони припиняли імпульсну генерацію на завершення фази «згасання» в умовах ремп-протоколу та перфорованого patch-clamp, хоча були неушкодженими та проявляли трансмембранні струми.

Зсув діапазону генерації може бути виявлений та наочно представлений на графіках тахограм за допомогою ремп-протоколу. На рис. 2, в наведено порівняння послідовностей МІ на початку та наприкінці експериментального відведення активності окремого нейрона за рівних контрольних умов. Можна бачити, що за 50 хв діапазон активності змістився в бік деполяризації; на початку та в кінці відведення відсутнє перекриття діапазонів генерації через підвищення ППГ на 30 пА. Щонайменше для деяких нейронів будь-яка амплітуда тестового стимулу є ефективною протягом обмеженого часу, що потребує контролю під час експерименту.

При підозрі, що тривала деполяризація нейронів шкодить їх спроможності до генерації або вони швидко втрачають свою імпульсну активність, ремп-стимуляція є адекватною заміною протоколу із серією степ-стимулів, оскільки за 10 с здатна виявити генераторну здатність на різних рівнях збудження.

Таким чином, ремп-протокол доповнює методичні умови тестування генераційної активності клітин, разом із відбором нейронів за зовнішніми ознаками та їх тестуванням на рівень потенціалу спокою та овершут ПД. Ремп-стимуляція може виявити часові рамки фази стабільної імпульсної активності при тестуванні з періодом 5–10 хв, а також визначити зміну найбільш важливих показників генерації: ППГ, залежності МІ від вхідного струму, дисперсії МІ.

Наші дослідження показують, що набір показників імпульсної активності, які вираховуються на розсуд дослідників, потребує певної систематизації та переоцінки. Загалом, визначаються такі показники: а) кількість ПД у відповідь на стимул або тривалість серії; б) порогові значення стимулів або потенціалів, при яких виникає або змінюється генерація; в) частоту чи відповідний їй період генерації в порогових точках або в діапазоні стимулів; г) похідні показники ПД – нахил, амплітуда, напівширина, які визначаються із запису потенціалу.

Щодо аналізу піків ПД, в наших результатах ми вбачаємо найбільш сталими ППГ і тахограми генерації, значення яких зберігаються на певному рівні впродовж фази стабільної активності. Реєстрація в цій фазі найкращим чином відмежовує вплив експериментальних факторів від ендогенних змін активності нейронів і може тривати від 10 до 30 хв в умовах перфорованого patch-clamp.

Ми вважаємо невинуватим критерій незмінності кількості ПД для визначення якості реєстрації, оскільки спостерігається постійний ріст ППГ у часі в контрольних умовах. Підвищення цього порогу у нормі збільшує кількість ПД у степ-протоколі залежно від амплітуди стимулу, тому вибірка клітин за таким правилом є неадекватною. З іншого боку, кількість ПД може зменшуватися через активне підвищення ППГ в фазі згасання активності, що компенсує ріст ППГ і призводить до зсуву діапазону генерації. Також як мінімум для 5 клітин ми спостерігали значні відхилення в кількості генерованих ПД в межах окремої серії стимуляції (більше 20%). Єдиною позитивною стороною критерію є витрата часу на його застосування на початку відведення, однак лише з позиції проходження фази посилення активності.

Сумнівним показником активності гостроізольованих нейронів ми вважаємо потенціал спокою, який вимірюється в режимі нульового вхідного струму. Ферментативна

обробка та ізолювання нерівномірно пошкоджують клітини, чим викликають деполяризаційний зсув мембранного потенціалу різної інтенсивності. Традиційний відбір «здорових» клітин із потенціалом спокою нижче за -40 мВ лише підкреслює важливість їх якісного ізолювання, та ставить статистичний показник потенціалу спокою в залежність від вправності експериментатора. За нашими результатами, склад зовнішньоклітинних розчинів модулює потенціал спокою також через вплив буферних систем або концентрації глюкози.

Порівняння генерації клітин під впливом речовин або інших факторів можливе лише у фазі «стабільної» активності, за умов достатньої її тривалості. В фазах «посилення» та «згасання» зіставлення імпульсації може виявитися неадекватним або неможливим. Гіпотези щодо зміни активності неможливо перевірити на реєстраціях в різних фазах, коли відбуваються значні зсуви діапазону генерації, як на рис.2, в.

Імпульсна активність нейронів нелінійно пов'язана з трансмембранними струмами, та знаходиться під впливом внутрішньоклітинних факторів, які зумовлюють щонайменше зміну картини генерації у часі в умовах реєстрації контрольної активності. Істотним фактором може слугувати внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація, оскільки зовнішня концентрація кальцію значно впливає на частоту генерації ізолюваних нейронів та ефект акомодатії, як було показано нами раніше [27, 28]. Імпульсна активність нейронів гіпокампа модулюється іонами літію [26] та епілептогенною речовиною пілокарпіном [25, 29], через залучення калієвих каналів М-типу та різних типів G-білків.

Ми припускаємо, що внутрішньоклітинні фактори впливають на імпульсну активність нейронів через механізм ритмогенезу, який викликає коливання поки невстановленої природи під зовнішньою мембраною клітини. В свою чергу, ці коливання рухають

трансмембранний потенціал клітини, стимулюють багаторазову повторну генерацію ПД та водночас підтримують її ритмічність. Підтвердженням існування механізму ритмогенезу можуть бути наші досліди про вплив на імпульсну активність речовини карбоніл-ціанід-м-хлорфенілгідразону (СССР), роз'єднувача протонного градієнта мітохондрій [10]. Так, СССР вже в наднизькій концентрації 1 нмоль/л повністю блокував множинну генерацію ПД як при прямокутній тест-деполяризації, так і при застосуванні ремп-сигналу. Однак іонні канали мембрани нейрона зберігали здатність формувати один повноцінний ПД у відповідь на прямокутний тест-стимул. Ми припускаємо, що блокування мітохондріальних функцій захоплення кальцію або продукції АТФ порушує механізм ритмогенезу і відповідно здатність нейрона до тривалої генерації ПД.

Пошкодження внутрішньоклітинного механізму ритмогенезу у фазі «згасання» активності може пояснювати різнобічні зовнішні ефекти розладу генерації ПД на мембрані нейрона. Так, перерви ритму коливань може викликати збільшення дисперсії генерації ПД. З іншого боку, ослаблення впливу механізму ритмоведіння на клітинну мембрану може призводити до деполяризаційного зсуву порогу ініціації генерації. Тобто порушення як мінімум двох ланок механізму ритмогенезу викликає два головних типи порушень активності в контрольних умовах.

Таким чином, реєстрація послідовностей МІ із застосуванням ремп-стимулів дає змогу визначати додаткові характеристики імпульсної активності – ППГ і ППГ, форму і амплітуду залежностей МІ при різній деполяризації нейрона. Запропоновані нами протоколи стимуляції та відповідний аналіз є інструментами, що обґрунтовують достовірність впливу хімічних речовин або інших експериментальних факторів на імпульсну активність нейронів.



**В.А. Яворский, Е.А. Лукьянец**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ПИЛООБРАЗНЫХ СТИМУЛЯЦИЙ ДЛЯ ЭКСПРЕСС- ДИАГНОСТИКИ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА**

В данной работе исследовались изменения импульсной активности нейронов гиппокампа при применении стимуляций пилообразной формы. Описано использование серийных регистраций электрической активности нейронов для экспрес-диагностики генераторной способности изолированных клеток. Установлено, что предложенный протокол дает возможность определять дополнительные характеристики импульсной активности нейрона – порог инициации генерации и порог подавления генерации, форму и амплитуду зависимостей межимпульсных интервалов при различной деполяризации нейрона. Предлагаемые нами протоколы стимуляции и соответствующий анализ являются инструментами, которые могут эффективно использоваться для обоснования достоверности влияния химических соединений или других экспериментальных факторов на импульсную активность нейронов во время фазы «стабильной» активности длительностью до 30 мин.

Ключевые слова: нейроны гиппокампа; перфорированный patch-clamp; потенциал действия; аккомодация; межимпульсный интервал.

*Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина.*

**V.A. Yavorsky, E.A. Lukyanetz**

**USING THE SERIAL RAMP RECORDINGS FOR RAPID TESTING OF THE GENERATING ABILITY OF IMPULSE ACTIVITY OF ISOLATED HIPPOCAMPAL NEURONS**

In this study we investigated changes of impulse activity of hippocampal neurons of the hippocampus by using ramp recordings. We have described the usage of serial ramp recordings of neuronal electrical activity for rapid testing of the generating ability of isolated hippocampal neurons. An analysis of the data has shown that the proposed protocol of serial ramp recordings allows to define additional characteristics of the neuronal impulse activity: (i) the thresholds for initiation of generation and suppression of the generation, (ii) the shape and amplitude of relationship between the interpulse intervals and neuronal depolarizations. The suggested stimulation protocols and related analysis are tools that can be effectively used to justify influence of chemicals or other experimental factors on the impulse activity of neurons.

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

**REFERENCES**

1. Lunko OO, Isaev DS, Maximyuk OP, Krishtal OA, Isaeva EV. The effect of enzymatic treatment using proteases on properties of persistent sodium current in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. *Fiziol Zh.* 2014; 60 (3): 75-9. [Ukrainian].
2. Estacion M, Waxman SG. The response of Na(V)1.3 sodium channels to ramp stimuli: multiple components and mechanisms. *J Neurophysiol.* 2013; 109 (2): 306-14.
3. Kononenko NI, Shao LR, Dudek FE. Riluzole-sensitive slowly inactivating sodium current in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurophysiol.* 2004; 91 (2): 710-8.
4. Power KE, Carlin KP, Fedirchuk B. Modulation of voltage-gated sodium channels hyperpolarizes the voltage threshold for activation in spinal motoneurons. *Exp Brain Res.* 2012; 217 (2): 311-22.
5. Wu SN, Lo YC, Shen AY, Chen BS. Contribution of non-inactivating Na<sup>+</sup> current induced by oxidizing agents to the firing behavior of neuronal action potentials: experimental and theoretical studies from NG108-15 neuronal cells. *Chin J Physiol.* 2011; 54 (1): 19-29.
6. Cheng X, Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Te Morsche RH, Drenth JP, Waxman SG. Deletion mutation of sodium channel Na(V)1.7 in inherited erythromelalgia: enhanced slow inactivation modulates dorsal root ganglion neuron hyperexcitability. *Brain.* 2011; 134 (Pt 7): 1972-86.
7. Estacion M, Waxman SG, Dib-Hajj SD. Effects of ranolazine on wild-type and mutant hNav1.7 channels and on DRG neuron excitability. *Mol Pain.* 2010; 6: 35.
8. Estacion M, Gasser A, Dib-Hajj SD, Waxman SG. A sodium channel mutation linked to epilepsy increases ramp and persistent current of Nav1.3 and induces hyperexcitability in hippocampal neurons. *Exp Neurol.* 2010; 224 (2): 362-8.
9. Yan J, Melemedjian OK, Price TJ, Dussor G. Sensitization of dural afferents underlies migraine-related behavior following meningeal application of interleukin-6 (IL-6). *Mol Pain.* 2012; 8: 6.
10. Ku WH, Schneider SP. Multiple T-type Ca<sup>2+</sup> current subtypes in electrophysiologically characterized hamster dorsal horn neurons: possible role in spinal sensory integration. *J Neurophysiol.* 2011; 106 (5): 2486-98.
11. Miao X, Meng X, Wu G, Ju Z, Zhang HH, Hu S, Xu GY. Upregulation of cystathionine-beta-synthetase expression contributes to inflammatory pain in rat temporomandibular joint. *Mol Pain.* 2014; 10 (1): 9.
12. Locatelli F, Botta L, Prestori F, Masetto S, D'Angelo E. Late-onset bursts evoked by mossy fibre bundle stimulation in unipolar brush cells: evidence for the involvement of H- and TRP-currents. *J Physiol.* 2013; 591 (Pt 4): 899-918.
13. Cains S, Blomeley CP, Bracci E. Serotonin inhibits low-threshold spike interneurons in the striatum. *J Physiol.* 2012; 590 (Pt 10): 2241-52.
14. Chen QH, Andrade MA, Calderon AS, Toney GM. Hypertension induced by angiotensin II and a high salt



- diet involves reduced SK current and increased excitability of RVLN projecting PVN neurons. *J Neurophysiol.* 2010; 104 (5): 2329-37.
15. Zhao ML, Wu CF. Alterations in frequency coding and activity dependence of excitability in cultured neurons of *Drosophila* memory mutants. *J Neurosci.* 1997; 17 (6): 2187-99.
  16. Druckmann S, Berger TK, Schurmann F, Hill S, Markram H, Segev I. Effective stimuli for constructing reliable neuron models. *PLoS Comput Biol.* 2011; 7 (8): e1002133.
  17. Jung SC, Hoffman DA. Biphasic somatic A-type K channel downregulation mediates intrinsic plasticity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *PLoS One.* 2009; 4 (8): e6549.
  18. Chen QH, Toney GM. Excitability of paraventricular nucleus neurones that project to the rostral ventrolateral medulla is regulated by small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *J Physiol.* 2009; 587 (Pt 17): 4235-47.
  19. Huang J, Yang Y, Zhao P, Gerrits MM, Hoeijmakers JG, Bekelaar K, Merkies IS, Faber CG, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Small-fiber neuropathy Nav1.8 mutation shifts activation to hyperpolarized potentials and increases excitability of dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 2013; 33 (35): 14087-97.
  20. Feng B, Strichartz G. Endothelin-1 raises excitability and reduces potassium currents in sensory neurons. *Brain Res Bull.* 2009; 79 (6): 345-50.
  21. Lang PM, Hilmer VB, Grafe P. Differential contribution of sodium channel subtypes to action potential generation in unmyelinated human C-type nerve fibers. *Anesthesiology.* 2007; 107 (3): 495-501.
  22. Grundken C, Hanske J, Wengel S, Reuter W, Abdulazim A, Shestopalov VI, Dermietzel R, Zoidl G, Prochnow N. Unified patch clamp protocol for the characterization of Pannexin 1 channels in isolated cells and acute brain slices. *J Neurosci Methods.* 2011; 199 (1): 15-25.
  23. Yavorskii VA, Lukyanetz EA. Evoked Impulse Activity of Isolated Hippocampal Neurons in the Perforated Patch-Clamp Configuration. *Neurophysiology.* 2012; 43: 417-24.
  24. Yavorsky VA, Lukyanetz EA. Using serial tachograms to measure the evoked impulse activity of isolated hippocampal neurons. *Fiziol Zh.* 2013; 59 (5): 3-10. [Ukrainian]
  25. Yavorskii VA, Kostyuk PG, Lukyanetz EA. Accommodation properties of isolated hippocampal neurons under conditions of an experimental model of epilepsy. *Neurophysiology.* 2006; 38: 175-81.
  26. Yavorskii VA, Lukyanetz EA. Effect of lithium ions on the accommodation characteristics of neurons from the CA1 hippocampal zone. *Neurophysiology.* 2000; 32: 220-2.
  27. Yavorsky VA, Lukyanetz EA. The role of Ca ions in frequency accommodation in rat hippocampal neurones. *Ukr Biokhim Zh.* 2001; 73: 127. [Ukrainian]
  28. Yavorsky VA, Lukyanetz EA. Interspike model of neuronal impulse activity. *Fiziol Zh.* 2009; 55: 135. [Ukrainian].
  29. Yavorsky VA, Lukyanetz EA. Pilocarpine-induced epileptiform activity of isolated CA1 hippocampal neurons. *Neurophysiology.* 1997; 29: 162-7.

*Матеріал надійшов  
до редакції 15.09.2013*

# Роль сірководню у регуляції кровообігу в печінці

П.І. Янчук, Л.О. Слободяник

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; E-mail: yanpuk49@ukr.net

*У гострих дослідях на лабораторних щурах показано, що внутрішньопортальне введення попередника синтезу сірководню L-цистеїну (15 мг/кг) розширює внутрішньопечінкові судини, внаслідок чого системний артеріальний тиск (САТ) і тиск крові у ворітній вені (Твв) вірогідно знижуються на 17,6 і 24,5% відповідно, а швидкість локального кровотоку в печінці (ЛК) та її кровонаповнення (КНП) збільшуються на 28,2 і 24,4% відповідно. При введенні донора сірководню NaHS (7 мг/кг) спостерігались аналогічні за напрямком зміни: САТ і Твв знижувались на 20,8 і 26,2% відповідно, а ЛК і КНП підвищувались на 16,4 та 30,9% відповідно. Введення L-цистеїну на фоні дії блокатора цистатіонін-γ-ліази DL-пропаргілгіцину (11 мг/кг) призводило до підвищення САТ на 20,4%, Твв на 26,6% та зменшення КНП на 21,5% і ЛК в печінці на 11,7% порівняно з вихідними значеннями цих показників. Отже, блокада цистатіонін-γ-ліази не тільки повністю усуває ефекти L-цистеїну, але й зумовлює пригнічення синтезу H<sub>2</sub>S з ендогенних його попередників, що призводить до звуження кровоносних судин печінки і, як наслідок, до підвищення тиску крові в них та зменшення швидкості тканинного кровотоку і об'єму депонованої в органі крові.*

*Ключові слова: сірководень; L-цистеїн; NaHS; печінка; тканинний кровотік; кровонаповнення; портальний тиск.*

## ВСТУП

Впродовж останніх років актуальним є питання щодо ролі газових трансмітерів сірководню (H<sub>2</sub>S), монооксиду азоту (NO) та монооксиду вуглецю (CO) у регуляції функцій організму. Спільним для цих трьох посередників є те, що вони мають унікальні фізико-хімічні властивості та виявляють свою біологічну активність механізмами, які принципово відрізняються від інших сигнальних молекул. Вони здатні легко проникати через клітинні мембрани, взаємодія з внутрішньоклітинними білками здійснюється без участі рецепторів, локалізованих на поверхні клітин, утворення їх реалізується за обов'язкової участі ферментів [1].

Шведським хіміком Карлом Вільгельмом Шееле було вперше синтезовано і описано молекулу H<sub>2</sub>S у 1777 р. [2]. Але особливого значення дослідження його впливу на функціонування організму набули лише в останні

роки [3]. Біологічні ефекти H<sub>2</sub>S пов'язані з регуляцією серцево-судинної, імунної, ендокринної, видільної, сенсорної та нервової систем [4–8]. Однак однією з найважливіших властивостей сірководню є його потужна судинорозширювальна дія [9, 10].

Ендогенний синтез H<sub>2</sub>S відбувається з амінокислоти L-цистеїну, яка може надходити до організму разом з продуктами харчування або утворюватися під час розпаду білків і синтезуватися з L-метіоніну в процесі транссульфування. Існують два головних шляхи катаболізму L-цистеїну. Одним з них є окиснення SH-групи діоксигеназою цистеїну з утворенням цистеїн-сульфінату, який потім може за допомогою декарбоксілювання перетворитися на гіпотаурин або на піруват і сульфід. Другий шлях полягає у видаленні атома сірки з цієї амінокислоти та без її окиснення утворює молекулу сірководню. Каталіз цих процесів здійснюється за допомогою піридоксаль-5'-фосфатзалежних

ферментів – цистатіонін- $\beta$ -синтази (CBS) та цистатіонін- $\gamma$ -ліази (CSE) [1]. За механізмом синтезу сірководню CSE відрізняється від CBS тим, що у першому випадку цистеїн перетворюється в тіоцистеїн, піруват і амоній [11, 12]. А в результаті нефементативного розпаду тіоцистеїну утворюється L-цистеїн та  $H_2S$ . Інший шлях за участю CBS відбувається при конденсації цистеїну з гомоцистеїном, синтезуючи цистатіонін з вивільненням сірководню. Варто зазначити, що ці ферменти поширені в тканинах організму. Проте переважна більшість CBS зосереджена в центральній нервовій системі, а CSE – в серцево-судинній. У деяких органах, наприклад в печінці та нирках, виявлено обидва типи ферментів. Експериментально підтверджено, що порушення синтезу ензимів у печінці, викликає розвиток фіброзу, стеатозу, гіпергомоцистенемії та зміни у регуляції генів, які відповідають за синтез ліпідів залозою [13]. CSE експресується гепатоцитами та зірчастими клітинами печінки [14]. Впливаючи на зірчасті клітини,  $H_2S$  викликає розширення мікросудин в органі. При цирозі печінки, індукованому перетисканням жовчної протоки, експресія CSE пригнічується, знижуючи кількість продукованого сірководню в плазмі крові щурів [15]. Донор сірководню NaHS зумовлює зменшення синтезу жовчі та екскрецію бікарбонатів залозою, тоді як за умов блокади CSE спостерігається протилежний ефект [16].

Незважаючи на поодинокі праці стосовно впливу сірководню на функціонування печінки [17], дія  $H_2S$  на її судинне русло залишається майже не вивченою. Тому метою нашої роботи було дослідити участь сірководню в регуляції печінкового кровообігу у щурів.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведені за умов гострого експерименту в умовах *in vivo* на 72 білих лабораторних щурах, нащадках лінії Вістар, обох статей масою 250–350 г. Тварин нарको-

тизували внутрішньоочеревинним введенням розчину уретану (1 г/кг).

Експерименти на тваринах здійснювали відповідно до Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986), Директиви ЄЕС №609 (1986) та наказу МОЗ України №281 від 01.11.2000 р. «Про заходи щодо подальшого вдосконалення організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин».

Системний артеріальний тиск (САТ) та тиск у ворітній вені (Твв) реєстрували електроманометром ЕМТ-31, зміни кровонаповнення печінки – реографічним методом у нашій модифікації [18] за допомогою реографа РГ-4-01, локальний кровотік в печінці – методом кліренсу водню з електрохімічною його генерацією, використовуючи полярограф LP-9. Всі показники записували на реєстраторі Н071.6М.

У дослідженнях використовували препарати, які вводили у ворітну вену в дозах: біологічний субстрат синтезу  $H_2S$  L-цистеїн («Sigma», США) – 15 мг/кг, донор сірководню NaHS («Sigma», США) – 7 мг/кг, інгібітор синтезу  $H_2$  SDL-пропаргілгліцин («Sigma», США) – 11 мг/кг.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою аналітичного пакету Statistica 8.0, використовуючи критерій t Стьюдента для результатів, що мали нормальний розподіл, та критерій Вілкоксона, які не мали нормального розподілу. Результати представляли у вигляді  $M \pm SD$  (середнє значення  $\pm$  середньоквадратичне відхилення). Відмінності між групами вважали вірогідними при рівні значущості  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив ендогенного сірководню на кровообіг в печінці вивчали, використовуючи попередник його синтезу L-цистеїн. Вихідні зна-

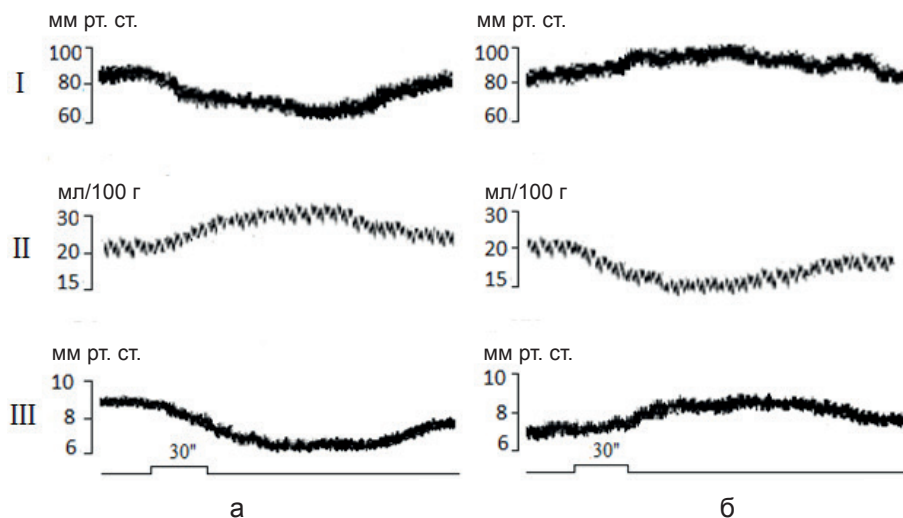
чення досліджуваних показників кровообігу у щурів становили: САТ –  $85,7 \pm 7,3$  мм рт. ст., Твв –  $9,0 \pm 3,1$  мм рт. ст., КНП –  $20,5 \pm 2,2$  мл/100г маси органа, ЛК –  $93,4 \pm 7,3$  мл·хв<sup>-1</sup>·100г. За умов введення L-цистеїну САТ і Твв знижувались на 17,6 і 24,5% (P<0,001) відповідно, а КНП та ЛК у печінці збільшувалися на 28,2 та 24,4% (P<0,001) відповідно (рисунок, табл.1).

Аналогічні зміни показників печінкової гемодинаміки спостерігались і під впливом екзогенного сірководню, для чого ми застосували донор сірководню гідросульфід натрію, який у розчині частково дисоціює

з утворенням Na<sup>+</sup> і HS<sup>-</sup>, і надалі – H<sub>2</sub>S. При введенні NaHS вірогідно знижувались САТ і Твв на 20,8 і 26,2% відповідно, а КНП і ЛК підвищувались на 30,9 та 16,4% відповідно (табл. 2).

Отримані нами результати свідчать про те, що як попередник ендогенного синтезу сірководню L-цистеїн, так і його донор NaHS викликають розширення кровоносних судини печінки, внаслідок чого тиск крові в них знижується, а швидкість тканинного кровотоку в органі та його кровонаповнення збільшуються.

Однак кровоносні судини печінки на відміну від переважної більшості інших судин



Вплив внутрішньопортального введення L-цистеїну (15 мг/кг) на системний артеріальний тиск (I), кровонаповнення печінки (II) і тиск у ворітній вені (III) щурів до (а) та після (б) введення DL-пропаргілгліцину (11мг/кг). Примітка: внизу відмітка введення препарату

**Таблиця 1. Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв), кровонаповнення печінки (КНП) та локального кровотоку (ЛК) у печінці щурів при внутрішньопортальному введенні L-цистеїну до та на фоні дії DL- пропаргілгліцину (M±SD, n=36)**

Показники	L-цистеїн			L-цистеїн на фоні дії DL-пропаргілгліцину		
	Вихідний рівень	Максимум реакції	Відсоток реакції від вихідного рівня	Вихідний рівень	Максимум реакції	Відсоток реакції від вихідного рівня
САТ, мм рт.ст.	85,7 ± 7,3	70,7 ± 9,7 ***	82,4	90,9 ± 7,3	107,0 ± 10,4 ***	117,7
Твв, мм рт.ст.	9,0 ± 3,1	6,8 ± 2,4 **	75,5	7,2 ± 1,7	9,6 ± 1,4 ***	133,3
КНП,мл/100 г	20,5 ± 2,2	26,3 ± 1,7 ***	128,2	19,6 ± 4,2	16,8 ± 2,1 **	85,7
ЛК,мл·хв <sup>-1</sup> ·100г	93,4 ± 7,3	116,2 ± 11,9 ***	124,4	102,7 ± 17,7	87,0 ± 11,9 ***	84,7

Примітка: тут і в табл. 2 і 3\* P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 порівнянно з вихідним рівнем

**Таблиця 2.** Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв), кровонаповнення печінки (КНП) та локального кровотоку (ЛК) у печінці щурів при внутрішньопортальному введенні NaHS ( $M \pm SD$ ,  $n=22$ )

Показники	Вихідний рівень	Максимум реакції	Відсоток реакції від вихідного рівня
САТ, мм рт.ст.	102,8 $\pm$ 10,6	81,5 $\pm$ 7,8*	79,2
Твв, мм рт.ст.	8,8 $\pm$ 1,3	6,5 $\pm$ 2,1**	75,5
КНП, мл/100 г	22,0 $\pm$ 2,2	28,8 $\pm$ 2,3*	130,9
ЛК, мл $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ 100г	75,8 $\pm$ 5,9	88,3 $\pm$ 10,6**	116,4

організму мають певні особливості реагування на дію вазоактивних факторів. Так, ворітні (пресинусоїдні) та венозні (постсинусоїдні) судини органа відповідають звуженням на дію такого типового вазодилатора, як ацетилхолін [19–21]. Нами було показано, що він, звужуючи венозні судини печінки, викликає мобілізацію крові із органа, і розширює сфінктери печінкових вен (ПВ), сприяючи посиленню відтоку депонованої в органі крові. Констрикторні реакції венозних судин печінки на дію ацетилхоліну реалізуються активацією М-холінорецепторів ендотеліоцитів з подальшим залученням посередника, ймовірно, норадреналіну, який активує  $\alpha$ -адренорецептори на гладеньком'язових клітинах (ГМК) цих судин. Розслаблення сфінктерів ПВ здійснюється завдяки виділенню в стінках судин під впливом ацетилхоліну посередника, можливо, адреналіну, який, у свою чергу, активує  $\beta$ -адренорецептори на ГМК ПВ. До останніх реакцій, на нашу думку, може бути частково залучений і монооксид азоту [21].

Як зазначалося вище, ендогенний синтез сірководню у серцево-судинній системі відбувається з амінокислоти L-цистеїну переважно за участю ферменту цистатіонін-

$\gamma$ -ліази. До речі, мРНК CSE виявлено в ендотелії судин і зірчастих клітинах печінки [15]. Не виключається і безпосередній вплив L-цистеїну на тонус ГМК ворітних судин печінки, без перетворення на сірководень [7]. Тому ми вирішили дослідити дію цієї амінокислоти на печінкову гемодинаміку за умов дії селективного інгібітора цистатіонін- $\gamma$ -ліази DL-пропаргілгліцину.

Введення DL-пропаргілгліцину зумовлювало вірогідні зміни досліджуваних показників: підвищення САТ на 17,7% і Твв на 33,3% та зменшення КНП на 14,3% і ЛК на 15,3% у печінці відносно вихідного рівня (табл. 3).

Така реакція судин кровоносного русла печінки свідчить про те, що DL-пропаргілгліцин заблокував дію ферменту CSE, завдяки чому пригнічувався ендогенний синтез сірководню з його попередників, що знаходяться в крові. Внаслідок цього внутрішньопечінкові судини звужилися, що і призвело до підвищення в них тиску і зменшення швидкості тканинного кровотоку в печінці та об'єму депонованої в ній крові.

Введення L-цистеїну на фоні дії DL-пропаргілгліцину призводило до підвищення

**Таблиця 3.** Зміни системного артеріального тиску (САТ), тиску у ворітній вені (Твв), кровонаповнення печінки (КНП) та локального кровотоку в ній (ЛК) при внутрішньопортальному введенні DL-пропаргілгліцину; ( $M \pm SD$ ,  $n=14$ )

Показники	Вихідний рівень	Максимум реакції	Відсоток реакції від вихідного рівня
САТ, мм рт.ст.	90,9 $\pm$ 7,3	107,0 $\pm$ 10,4***	117,7
Твв, мм рт.ст.	7,2 $\pm$ 1,7	9,6 $\pm$ 1,4***	133,3
КНП, мл/100 г	19,6 $\pm$ 4,2	16,8 $\pm$ 2,1**	85,7
ЛК, мл $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ 100г	102,7 $\pm$ 17,7	87,0 $\pm$ 11,9***	84,7



САТ на 20,4% ( $P < 0,05$ ), Твв на 26,6% ( $P < 0,01$ ) та зменшення КНП і ЛК на 21,5 і 11,7% відповідно ( $P < 0,01$ ) порівняно з вихідними значеннями цих показників (див. табл.1).

Усунення реакцій у судинному руслі печінки на дію L-цистеїну за умов попереднього введення DL-пропаргілгліцину вказує на те, що ініціюються ці вазодилаторні ефекти сірководнем, який синтезується кровоносними судинами як із введеного ззовні L-цистеїну, так і з попередників  $H_2S$ , що циркулюють у кровоносній системі.

Свій вазодилаторний ефект на ворітні судини печінки  $H_2S$  може здійснювати за рахунок активації АТФ-чутливих калієвих каналів ( $K_{ATP}$ -каналів) [7]. Головним ефектом дії цієї молекули є гіперполяризація – феномен, який не пов'язаний з активацією гуанілатциклази [22]. Сірководень, впливаючи на калієві канали, які чутливі до концентрації аденозинтрифосфату (АТФ), викликає гіперполяризацію мембран ГМК [23, 24]. Причому зв'язування  $H_2S$  з сірковмісними групами білків цих каналів, викликає зміни в їх просторовій конфігурації [25], що призводить до посиленого виходу іонів калію з клітини в міжклітинний простір. Водночас активація  $K_{ATP}$ -каналів супроводжується пригніченням потенціалчутливих кальцієвих каналів L-типу, котрі забезпечують надходження іонів кальцію всередину клітини. Висока внутрішньоклітинна концентрація кальцію є необхідною умовою розвитку скорочення ГМК. Закриття цих каналів спричиняє зменшення концентрації вільного внутрішньоклітинного кальцію [9]. Тому інгібування потенціалзалежних кальцієвих каналів викликає зниження внутрішньоклітинної концентрації кальцію та розслаблення судин.

Отже, сірководень відіграє важливу роль у контролі як печінкового кровообігу, що показано нашими дослідженнями, так і в регуляції гемодинаміки інших судинних регіонів організму, про що свідчать дані Semenikhina та співавт. [7]. Порушення

рівноваги синтезу цього газового трансмітера, ймовірно, викликають виникнення та розвиток патологічних процесів у серцево-судинній системі, зокрема такого важкого захворювання, як портальна гіпертензія. Завдяки своїм фізіологічним властивостям сірководень може бути застосований для корекції зрушень функціонування та захисту кардіоваскулярної системи від пошкоджень при різних її захворюваннях.

## ВИСНОВКИ

1. Як ендогенний, так і екзогенний сірководень бере активну участь у регуляції кровообігу в печінці, свідченням чому є розширення внутрішньопечінкових судин, зумовлене внутрішньопортальним введенням попередника синтезу  $H_2S$  L-цистеїну (15 мг/кг) та його донора NaHS (7 мг/кг), внаслідок чого тиск крові в судинах знижується, а швидкість тканинного кровотоку в органі та його кровонаповнення збільшуються.

2. Блокада цистатіонін- $\gamma$ -ліази за допомогою DL-пропаргілгліцину (11 мг/кг) не тільки повністю усуває ефекти L-цистеїну, але й зумовлює пригнічення синтезу  $H_2S$  з ендогенних його попередників, що призводить до звуження кровоносних судин печінки і, як наслідок, до підвищення тиску крові в них та зменшення швидкості тканинного кровотоку і об'єму депонованої в органі крові.

**П.И. Янчук, Л.А. Слободяник**

## РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ КРОВООБРАЩЕНИЯ В ПЕЧЕНИ

В острых опытах на лабораторных крысах показано, что внутриворотальное введение предшественника синтеза сероводорода L-цистеина (15 мг/кг) расширяет внутриворотальные сосуды, вследствие чего системное артериальное давление (САД) и давление крови в воротной вене (Двв) достоверно понижаются на 17,6 и 24,5% соответственно, а скорость локального кровотока в печени (ЛК) и ее кровенаполнение (КНП) увеличиваются на 28,2 и 24,4% соответственно. При введении донора сероводорода NaHS (7 мг/кг) наблюдались аналогичные изменения: САД и Двв понижались на 20,8 и 26,2% соответственно, а ЛК и КНП повышались на 16,4 и 30,9%



соответственно. Введение L-цистеина на фоне действия блокатора цистатионин-γ-лиазы DL-пропаргилглицина (11 мг/кг) приводило к повышению САД на 20,4%, Двв на 26,6% и уменьшению КНП на 21,5% и ЛК в печени на 11,7% в сравнении с исходными значениями этих показателей. Таким образом, блокирование цистатионин-γ-лиазы не только полностью устраняет эффекты L-цистеина, но и вызывает угнетение синтеза H<sub>2</sub>S из эндогенных его предшественников, что приводит к сужению кровеносных сосудов печени и, как следствие, к повышению давления крови в них и уменьшению скорости тканевого кровотока и объема депонированной в органе крови.

Ключевые слова: сероводород; L-цистеин; NaHS; печень; тканевой кровоток; кровенаполнение; портальное давление.

**P.I. Yanchuk, L. A. Slobodianyuk**

### THE ROLE OF HYDROGEN SULFIDE IN REGULATION OF CIRCULATION BLOOD LIVER

It was shown in acute experiments on laboratory rats that intraportal injection of hydrogen sulfide's precursor L-cysteine (15 mg/kg) caused dilatation of the intrahepatic vessels. As a result, systemic blood pressure (SBP) and blood pressure in the portal vein (PVP) significantly decreased on 17,6 and 24,5%, respectively, and the rate of local blood flow in the liver (LF) and its blood filling (BF) increased on 28,2 and 24,4% respectively. Application of hydrogen sulfide donor NaHS (7 mg/kg) resulted in similarly directed changes: SBP and PVP decreased on 20,8% and 26,2% respectively, LF and BF increased on 16,4% and 30,9% respectively. Application of L-cysteine in the conditions of cystathionine-gamma-lyase blockade by DL-proprargyllitsyn led to an increase in SBP on 20,4% and PVP on 26,6% and a decrease of BF on 21,5% and LF in the liver on 11,7% comparing with baseline values of these parameters. So, blockade of cystathionine-gamma-lyase not only completely removed the effects of L-cysteine, but also inhibited synthesis of H<sub>2</sub>S from its endogenous predecessors, which led to vasoconstriction of liver's blood vessels and, consequently, to an increase of blood pressure and a decrease of liver blood flow rate and volume of blood deposited in liver.

Key words: hydrogen sulfide; L-cysteine; NaHS; liver; blood filling; portal pressure.

*Taras Shevchenko National University of Kyiv*

### REFERENCES

1. Wang R. Hydrogen sulfide: the third gas transmitter in biology and medicine. *Antioxidants Redox Signal*. 2010; 12(9):1061-7.
2. Moataz M. Hydrogen sulfide as a gas transmitter. *J Neurochem*. 2010; 113:14-26.
3. Carsten AW. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator. *J Nephrol*. 2009; 22:173-6.
4. Han Y, Qin J, Chang X, Yang Zetal. Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats. *Neurosci Res*. 2005; 53:216-9.
5. Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *J Appl Physiol*. 2007; 102:261-8.
6. Dawe GS, Han SP, Bian JS, Moore PK. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience*. 2008; 152:169-77.
7. Semenykhina OM, Bazilyuk OV, Korkach YP, Sagach VF. Mechanisms of hydrogen sulfide effects on contractile activity of vascular smooth muscle in rats. *FiziolZh*. 2011; 57(4):3-12 [Ukrainian].
8. Goshovska YV, Shimanskaya TV, Semenykhina OM, Sagach VF. The effects of donor hydrogen sulfide in cardioprotection. *FiziolZh*. 2012; 6:3-15 [Ukrainian].
9. Xiao Yu Tiana, Wing Tak Wonga et al. NaHS relaxes rat cerebral artery in vitro via inhibition of L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel. *Pharmacol Research*. 2012; 65:239-46.
10. Sun Yan, Tang Chao-shu, Du Jun-bao and JIN Hong-fang. Hydrogen sulfide and vascular relaxation. *Chin Med J*. 2011; 124(22):3816-9.
11. Adrienne L, King AL, Lefer DJ. Cytoprotective actions of hydrogen sulfide in ischaemia-reperfusion injury. *Exp Physiol*. 2011; 96(9):840-6.
12. Renga B. Hydrogen sulfide generation in mammals: the molecular biology of cystathionine-beta-synthase (CBS) and cystathionine-gamma-lyase (CSE). *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011; 10:85-91.
13. Robert K, Nehme J, Bourdon E. et al. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology*. 2005; 128:1405-15.
14. Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology*. 2006; 131:259-71.
15. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E. et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology*. 2005; 129:1210-24.
16. Fujii K, Sakuragawa T, Kashiba M. et al. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of biliary bicarbonate excretion in the rat liver. *Antioxid. Redox Signal*. 2005; 7:788-794.
17. Sarathi Mania, Wei C. et al. Hydrogen sulfide and the liver. *Nitric Oxide*. 2014; 10:1006-16.
18. Tsybenko VA, Yanchuk PI, Simonenko PN. Application of acute experiments the impedance plethysmography to study liver depositing function. *Fiziol Zh*. 1984; 30(6):756-8 [Russian].
19. Reilly FD, Dimlich RV, Cilento EV, McCuskey RS. Hepatic Microvascular regulatory mechanisms. II. Cholinergic mechanisms. *Hepatology*. 1982; 2(2):230-5.
20. Yanchuk PI, Pasichnichenko OM, Komarenko VI,

- Prikhodko TP, Tsybenko VO. Elucidating mechanisms of acetylcholine constrictor action on the portal vessels. *FiziolZh.* 2006; 52(5):28-33.
21. Yanchuk P, Prikhodko T, Pasichnichenko O, Terekhov A, Tsybenko V. Mechanisms of Contractile Action of Acetylcholine on Hepatic Vein. *Fiziol Zh.* 2011; 57(1):21-26.
22. Melnyk AB, Voloschuk NO, NOPentyuk, Zaichko KO. The role of hydrogen sulphide and aminoacids sulfur-containing in regulation tone of vascular smooth muscle wall the rats. *Neurophysiology.* 2010; 42(2):126-31 [Ukrainian].
23. JangG, WuL, LiangW, WangR. Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 2005; 68:1757-64.
24. Wai San Cheanga, Wing Tak Wonga, Bing Shenetal. 4-Aminopyridine-sensitive K<sup>+</sup>channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery. *Vascular Pharmacology.* 2010; 53:94-98.
25. Resnick NL. The third gas. *Chemistry and life.* 2009; 10:40-46 [Russian].

*Матеріал надійшов  
до редакції 03.02.2015*

# Вплив нормобаричної гіпоксії на показники зовнішнього дихання дітей, які мешкають на радіоактивно забруднених територіях

<sup>1</sup>В.Я Березовський, <sup>1</sup>Л.М. Лісуха, <sup>2</sup>Є.І. Степанова, <sup>2</sup>І.Є. Колпаков

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, E-mail: lisukha\_lyubov@inbox.ru;

<sup>2</sup>ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України, Київ.

*Досліджено вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії (ПНГ) саногенного рівня на дітей, які мешкають на радіоактивно забруднених територіях. Обстежено 106 дітей віком від 6 до 17 років з ознаками бронхоспазму: 55 осіб основної та 51 – контрольної групи. Показано, що після курсу сеансів ПНГ (12 % кисню в азоті) змінюється стан дихальної системи. Встановлено, що у основній групі вірогідно збільшилися показники вентиляційної спроможності легенів: життєвої ємності легенів, бронхіальної прохідності проксимальних бронхів великого та середнього діаметра, та дистальних бронхів малого діаметра. Частково або повністю усувався бронхоспазм. Вірогідно подовжувався час затримки дихання на вдиху (проба Штанге), знижувалася частота серцевих скорочень порівняно з контрольною групою.*

*Ключові слова: переривчаста нормобарична гіпоксія; бронхоспазм; радіоактивно забруднені території.*

## ВСТУП

Відомо, що дихання повітрям зі зниженим парціальним тиском кисню здійснює позитивний ефект на дітей з гіперреактивністю бронхів. Однією з перших реакцій на дію переривчастої нормобаричної гіпоксії (ПНГ) – збільшення хвилинного об'єму дихання. Існує достатньо літературних даних щодо застосування ПНГ у дітей з патологією бронхолегеневої системи [1 – 4]. Дослідження у них функції дихання і гемодинаміки свідчать про поліпшення прохідності бронхів, підвищення альвеолярної вентиляції, зменшення гіпоксемії і гіпоксії міокарда, збалансування роботи обох відділів вегетативної нервової системи. Більшість дослідників відмічають високу ефективність дії ПНГ на розслаблення гладеньких м'язів бронхіол і кровоносних судин та усунення проявів бронхоспазму [5 – 10].

Дитяча популяція є найбільш вразливою до несприятливих екологічних факторів.

© В.Я Березовський, Л.М. Лісуха, Є.І. Степанова, І.Є. Колпаков

Їх анатоμο-фізіологічні особливості характеризуються тим, що інтенсивність як повітро-, так і водообміну істотно вище. Низький зріст дітей зумовлює відносно більший контакт з хатнім та вуличним пилом, ґрунтовим забрудненням. Висока фізична активність, інтенсивне споживання кисню, високий хвилинний об'єм дихання та значна інтенсивність обмінних реакцій організму на фоні незрілості імунної та ендокринної систем, створюють напруження фізіологічної регуляції зовнішнього дихання, систем кисневого постачання тканин, серцево-судинної системи [11 – 14].

Актуальність теми зумовлена тим, що у структурі поширеності захворювання органів дихання у дітей, що потерпіли від Чорнобильської катастрофи, займають перше місце. У 2013 р. частота цієї патології серед усього дитячого населення України у віці від 0 до 17 років становила 58 % [16].

Метою нашого дослідження було вивчити

вплив дозованої нормобаричної гіпоксії са-ногенного рівня на показники зовнішнього дихання дітей, що постійно мешкають на радіоактивно забруднених територіях.

## МЕТОДИКА

Обстежено 106 дітей, які знаходилися на стаціонарному лікуванні в клініці ДУ «Національного наукового центру радіаційної медицини НАМНУ». До контрольної групи ввійшла 51 дитина: 26 з бронхоспазмом без інших проявів патології органів дихання та 25 з клінічними ознаками патології органів дихання. До основної групи ввійшло 55 осіб: 28 з бронхоспазмом без інших проявів патології органів дихання і 27 з клінічними ознаками патології бронхолегеневої системи. Зважаючи на те, що в кожену групу входили діти віком від 6 до 17 років, ми окремо аналізували показники дітей молодшого шкільного віку (6 – 11 років) та старшого шкільного віку (12 – 17 років).

Території проживання дітей основної та контрольної групи належать до 2-ї зони (зона – обов'язкового відселення – територія зі щільністю забруднення ізотопами  $^{137}\text{Cs}$  (цезію) понад  $555\text{кБк/м}^2$ ), 3-ї зони (зона – гарантованого добровільного відселення – територія зі щільністю забруднення ізотопами  $^{137}\text{Cs}$  від 185 до  $555\text{кБк/м}^2$ ) та 4-ї зони (зона посиленого радіоекологічного контролю – територія зі щільністю забруднення ізотопами  $^{137}\text{Cs}$  від 37 до  $185\text{кБк/м}^2$  [17]. Вміст  $^{137}\text{Cs}$  в організмі дітей варіював від 269 до 6253 Бк у тілі.

Дослідження вентиляційної спроможності легенів проводили за допомогою пневмотахометра автоматизованого ПТА-1 вітчизняного виробництва. Визначали: форсовану життєву ємність легень (ФЖЄЛ); пікову об'ємну швидкість видиху (ПОШ); об'ємні швидкості видиху відповідно рівням 25, 50, 75 %; об'єм форсованого видиху за першу секунду (ОВФ<sub>1</sub>); індекс Тиффно (ОВФ<sub>1</sub>/ЖЄЛ %). Аналіз цих показників проводили у

відсотках від належних [15]. Для виявлення бронхіальної гіперреактивності (прихованого та неприхованого бронхоспазму) використовували фармакологічну інгаляційну пробу з бронхорозширювальним препаратом – сальбутамол (salbutamol). Цей препарат є адренергічним бронходилататором, який стимулює  $\beta_2$ -адренорецептори легенів, що призводить до розслаблення гладеньких м'язів бронхів. Тест вважався позитивним при прирості показників на 12 % і більше порівняно з початковими значеннями. Дослідження динаміки функціонального стану оцінювали відповідно до проби з затримкою дихання на вдиху (проби Штанге); частоти серцевих скорочень (ЧСС); частоти дихання (ЧД).

Пацієнти основної групи з патологією органів дихання отримували комбіноване лікування, тобто медикаментозне згідно з протоколами при захворюваннях бронхолегеневої системи та сеанси ПНГ. Діти без клінічних симптомів патології органів дихання ніяких фармакологічних засобів для усунення бронхоспазму не отримували. У контрольній групі застосовано лікування згідно з протоколами. При цьому діти без патології органів дихання отримували медикаментозне лікування для шлунково-кишкового тракту.

Нами застосовано нормобаричну гіпоксичну газову суміш, що складалася із 12 % кисню і 88 % азоту. Сеанси ПНГ проводили один раз на добу і підбирали індивідуально для кожної дитини. В основному використовували базовий курс: кожен сеанс складався із трьох циклів дихання у проміжках між якими пацієнт дихав атмосферним повітрям. Курс лікування в середньому був від 7 до 14 сеансів. У кожному сеансі ПНГ період деоксигенації тривав 15 – 20 хв, а період реоксигенації 7 – 10 хв. Загальна тривалість деоксигенації одного сеансу становила 45 – 60 хв. ПНГ проводили за допомогою індивідуального апарата гірського повітря типу «Борей» виробництва державного науково-дослідного медико-інженерного центру «НОРТ» НАН України (Київ). Принцип дії апарата полягає в

сепарації складових атмосферного повітря за допомогою молекулярних сит. Газову суміш подавали під прозорий шолом (блістер), який опускали на голову пацієнта до контакту з плечовим поясом.

Для визначення індивідуальної чутливості до гіпоксії перед початком лікування здійснювали пробний сеанс дихання гіпоксичною газовою сумішшю. Вимірювали ЧСС, артеріальний тиск (АТ), ЧД. Парціальний тиск кисню ( $P_{O_2}$ ) газової суміші на початку сеансу становив 106 мм рт. ст. У II та III сеансах його знижували ступінчасто так, що IV і наступні сеанси відбувалися за рівня  $P_{O_2}$  76-72 мм рт. ст. Тривалість пробного сеансу була 15 хв. Його результати оцінювали за шкалою і загальним самопочуттям та підбирали індивідуальні режими проведення сеансів ПНГ [18].

Дослідження проведено з дотриманням національних норм біоетики та положень Гельсінської декларації (у редакції 2013р.) за письмовою згодою батьків хворих дітей після докладного інформування про цілі, тривалість та процедуру дослідження.

При аналізі отриманих результатів використовували методи статистичної обробки з позиції доказової медицини [19, 20], програми «Microsoft Excel» та програмного забезпечення «OriginPro 7,5» і «SPSS Statistics (Version 17)». Вірогідність відмінностей для вибірок, після перевірки на нормальність розподілу визначали за критерієм t Стьюдента. Для порівняння двох груп з сукупностей, які відрізняються від нормального розподілу, використовували непараметричний критерій Вілкоксона і Манна-Уїтні. Статистично значущими вважалися відмінності результатів при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Комбінований метод з сеансами ПНГ виявився більш ефективним у корекції бронхоспазму. У дітей без клінічних проявів захворювання органів дихання показники вентиляційної спроможності легенів стати-

стично значущі відносно контрольної групи: ФЖЄЛ – на 18 %; ПОШ – на 17 %;  $МОШ_{25}$  – 15 %;  $МОШ_{50}$  – на 20 %;  $МОШ_{75}$  – на 15, %;  $ОВФ_1$  – на 12 % (табл. 1). У більшості дітей явний чи прихований бронхоспазм на всіх рівнях бронхіального дерева було повністю усунено. Після комбінованого лікування у пацієнтів з патологією органів дихання показники вентиляційної спроможності легенів теж вірогідно збільшилися щодо контролю: ФЖЄЛ – на 5 %; ПОШ – 11,8 %;  $МОШ_{25}$  – 10 %;  $МОШ_{50}$  – 5,5 %;  $МОШ_{75}$  – 3 %;  $ОВФ_1$  – 14 % (табл. 2). Одержані нами результати дають змогу стверджувати, про підвищення прохідності бронхів у обох групах після сеансів ПНГ та усунення вентиляційних порушень. Аналіз результатів при розподілі за віком свідчить, що вентиляційна спроможність легенів при комбінованому лікуванні вірогідно збільшилася відносно вихідного рівня та контролю. У молодших пацієнтів більш значно підвищилися показники зовнішнього дихання та усунувся бронхоспазм порівняно зі старшою віковою групою (рис. 1, 2).

Згідно з літературними даними, адаптація до нормобаричної гіпоксії позитивно впливає на дітей і підлітків при захворюванні бронхолегеневої системи. Цей процес реалізується через загальний стрес-синдром. При цьому мобілізуються енергетичні і структурні ресурси організму. Нормалізуються показники функцій системи дихання, сурфактантна система легень, сатурація, імунологічна реактивність [8, 10, 21, 22]. Підвищується швидкість дифузії кисню із альвеол в кров, зменшується шунтування крові в легенях, що призводить до оксигенації крові. [8, 9].

Таким чином, для усунення бронхоспазму у дітей з соматичною патологією шлунково-кишкового тракту у період загострення, або ремісії без клінічних проявів захворювання органів дихання сеанси ПНГ можна використовувати самостійно, без фармакологічних засобів. Ступінчаста адаптація до ПНГ ліквідує його прояви. Комбінований метод лікування може бути рекомендовано в



**Таблиця 1. Зміна показників (%) вентиляційної спроможності легенів у дітей віком від 6 до 17 років основної та контрольної групи без патології органів дихання (M±m)**

Показник	Діти контрольної групи (n=26)			Діти основної групи (n=28)		
	До лікування	Після лікування	Δ, %	До сеансів переривчастої нормобаричної гіпоксії	Після комбінованого лікування з сеансами переривчастої нормобаричної гіпоксії	Δ, %
Форсована життєва ємність легенів	88,4±1,5	91,8±1,4*	+3,4	92,0±1,8	108,2±3,8*, ***	+16,2
Пікова об'ємна швидкість видиху	82,5±3,1	87,0±2,7*	+4,5	81,6±1,5	96,7±2,1*, **	+15,1
Максимальна об'ємна швидкість видиху відповідно до рівня						
25 %	92,5±92,5	97,5±3,4*	+5,0	92,7±1,5	107,5±2,2*, **	+14,8
50 %	93,0±5,0	101,9±3,9*	+8,9	100,0±3,1	120,4±3,9*, ***	+20,4
75 %	109,0±5,7	119,0±5,8*	+10	117,8±6,0	135,8±6,4*, **	+18,0
Об'єм форсованого видиху за першу секунду	91,3±1,9	93,0±1,5	+1,7	96,4±1,9	107,4±2,5*, ***	+11,0

Примітка: тут і в табл.2: \*P<0,05 вірогідність різниці в групах після лікування, за критерієм Вілкоксона  
 \*\*\*P<0,001; \*\*P <0,05 - вірогідність різниці показників після лікуванням відносно контрольної групи за критерієм Манна-Уїтні.

**Таблиця 2. Зміна показників (%) вентиляційної спроможності легенів у дітей віком від 6 до 17 років основної та контрольної групи з патологією органів дихання (M±m)**

Показник	Діти контрольної групи (n=25)			Діти основної групи (n=27)		
	До лікування	Після лікування	Δ, %	До сеансів переривчастої нормобаричної гіпоксії	Після комбінованого лікування з сеансами переривчастої нормобаричної гіпоксії	Δ, %
Форсована життєва ємність легенів	85,1±3,4	94,8±5,2*	+9,7	86,1±1,7	99,8±1,6*, **	+13,7
Пікова об'ємна швидкість видиху	64,4±3,6	75,5±3,0*	+11,1	68,8±3,0	88,6±3,3*, **	+19,8
Максимальна об'ємна швидкість видиху відповідно до рівня						
25 %	64,4±4,1	78,0±3,0*	+13,6	69,4±4,8	90,9±3,9*, **	+21,5
50 %	66,0±4,2	83,0±2,9*	+17	79,7±6,8	105,0±7,0*, **	+25,1
75 %	69,0±4,0	87,2±3,2*	+18,2	93,8±10,0	120,6±8,7*, **	+26,8
Об'єм форсованого видиху за першу секунду (FEV <sub>1</sub> %)	77,0±4,1	87,9±3,0*	+10,9	84,1±3,2	97,1±2,8*	+13,0

період гострого перебігу захворювання або при загостренні хронічної патології органів дихання у дітей, що проживають на радіоактивно забруднених територіях.

ЧД у пацієнтів як основної, так і контрольної груп без клінічних симптомів патології органів дихання була в межах вікової норми. У 48 % дітей контрольної групи з патологією органів дихання цей показник був вищим від норми. При виписуванні зі стаціонару ЧД мала тенденцію до зниження з  $23,4 \pm 0,8$  до  $21,2 \pm 0,4$  хв<sup>-1</sup> (на 10 %), але у

28 % реєстрували відхилення. У основній групі реєстрували підвищення ЧД у 37 %. Після комбінованого лікування ЧД вірогідно зменшилася з  $22,3 \pm 0,5$  до  $18,5 \pm 0,4$  хв<sup>-1</sup>, тобто на 17 %, а у порівнянні з контролем – на 21 %. Це свідчить про посилення альвеолярної вентиляції та зменшення функціонального мертвого простору. Як показали спеціальні дослідження [1, 8] такі зміни поліпшують вентиляційно-перфузійних співвідношення та підвищують транспорт кисню через аерогематичний бар'єр [ 9].

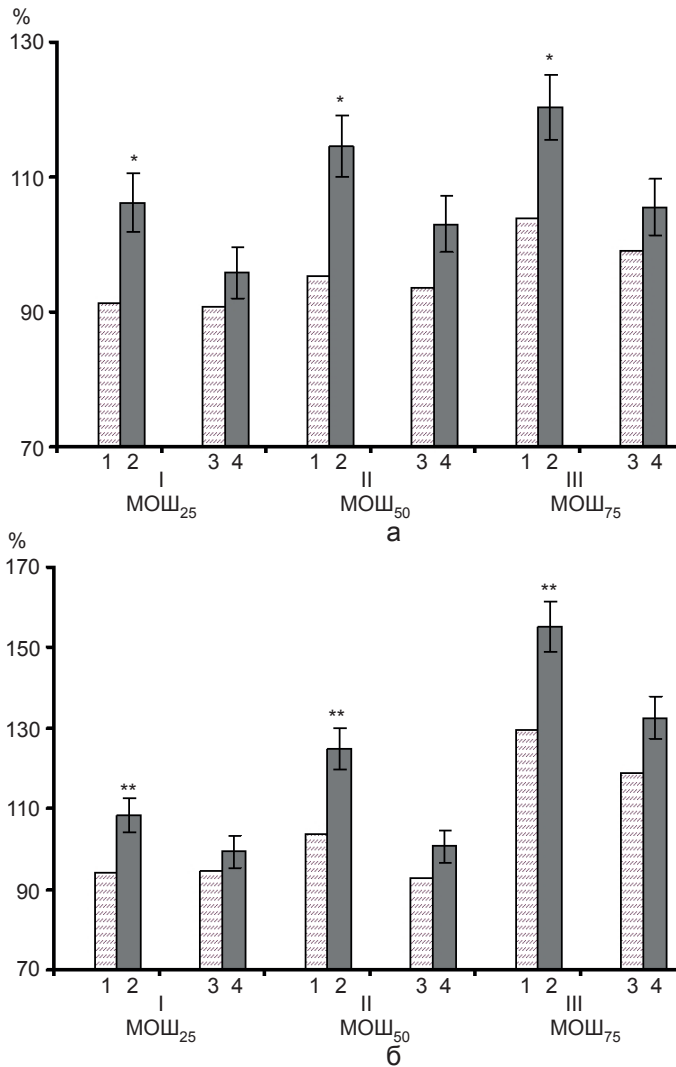


Рис 1. Зміна прохідності бронхів на всіх рівнях бронхіального дерева без клінічних симптомів патології органів дихання до (1) і після комбінованого лікування з сеансами переривчастої нормобаричної гіпоксії (2) та до (3) і після медикаментозного лікування (4) у дітей 6-11 (а) років основної (I, n=12) та контрольної (II, n=16) груп та 12-17 (б) років основної (n=13) та контрольної (n=13). МОШ – об'ємні швидкості видиху відповідно до рівнів 25, 50, 75%. \*P<0,05; \*\*P<0,001

Інформативно значущими були зміни проби Штанге. У дітей без клінічних симптомів патології органів дихання (контрольна група) вихідні значення затримки дихання на вдиху –  $29,0 \pm 1,6$  с. Відхилення від вікових нормативів [23] реєстрували у 88 %. У основній групі до сеансів ПНГ цей показник –  $32,5 \pm 2,3$  с, зниження спостерігали у 71 %. Після застосування медикаментозного лікування відхилення залишалися у 61,5 %. Використання комбінованого методу свідчить, що показники проби Штанге нормалізувалися, а

щодо контролю збільшилися на 41 % .

У контрольній групі з патологією органів дихання значення проби Штанге –  $24,6 \pm 1,8$  с, відхилення від норми – у 92 %. У дітей основної групи –  $24,3 \pm 1,5$  с, при цьому зниження – 81,5 %. Застосування медикаментозного лікування показало, що у 68 % показники нижчі від норми. Комбінований метод виявився більш ефективним. Проба Штанге у дітей з патологією органів дихання нормалізувалася та збільшилася на 35 % щодо контролю.

Медикаментозне лікування з сеансами

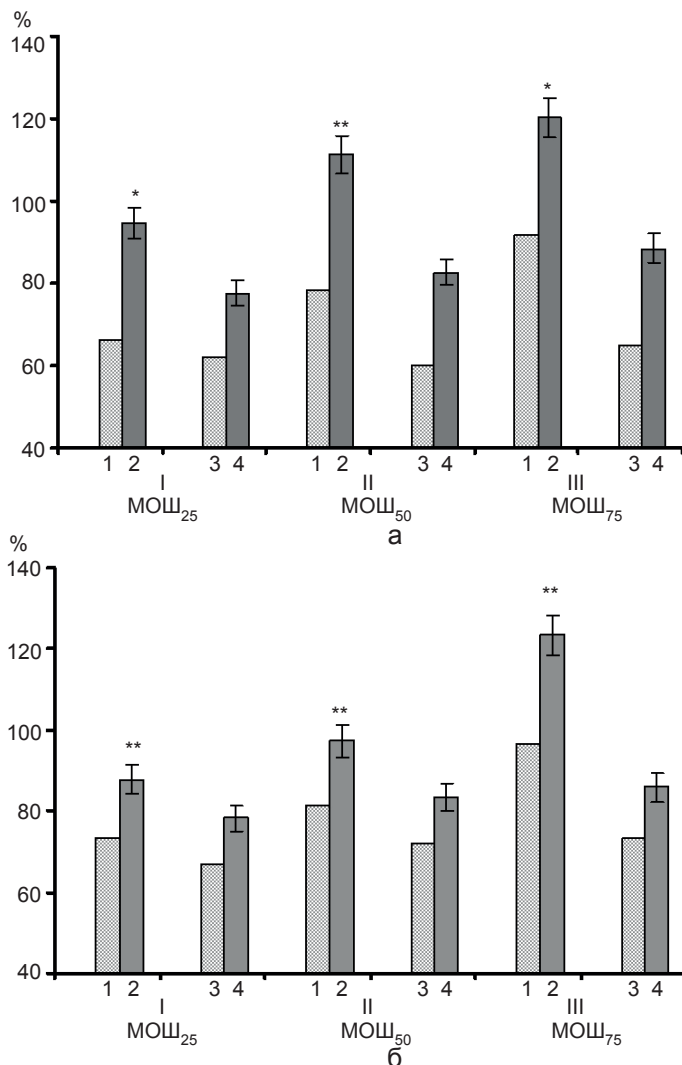


Рис. 2. Зміна прохідності бронхів на всіх рівнях бронхіального дерева з клінічними симптомами патології органів дихання до (1) і після комбінованого лікування з сеансами переривчастої нормобаричної гіпоксії (2) та до (3) і після медикаментозного лікування (4) у дітей 6-11 (а) років основної (I, n=15) та контрольної (II, n=12) груп та 12-17 (б) років основної (n=13) та контрольної (n=12). МОШ – об'ємні швидкості видиху відповідно до рівнів 25, 50, 75%. \*P<0,05; \*\*P<0,001

ПНГ свідчить про вірогідне збільшення тривалості затримки дихання на вдиху у основній групі. Як у дітей молодшого, так і старшого шкільного віку ця затримка після сеансів ПНГ, мала вірогідне подовження порівнянно з контрольною групою (рис. 3). Проба Штанге дає змогу оцінити стійкість організму до гіперкапнії і гіпоксії та відображає загальний стан кисневозабезпечувальних систем організму. Збільшення часу затримки дихання після ПНГ може свідчити про підвищення резервів серцево-судинної системи, функції

дихання, тренованості організму. Одержані результати дають змогу стверджувати, що у мешканців радіоактивно забруднених територій адаптація до нормобаричної гіпоксії достатньо підвищує кисневе забезпечення організму.

У дітей контрольної групи без клінічних симптомів патології органів дихання на момент обстеження була характерна брадикардія у 23 % та тахікардія – у 11 %. Після застосування медикаментозного лікування ЧСС у цій групі майже не змінилася і залишалася в межах  $85,8 \pm 1,7 \text{ хв}^{-1}$ , а у 11 % зберігалася

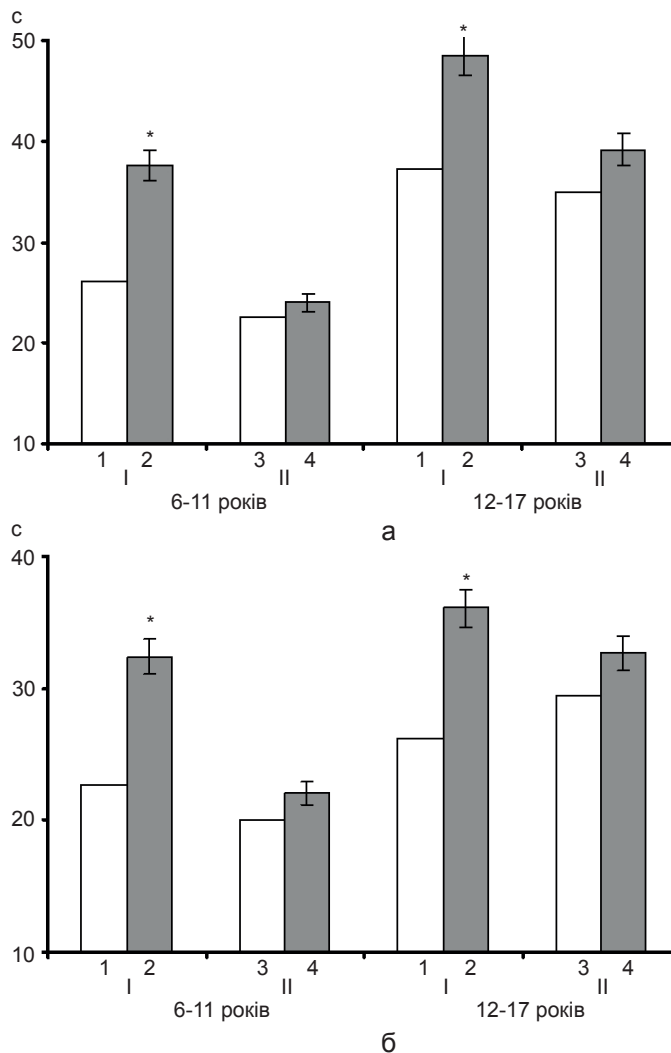


Рис. 3. Зміна тривалості проби Штанге у дітей з бронхоспазмом (а) без наявних симптомів патології органів дихання та з клінічними симптомами патології органів дихання (б) до (1) і після (2) комбінованого лікування з сеансами переривчастої нормобаричної гіпоксії, до (3) і після (4) медикаментозного лікування основної (I) та контрольної групи (II)

брадикардія. У основній групі до курсу сеансів ПНГ брадикардія була у 14 %, тахікардія – у 21 %. Після комбінованого лікування відмічали вірогідне зниження ЧСС з  $87,5 \pm 2,2$  до  $77,4 \pm 0,9$   $\text{хв}^{-1}$  (на 13 %), а відносно контролю – на 10,3 %, та майже у всіх дітей була в межах норми. У контрольній групі з патологією органів дихання брадикардію реєстрували у 16 %, а тахікардію у 36 %. На тлі лікування відмічали вірогідне зниження ЧСС з  $99,2 \pm 2,5$  до  $96,6 \pm 2,2$   $\text{хв}^{-1}$ , при цьому у 20 % залишалася тахікардія. У основній групі брадикардія була у 15 %, тахікардія – у 30 %. Після комбінованого лікування ЧСС вірогідно знизилася з  $89,9 \pm 2,7$  до  $80,4 \pm 1,0$   $\text{хв}^{-1}$  – на 12 %, а щодо контролю на 19,5 %. Нормалізація ЧСС до вікової норми у відповідь на ПНГ сприяє зниженню навантаження на серцевий м'яз та збалансуванню роботи обох відділів ЦНС.

Отже, у дітей, що постійно проживали на радіоактивно забруднених територіях та отримали комбіноване лікування з сеансами ПНГ, позитивна динаміка ЧСС може свідчити про адаптацію серцево-судинної системи до гіпоксії саногенного рівня, при цьому у більшості із них немає необхідності в додатковій медикаментозній корекції.

## ВИСНОВКИ

1. При комбінованому лікуванні з використанням курсу сеансів ПНГ у дітей з проявами бронхоспазму без клінічних ознак патології органів дихання відмічено статистично значуще підвищення вентиляційної спроможності легенів: життєвої ємкості легенів, бронхіальної прохідності проксимальних бронхів великого та середнього діаметра та дистальних бронхів малого діаметра.

2. У дітей із проявами бронхоспазму та патологією органів дихання, що отримували медикаментозне лікування та сеанси ПНГ більш виражено зростали показники вентиляційної спроможності легенів у порівнянні з контрольною групою, що отримувала тільки медикаментозне лікування.

3. Виявлено, що тривалість часу затримки дихання на вдиху (проба Штанге), після сеансів ПНГ вірогідно збільшилася у дітей основної групи, що свідчить про підвищення кисневого забезпечення організму.

**В.А.Березовский, Л.М. Лисуха, Е.И. Степанова, И.Е. Колпаков**

## ВЛИЯНИЕ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ У ДЕТЕЙ, КОТОРЫЕ ПРОЖИВАЮТ НА РАДИОАКТИВНО ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ

Исследовано влияние прерывистой нормобарической гипоксии (ПНГ) саногенного уровня на детей, которые проживают на радиоактивно загрязненных территориях. Обследовано 55 детей в возрасте от 6 до 17 лет с признаками бронхоспазма: 55 человек основной и 51 – контрольной группы. Показано, что после курса сеансов ПНГ (12 % кислорода в азоте) изменяется состояние дыхательной системы. Статистически достоверно в основной группе увеличились показатели вентиляционной способности легких: жизненной емкости легких, бронхиальной проходимости проксимальных бронхов крупного и среднего диаметра, и дистальных бронхов малого диаметра. Частично или полностью устранился бронхоспазм. Достоверно удлинялось время задержки дыхания на вдохе (проба Штанге), снизилась частота сердечных сокращений в сравнении с группой контроля.

Ключевые слова: прерывистая нормобарической гипоксия; бронхоспазм; радиоактивно загрязненные территории.

<sup>1</sup>V.A. Berezovskyi, <sup>1</sup>L.M. Lisukha, <sup>2</sup>Ye.I. Stepanova, <sup>2</sup>I.Ye. Kolpakov

## THE INFLUENCE OF THE NORMOBARIC HYPOXIA FOR THE BREATHING INDEXES OF THE CHILDREN LIVED IN RADIOACTIVE CONTAMINATED TERRITORIES

There was conducted a research of the influence the sanogenic level of intermittent normobaric hypoxia (INH) for children lived in radioactively contaminated territories. The research involved 106 children in the age from 6 to 17 with symptoms of bronchospasm: 55 persons of the main group and 51 persons of the screening group. It was confirmed that after the course of sessions INH (12 % oxygen in nitrogen) the respiratory system has changed. It is known statistically that in the main group the indexes of ventilation lung capacity have increased: vital capacity of the lungs, bronchial obstruction proximal bronchi of large and medium diameter, and distal bronchi small diameter. The bronchospasm has removed completely or partially. It was confirmed significantly that the breath-holding time becomes longer (test Stange) and heart rate reduced in



comparison with the screening group.

Key words: intermittent normobaric hypoxi;, bronchospasm; radioactively contaminated territories.

<sup>1</sup>*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, National Academy of Sciences of Ukraine;*

<sup>2</sup>*State Institution «National Research Center for Radiation Medicine NAMS of Ukraine, Kyiv/*

## REFERENCES

- Borukaeva IH. Efficiency of interval hypoxic training at bronchial asthma with children and adolescents. *Pediatrics*. 2007; 86 (4): 29 – 35. [Russian].
- Powell FL, Garcia N. Physiological effects of intermittent normobaric hypoxia. *High Alt Med. Biol.* 2000; 1(2): 125 – 36.
- Karaterzi GI. The effect of intermittent normobaric hypoxia on some indicators of functions of the respiratory system. *Buletinul ASM. Stiintele vietii*. 2011; 3 (315) : 62-7. [Russian].
- Rostova AV, Nezabudkin SN, Korostovtsev DS. The role of complex therapy in gaining bronchial asthma control in children. *Allergology*. 2006; 3: 41- 4. [Russian].
- Streilkov RB, Chizhov AY. Intermittent normobaric hypoxia: prevention, treatment, rehabilitation. 2 nd ed. Yekaterinburg : «Ural worker»; 2001.[Russian].
- Streilkov RB. Prospects for application of the method intermittent normobaric hypoxia in medical practice. *Resorts gazette*. 2006; 5(38) : 50 – 1. [Russian].
- Berezovskiy VA, Levashov MI. Natural and instrumental orotherapy and rehabilitation patients with pulmonary diseases. *Ukr pulmonol J*. 2005; 3: 15 – 7. [Ukrainian].
- Borukaeva IH. Combined treatment with intermittent hypoxic training and enteral oxygen therapy in the rehabilitation of patients with bronchial asthma. *Bulletin of regenerative medicine*. 2010; 4: 65 – 8. [Russian].
- Shagumov KY. Pathophysiological rationale for use of interval hypoxic training in the rehabilitation of children with asthma [dissertation]. Vladikavkaz; Kuban State Medical University; 2011. [Russian].
- Borukaeva IH. Interval hypoxic training in the rehabilitation of patients with chronic obstructive pulmonary disease at a sanatorium stage. *Questions balneology, physiotherapy and therapeutic physical culture*. 2007; 5 : 21 – 4. 23. [Russian].
- Rodrigues-Roisin R, Anzueto A, Bour-beau J et al. Global initiative for chronic obstructive pulmonary disease revised 2011. GOLD Executive Committee; GOLD Science Committee; 2011. 90 p.
- Nahorna NV, Dubov GV. Ecology and pathology of the respiratory system with children: medical and social aspects. *Child's health*. 2009; 4(19):18 – 22. [Ukrainian].
- Katylov AV, Dmitriev DV. Diagnosis and therapeutic tactics at bronchoobstructive syndrome with children. *Children's doctor*. 2011; 1(18): 11 – 21. [Ukrainian].
- Katylov AV, Dmitriev DV. Bronchitis with children. *Children's doctor*. 2012; 3 – 4(16-17):18 – 25. [Ukrainian].
- Saveliev BP, Shiryaeva IS. Functional parameters of the respiratory system in children and adolescents. Moscow: Medicine; 2001. [Russian].
- Antypkin YG. Status and prospects of development of pediatric pulmology in Ukraine. *Health of Ukr*. 2014; 4(31): 11[Ukrainian].
- Medical and demographic consequences of the Chernobyl disaster in Ukraine. *Chornobylinterinform*. Kiev; 2004. p. 58 – 75. [Ukrainian].
- Berezovskiy VA, Horban YM, Levashov MI, Sutkovskiy AD. Technology body resistance increase using hypoxotherapy. Kyiv; 2000. 23 p. [Ukrainian].
- Ayvazian SA Mkhitarian VS Applied Statistics and Econometrics basics. Moscow; 1998. [Russian].
- Leonov VP, Izhevsk PV. Applied Statistics in Medicine. *Inter J of Med Pract*. 1998; 4: 7 – 15. [Russian].
- Starodub AG, Barylyak LG, Korolyshyn TA, Popovych IL. Application of interval normobaric hypoxic training amelioration influence balneotherapeutic complex spa Truskavets on resistance to hypoxia and immune system. *Med hydrol and rehabil*. 2012; 10(3) : 4 – 12. [Ukrainian].
- Barylyak LG, Fyl VM, Roman IYu, Tkachuk SP, Bilinska GI. Resistance to hypoxia and state neyroendokrynno-immune complexes and metabolism in children who arrive in Truskavec with thorns, contaminated with radionuclides. *Med hydrol and rehabil*. 2010 ; 8(4) : p. 10 – 20. [Ukrainian].
- Kienya AI Bandazheuski YI. Healthy persons: basic indicators. Minsk: IP “Ekoperspektiva”; 1997.
- Kolchinskaya AZ. Oxygen regimes of the child and adolescent organism Kiev: Naukova Dumka ; 1973.1 [Ukrainian].
- Bogatyrychuk LM, Krivoruchko SG. Normobaric hypoxotherapy in combating the effects of the Chernobyl disaster. *Med rehabilit, balneol, physiotherapy*. 1988; 4 : 25 – 29.[Ukrainian].
- Sukhina EM, Cyganova TN, Safonicheva OG. Cyganova TN Safonicheva Effectiveness of the method of interval hypoxic training under the resort. *Herald of new med technolog*. 2011; 18 (3) : 236 – 8.[Russian].
- Kolpakov IY. State of functional system with children who have undergone exposure due to the Chernobyl AP [dissertation]. Kyiv: Bogomolets Institute of physiology, NAS of Ukraine; 2003. [Ukrainian].
- Stepanova YI, Vdovenko VY, Kondrashova VG, Kolpakov IY. Chernobyl disaster and health of children. *New millennium med*. 2010; 4 : 18 – 22. [Ukrainian].
- Stepanova YI, Kolpakov IY, Vdovenko VY. Functional condition of the respiratory system in children who tests radiation exposure from the Chernobyl disaster. Kyiv: 2003.[Ukrainian].
- Korneev MM, Plekhova OI, Borisko GO. Health descendants liquidators of the accident at the Chernobyl AP. Kharkiv; 2011. [Ukrainian].
- Shestopalov V, Naboka M, Likhosherstov O, Chaban O, Svendsen Y. Radiation impact and children health. *NAS of Ukr Herald*. 2011; 4 : 12 – 23. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов до редакції 21.10.2014*

# Вплив нанодисперсного діоксиду церію на онтогенетичні зміни антиоксидантної системи в слизовій оболонці шлунка та кишечника щурів

О.Ю. Єфіменко<sup>1</sup>, Ю.О. Савченко<sup>1</sup>, Т.М. Фалалєва<sup>1</sup>, Т.В. Берегова<sup>1</sup>, Н.М. Жолобак<sup>2</sup>, О.Б. Щербаков<sup>2</sup>, Ю.В. Малюкин<sup>3</sup>, М.Я.Співак<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; <sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ; <sup>3</sup>Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, Харків; E-mail: usavchenko@mail.ru

*Встановлено, що з віком у слизовій оболонці шлунка збільшується вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів: дієнових кон'югатів – на 30 %, продуктів, що реагують на тіобарбітурову кислоту – на 285 % та шиффових основ – на 181 %. Нанодисперсний діоксид церію (НДЦ) у старих щурів зменшував вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у слизовій оболонці шлунка, а саме: дієнових кон'югатів – на 43 %, сполук, що реагують на тіобарбітурову кислоту – на 51 % та шиффових основ – на 44 % відносно контрольної групи щурів відповідного віку. Аналогічно, у слизовій оболонці товстої кишки старих щурів зростає вміст дієнових кон'югатів на 40 %, сполук, що реагують на тіобарбітурову кислоту продуктів та шиффових основ на 114 та 132 % відповідно. НДЦ знижував вміст продуктів, що реагують на тіобарбітурову кислоту на 69 % та шиффових основ на 132 %. У шлунку з віком знижується супероксиддисмутазна (на 43 %) та каталазна (на 24 %) активність, тоді як у товстій кишці зростає лише супероксиддисмутазна активність на 43 %. В товстій кишці НДЦ знижував супероксиддисмутазну (на 34 %) та каталазну (на 21 %) активність відносно контролю. Таким чином, НДЦ відновлює процеси перекисного окиснення ліпідів у слизовій оболонці шлунка та товстої кишки, в яких з віком розвивається окислювальний стрес.*

*Ключові слова: нанодисперсний діоксид церію; перекисне окиснення ліпідів; слизова оболонка шлунка та товстої кишки.*

## ВСТУП

Відомо, що фізіологічне старіння організму має багатофакторний, багатоступеневий та незворотний характер. Наукові дані щодо механізму старіння організму свідчать про активуючий вплив перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) на темп старіння [1]. Вони знайшли своє відображення у сучасній вільнорадикальній теорії старіння, головна ідея якої полягає в тому, що причиною цього процесу є накопичення пошкоджень, викликаних такими вільними радикалами, як супероксид, перекис водню тощо. Основна властивість антиоксидантів – здатність інактивувати вільні радикали [2].

В останні роки зростає інтерес учених усього світу до нанотехнологій, які можуть поліпшити фармакологічні методи лікування. Зокрема, діоксид церію є перспективним для застосування в клінічній практиці. При переході в нанодисперсний стан він значно змінює фізико-хімічні властивості, які нагадують вплив ферментів антиоксидантного захисту [3]. Нанодисперсний діоксид церію (НДЦ) сповільнює прогресування дегенерації сітківки ока [4], проявляє антиоксидантні властивості в тканинах мозку [5], фібробластах шкіри людини [6], ендотеліальних клітинах [7] та клітинах серця [8]. Даних щодо його антиоксидантних властивостей в травному тракті дуже мало. Є лише декілька

праць, присвячених цьому питанню, в яких показано, що наночастинки захищають шлунково-кишковий епітелій від радіаційного пошкодження [9]. У дослідженнях на ракових клітинах шлунка людей доведено, що їх життєздатність тісно корелює з концентрацією і нестехіометричними властивостями НДЦ [10].

Мета нашої роботи – вивчити стан ПОЛ та активність ферментів антиоксидантного захисту, супероксиддисмутази та каталази в слизовій оболонці шлунка та товстої кишки у щурів різних вікових груп за дії НДЦ.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 3 (130–160 г) та 22–24-місячних (390–450 г) білих нелінійних щурах по 40 тварин у групі. Кожну вікову групу було поділено таким чином: I – інтактні тварини (контроль), II – тварини, які отримували 2,9 мл дехлорованої води, III – щури, яким вводили 2,9 мл/кг стабілізуючого розчину, та IV – тварини, які отримували НДЦ у дозі 1 мг/кг, розведеного в стабілізуючому розчині об'ємом 2,9 мл/кг. Всі речовини вводили упродовж 10 діб, один раз на добу інтрагастрально.

Роботу з тваринами проводили відповідно до Закону України від 21.02.2006 № 3447–IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та у відповідності з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington DC, 1996); вимогами GLP і директивою Ради ЄС 86/609 ЕЕС від 24 листопада 1986р. про наближення законів, підзаконних актів і адміністрованих положень держав-членів ЄС щодо питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети. Протокол біоетичної комісії №8 від 03.04.2014.

НДЦ синтезовано у відділі проблем інтерферону та імуномодуляторів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболот-

ного НАН України за методикою Іванова та Співака [11]. Синтезований золь містив 0,1 М НДЦ (у перерахунку на церій) розміром 2–7 нм, стабілізованих цитратом натрію, з  $\zeta$  – потенціалом  $-20$  мВ. Для роботи використовували розведення вихідного золю, які проводили у стерильній деіонізованій воді.

Після декапітації щурів розрізали передню черевну стінку по білій лінії, шлунки обережно вилучали та промивали холодним фізіологічним розчином, після чого їх вивертали назовні через надріз у ділянці передшлунка та знову промивали. Протягом 3 – 5 хв здійснювали інтенсивне механічне відділення слизової оболонки на чашці Петрі за допомогою хірургічних інструментів. У скляному гомогенізаторі Поттера із тефлоновим поршнем готували 10%-й гомогенат слизової оболонки шлунка на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4). Тканину гомогенізували до однорідного стану та пропускали через нейлоновий фільтр для видалення не повністю зруйнованих клітин та ядер. Пухкий осад відкидали. Усі маніпуляції, пов'язані із забором матеріалу та приготуванням гомогенатів тканини, здійснювали при температурі від 0 до  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Вміст сполук, що реагують на тіобарбітурову кислоту визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом [12], шиффових основ – флуориметричним методом [13] та оцінювали за реакцією з цією кислотою [14]. Активність супероксиддисмутази оцінювали з використанням нітросинього тетразолію [15], каталази – за зменшенням кількості  $\text{H}_2\text{O}_2$  у розчині після інкубації за оптимальних умов [14].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [16]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за критерієм  $t$  Стьюдента. Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна похибка середнього.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінювання вмісту продуктів ПОЛ – один з біохімічних маркерів окисно-антиоксидантного балансу. Під час нашого дослідження було визначено вміст продуктів ліпідної пероксидації: первинних продуктів ПОЛ– дієнових кон'югатів (ДК), проміжних продуктів – сполук, що реагують на тіобарбітурову кислоту, головним з яких малоновий діальдегід, та кінцевих продуктів – шиффових основ.

У результаті проведених досліджень вірогідних змін між I, II та III групами не виявлено, тому подальший вплив НДЦ ми порівнювали з контрольною групою тварин. Встановлено, що з віком у слизовій оболонці шлунка 24-місячних тварин вірогідно збільшується вміст продуктів ПОЛ: ДК – на 30 %, сполук, що реагують на тіобарбітурову кислоту – на 286 % та шиффових основ – на 182 % відносно контрольної групи (табл. 1).

У тварин 24-місячного віку, яким вводили НДЦ, вміст продуктів ПОЛ у слизовій оболонці шлунка вірогідно зменшувався: ДК – на 43 %, сполук, що реагують на тіобарбітурову кислоту – на 51 % та шиффові основи – на 45 % відносно контрольної групи щурів відповідного віку (див. табл. 1).

Супероксиддисмутаза є важливим ферментом системи антиоксидантного захисту клітини. Від її активності залежить ефективність інактивації супероксидних

радикалів та, відповідно, вільнорадикальних процесів у клітині. Каталаза – один з ключових ензимів, які забезпечують дезактивацію перекису водню та захист від окисного стресу. Активність каталази відображає здатність клітин протидіяти накопиченню  $H_2O_2$ . Лише у разі узгодженої роботи супероксиддисмутази та каталази можливе ефективне видалення активних кисневих метаболітів. При оцінці антиоксидантної системи у слизовій оболонці шлунка молодих і старих щурів активність цих ферментів знаходиться в межах значень контрольних груп тварин відповідного віку (табл. 2).

Встановлено, що з віком знижується супероксиддисмутаза (на 43 %) та каталаза (на 24 %) активність. Prasad та співавт. [17] встановили, що НДЦ захищав слизову оболонку травного тракту від окисного пошкодження етанолом. Наші результати свідчать про зниження інтенсивності ПОЛ у старих щурів під дією НДЦ. При цьому його вплив на антиоксидантну систему, а саме активність каталази і супероксиддисмутази, не було виявлено. Це може говорити про зменшення накопичення активних форм кисню під впливом НДЦ, який відіграє роль сильного антиоксиданта.

За результатами наших досліджень були виявлені вікові зміни в слизовій оболонці товстої кишки. У 24-місячних щурів вірогідно зростав вміст ДК на 40 %, сполук,

Таблиця 1. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у слизовій оболонці шлунка щурів ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Група тварин	Дієнові кон'югати, нмоль•мг білка <sup>-1</sup>	Сполуки, що реагують на тіобарбітурову кислоту нмоль•мг білка <sup>-1</sup>	Шиффові основи, ум.од.•мг білка <sup>-1</sup>
3-місячні (контроль)	244,12±18,33	65,14±5,99	5,91±0,42
Тварини, яким вводили нанодисперсний діоксид церію	231,12±12,04	60,19±4,81	5,11±0,37
24-місячні (контроль)	317,89±22,74*	250,85±20,02*	16,66±1,40*
Тварини, яким вводили нанодисперсний діоксид церію	180,03±16,42**	122,31±11,56**	9,17±0,86**

\*  $P < 0,05$  порівняно з контрольними 3-місячними тваринами, \*\*  $P < 0,05$  – з контрольними 24-місячними тваринами.



**Таблиця 2. Активність ферментів антиоксидантного захисту у слизовій оболонці шлунка щурів ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Група тварин	Супероксиддисмутаза, ум.од. • хв <sup>-1</sup> • мг білка <sup>-1</sup>	Каталаза, нмоль • хв <sup>-1</sup> • мг білка <sup>-1</sup>
3-місячні (контроль)	0,16±0,01	6,49±0,42
Тварини, яким вводили нанодисперсний діоксид церію	0,15±0,02	5,94±0,40
24-місячні (контроль)	0,09±0,01*	4,89±0,41*
Тварини, яким вводили нанодисперсний діоксид церію	0,07±0,01	4,18±0,37

\*  $P < 0,05$  порівняно з контрольними 3-місячним тваринами.

що реагують на тіобарбітурову кислоту та шиффових основ на 115 та 132 % відповідно. У старих тварин, яким вводили НДЦ, достовірно знижувався вміст проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ: сполук, що реагують на тіобарбітурову кислоту – на 70 % та шиффових основ – на 41 % відносно контрольної групи старих щурів (табл. 3). Вміст ДК вірогідно не змінювався.

У старих щурів порівняно з молодими не було виявлено зростання активності супероксиддисмутази та каталази. Тоді як у старих щурів, яким вводили НДЦ, у слизовій оболонці товстої кишки достовірно знижувалася активність: супероксиддисмутазна – на 35 %, каталазна – на 21% відносно контрольних значень (табл. 4). Це свідчить про можливе зменшення активності антиоксидантних ферментів у старих щурів в умовах зниження генерації активних форм кисню за дії НДЦ.

Як бачимо, результати дослідження слизової оболонки шлунка та товстої кишки дещо відрізняються. Це можна пояснити різною інтенсивністю ПОЛ. Очевидно, що слизова оболонка шлунка стає більш уразливою з віком.

Отже, у щурів старіння супроводжується наростанням оксидативного стресу в слизовій оболонці шлунка та товстої кишки, який є наслідком порушення балансу між продукцією вільних радикалів та антиоксидантним захистом, що підтверджується даними літератури [18]. НДЦ відновлював про- та антиоксидантний баланс у слизових оболонках травного тракту.

Особливо важливе вивчення ПОЛ у людей похилого віку, оскільки виникнення у них таких захворювань, як рак, діабет, серцево-судинні, аутоімунні хвороби і нейродегенеративні розлади є наслідком вікових змін у системі антиоксидантного захисту [19].

**Таблиця 3. Вміст продуктів ПОЛ у слизовій оболонці товстої кишки щурів ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Група тварин	Дієнові кон'югати, нмоль • мг білка <sup>-1</sup>	Сполуки, що реагують на тіобарбітурову кислоту, нмоль • мг білка <sup>-1</sup>	Шиффові основи, ум. од. • мг білка <sup>-1</sup>
3-місячні (контроль).	255,39±22,01	130,48±11,60	8,47±0,75
Тварини, яким вводили нанодисперсний діоксид церію	234,54±18,50	121,16±9,86	8,15±0,51
24-місячні (контроль)	359,80±24,78*	280,08±21,26*	19,65±1,15*
Тварини, яким вводили нанодисперсний діоксид церію	337,54±26,75	194,53±15,77**	7,95±0,59**

\*  $P < 0,05$  порівняно з контрольними 3-місячним тваринами, \*\*  $P < 0,05$  з контрольними 24-місячними тваринами.



**Таблиця 4. Активність ферментів антиоксидантного захисту у слизовій оболонці товстої кишки щурів (M±m, n=10)**

Група Тварин	Супероксиддисмутаза, ум.од.·хв <sup>-1</sup> ·мг білка <sup>-1</sup>	Каталаза, нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг білка <sup>-1</sup>
3-місячні (контроль)	0,18±0,02	8,29±0,52
Тварини, яким вводили нанодисперсний діоксид церію	0,17±0,01	8,14±0,64
24-місячні (контроль)	0,26±0,02	9,17±0,77
Тварини, яким вводили нанодисперсний діоксид церію	0,17±0,02*	7,21±0,48*

\* P < 0,05 порівняно з контрольними 24-місячними тваринами.

Відомо, що антиоксиданти можуть бути природного (біоантиоксиданти) і синтетичного походження. Дані літератури щодо антиоксидантної дії вітамінів у слизовій оболонці травного тракту суперечливі. Одні автори доводять антиоксидантну дію вітамінів, тоді як інші ставлять її під сумнів [20]. Крім того, відомі такі недоліки антиоксидантів, як погана розчинність у воді, неефективна проникність у шлунково-кишковому тракті та/або нестабільність при зберіганні. Антиоксиданти синтетичного походження мають рухливий атом водню і тому реагують з вільними радикалами, а також каталізаторами вільнорадикального окиснення, насамперед з іонами металів змінної валентності. До цього типу антиоксидантів і належить НДЦ. Він може змінювати валентність Ce<sup>3+</sup> до Ce<sup>4+</sup>. Процес проходить в декілька стадій, в результаті яких відбувається окиснення НДЦ з подальшою регенерацією до вихідного стану [21]. А це специфічна і дуже важлива властивість цього матеріалу. Традиційні антиоксиданти (аскорбінова кислота, токоферол тощо) здатні брати участь тільки в одному окисно-відновному циклі, після чого переходять в окисний стан або руйнуються. Ймовірно, НДЦ у цьому аспекті має перевагу перед існуючими антиоксидантами і в деяких випадках перевершує їх за своєю активністю. До того ж, він малотоксичний, що важливо при застосуванні у людей похилого віку [22].

Отримані результати свідчать, що з віком порушується окисно-антиоксидантна

рівновага: посилюється продукція активних форм кисню, про що вказують зміни супероксиддисмутазної і каталазної активностей та накопичення продуктів ліпідної пероксидації. Встановлено відновлювальну дію НДЦ на показники окисно-антиоксидантного балансу у слизовій шлунка та товстої кишки у щурів. Отже, отримані результати можуть бути підґрунтям для створення на основі НДЦ засобів профілактики чи зниження оксидативного стресу.

## ВИСНОВКИ

1. З віком у слизовій оболонці шлунка та товстої кишки зростає вміст продуктів ПОЛ та знижується активність антиоксидантних ферментів.

2. НДЦ в слизовій оболонці шлунка старих щурів зменшує вміст продуктів ПОЛ.

3. У слизовій оболонці товстої кишки старих щурів НДЦ знижує вміст продуктів ПОЛ та активність антиоксидантних ферментів.

4. НДЦ відновлює про- та антиоксидантний стан у слизових оболонках травного тракту, в яких з віком розвивається оксидативний стрес.

*Робота виконана за фінансування Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України в рамках виконання науково-дослідної роботи «Експериментальне обґрунтування застосування нанодисперсного діоксиду церію в гастроентерології, проктології і геріатрії», № державної реєстрації 0113U006058.*

**Ю. Ефименко<sup>1</sup>, Ю.О. Савченко<sup>1</sup>, Т.М. Фалалеева<sup>1</sup>, Т.В. Береговая<sup>1</sup>, Н.М. Жолобак<sup>2</sup>, О.Б. Щербаков<sup>2</sup>, Ю.В. Малукин<sup>3</sup>, Н.Я. Спивак<sup>3</sup>**

## **ВЛИЯНИЕ НАНОДИСПЕРСНОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА И КИШЕЧНИКА КРЫС**

Установлено, что с возрастом в слизистой оболочке желудка и толстой кишки увеличивается содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновых конъюгатов – на 30 %, продуктов, которые реагируют на тиобарбитуровую кислоту – на 285 % и шиффовых основ на 181%. Нанодисперсный диоксид церия (НДЦ) у старых крыс уменьшал содержание продуктов ПОЛ в слизистой оболочке желудка, а именно: диеновых конъюгатов – на 43 %, продуктов, которые реагируют на тиобарбитуровую кислоту – на 51 % и шиффовых основ на 44 % относительно контрольной группы крыс соответствующего возраста. Аналогично, в слизистой оболочке толстой кишки старых крыс возрастало содержание диеновых конъюгатов на 40%, продуктов, которые реагируют на тиобарбитуровую кислоту и шиффовых основ на 114 и 132 % соответственно. НДЦ снижал содержания продуктов, которые реагируют на тиобарбитуровую кислоту на 69% и шиффовых основ на 132 %. В желудке с возрастом снижается супероксиддисмутазная (на 43 %) и каталазная (на 24 %) активность, тогда как в толстой кишке возрастает супероксиддисмутазная активность на 43%. В толстой кишке НДЦ снижал супероксиддисмутазную (на 34 %) и каталазную активность (на 21 %) относительно контроля. Таким образом, НДЦ восстанавливает процессы ПОЛ в слизистой оболочке желудка и толстой кишки, в которых с возрастом развивается оксидативный стресс. Ключевые слова: нанодисперсный диоксид церит; перекисное окисление липидов; слизистая оболочка желудка и толстой кишки.

**O.Yu Iefimenko<sup>1</sup>, I.O. Savchenko<sup>1</sup>, T.M. Falalyeyeva<sup>1</sup>, T.V. Beregova<sup>1</sup>, N.M. Zholobak<sup>2</sup>, O.B. Shcherbakov<sup>2</sup>, Yu.V. Malyukin<sup>3</sup>, M. Ya Spivak<sup>3</sup>.**

## **THE INFLUENCE OF NANODISPERSE CERIUM DIOXIDE ON ONTOGENETIC CHANGES OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE MUCOSA OF THE STOMACH AND COLON IN RATS**

It was established that with age the content of lipid peroxidation products increased in the mucosa of the stomach: Diene conjugates by 30%, products which react to thiobarbituric

acid by 285% and Schiff bases by 181%. Nanodisperse cerium dioxide (NCD) reduced the content of lipid peroxidation in the gastric mucosa in old rats: Diene conjugates by 43 %, products which react to thiobarbituric acid by 51% and Schiff bases by 44% relative to the control group of rats given age. Similarly, it was established that the content of Diene conjugates increased by 40%, products which react to thiobarbituric acid by 114% and Schiff bases by 132% in the mucosa of the colon of old rats. NCD significant reduced the content of products which react to thiobarbituric acid by 69% and Schiff bases by 132%. In the stomach superoxide dismutase (by 43%) and catalase activity (by 24%) decreases with age, while in the colon superoxide dismutase activity increases (by 43%). In the colon NCD significant decreased superoxide dismutase (by 34%) and catalase activity (by 21%) relative to controls. Thus, the NCD restores lipid peroxidation in the gastric mucosa and colon, in which develops oxidative stress with age.

Key words: nanodisperse cerium dioxide; lipid peroxidation; mucosa of the stomach and colon.

<sup>1</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv;

<sup>2</sup> Danylo Zaboloty Institute of Microbiology and Virology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;

<sup>3</sup> Insitute for Scintillation Materials National Academy of Science of Ukraine, Kharkiv.

## **REFERENCES**

1. Salmon AB, Richardson A, Pérez VI. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radic Biol Med.* 2010; 48 (5): 642–76.
2. Nusbaum NJ The aging/cancer connection. *Am. J. Med. Sci.* 1998; 315(1): 40–9.
3. Celardo I, Traversa E, Ghibelli LJ. Cerium oxide nanoparticles: a promise for applications in therapy. *Exp Ther Oncol.* 2011; 9(1):47–51.
4. Wong LL, McGinnis JF. Nanoceria as bona fide catalytic antioxidants in medicine: what we know and what we want to know. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 801 (1): 821–28.
5. Heckman KL, De Coteau W, Estevez A, Reed KJ, Costanzo W. Custom cerium oxide nanoparticles protect against a free radical mediated autoimmune degenerative disease in the brain. *ACS Nano.* 2013; 7(12): 10582–96.
6. Lee SS, Song W, Cho M, Puppala HL, Nguyen P. Antioxidant properties of cerium oxide nanocrystals as a function of nanocrystal diameter and surface coating. *ACS Nano.* 2013; 7(11): 9693–703.
7. Chen S, Hou Y, Cheng G, Zhang C, Wang S. Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Biol Trace Elem Res.* 2013; 154(1): 156–66.
8. Jianli N, Azfer A, Rogers L, Wang X. Cardio protective effects of cerium dioxide nanoparticle in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2007; 73(3): 549–59.

9. Colon J, Hsieh N, Ferguson A, Kupelian P, Seal S, Jenkins DW. Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2. *Nanomedicine*. 2010; 6(5): 698–705.
10. Li C, Zhao W, Liu B, Xu G, Liu L. Cytotoxicity of ultrafine monodispersed nanoceria on human gastric cancer cells. *J Biomed Nanotechnol*. 2014; Jul;10(7):1231–41.
11. Ivanova OS, Shekynova TO, Ivanov VK, Scherbakov AB, Popov AL. One-step synthesis of colloidal solutions of cerium dioxide for biomedical applications. *Dokl. Akadem. nayk*. 2011; 437 (5):638–41 [Russian].
12. Gavrylov VB, Gavrylova AR., Chmara NF. Measurement of diene conjugates in plasma by UV absorbance heptane and isopropanol extracts. *Laboratornoe delo*. 1988; 2: 60–3 [Russian].
13. Kolesova OE, Markin AA, Fedorova TN. Lipid peroxidation and methods for determining lipid peroxidation products in biological samples. *Labor. delo*. 1984; 9: 540–46 [Russian].
14. Stalnaya ID, Garyushvili TG. The modern methods of biocemistry. – M.: Medicina. 1977: 66–8 [Russian].
15. Chevari S, Chaba I, Sekey I. The role of superoxide dismutase in cell oxidative processes and method of its determination in biological material. *Labor. delo*. 1985; 11: 678–81.
16. Tyurin YuN. Distribution associated with normal. M.: Infra\*M. 1998 [Russian].
17. Prasad RGSV, Davan R, Johti S. Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal mucosa from ethanol induced gastric ulcer in in-vivo animal model. *Nano Biomed Eng*. 2013; 5(1):46–9.
18. Le Couteur DG, Blyth FM, Creasey HM. et al. The association of alanine transaminase with aging, frailty, and mortality. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010; 65(7): 712–17.
19. Obychova LK. Contribution of Academician NM Emanuel in the development of domestic Gerontology: free radical mechanisms in the aging process. *Usp. Gerontoli*. 1999;3:27–31 [Russian].
20. Drake IM, Mapstone NP, Schorah CJ, et al. Reactive oxygen species activity and lipid peroxidation in *Helicobacter pylori* associated gastritis: relation to gastric mucosal ascorbic acid concentrations and effect of *H pylori* eradication. *Gut*. 1998; 42(6):768–71.
21. Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun (Camb)*. 2010; 46 (16): 2736–38.
22. Xia T, Kovoichich M, Liong M, Mädler L. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*. 2008;2(10): 2121–34.

*Матеріал надійшов  
до редакції 10.07.2014*

# Особливості харчової поведінки у осіб з нормальною та підвищеною масою тіла

Ю.С. Шевченко, Л.Е. Весніна, І.П. Кайдашев

Українська медична стоматологічна академія, Полтава; E-mail: yulichkash@mail.ru

*За допомогою опитувальників Голландського DEBQ та трифакторного TFEQ-R18 визначено особливості харчової поведінки та їх вплив на якість життя у молодих осіб віком від 18 до 25 років, які були розподілені на дві групи за індексом маси тіла (ІМТ). У групу контролю увійшла 41 особа з нормальною масою тіла (ІМТ=18,5 – 24,9 кг/м<sup>2</sup>), до дослідної – 27 осіб з підвищеною масою (ІМТ вище ніж 25 кг/м<sup>2</sup>). Визначено наявність порушень харчової поведінки у 85,19% осіб дослідної групи та у 41,46% з контрольної. За структурою порушень у людей з підвищеною масою тіла переважали обмежувальний та екстернальний тип харчової поведінки. У осіб з нормальною масою – екстернальний та обмежувальний. Дослідження показників якості життя за допомогою опитувальника SF-36 показали у осіб з підвищеною масою тіла вірогідне зниження рольового фізичного функціонування та інтенсивності болю. Загальний фізичний компонент здоров'я у дослідній групі був вірогідно нижчим – 52,70 щодо 56,11 бала. Зроблено висновок, що порушення харчової поведінки у осіб з нормальною та підвищеною масою тіла потребують індивідуального підходу до формування навичок здорового способу життя та виправлення порушеного харчового стереотипу, що будуть протидіяти подальшому збільшенню маси та сприятимуть підвищенню якості життя.*

*Ключові слова:* порушення харчової поведінки; якість життя; індекс маси тіла; підвищена маса тіла.

## ВСТУП

Нормальне функціонування організму людини великою мірою залежить від повноцінного харчування. Життєдіяльність поєднується зі значною витратою енергії, яка відновлюється за рахунок поживних речовин. Постійний баланс між споживаною та витраченою енергією – головна умова регуляції нормальної маси тіла та енергетичного обміну. Світовою проблемою стає енергетичний дисбаланс між калоріями, які споживає та витрачає людина, в основі якого глобальна зміна харчування – збільшення споживання висококалорійної їжі та гіподинамія. Для підтримки нормальної маси тіла є важливим адекватна харчова поведінка, коли споживання відповідає потребам в поживних речовинах і енергії за складом, збалансованістю, кількістю, обсягом фізичної активності, харчовою мотивацією. Психологічним факторам відводиться пріоритетна роль у генезі формування надлишкової маси та ожиріння [1]. У клінічній практиці практично не буває випадків надлишкової маси без розладу особистості [2]. Зростання кількості хворих з порушенням харчової поведінки – тенденція останніх років більшості економічно розвинених країн [3]. Саме порушення харчової поведінки вважають одним з домінуючих факторів у становленні та розвитку метаболічного синдрому [4]. Чисельність хворих з ожирінням, у яких переважають вказані розлади, наразі становить до 60% [5].

У 95% випадків формування надлишкової маси та ожиріння провідним фактором є нейрохімічний дефект церебральних систем, що регулюють харчову поведінку та гормональний статус [5]. Нейрохімічні системи гіпоталамуса, який інтегрує інформацію про метаболічний статус організму, що надходить від структур стовбура мозку та лімбічної

ритетна роль у генезі формування надлишкової маси та ожиріння провідним фактором є нейрохімічний дефект церебральних систем, що регулюють харчову поведінку та гормональний статус [5]. Нейрохімічні системи гіпоталамуса, який інтегрує інформацію про метаболічний статус організму, що надходить від структур стовбура мозку та лімбічної

© Ю.С. Шевченко, Л.Е. Весніна, І.П. Кайдашев

системи, відіграють ключову роль у функціонуванні харчового споживання. Інтеграція гіпоталамічними нейронами сигналів різної природи є основою активності систем, що контролюють поведінкові та фізіологічні процеси. Сигнальний модуль ядерного фактора транскрипції  $\kappa\text{B}$  ( $\text{IKK}\beta/\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) є фундаментальним зв'язком між надлишковим надходженням поживних речовин та дисфункцією гіпоталамічної сигналізації [6].

Мета нашого дослідження визначення особливостей харчової поведінки та їх впливу на якість життя у молодих осіб.

## МЕТОДИКА

У обстежені взяли участь 68 осіб віком від 18 до 25 років обох статей, студенти Української медичної стоматологічної академії. На проведення дослідження отримано дозвіл комісії з біоетики та добровільну згоду від учасників. Визначали масу тіла, зріст, напівокружність талії (ПТ) і стегон (ПС), індекс маси тіла (ІМТ, WHO, 1998). За ІМТ сформовано дві групи: контрольну складала 41 особа - 20 юнаків та 21 дівчина з нормальною масою тіла (ІМТ=18,5-24,9  $\text{кг}/\text{м}^2$ ), дослідну - 27 осіб, з них 16 юнаків та 11 дівчат (ІМТ вище 25  $\text{кг}/\text{м}^2$ ) з підвищеною масою тіла.

Дані особистого та сімейного анамнезу визначали у спеціально розробленій карті спостережень. Харчову поведінку оцінювали за допомогою опитувальників Голландського DEBQ (від англ. Dutch Eating behavior Questionnaire) [7] та трифакторного TFEQ-R18 (від англ. Three-factor Eating questionnaire) [8].

Опитувальник DEBQ складається з 33 питань з варіантами відповіді: «ніколи», «зрідка», «іноді», «часто» і «дуже часто» та оцінюється за 5-бальною шкалою, окрім 31-го питання зі зворотним значенням. Він дає можливість визначити екстернальний, емоційний та обмежувальний типи порушення харчової поведінки з середніми значеннями 2,7; 1,8 та 2,4 бала відповідно. Опитуваль-

ник TFEQ містить 18 питань по 4 варіанти відповіді: «однозначно так», «швидше так, ніж ні», «швидше ні, ніж так», «однозначно ні» з оцінюванням за 4-бальною шкалою [8]. Оцінюється когнітивно-обмежувальний, неконтрольований (сила голоду) та емоційний типи порушень.

Якість життя визначали за допомогою опитувальника SF-36 (від англ. Short Form Health Survey) [9], в якому 36 питань згруповані у 8 шкал: фізичне функціонування; рольове фізичне функціонування; інтенсивність болю та її вплив на повсякденну діяльність; загальний стан здоров'я, загальна активність, енергійність та життєздатність, соціальне функціонування, рольове емоційне функціонування, психічне здоров'я. Варіація за шкалами в балах від 0 до 100, більш високі значення є критерієм високого рівня якості життя.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програмного пакету Statistika 6.1 («StatSoft Inc.», США). Розраховували середнє арифметичне (M) та його похибку (m). Кореляційні взаємовідносини показників визначали за допомогою рангової кореляції Спірмена. Відмінності вважали статистично вірогідними  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ

Слід відмітити вірогідні відмінності маси та ІМТ порівняно з контрольною групою на 34 та 34,5% (табл. 1). Значення ПТ у осіб з підвищеною масою тіла на 21,9%, ПС на 14,2% перевищували контроль.

Нами було використано опитувальники Голландський DEBQ та трифакторний Стункарда TFEQ-18, формат яких надає можливість визначити подібні типи порушень харчової поведінки. За допомогою першого їх виявлено в обох групах у 40 осіб з 68 (58,8%, табл. 2). Вірогідні відмінності між групами визначені за обмежувальним типом. Зміни харчової поведінки спостерігались у 23 (85,19%) осіб з підвищеною масою тіла



Таблиця 1. Порівняльна оцінка антропометричних показників в досліджуваних групах (M±m)

Показники	Особи з нормальною масою тіла (n=41)	Особи з підвищеною масою тіла (n=27)
Вік, роки	18,87 ± 0,17	19,52 ± 0,44
Зріст, см	173,8 ± 0,96	173,59 ± 2,08
Маса тіла, кг	64,39 ± 1,05	86,28 ± 2,72*
Індекс маси тіла, кг/м <sup>2</sup>	21,29 ± 0,25	28,63 ± 0,72*
Напівокружність талії, см	71,68 ± 0,92	87,44 ± 2,0*
Напівокружність стегон, см	96,76 ± 0,69	111,0 ± 1,79*

\* P < 0,05 порівняно з особами з нормальною масою тіла.

та у 17 (41,46%) з нормальною. В дослідній групі екстернальна поведінка визначена у 9 (33,33%) осіб, поєднання екстернальної та обмежувальної – у 3 (11,11%) осіб. Було визначено такі порушення харчової поведінки: у контрольній групі за екстернальним типом спостерігалось у 12 (29,27%) осіб; поєднання екстернальної та обмежувальної – у 2 (4,88%); емоційної та екстернальної – у 5 (12,2%); ізолюване за екстернальним типом визначено у 2 (7,41%) осіб дослідної групи; у 4 (9,76%) з нормальною масою тіла; обмежувальний тип – у 20 (74,07%) осіб дослідної групи (з них у 10 (37,04%) осіб він ізолюваний, у 3 (11,11%) обмежувальний тип поєднувався з екстернальним, у 3 (11,11%) – з емоційним).

У студентів з нормальною масою за обмежувальним типом спостерігалось порушення у 8 (19,51%) осіб, в поєднанні з екстернальним – у 2 (4,88%), з емоційним – у 1 (2,44%) особи, ізолюване – у 4 (9,76%) осіб. Респонденти відмічали, що обмеження у прийомі їжі були досить нетривалі та нерегулярні. Порушення харчової поведінки за емоційним типом було відмічено у 8 (29,63%) осіб з підвищеною масою тіла та у 7 (17,1%) – з нормальною. Поєднання емоційного та обмежувального типів було у 3 осіб (11,11%),

ізолюване порушення – у 1 (3,70%) особи з підвищеною масою. В групі контролю ізолюване порушення за емоційним типом не спостерігалось. У 4 (14,81%) осіб з підвищеною масою тіла та у 1 (2,44%) особи з нормальною відмічені всі три типи порушень.

Опитувальник TFEQ, розроблений у 1985 р. для виявлення стриманості (свідоме обмеження прийому їжі для визначення контролю маси тіла), неконтрольованості (втрата контролю над споживанням їжі у супроводі суб'єктивного відчуття голоду) та емоційності (нездатність протистояти емоційним сигналам) [8]. За цим опитувальником порушення спостерігались у 59,26% осіб з підвищеною масою тіла, з них когнітивний обмежувальний тип переважав та був виявлений у 37,04% студентів, емоційний – у 18,52%, неконтрольований – у 3,7%. У людей з нормальною масою тіла порушення відмічені у 11 (26,83%), з них зміни за когнітивною обмежувальною шкалою – у 6 (14,63%), за емоційною – у 7 (17,1%) та за неконтрольованою шкалою – у 3 (7,32) осіб. Поєднання когнітивної та емоційної шкали було у 1 особи, емоційної та неконтрольованої – у 2, ізолювані порушення за емоційною шкалою у – 3 (7,32%), за когнітивною – у 4 (9,76%) осіб.

Таблиця 2. Структура харчової поведінки за опитувальником DEBQ (M±m)

Тип харчової поведінки	Особи з нормальною масою тіла (n=41)	Особи з підвищеною масою тіла (n=27)
Обмежувальна	1,89 ± 0,15	2,86 ± 0,15*
Емоційна	1,37 ± 0,07	1,45 ± 0,11
Екстернальна	2,62 ± 0,10	2,59 ± 0,10

Дослідження впливу порушень харчової поведінки на якість життя показали, що у осіб з підвищеною масою тіла знижені показники практично за всіма шкалами опитувальника (табл. 3). У осіб з підвищеною масою вірогідно у 1,2 раза зменшено рольове фізичне функціонування та інтенсивність болю. Загальний фізичний компонент здоров'я був недостатньо високим в обох групах, але у осіб з підвищеною масою тіла був меншим у 1,1 раза (52,70 та 56,11 бала відповідно). Психічний компонент здоров'я в обох групах вірогідно не відрізнявся, але за значенням в балах був недостатньо високим.

## ОБГОВОРЕННЯ

Харчова поведінка формується компонентами, які забезпечують споживання: підготовчі моделі поведінки для пошуку їжі, фактичне споживання та фізіологічні процеси утилізації поживних речовин. Обмежувальний тип характеризується стримуванням до вживання їжі, яке є необґрунтовано надлишковим та несистемним та не призводить до зниження маси. Строгі дієти чергуються з періодами переїдання з інтенсивним набором маси тіла. Респонденти підтвердили, що обмеження у прийомі їжі, які вони собі призначали, важко витримати відносно тривалий час, використання обмежень виникало у більшості з них спонтанно. Вони часто скаржились на

появу емоційно-афективних розладів – «дієтичної депресії» – роздратованості, на відчуття внутрішньої напруженості, постійної втоми, агресивності, поганого настрою, що сприяло відмові від дієти і набиранню маси.

Розвиток екстернального типу порушення харчової поведінки ґрунтується на культуральнозумовлених стереотипах відношення до їжі як засобу комунікації та заохочення. Його реалізація визначається підвищеною реакцією не на гомеостатичні стимули – вміст глюкози та вільних жирних кислот у крові, моторику та наповненість шлунка, а на зовнішні ознаки та стимули, пов'язані із прийомом їжі [10]. При екстернальному типі бажання поїсти стимулюється зовнішнім виглядом їжі, запахом та текстурою, впливом реклами. Людина з екстернальним типом приймає їжу завжди, коли її бачить [11]. За результатами у осіб з екстернальним типом прийом їжі стимулювався зовнішніми подразниками, а відчуття ситості виникало лише після механічного переповнення шлунка.

Емоційний тип харчування, або гіперфагічна реакція на стрес та емоційне переїдання, розглядається як відповідь на негативні емоції [12], его-загрози або дістрес [13]. Стимулом стає емоційний дискомфорт: тривожність, поганий настрій, смуток, образа, розчарування, самотність. Емоційний тип пов'язують з переїданням, обжерливістю, булімією та ожирінням [12]. У 60% пацієнтів з

Таблиця 3. Структура харчової поведінки за опитувальником SF-36 (M±m)

Показники	Особі з нормальною масою тіла (n=41)	Особі з підвищеною масою тіла (n=27)
Фізичне функціонування	94,33 ± 1,49	92,41 ± 1,26
Рольове фізичне функціонування	88,33 ± 5,66	75,0 ± 3,33*
Біль	89,33 ± 4,30	77,22 ± 3,60*
Загальне здоров'я	70,97 ± 3,13	67,67 ± 3,11
Життєздатність	67,83 ± 2,53	66,30 ± 2,24
Соціальне функціонування	85,0 ± 3,15	82,41 ± 3,30
Рольове емоційне функціонування	75,55 ± 6,87	69,13 ± 4,78
Психічне здоров'я	66,93 ± 3,09	69,78 ± 2,64
Фізичний компонент здоров'я	56,11 ± 1,04	52,70 ± 0,69*
Психічний компонент здоров'я	48,32 ± 1,60	48,49 ± 0,24

ожирінням визначений такий тип порушення харчової поведінки [14]. За опитувальником TFEQ-R18 емоційний тип спостерігався у осіб з нормальною масою тіла, стимулами до прийому їжі ставали поганий настрій, почуття образи, нудьга, дратівливість.

Наші результати збігаються з даними досліджень Дудар, Овдій [15], Крапівіної та співавт. [16], що дає змогу зробити висновок, що наявність у осіб з підвищеною масою тіла усіх трьох типів порушень підтверджує необхідність поведінкової терапії та комплексної корекції підвищеної маси тіла.

На наш погляд, переважання обмежувального типу порушень у осіб з підвищеною масою тіла мали значний відсоток. Він характеризується свідомими зусиллями для досягнення або підтримки зниження маси тіла самообмеженням у раціоні. Студенти з таким типом порушень акцентували увагу на бажанні контролювати масу тіла, періодично використовували різноманітні дієти, але відмічали низьку ефективність та повернення до початкової маси тіла.

Зміни харчової поведінки дуже часто відображаються на фізичному та особливо психічному стані особистості. Для визначення оцінки критеріїв якості життя та його складових: фізичного, психологічного, рівня самостійності, суспільного життя, функціонування у навколишньому середовищі, духовності, було використано сучасний стандартизований опитувальник, що визначає соціальне, психічне та фізичне самопочуття людини – SF-36 (від. англ. 36-Item Short-Form Health Survey); Nottingham Health Profile, WHOQOL-100, WHOQOLBREF [18].

За нашими результатами найбільш високі значення за шкалою фізичного функціонування – 92,41 бала у осіб з підвищеною масою та 94,33 бала – у осіб з нормальною масою свідчать про відсутність обмежень виконання фізичних навантажень фізичним станом респондентів та відсутність впливу стану здоров'я на фізичну активність. Значення рольового фізичного функціонування нижчі

в обох групах, а у осіб з підвищеною масою вірогідно у 1,2 раза менші, ніж у контролі (75,0 та 88,33 бала відповідно), що свідчить про певне обмеження повсякденної рольової діяльності, пов'язаної з виконанням роботи.

Самопочуття особами з підвищеною масою тіла оцінюється нижче, про що говорить вірогідне зниження інтенсивності болю. Вплив больових відчуттів та їх інтенсивності на здатність займатися повсякденною діяльністю у цих осіб більш значущий, больові відчуття є частішими та інтенсивнішими. За чотирма шкалами фізичний компонент здоров'я є нижчими у осіб з підвищеною масою тіла, що свідчить про певні обмеження їх загального рівня життєдіяльності. Значення цього показника не мали вірогідних відмінностей між групами, але, незважаючи на розуміння особами з підвищеною масою тіла необхідності її контролю та свідомого харчового обмеження, підвищена маса не є для них причиною зниження життєвої та соціальної активності. Але визначені в обох групах практично однакові недостатньо високі показники психічного компонента здоров'я – 48,49 бала у осіб з підвищеною та 48,32 – з нормальною масою тіла свідчать, що в цілому студентська молодь не задоволена якістю життя.

В останні роки спостерігається стійке зниження стану здоров'я студентської молоді [19]. Оцінка якості життя за допомогою опитувальника SF-36 показала, що студенти молодших курсів Мінського медичного університету мають найбільш низькі показники, що відображають незадоволеність якістю життя, зниження фізичних резервів, життєвої активності [19, 20]. Відмічено зниження показників за шкалами «рольове емоційне функціонування» та «психічне здоров'я», що опосередковує перешкоджання емоційного стану виконання повсякденної роботи – зниження обсягу роботи, збільшення часу її виконання, непрямі ознаки депресії, тривоги.

У осіб з підвищеною масою тіла визначено позитивний кореляційний зв'язок між

показником ПТ та показниками неконтрольованої харчової поведінки за опитувальником TFEQ-R18 ( $r=0,426058$ ,  $P<0,05$ ) та емоційний тип ( $r=0,396147$ ,  $P<0,05$ ). Слід відзначити, що наявні кореляційні зв'язки стосуються менш значущих типів порушень, бо провідним у дослідній групі є саме обмежувальний тип. На наш погляд, у відсутності зв'язків можуть відігравати важливу роль спроби контролю за масою тіла, які викликають її коливання у осіб з підвищеною масою з обмежувальним типом. Це підтверджує вірогідний зв'язок між показником обмежувального типу та ПТ ( $r=0,364258$ ,  $P<0,05$ ) у групі контролю.

Опубліковані дані досліджень з використанням анкет Composite International Diagnostic Interview серед 3021 особи віком від 14 до 21 року у Німеччині, які показали відсутність зв'язку між порушеннями харчової поведінки та значеннями ІМТ [21]. Нами не виявлено залежності якості життя від типів змін харчової поведінки у осіб з підвищеною масою тіла. В групі контролю визначені вірогідні позитивні кореляційні зв'язки обмежувального типу з фізичним функціонуванням ( $r=0,425683$ ,  $P<0,05$ ) та фізичним компонентом здоров'я ( $r=0,443754$ ,  $P<0,05$ ), між показниками обмежувального типу та психічного стану – соціального функціонування ( $r=0,577319$ ,  $P<0,05$ ), психологічного здоров'я ( $r=0,516766$ ,  $P<0,05$ ) та психічного компонента здоров'я ( $r=0,384989$ ,  $P<0,05$ ).

Такі результати свідчать безпосередньо про менший відсоток обмежувальної поведінки у студентів з нормальною масою тіла, контроль за її постійністю безпосередньо відтворюється на цілій низці критеріїв якості життя, хоча їх значення переважають показники основної групи. Наслідки такого контролю для осіб з нормальною масою виявляються більш дієвими. У осіб з підвищеною масою тіла відсутність зв'язків порушень з показниками якості життя можна пояснити насамперед тим, що студенти, які вже мають підвищену масу тіла, ще не відчують клінічних проявів розвитку патологічних

станів, пов'язаних із зайвою масою та ожирінням, не мають значного обмеження життєдіяльності та погіршення самопочуття, хоча і оцінюють якість свого життя дещо нижче.

Таким чином, порушення харчової поведінки визначені у 85,19% осіб з підвищеною масою тіла та у 41,46% групи контролю. У студентів з підвищеною масою тіла виявлено усі три типи порушень з переважанням обмежувального та екстернального типу, у осіб з нормальною масою переважають екстернальний та обмежувальний типи. Особливості порушень харчової поведінки у осіб з підвищеною масою сприяють вірогідному зниженню якості життя за показниками ролі фізичного функціонування, болю та загального фізичного компонента здоров'я. Зміни харчової поведінки у осіб з нормальною та підвищеною масою тіла потребують індивідуального підходу до формування навичок здорового способу життя та виправлення порушеного харчового стереотипу, що будуть протидіяти подальшому збільшенню маси та сприятимуть підвищенню якості життя.

**Ю.С. Шевченко, Л.Э. Веснина, И.П. Кайдашев**

### **ОСОБЕННОСТИ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ У ЛИЦ С НОРМАЛЬНОЙ И ПОВЫШЕННОЙ МАССОЙ ТЕЛА**

С помощью опросников Голландского DEBQ и трехфакторного TFEQ-R18 определены особенности пищевого поведения и их влияние на качество жизни у молодых людей в возрасте от 18 до 25 лет, которые были распределены на две группы по индексу массы тела (ИМТ). В группу контроля вошли 41 человек с нормальной массой тела (ИМТ=18,5-24,9 кг/м<sup>2</sup>), в исследуемую группу – 27 человек (ИМТ выше 25 кг/м<sup>2</sup>) с повышенной массой. Определено наличие нарушений пищевого поведения у 85,19 % лиц с повышенной массой тела и у 41,46 % лиц с нормальной массой. По структуре нарушений у людей с повышенной массой тела выявлено превышали ограничительный и экстернальный тип. У лиц с нормальной массой преобладали экстернальный и ограничительный типы нарушений пищевого поведения. Исследование показателей качества жизни с помощью опросника SF-36 показало у лиц с повышенной массой тела достоверное снижение ролевого физического функционирования и интенсивности боли. Общий компонент физического



здоровья недостаточно высокий в обеих группах, у лиц с повышенной массой тела был вероятно ниже – 52,70 против 56,11 балла. Сделан вывод, что нарушения пищевого поведения у лиц с нормальной и повышенной массой тела требуют индивидуального подхода к формированию навыков здорового образа жизни и исправления нарушенного пищевого стереотипа, что будет противодействовать дальнейшему увеличению массы и способствовать повышению качества жизни.

Ключевые слова: нарушение пищевого поведения; качество жизни; индекс массы тела; повышенная масса тела.

*Українська медичинська стоматологічна академія, Полтава*

**Yu. Shevchenko, L. Vesnina, I. Kaydashev**

### **FEATURES OF EATING BEHAVIOR IN PERSONS WITH NORMAL AND INCREASED BODY WEIGHT**

Using the Dutch Eating Behavior Questionnaire (DEBQ) and Three-factor Eating Questionnaire–R18 (TFEQ-R18), we defined the peculiarities of eating behavior and their impact on quality of life in young people aged 18-25 years. All participants were divided into two groups according to body mass index (BMI). The control group included 41 persons with normal body weight (BMI 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup>). The group of young adults with increased body weight (BMI over 25 kg/m<sup>2</sup>) consisted of 27 persons. We found eating behavior disorders in 85,19 % of overweight people and in 41,46 % of persons with normal weight. The restrictive eating behaviors as well as a significant percentage of violations by external type had predominated in overweight individuals by the structure of disorders. The external and restrictive types of eating behavior disorders were predominated in persons with normal weight. Investigation of quality of life using the SF-36 questionnaire showed a significantly decline in the physical role functioning and pain. Index of general physical health component, being not high enough in both groups, was significantly lower in overweight people with 52.70 points against 56.11. We concluded that the eating behavior disorders in persons with normal weight and in overweight people required an individual approach to forming healthy lifestyle and fixing broken food stereotype. It will counteract the further increase of body weight and contribute to improving the quality of life.

Key words: eating behavior, eating behavior disorders, quality of life, body mass index, increased body weight.

*Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava*

### **REFERENCES**

1. Petrov DP. Psychological and social aspects of obesity. Obesity (clinical essays). Baranovsky AY, Vorohobina NV, editors. St. Petersburg: Dialect, 2007. [Russian].
2. Sansone R, Wiederman M, Sansone L. The prevalence of borderline personality disorder among individuals with

- obesity: a critical review of the literature. *J Eat Behav.* 2000; 1: 93-104.
3. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: nutrition intervention in the treatment of anorexia nervosa, bulimia nervosa, and eating disorders not otherwise specified (EDNOS). *J Am Diet Assoc.* 2001; 7: 810-19.
4. Lazebnik LB, Zvenigorodskaya LA. [Metabolic syndrome and digestive organs]. Moscow: Anaharsis; 2009. [Russian].
5. Voznesenskaya TG, Safonova VA, Platonova NM. Eating disorders and comorbid syndromes in obesity and methods of their correction. *J Neurol Psychiatry named of SS Korsakov.* 2000; 12:49-52. [Russian].
6. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK $\beta$ /NF-kB and stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell.* 2008 Oct 3; 135(1): 61-73.
7. Van Strien T, Frijters JER, Bergers GPA, Defares PB. The Dutch Eating Behavior Questionnaire (DEBQ) for assessment of restrained, emotional, and external eating behavior. *IJED.* 1986; 5: 295-315.
8. Stunkard A J, Messick S. The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. *J Psychosom.* 1985; 29: 71-83.
9. Ware JE, Snow KK, Kosinski M, Gandek B. SF-36 Health Status Survey. Manual and interpretation guide. Lincoln R.I.: Quality Metric Incorporated. 2000.
10. Schachter S. Obesity and eating. *Science* 1968 Aug. 23; 361: 751-6.
11. Voznesenskaya TG. Eating disorders in obesity and their correction. *J Obes Metabol.* 2004; 2: 91-4. [Russian].
12. Lindeman M, Stark K. Emotional eating and eating disorder psychopathology. *J Eat Disord.* 2001; 9: 251-9.
13. Van Strien T, Ouwens MA. Effects of distress, alexithymia and impulsivity on eating. *J Eat Behav.* 2007; 8: 251-7.
14. Dedov II, Melnichenko GA, editors. Obesity: etiology, pathogenesis, clinical aspects. Moscow: Medical Information Agency; 2006. [Russian].
15. Dudar LV, Ovdij MO. The role of eating behavior and diet in the development of overweight of young people. *J Modern Gastroenterol.* 2013; 4(72): 31-4. [Ukrainian].
16. Krapivina NA, Artyuk NV, Tachkova OA The influence of certain hormones on the reproductive function and eating behavior of the obese women. *Vest Novosibirsk Med Univ.* 2007; 5 Suppl 3:19-23. [Russian].
17. de Lauzon B, Romon M, Deschamps V, Lafay L, Borys JM, Karlsson J, et al. The Three-Factor Eating Questionnaire-R18 is able to distinguish among different eating patterns in a general population. *J Nutr.* 2004; 134 Suppl 9: 2372-80.
18. The WHOQOL Group. The World Health Organization Quality of Life Assessment (WHOQOL): Position Paper from the World Health Organization. *Soc Sci Med.* 1995; 41: 1403-09.
19. Shagina I R. Improving the health of young people. Proceedings of the All-Russian scientific and practical



- conference with international participation “The actual problems of population policy and the state of population health of the Russian federation”. Astrahanj; 2009; p. 23-7.
20. Zelezinskaya GA, Korenko PN, Kravchenok MR, Sallum RI. The quality of life of medical students and medical residents. J Med of MSTU. 2006; 4:20-6. [Russian].
21. Lamertz C, Jacobi C, Yassouridis A, Arnold K, Henkel AW. Are obese adolescents and young adults at higher risk for mental disorders? A community survey. Obes Res. 2002; 11: 1152-60.

*Матеріал надійшов  
до редакції 04.06.2014*

# Вміст ліпідів і продуктів їх пероксидації в тимоцитах щурів за умов експериментального ульцерогенезу

В.А.Ковальова, Д.В.Шелест, Л.І.Остапченко

ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, Київ;  
E-mail: vikikov@univ.kiev.ua

*Досліджено вміст ліпідів і продуктів їх пероксидації в тимоцитах щурів при експериментальному ульцерогенезі. Встановлено вірогідне зростання вмісту дієнових кон'югатів (ДК), маленового діальдегіду (МДА) та шиффових основ (ШО) при експериментальних моделях виразки шлунка (етанолова і стресова). Встановлено, що при етаноловій виразці вміст ДК збільшується в 1,8 раза, МДА в 2,1 і ШО в 1,3 раза. При етаноловій і стресовій виразках зростає вміст холестерину в 1,7 і 1,5 раза, триацилгліцерину у 2 і 2,3 раза і жирних кислот у 2,2 та 1,9 раза відповідно відносно контролю. Зменшувався вміст фосфатидилетаноламіну в 1,5 та 1,3 раза відносно контролю. Також при стресовій моделі було відмічено зменшення вмісту фосфотидилінозитолу в 1,3 раза і збільшення лізофосфатидилхоліну в 1,7 раза щодо контролю. Таким чином, встановлено вірогідне зростання вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (ДК, МД, ШО), а також зміни вмісту нейтральних ліпідів (холестерину, триацилгліцерину) і фосфоліпідів у тимоцитах щурів при експериментальних моделях виразки шлунка.*

*Ключові слова:* виразкова хвороба шлунка; тимоцити; продукти пероксидації ліпідів; нейтральніліпідиди і фосфоліпідиди.

## ВСТУП

Нині виразкова хвороба шлунка є одним з найпоширеніших захворювань органів травлення людини у всіх країнах світу. Її виявляють у 5-10% дорослого населення, переважно у чоловіків віком до 50 років, причому за останні десятиріччя відмічено зростання захворюваності [1,2]. В Україні зареєстровано близько 4 млн. таких хворих [3]. Існує багато несприятливих факторів, що спричинюють хвороби травної системи, зокрема виразкову хворобу шлунка. Утворення виразок може бути наслідком стресу, зловживання алкоголем, незбалансованого харчування, паління, вживання нестероїдних протизапальних препаратів тощо. Це хронічне захворювання супроводжується появою виразкових дефектів слизової оболонки шлунка. Розвиток виразкової хвороби впли-

© В.А.Ковальова, Д.В.Шелест, Л.І.Остапченко

ває на організм комплексно, страждають такі органи, як печінка, підшлункова залоза, а також імунна система [4].

Завдяки імунній системі, яка захищає нас від патогенних впливів, більшість захворювань перебігає короткочасно і практично без ускладнень і наслідків, що руйнують здоров'я. Організм має широкий набір різних форм імунної відповіді та факторів захисту проти патогенного впливу [5]. Розрізняють первинні – центральні (кістковий мозок і тимус) та вторинні – периферичні (селезінка, лімфовузли, апендикс) органи імунної системи. Всі вони взаємопов'язані системою кровотоку, лімфотоку і єдиною системою імунорегуляції.

Центральні органи імунної системи виконують дуже важливі функції, забезпечуючи самовідновлення імунітету. В них проходять процеси проліферації клітин-попередників,

їх диференціювання та дозрівання, та заселення периферичних органів імунної системи зрілими імунокомпетентними клітинами. Тому біохімічне дослідження стану Т-лімфоцитів і імунного статусу загалом є дуже важливим для розуміння механізмів розвитку виразкової хвороби та можливої профілактики імунодефіциту.

Метою нашої роботи було дослідити вміст ліпідів і продуктів їх пероксидації в тимоцитах щурів за умов експериментальних моделей виразок (етанолової та стресової).

## МЕТОДИКА

У дослідах використовували вибірки з 10 білих нелінійних щурів обох статей масою  $200 \pm 17$  г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію, за добу до проведення дослідів вони мали доступ лише до води [6].

Етанолові виразки моделювали введенням у шлунок через зонд 1 мл етанолу в концентрації 80% [7]. Для отримання нейродистрофічних уражень шлунка за моделлю іммобілізаційного стресу в модифікації Гройсмана та Каревіної, так званого "соціального стресу" [8], щурів розміщували в металевих перфорованих патронах зі скляним вікном у донній частині, де розміщувалася голова. Патрони з тваринами розміщували в колонії вільноживучих щурів, в яких створювали умови для їх природного існування (освітлення, вода, корм).

Перед розтином тварин декапітували. Вміст дієнових кон'югатів (ДК) та маленового діальдегіду (МДА) в тимоцитах визначали спектрофотометричним методом, шиффових основ (ШО) – флюорометричним [9, 10]. Екстракцію ліпідів проводили за методом Kates [11]. Для визначення вмісту фракцій нейтральних і полярних ліпідів застосовували метод тонкошарової хроматографії (рухома фаза для нейтральних ліпідів містила гексан, діетиловий ефір і мурашину кислоту у співвідношенні 80:20:2; рухома фаза для поділу фосfolіпідів складалася з хлороформу,

метанолу і води у співвідношенні 50:25:4. Для проявлення фракцій використовували 10%-й розчин  $H_2SO_4$ ) [11]. Усі показники перераховано на 1 мг білка, його кількісний вміст визначали за методом Lowry [12].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що при етаноловій і стресових виразках зростає вміст ДК у 1,8 і 2 рази, МДА в 2,1 і 1,9 рази та ШО в 1,3 і 1,3 рази відповідно щодо контрольних значень (табл. 1).

ДК відносяться до токсичних метаболітів, які чинять пошкоджувальний вплив на білки та нуклеїнові кислоти [13]. Негативна роль МДА полягає у тому, що він зшиває молекули ліпідів і погіршує плинність мембран за рахунок двох альдегідних груп, які знаходяться на кінцях молекули. Внаслідок цього мембрана стає менше рухливою і більше ламкою. Порушуються процеси, пов'язані зі зміною її поверхні: фагоцитоз, піноцитоз, клітинна міграція тощо [13]. Безперервне накопичення ШО дестабілізує мембрани і сприяє деструкції клітин [14]. Нагромадження в організмі продуктів перекисного окиснення ліпідів – ПОЛ (ДК, МДА, ШО) [15] призводить до стимуляції монооксигеназної системи, зміни реакції ліпідного, гормонального, імунного, мікроелементарного, нейромедіаторного статусів, числа місць зв'язування і спорідненості рецепторів до лігандів, виснаження антиоксидантної системи [16].

Крім описаних вище негативних наслідків, спричинених накопиченням шкідливих метаболітів, зазначимо, що ліпідні пероксиди є попередниками при формуванні ейкозаноїдів, а АФК здатні до регуляторних впливів [17, 18]. Зокрема, вони стимулюють запасання в клітині вторинних месенджерів циклонуклеотидів: цАМФ і цГМФ, при цьому останній утворюється в результаті активації гідропероксидами цитоплазматичної гуанілатциклази. АФК викликають накопичення іонів кальцію в

**Таблиця 1. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у тимоцитах щурів за умов етанолової та стресової моделей виразок (M±m, n=10)**

Схема досліджу	Дієнові кон'югати, мкг/мг білка	Малоновий діальдегід, мкг/мг білка	Шиффові основи, ум. од.
Контроль	26,4±2,1	22,5±1,7	3,7±0,3
Етанол	46,9±3,7*	48,0±3,7*	4,0±0,3
Стрес	52,7±4,2*	42,9±3,4*	4,8±0,4*

Примітка. Тут і в таб. 2 і 3\*  $P \leq 0,05$  вірогідно відносно контролю

цитозолі та стимуляцію фосфорилування білків внаслідок активації протеїнкіназ та інгібування протеїнфосфатаз, активують білок Ras, який відіграє важливу роль при передачі сигналу до ядра. Загалом, АФК та ліпідні гідропероксида в низьких субтоксичних концентраціях здатні індукувати такі процеси, як експресія генів (в тому числі гени ранньої відповіді та інші протоонкогени), поділ клітин, активацію транскрипційних факторів (INF-k $\beta$ ), синтез білків (цитокінів тощо).

Ліпіди відіграють важливу роль в організмі, вони є структурними компонентами мембран, забезпечують реалізацію енергетичної та захисної функції. При змінах у відносному вмісті цих компонентів модифікуються мембранні структури, що призводить до порушення її проникності, функціонування трансмембранних насосів та мембранозв'язаних ферментів, передачі міжклітинних сигналів. Вважають, що формування деяких патологій пов'язане з зміною процесів внутрішньоклітинної трансдукції сигналу, основою якої є порушена взаємодія ендogenousного ліганду зі специфічним трансмембранним рецептором. Це безпосередньо впливає на метаболізм деяких фосфоліпідів –

попередників вторинних клітинних месенджерів (фосфатидилінозитол - ФІ, фосфатидилхолін - ФХ, ейкозаноїдів). Тому зміни вмісту окремих ліпідних фракцій можуть слугувати маркером численних патологій, зокрема виразки шлунка, раку, кардіоваскулярних, запальних хвороб.

У нашому дослідженні спостерігалось збільшення вмісту холестерину в 1,7 та 1,5 раза, триацилгліцерину в 2 та 2,3 раза та жирних кислот в 2,2 та 1,9 раза відповідно відносно контролю (табл. 2).

Фосфоліпіди – структурні та регуляторні компоненти мембран – беруть участь у підтриманні життєдіяльності всіх клітин, модулюючи процеси транспортування, механізми сигнальної трансдукції і міжклітинної взаємодії [19]. Встановлено, що при етаноловій та стресовій виразці зменшується в тимоцитах вміст фосфатидилетаноламіну (ФЕА) в 1,5 та 1,3 раза відповідно відносно контролю (табл. 3). При стресовій моделі також було відмічено зменшення вмісту ФІ в 1,3 раза та зростання кількості лізофосфатидилхоліну в 1,7 раза відносно контролю. Слід зазначити, що за умов дії таких ульцерогених чинників, як етанол та стрес, змінюються

**Таблиця 2. Вміст нейтральних ліпідів у тимоцитах щурів за умов етанолової та стресової моделей виразок (M±m, n=10)**

Схема досліджу	Холестерин, мкг/мг білка	Триацилгліцериди, мкг/мг білка	Жирні кислоти, %
Контроль	15,4±1,1	25,8±2,0	99,9±7,8
Етанол	26,8±2,0*	52,9±4,1*	221,7±17,6*
Стрес	23,8±1,8*	58,4±4,5*	192,3±15,2*

**Таблиця 3. Вміст (мкг/мг білка) фосфоліпідів у тимоцитах щурів за умов етанолової та стресової моделей виразок ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Схема досліду	Лізофосфатидилхолін	Фосфатидил-інозитол	Фосфатидилсерин	Фосфатидил-етаноламін
Контроль	1,0 $\pm$ 0,1	16,5 $\pm$ 1,1	42,2 $\pm$ 2,3	14,9 $\pm$ 1,0
Етанол	1,1 $\pm$ 0,1	14,7 $\pm$ 1,0	36,8 $\pm$ 2,9	10,1 $\pm$ 0,8*
Стрес	1,7 $\pm$ 0,1*	13 $\pm$ 0,9*	39,7 $\pm$ 3,1	11,5 $\pm$ 0,9*

переважно функціонально активні, заряджені фосфоліпіді: ФІ та ФЕА. Зростання вмісту ЛФХ за умов стресової моделі може бути пов'язане з активацією фосфоліпази  $A_2$  або процесів ПОЛ (підвищення інтенсивності змінює мікрів'язкість біомембран, сприяє відкриванню кальцієвих каналів, що посилює потік у клітину іонів кальцію, які активують мембранні фосфоліпази [20]).

Ліпідний склад тимоцитів щурів зазнає істотних змін за умов експериментального ульцерогенезу. Це у свою чергу може призвести до порушення плинності ліпідних шарів, цілісності клітинної мембрани і мембран органел таких, як мітохондрії та ендоплазматичний ретикулум, процесів передачі рецепторних сигналів, що може спричинити загибель клітин через некроз або апоптоз.

Таким чином, встановлено, що ліпідний склад тимоцитів щурів істотно змінюється за умов експериментального ульцерогенезу. Отримані результати свідчать про зниження вмісту фосфоліпідів та зростання вмісту нейтральних ліпідів і лізофосфатидилхоліну в тимоцитах щурів. Однією з причин таких змін може бути активація процесів ПОЛ, про що говорить підвищення вмісту ДК, ШО, МДА.

**В.А.Ковалева, Д.В.Шелест, Л.І.Остапченко**

#### **СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ПЕРОКСИДАЦИИ В ТИМОЦИТАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УЛЬЦЕРОГЕНЕЗА**

Исследовано содержание липидов и продуктов их пероксидации в тимоцитах крыс при экспериментальном ульцерогенезе. Установлено достоверное увеличение

содержания диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), шиффовых оснований (ШО) при экспериментальных моделях язвы желудка (этаноловая и стрессовая). Установлено, что при этаноловой язве содержание ДК увеличивается в 1,8 раза, МДА в 2,1 и ШО в 1,3 раза относительно контрольных значений. При стрессовой модели было отмечено увеличение содержания ДК в 2 раза, МДА в 1,9 и ШО в 1,3 раза. При этих язвах возрастает содержание холестерина в 1,7 и 1,5 раза, триацилглицерина в 2 и 2,3 раза и жирных кислот в 2,2 и 1,9 раза соответственно. Уменьшается содержание фосфатидилэаноламина в 1,5 раза и 1,3 раза соответственно относительно контроля. Также было отмечено уменьшение содержания фосфатидилинозитола в 1,3 раза и увеличение количества ЛФХ в 1,7 раза относительно контроля. Таким образом, установлено достоверное возрастание содержания продуктов перекисного окисления липидов, а также изменения содержания нейтральных липидов и фосфолипидов в тимоцитах крыс при экспериментальных моделях язвы желудка.

Ключевые слова: язвенная болезнь желудка; тимоциты; продукты пероксидации липидов; нейтральные липиды и фосфолипиды

*УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко.*

**V. A. Kovaleva, D. V. Shelest, L. I. Ostapchenko**

#### **THE CONTENT OF LIPIDS AND PRODUCTS OF THEIR PEROXIDATION OF RAT THYMOCYTES IN EXPERIMENTAL ULCEROGENESIS**

The work is dedicated to the research of the content of lipids and products of their peroxidation in rats thymocytes in experimental ulceration. It was found significant increase of the content of lipid peroxidation products diene conjugates (DC), malondialdehyde (MDA), schiff base (SB) in experimental models of gastric ulcers (ethanol and stress). It was established that under ethanol gastric the contents of DC increases by 1.8 times, MDA by 2.1 and SB by 1.3 times relative to control values. Under stress model it was observed an increase in the number of DC by 2 times, MDA by 1.9 and SB by 1.3 times relative to control. When ethanol and stress ulcers cholesterol



increased by 1.7 and 1.5 times, triacylglycerol by 2 and 2.3 times and fatty acids by 2.2 and 1.9 times, respectively, relative to controls. Phosphatidylethanolamine content decreases by 1.5 and 1.3 times compared to control. Also, the stress model, it was observed reduction of phosphatidylinositol by 1.3 times and increased lizofosfatydyhholinu by 1.7 times compared to control. Therefore, our studies indicate quantitative changes of lipid content (neutral- and phospholipids) in rats' thymocytes under experimental (ethanol and stress) ulceration. The reason of this changes may be activation of lipid peroxidation, as shown by the increase of lipid peroxidation products' (DK, MDA, SB) content.

Key words: peptic ulcer; thymocytes; lipid peroxidation products; neutrallipids and phospholipids

*Educational and Scientific Centre Institute of Biology Taras Shevchenko Kyiv National University.*

## REFERENCES

1. Vasylenko VKh, Hrebenev AL, Sheptulyyn AA. Ulcer disease. M.: Medicine:1987. [Russian].
2. Smyrnov IuV, Oslopov VN, Bylych YL. Epidemiological aspects of the combination of hypertension and ulcer disease. Ter arkh. 1990;2:48-50. [Russian].
3. Saenko VF, Homoliako YV, Buryi AN. Features of associated with Helicobacter pylori infection stomach and duodenum diseases' diagnosis and treatment in the surgical clinic. Klinichna khirurhii. 2001;6:14-18. [Ukrainian].
4. Shetty R, Kumar KV, Naidu MUR, Ratnakar KS. Effect of Ginkgo biloba extract on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. Indian J. of Pharmacology. 2000;32(6):313-317.
5. Royt A, Brostoff D, Meyl D. Immunology. M.: Mir; 2000. [Russian].
6. Zapadniuk YP, Zapadniuk VY, Zakharyia EA, Zapadniuk BV. Laboratory animals. Breeding, keeping, using in experiment. K.: Vyshcha shkola:1983. [Russian].
7. Academician, prof. RAMN Yvashkyn VT, prof. Rapoport SY, editors. Gastroenterology directory of practical doctor. M.: Sov. sport; 1999. [Russian].
8. Groysman SD, Karevina TG. About the effect of atropine on the stressor gastric mucosal lesions in rats Bibl. Ukaz. VINITI. Dep. Rukopisi. 1979;12:131. [Russian].
9. Orehovich VI. Modern methods in biochemistry. M.: Medicine; 1977. [Russian].
10. Gavrilov VP, Gavrilova AR, Mayorova IG. Methodology for determination of malondialdehyde in blood serum. Vopr.med.himii. 1987; 1: 118-22. [Russian].
11. Kates M. Techniques of lipidology, isolation, analysis and identification of lipids. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Amsterdam, NY: North-Holland Pub. Co.American Elsevier. 1972;269-610.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RI. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;193(1):265-75.
13. Tarasov NI, Teplyakov AT, Malahovich EV and other. State of lipid peroxidation and antioxidant defense in blood of patients with myocardial infarction, burdened by circulatory failure. Ter arkh. 2002;12:12-5. [Russian].
14. Kurashvili LV, Kosoy GA, Zaharova IR. Modern notion of lipid peroxidation and antioxidant system in pathological states. Metodicheskoe posobie. Penza: Ins-t usoversh. vrachey MZ RF; 2003. [Russian].
15. Boldyirev AA. Problems of endogenous lipid peroxidation products' analysis. Itogi nauki i tehniki.1986; 5:134. [Russian].
16. Mori T, Asano T, Matsui T, Muramatsu H. Intraluminal increase of superoxide anion follow transient focal cerebral ischemia in rats. Brain Res. 1999; 2:350-7.
17. Zozulya YuA, Baraboy VA, Sutkovoy DA, editors. Oxidation-antioxidant homeostasis in norm and pathology. Kiev: Nauk. Dumka; 1997. [Russian].
18. Zhuravlev AI. Development of BN Tarusov's ideas about the role of chain processes in biology. Bioantioxidants and regulation of metabolism in norm and pathology. M.: Nauka: 1982. [Russian].
19. Elliot V, Elliot D. Biochemistry and Molecular Biology. M.: Nauka; 2002. 446 p. [Russian].
20. Tsimmerman YaS. Essays of Clinical Gastroenterology. Perm.; 1992. 56-60. [Russian].

*Матеріал надійшов до редакції 26.11.2013*

## Вплив екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини

В.Я.Березовський<sup>1</sup>, І.Г.Літовка<sup>1</sup>, С.П.Весельський<sup>2</sup>, Р.В.Янко<sup>1</sup>, У.О. Жернокльов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; <sup>2</sup>Інститут фізіології імені Петра Богача Національного Київського університету ім. Тараса Шевченка, Київ;  
E-mail: litir@biph.kiev.ua

*Досліджували у весняний період 28-добовий вплив фармакологічної дози (5 мг/кг) мелатоніну на показники ремоделювання кісткової тканини 3-місячних щурів-самців із високим та низьким рівнем енергетичного метаболізму. Показано зниження активності остеобластів і зростання активності остеокластів незалежно від інтенсивності енергетичного метаболізму, підвищення концентрації глікозаміногліканів, вільних амінокислот. Це свідчить про пригнічення фізіологічного ремоделювання кісткової тканини і не сприяє підтриманню цілісності органічного матриксу та фіксації неорганічного компонента сполучної тканини – кристалів гідроксіапатиту.*

*Ключові слова:* мелатонін; кісткова тканина.

### ВСТУП

Мелатонін відіграє ключову роль як паракринна сигнальна молекула для локальної координації клітинних функцій і міжклітинних зв'язків. Водночас він може діяти і як типовий гормон для віддалених клітин-мішеней. Функціонально всі клітини, що продукують мелатонін, мають відношення до так званої дифузної нейроендокринної системи, універсальної системи адаптації та підтримки гомеостазу. За своїми властивостями він належить до циркадно-залежних регуляторів метаболізму.

Головними ефектами дії цього гормону на кісткову тканину є: стимулювання диференціації та активації остеобластів, гальмування диференціації остеокластів, нейтралізування утворених остеокластами вільних радикалів, посилення синтезу колагенових і неколагенових білків кісткового матрикса [1–3]. Існують і інші гіпотези щодо впливу мелатоніну на ці процеси. Виявлено залежність між високою його концентрацією в плазмі крові щурів-самців лінії Вістар і низьким рівнем маркерів формування кісткової

тканини [4]. В іншому дослідженні проаналізовано ефекти мелатоніну на культуру остеобластів за наявності остеокластів. Виявлено пригнічення активності обох типів клітин, що дало змогу зробити висновок про існування балансу між ними [5, 6]. Автори підкреслюють важливість міжклітинної взаємодії остеобластів і остеокластів для розуміння їх фізіологічної активності так само, як і реакції на додавання мелатоніну.

У наших попередніх дослідженнях спостерігали вплив 28-добового перорального введення екзогенного мелатоніну у фізіологічній дозі 1 мг/кг у весняний період на фізіологічне ремоделювання кісткової тканини у молодих і дорослих щурів-самців лінії Вістар [7–9]. Показано вірогідне підвищення його концентрації у сироватці крові молодих і дорослих дослідних щурів на 50 та 25,6% відповідно, вірогідне підвищення активності лужної фосфатази у кістковій тканині обох досліджуваних груп тварин та її зниження у сироватці крові 9-місячних щурів і тенденцію до зниження у 3-місячних. Підвищення ендогенного вмісту гормону

супроводжувалося вірогідним зростанням активності кислої фосфатази в 1,6 і 1,3 раза та концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові в 3,1 і 1,4 раза у 3- та 9-місячних щурів відповідно. Експресія гена інсуліноподібного фактора росту I у тварин обох досліджуваних груп мала тенденцію до підвищення. Зроблено висновок, що введення мелатоніну у дозі 1 мг/кг значно інтенсифікує фізіологічне ремоделювання кісткової тканини як у молодих, так і дорослих щурів.

Відомо, що в популяції щурів існують особини з високим і низьким рівнем енергетичного метаболізму (РЕМ). Виникає питання чи однаково вони реагують на введення екзогенного мелатоніну? Чи збільшена до фармакологічного рівня доза мелатоніну діє так само як фізіологічна?

Мета цієї роботи – дослідити показники ремоделювання кісткової тканини щурів із високим та низьким рівнем метаболізму після введення екзогенного мелатоніну.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 24 молодих (3 міс) щурах-самцях лінії Вістар у весняний період (березень–квітень), одержаних із розплідника віварію Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України. Тварини знаходилися у стандартних умовах віварію при природному циклі світло/темрява та отримували звичайний раціон харчування.

Споживання кисню визначали методом непрямой калориметрії о 10.00 ранку натщесерце. Усі вимірювання проводили три рази. Розраховували споживання кисню у мілілітрах за 1 год на 1 кг. Всю популяцію щурів-самців розділили на тварин із низьким та високим РЕМ. Їм перорально у фармакологічній дозі 5 мг/кг протягом 28 діб вводили 1 мл водної суспензії мелатоніну («Unipharm Inc.», США) о 10.00. Контрольним щурам у той самий час вводили еквівалентну кількість дистильованої води.

У сироватці крові щурів за допомогою

стандартних наборів реактивів визначали лужну фосфатазу (ЛФ, «Лахема», Чехія) – показник формування кісткової тканини, а також кислу фосфатазу (КФ, «BioSystems», Іспанія), тартратрезистентну кислу фосфатазу (ТРКФ, «BioSystems», Іспанія), глікозаміноглікани (ГАГ) – показники резорбції [10]. В екстракті кісткової тканини досліджували уранові кислоти [11], гіалуронідазну активність [12].

Концентрацію вільних амінокислот і ліпідів у кістковій тканині розраховували методом тонкошарової хроматографії. Для визначення основних фракцій ліпідів у кістковій тканині стегнову кістку очищали від м'язів і відмивали від кісткового мозку. Наважку кісткової тканини (100 мг) знежирювали і зневоднювали в спирті та ацетоні (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 пластинах Silufol (Чехія) розміром 15×15 см, попередньо активуючи їх упродовж 1 год в термостаті при 110°C. Водночас у хроматографічну камеру для кращого насичення вносили фільтрувальний папір і наливали суміш розчинників: гексан–діетиловий ефір–оцтова кислота (7:23:1) [14].

Для визначення амінокислотного складу знежирену та зневоднену стегнову кістку піддавали гідролізу при 100°C 20 хв у розчині 0,04 моль/л  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1:10). Центрифугували 30 хв при 3000  $\text{хв}^{-1}$ . Супернатант випарювали при 40–60°C і розчиняли в 0,1 мл 50 %  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ . 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 результатів здійснювали з використанням програми OriginPro 8.5. Визначали такі статистичні показники:

середнє значення –  $M$ , середнє квадратичне відхилення –  $m$ , вірогідність різниці двох масивів значень –  $P$ , який знаходили за критерієм  $t$  Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Метаболічний стан клітинних елементів кісткової тканини, які характеризують інтенсивність її фізіологічного відновлення/руйнування, ми оцінювали вимірюючи відповідні маркери двох основних типів клітин, що беруть участь у фізіологічному ремоделюванні кістки: остеобластів та остеокластів.

Після перорального введення мелатоніну спостерігали загалом у групі тенденцію до зниження активності ЛФ на 8% порівняно з контрольними значеннями. Активність ЛФ у сироватці крові у тварин із високим та низьким РЕМ вірогідно не змінювалася. Виявлено лише тенденцію до її незначного (3%) зростання при високому РЕМ і тенденцію до зниження активності на 6% порівняно з контролему щурів із низьким РЕМ.

Отримані нами результати узгоджуються з літературними даними щодо негативного впливу високих концентрацій мелатоніну на маркери формування кістки [4], однак суперечать тому, що мелатонін у фармакологічних дозах стимулює проліферацію остеобластів та підвищує активність ЛФ [2, 17].

Виявлено зростання на 78% ( $P < 0,001$ ) активності КФ у сироватці крові щурів. У щурів із високим і низьким РЕМ відзначено підвищення активності КФ на 92 і на 72% ( $P < 0,001$ ) відповідно порівняно з контролем (рис.1, а). Таким чином, спрямованість змін активності КФ була однаковою як загалом, так і у тварин із різним РЕМ. Активність ТРКФ у щурів знизилася в цілому на 72% ( $P < 0,001$ ) відносно вихідних значень. У тварин як із високим, так і низьким РЕМ активність ТРКФ знижувалася на 79 і 85 % ( $P < 0,001$ ) відповідно (рис.1, б).

Вважаємо, що екзогенний мелатонін

пригнічує процеси фізіологічного ремоделювання у молодих тварин, а саме: сприяє зниженню активності остеобластів і зростанню активності остеокластів незалежно від РЕМ та загалом по групах. Про це свідчать показники відповідних ферментів. Аналогічні дані наведено Schroeder та співавт. [18], які показали, що екзогенний мелатонін у фармакологічній дозі гальмує резорбцію кісток. Проте існують також інші відомості. Показано, що мелатонін знижує резорбцію кісткової маси внаслідок пригнічення регуляції RANK-L [19].

Припускаємо, що пригнічення фізіологічного ремоделювання кісткової тканини після введення екзогенного мелатоніну посилюється ендogenousними ендокринними впливами. Адже відомо, що фармакологічні дози мелатоніну пригнічують тиреоїдну активність. А зниження функції щитоподібної залози суттєво впливає на структурно-метаболічний стан кісткової тканини. За літературними даними при зменшенні концентрації тиреоїдних гормонів знижується активність як остеобластів, так і остеокластів. Це призводить до 2-3-кратного гальмування швидкості ремоделювання кісткової тканини [20, 21].

Основні біохімічні механізми обміну колагену та протеогліканів у кістковій тканині аналізували визначаючи концентрацію ГАГ, уронових кислот та гіалуронідазну активність. Ці показники відображають реактивність сполучної тканини у відповідь на зовнішні подразники. Після введення фармакологічної дози мелатоніну спостерігали підвищення концентрації ГАГ у сироватці крові на 29 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. У тварин із високим та низьким РЕМ спрямованість реакції була однаковою – тенденція до підвищення.

Відомо, що надлишок ГАГ змінює колоїдну структуру кісткової тканини, посилює її гідрофільність, що спричиняє набухання і розпушення колагенових волокон. Тобто відбуваються руйнівні зміни органічного

матриксу кісткової тканини під впливом надлишку мелатоніну, які призводять до зниження консолідації колагенових волокон та їх зв'язку із кристалами мінералів.

У складі ГАГ містяться уронові кислоти, вміст яких зростає у сироватці крові при остеопорозі. Ми не виявили їх вірогідних змін як загалом у групі, так і у тварин із різним РЕМ. Гіалуронідазна активність у сироватці крові не змінювалася.

Загальна біохімічна особливість кісткової тканини – високий вміст ліпідів. Вони є важливою складовою сполучної тканини, проте їх роль у мінералізації кісткової тканини вивчена недостатньо. Зокрема, це стосується ролі білково-ліпідних комплексів у процесі остеогенезу та утворенні ядер кристалізації.

Досліджуючи концентрацію загальних ліпідів після введення мелатоніну, ми виявили її зниження у кістковій тканині на 13% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем.

Відомо, що фосфоліпіди відіграють суттєву роль у функціонуванні клітинних оболонок, внутрішньоклітинному обміні та виконують ключову роль у зоні контакту

некальцифікованого та кальцифікованого хрящів. Саме там розташована базофільна лінія, яка у людей та ссавців може бути охарактеризована як фронт мінералізації. При визначенні концентрації фосфоліпідів по групі загалом, а також у тварин із високим та низьким РЕМ, ми не виявили вірогідних змін порівняно з контролем. Хоча спостерігалася тенденція до зниження цього показника на 10%.

Концентрація решти фракцій – загального, вільного та ефірів холестерину, вільних жирних кислот і тригліцеридів як загалом у групі, так і у тварин із високим та низьким РЕМ не змінювалася відносно контролю.

Амінокислоти – це саме ті базальні структури, з яких білки створюють свою первинну і всі наступні рівні організації. Концентрація більшості досліджуваних нами вільних амінокислот у кістковій тканині щурів загалом по групі після 28-добового прийому екзогенного мелатоніну зростала. Із 14 груп амінокислот зростання відмічено в 9 випадках, а саме: проліну та оксипроліну на 80% ( $P < 0,01$ ), лейцину – на 33% ( $P < 0,05$ ), фенілаланіну – на 75% ( $P < 0,05$ ), ізолейцину – на 67% ( $P < 0,01$ ). Вірогідне зниження

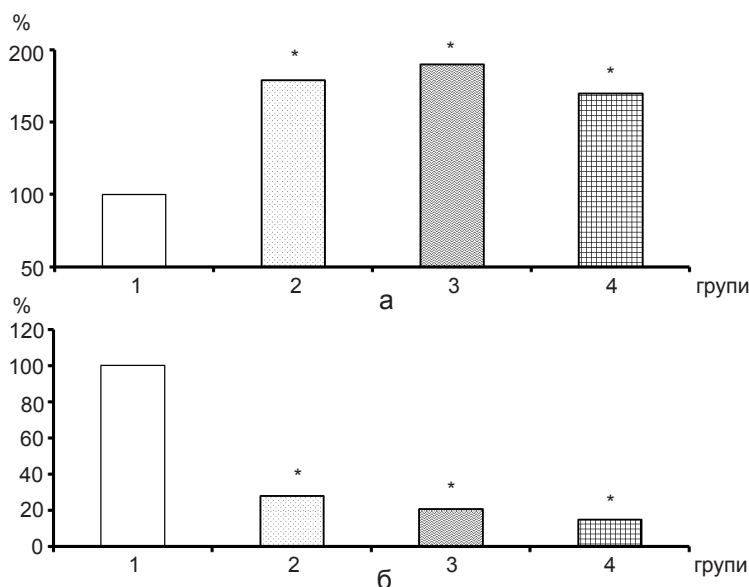


Рис.1. Активність кислої фосфатази (а) та тартратрезистентної кислої фосфатази (б) у сироватці крові молодих щурів після введення мелатоніну: 1 – контроль, 2 – загалом по групі, 3 – високий рівень енергетичного метаболізму, 4 – низький рівень енергетичного метаболізму. \*  $P < 0,001$  порівняно з контролем



спостерігали лише концентрації валіна та триптофану на 57% порівняно з контролем.

У особин із високим РЕМ спостерігали збільшення концентрації гліцину та метіоніну на 55% ( $P < 0,01$ ) і зменшення валіну та триптофану на 50% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. У щурів із низьким РЕМ знизилася концентрація аланіну та глобуліну на 28% ( $P < 0,01$ ), збільшилася концентрація проліну та оксипроліну на 88% ( $P < 0,01$ ), лейцину – на 60% ( $P < 0,01$ ), фенілаланіну – на 75% ( $P < 0,01$ ) та ізолейцину – на 66% ( $P < 0,01$ ) порівняно з контролем.

Зміни концентрації амінокислот, що безпосередньо беруть участь у синтезі колагену в кістковій тканині молодих тварин, після впливу екзогенного мелатоніну були односпрямованими. В більшості випадків ці показники вірогідно зростали, що може свідчити про пригнічення синтезу колагену органічного матриксу кісткової тканини. Отримані нами результати свідчать про негативний вплив фармакологічної дози мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини.

Таким чином, введення молодим щурам мелатоніну у фармакологічній дозі у весняний період пригнічує фізіологічне ремоделювання кісткової тканини. А саме: сприяє зниженню активності остеобластів і зростанню активності остеокластів незалежно від споживання кисню та загалом по групі, підвищенню концентрації ГАГ, вільних амінокислот. Це, на нашу думку, не сприяє підтриманню цілісності органічного матриксу та фіксації неорганічного компонента сполучної тканини – кристалів гідроксіапатиту.

**В.А.Березовский<sup>1</sup>, И.Г.Литовка<sup>1</sup>,  
С.П.Весельский<sup>2</sup>, Р.В.Янко<sup>1</sup>, У.А.Жерноклев<sup>1</sup>**

### **ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА НА РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ**

Исследовали в весенний период 28-суточное влияние фармакологической дозы (5 мг/кг) мелатонина на показатели

ремоделирования костной ткани 3-месячных крыс-самцов с высоким и низким уровнем энергетического метаболизма. Показано снижение активности остеобластов и возрастание активности остеокластов независимо от интенсивности энергетического метаболизма, повышение концентрации гликозаминогликанов, свободных аминокислот. Это свидетельствует об угнетении физиологического ремоделирования костной ткани и не способствует поддержанию целостности органического матрикса и фиксации неорганического компонента соединительной ткани – кристаллов гидроксиапатита.

Ключевые слова: мелатонин; костная ткань.

**V.A.Berezovsky<sup>1</sup>, I.G.Litovka<sup>1</sup>, S.P.Veselsky<sup>2</sup>,  
R.V.Janko<sup>1</sup>, U.A.Zhernoklev<sup>1</sup>**

### **THE EFFECT OF EXOGENOUS MELATONIN ON BONE REMODELING**

It was investigated in spring 28-day experiment the administration of pharmacological doses (5 mg/kg) of melatonin to 3-month male rats with high and low levels of energy metabolism remodeling of bone tissue. It was shown the decrease in activity of osteoblast and increase of osteoclast activity regardless of energy metabolism intensity, increase in concentration of glycosaminoglycans and free amino acids. This indicates the inhibition of physiological bone remodeling and helps to maintain the integrity of the organic matrix and the inorganic component of the fixation of the connective tissue - hydroxyapatite crystals.

Key words: melatonin; bone tissue.

<sup>1</sup>*O.O.Bogomolets Institute of Physiology NAS, Kiev;*

<sup>2</sup>*Peter Bohach Institute of Physiology of Kiev National Taras Shevchenko University*

### **REFERENCES**

1. Anisimov V. Role of melatonin in organism and its practice in. St/ Petersburg: Systema: 2007 [Russian].
2. Nakade O, Koyama H, Ariji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res.* 1999; 27(2):106-10;
3. Roth JA, Byung-Gook Kim, Fei Song, Wen-Lang Lin, Moon-II Cho. Melatonin promotes osteoblasts differentiation and bone formation. *J Biological Chemistry.* 1999; 247(45):22041-47.
4. 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.
5. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone disease: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis. *J Osteoporosis.* 2010; 2010(1):1-10.
6. Suzuki N, Hattori A. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J Pineal*

- Res. 2002; 33(4):253–58.
7. Berezovsky VJ, Litovka IG, Kostjuchenko OS, Janko RV. Influence of melatonin on physiological regeneration processes of bone tissue of young rats. Space Technol. Sci. 2008; 14(3):75-81 [Ukrainian].
  8. Berezovsky VJ, Litovka IG, Veselsky SP, Zamorska TM, Janko RV. Influence of exogenous melatonin on lipids and amino acid warehouse in organic matrix of bone tissue. Space Technol. Sci. 2012; 18(3):78-82 [Ukrainian].
  9. Litovka IG, Berezovsky VA. The organic matrix adaptation and bone remodeling. Donetsk: Publisher Zaslavsky A.:2014 [Russian].
  10. Klyatskin SA, Lifshitz RI. Determination of glycosaminoglycans by orsinov 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. Diagnostics. 1996; 3:21-22 [Russian].
  13. Peter VI, Regerand TI, Lysenko EI. Extraction, separation and quantification of lipid fractions of blood serum. Lab Business. 1986; 6:339 [Russian].
  14. Way of sample preparation of biofluids detecting in lipids determination. Nature. Veselskiy SP, Lysachenko PS, Kostenko S.I., Gorenko ZA, Kurovska LF. Deklaratsiynny patent for vinahid №33564A, 15.02.2001. [Ukraine], stated 11.03.1999 -Byul.№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. Lab 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): 231–39.
  18. Schroeder A, Van Der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. J Maxillofacial Surgery. 1981; 9(1):15–25.
  19. Penarrocha Diago M, Oltra Moscardo M.J., Sanchis Bielsa J.M. Implantologia Oral. Barcelona, Spain: Ars Medica; 2005. Conceptos generales de implantologia. P.3–17.
  20. Greenspan SL. Effect of thyroid hormone on bone / Greenspan SL, Greenspan FS. Mezhd Zh Med Praktiki. 2001; 1:47-55 [Russian].
  21. Danilova LI. Thyroid hormones and bone metabolism. Med News. 2001; (9):3-7 [Russian].

*Матеріал надійшов  
до редакції 29.01.2015*

# Роль тромбоксану та лейкотрієнів у реалізації скоротливих реакцій ворітної вени, викликаних дією ацетилхоліну і норадреналіну

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

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»; E-mail: alenka\_vinogradova@ukr.net

*Досліджували вплив пікогаміду та зілеутону на тонічну скоротливу активність ізольованих препаратів ворітної вени щурів, індуковану ацетилхоліном ( $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л) і норадреналіном ( $5 \cdot 10^{-7}$  моль/л). Синтезовані ендотеліальними клітинами продукти перетворення арахідонової кислоти (простагландини, лейкотрієни) відіграють важливу роль у місцевій регуляції судинного тону. Утворені внаслідок каскаду ферментативних перетворень сполуки здатні модулювати ефект інших вазоактивних чинників. Пікогамід ( $6,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) – блокатор тромбоксанових рецепторів і тромбоксансинтази – пригнічує ацетилхолініндуковані скорочення ізольованих сегментів ворітної вени з інтактним ендотелієм на 29 % та норадреналініндуковані – на 45 % щодо контролю. Отримані результати свідчать про участь тромбоксану та/ або ендопероксиду  $H_2$  у досліджуваних нами судинних реакціях. Часткове усунення досліджуваних тонічних реакцій блокатором 5-ліпоксигенази зілеутоном ( $4,2 \cdot 10^{-5}$  моль/л) на 23% відносно контрольних значень свідчить про те, що у підвищенні тону ворітної вени під дією ацетилхоліну і норадреналіну задіяні продукти ліпоксигеназного шляху перетворення арахідонової кислоти.*

*Ключові слова:* ацетилхолін; норадреналін; ворітна вена; тромбоксан; лейкотрієни.

## ВСТУП

Метаболіти арахідонової кислоти відіграють важливу роль у регуляції судинного тону як за умов норми, так і патології. Із арахідонової кислоти утворюється велика кількість метаболітів з різними характеристиками, що об'єднуються під загальною назвою – ейкозаноїди. Існує три основні шляхи їх синтезу: циклооксигеназний (ЦОГ) каскад ферментативних перетворень, яким утворюються простагландини; ліпоксигеназний, котрим синтезуються лейкотрієни і деякі гідроперокси; та шлях утворення цитохрому P-450, яким формуються P450-ейкозаноїди. Внаслідок усіх цих перетворень утворюються вазоактивні речовини або ж сполуки, що здатні модулювати ефект інших вазоактивних чинників [1]. Серед усієї групи ейкозаноїдів

тромбоксан  $A_2$  та простагландин  $I_2$  є найбільш важливими у механізмі підтримання серцево-судинного гомеостазу. Вони утворюються в ендотелії судин і в тромбоцитах і чинять протилежні ефекти [2,3].

Здатність до синтезу ЦОГ-залежних простаноїдів, зокрема простагландинів  $D_2$  та  $E_2$ , тромбоксану  $A_2$  мають клітини Купфера, що у великій кількості знаходяться в печінці та її судинах (в тому числі і у ворітній вені – ВВ) [4, 5]. Після блокади ЦОГ у ВВ собак відбувається потужна констрикція брижових та ворітних судин, але завдяки компенсаторним механізмам загальний кровотік у печінці може залишатись незмінним [6]. У ВВ морських свинок виявлено тромбоксанові рецептори, а також здатність судини змінювати свою скоротливу активність під дією тромбоксану і простагландинів  $D_2$ ,  $E_2$  [7]. У

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

дослідах, проведених на венах щурів, було показано, що арахідонова кислота і тромбін викликають ендотелійзалежне підвищення тону судин у реакціях, індукованих норадреналіном [8]. Участь простаноїдів також виявлена у механізмі дії агоністів  $\alpha_1$ - та  $\alpha_2$ -адренергічних рецепторів судин пальця людини [9]. Звуження загальної сонної артерії щурів, індуковане норадреналіном, реалізується через  $\alpha_1$ -адренорецептори і є залежним від судинозвужувальних простагландинів [10]. У дослідженнях на базилярній артерії та аорті собак перфузія індометацином судин з інтактним ендотелієм викликає зменшення констрикторних відповідей на дію норадреналіну, що автори пов'язують з вивільненням ендотелієм констрикторних факторів циклооксигеназного шляху утворення [11, 12]. Раніше нами було показано, що індометацин пригнічує тонічну активність ізольованих препаратів ВВ зі збереженим ендотелієм, індуковану як ацетилхоліном, так і норадреналіном, що підтверджує участь простаноїдів у реалізації таких судинорухових реакцій [13].

Метою нашого дослідження було перевірити можливу участь тромбоксану та лейкотрієнів у опосередкуванні тонічних реакцій ВВ, зумовлених дією ацетилхоліну та норадреналіну.

## МЕТОДИКА

Експериментальні дослідження проведені на 40 білих нелінійних лабораторних щурах обох статей масою 200–300 г. У гострому досліді після евтаназії за допомогою глибокої наркотизації хлороформом у тварин здійснювали лапаротомію та видаляли ВВ. Ретельно відпрепаровану від сполучної тканини та периваскулярних сплетень судину закріплювали у плексигласовій камері з проточним підігрітим розчином Тіроде. Тут судинні препарати підлягали пасивному розтягнанню з силою близько 5 мН та витримували впродовж 30 хв. Розчин, температуру якого підтримували в межах 37°C за

допомогою термостата, постійно подавали у камеру по проточній системі зі швидкістю 2–2,5 мл/хв. З тією самою швидкістю надходили досліджувані речовини. Скорочення ізольованого фрагмента ВВ реєстрували за допомогою тензометричної установки [14]. Зміни тонічного напруження гладеньких м'язів ізольованих сегментів ВВ вимірювали в абсолютних одиницях – міліньютонх. У роботі були використані: ацетилхолін, норадреналін (ВАТ «Здоров'я», Харків), пікотамід, зілеутон («Sigma-Aldrich», США). Для визначення участі у досліджуваних реакціях тромбоксану, синтезованого стінкою ВВ під дією ацетилхоліну та норадреналіну, застосовували неселективний блокатор тромбоксансинтетази та тромбоксанових рецепторів – пікотамід ( $6,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) [15]. Для дослідження загальної ролі лейкотрієнів у реалізації дії норадреналіну та ацетилхоліну на тонічну активність ВВ застосовували неселективний блокатор 5-ліпоксигенази – зілеутон ( $4,2 \cdot 10^{-5}$  моль/л). Кожну серію дослідів було проведено на 10 ізольованих препаратах ВВ печінки щурів.

Отримані результати оброблені з використанням аналітичного пакета Statistica 6.0 («StatSoft Inc.», США). Амплітуда скорочень судинних препаратів представлена як  $M \pm S$  (середні значення  $\pm$  середнє квадратичне відхилення). Зміни вважали статистично значущими при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У літературі існують дані, які свідчать про вплив антагоністів рецепторів тромбоксану  $A_2$ /простагландину  $H_2$  в ацетилхолініндукованих скоротливих реакціях судин [16,17]. У контрольних дослідах ацетилхолін спричиняв скорочення ВВ з амплітудою  $5,38 \pm 0,99$  мН. Після попередньої аплікації пікотамідом амплітуда цих скорочень знижувалися до  $3,8 \pm 1,09$  мН (рис.1). Підвищення тону ВВ, викликане дією норадреналіну, у контрольній групі становило  $3,99 \pm 0,74$  мН ( $n=10$ ). Після

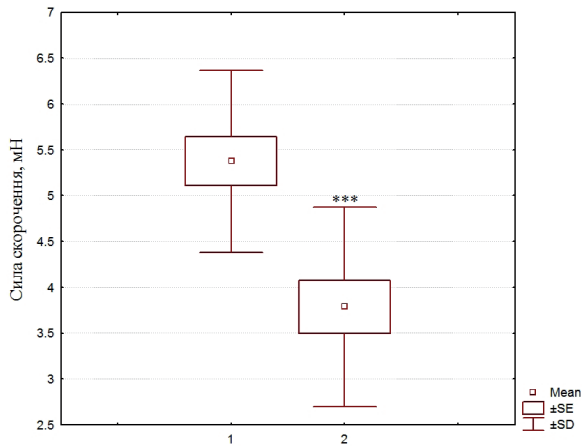


Рис.1. Амплітуда тонічних скорочень ізолюваних препаратів ворітної вени щура, індукованих ацетилхоліном ( $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л) до (1) та під час (2) дії пікотаміду ( $6,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л); \*\*\*  $P < 0,001$

блокування дії тромбоксану пікотамідом амплітуда норадреналініндукованих тонічних реакцій ізолюваних судинних препаратів була  $2,6 \pm 0,68$  мН (рис.2).

Отримані результати свідчать про часткове опосередкування тромбоксаном підвищення тону ВВ, зумовленого дією як ацетилхоліну, так і норадреналіну. Тромбоксанові рецептори можуть також активуватись попередником тромбоксану простагландином

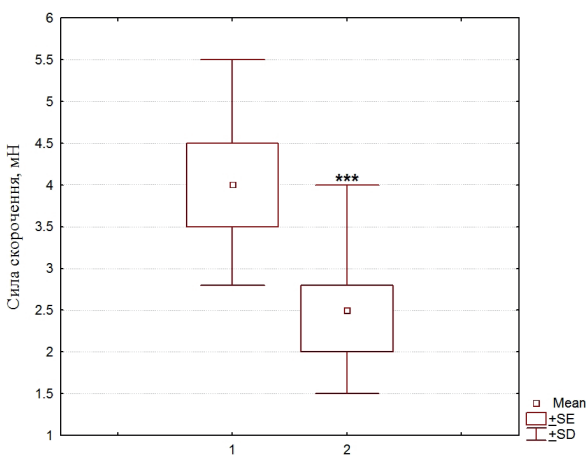


Рис.2. Амплітуда тонічних скорочень ізолюваних препаратів ворітної вени щура, індукованих норадреналіном ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л) до (1) та під час (2) дії пікотаміду ( $6,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л); \*\*\*  $P < 0,001$

$H_2$  тому, цілком ймовірно, що він задіяний у досліджуваних нами реакціях.

Разом з тим є відомості, що у ацетилхолініндукованих реакціях коронарних артерій кролів простагландини участі не беруть, але в них задіяні лейкотрієни  $C_4$  та  $D_4$  [18]. У зв'язку з цим ми вирішили дослідити загальну участь лейкотрієнів у опосередкуванні скоротливих реакцій ВВ, індукованих ацетилхоліном і норадреналіном.

У контрольних дослідах амплітуда тонічного скорочення ВВ, індукованого ацетилхоліном, становила  $4,6 \pm 1,17$  мН, після застосування зілеутону –  $3,56 \pm 1,0$  мН (рис. 3). У наступній серії дослідів амплітуда норадреналініндукованих тонічних скорочень ВВ у контрольній групі щурів становила  $4,29 \pm 1,03$  мН. На тлі дії зілеутону (рис.4) цей показник знизився до  $3,34 \pm 0,86$  мН. Статистично вірогідне зменшення амплітуди тонічних скорочень ВВ, викликаних дією ацетилхоліну та норадреналіну після застосування блокатора ферменту 5-ліпоксигенази зілеутону, свідчить про участь лейкотрієнів у цих реакціях.

Таким чином, ми розглянули два механізми часткового опосередкування вазоактивної дії норадреналіну та ацетилхоліну

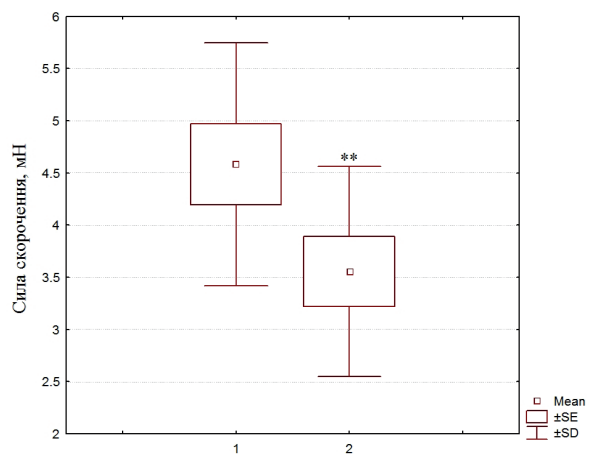


Рис.3. Амплітуда тонічних скорочень ізолюваних препаратів ворітної вени щура, індукованих ацетилхоліном ( $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л) до (1) та під час (2) дії зілеутону ( $4,2 \cdot 10^{-5}$  моль/л); \*\*  $P < 0,01$



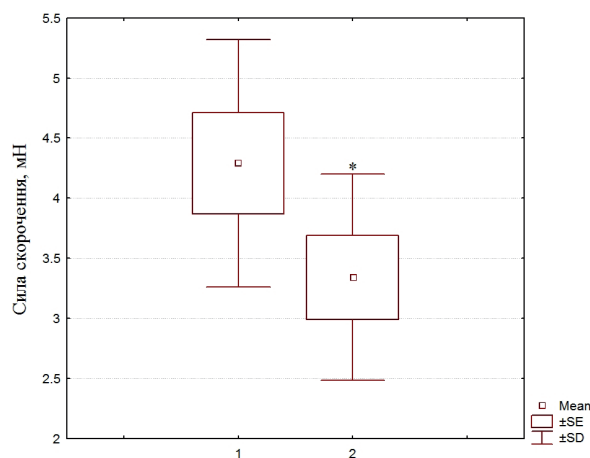


Рис. 4. Амплітуда тонічних скорочень ізольованих препаратів ворітної вени щура, індукованих норадреналіном ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л) до (1) та під час (2) дії зилеутону ( $4,2 \cdot 10^{-5}$  моль/л); \*  $P < 0,05$

на ВВ щурів. Результати наших досліджень вказують на участь тромбоксану (продукту циклооксигеназного перетворення арахідонової кислоти) у реалізації цієї дії. Також нам вдалося виявити причетність лейкотрієнів до констрикторних реакцій ВВ, індукованих ацетилхоліном та норадреналіном.

Аналіз вищезгаданих даних літератури безперечно вказує на складні механізми регуляції судинного тону, в тому числі і судин печінки, у яких істотну роль відіграють ейкозаноїди. Подальше вивчення таких механізмів необхідне для формування фундаментальних знань, а також для з'ясування механізмів виникнення і розвитку патологічних станів судин та розробки методів їх корекції.

## ВИСНОВКИ

Пікотамід пригнічує ацетилхолін- та норадреналініндуковані тонічні скорочення ізольованих сегментів ВВ з інтактним ендотелієм, що свідчить про участь у цих реакціях тромбоксану та/ або ендопероксиду  $H_2$ .

У реалізації тонічних відповідей ВВ щурів, зумовлених дією ацетилхоліну та норадреналіну, задіяні також продукти ліпоксигеназного шляху перетворення арахідонової

кислоти, на що вказує часткове усунення досліджуваних реакцій блокаторм ліпоксигенази зилеутоном.

**О.О. Виноградова, П.І. Янчук,  
О.М. Пасичніченко**

## РОЛЬ ТРОМБОКСАНА И ЛЕЙКОТРИЕНОВ В МЕХАНИЗМЕ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ВОРОТНОЙ ВЕНЫ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ДЕЙСТВИЕМ АЦЕТИЛХОЛИНА И НОРАДРЕНАЛИНА

Изучали влияние пикотамида и зилеутона на тоническую сократительную активность изолированных препаратов воротной вены крыс, индуцированную ацетилхолином ( $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л) и норадреналином ( $5 \cdot 10^{-7}$  моль/л). Пикотамид ( $6,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) подавляет ацетилхолин- и норадреналининдуцированные тонические сокращения изолированных сегментов воротной вены с интактным эндотелием, что свидетельствует об участии тромбоксана и / или ендопероксида  $H_2$  в этих реакциях. Частичное устранение указанных реакций блокаторм липоксигеназы зилеутоном ( $4,2 \cdot 10^{-5}$  моль/л) свидетельствует о том, что в таких реакциях задействованы продукты липоксигеназного пути превращения арахидоновой кислоты.

Ключевые слова: ацетилхолин; норадреналин; воротная вена; тромбоксан; лейкотриены.

**О.О. Vinogradova, P.I. Yanchuk,  
O.M. Pasichnichenko**

## ROLE OF THROMBOXANE AND LEUKOTRIENES IN MECHANISMS OF CONTRACTILE REACTIONS OF PORTAL VEIN, INDUCED BY ACETYLCHLINE AND PHENYLEPHRINE

Effects of picotamide and zileuton on tonic contractile activity of the rat portal vein preparations, induced by acetylcholine ( $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l) and phenylephrine ( $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l) were investigated. Conversion of arachidonic acid products (prostaglandins, leukotrienes) synthesized by endothelial cells, plays an important role in the local regulation of vascular tone. The compounds formed in a cascade of enzymatic transformations can modulate the effect of other vasoactive factors. Picotamide ( $6,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) - thromboxane receptor and thromboxane-synthase blocker - depress acetylcholine-induction tonic contraction of isolated segments of portal vein with intact endothelium by 29% and norepinephrine-induction reduction of 45% relative to the control values. The obtained results indicate a participation of thromboxane and/or endoperoxide  $H_2$  in this reaction. Partial inhibition of the contractions by 5-lipoxygenase blocker zileuton ( $4,2 \cdot 10^{-5}$  mol/l) at 23% relative to control values suggests, that products of lipoxigenase pathways of

arachidonic acid conversion are involved in mechanisms of specified reactions. These data indicate complex mechanisms of regulation of vascular tone of the portal vein, which play an important role eicosanoids. Further study of these mechanisms is necessary for the formation of basic knowledge, as well as to elucidate the mechanisms of occurrence and development of pathological conditions of vessels and the development of methods of their correction.

Key words: acetylcholine; phenylephrine; portal vein; thromboxane; leukotrienes.

## REFERENCES

- Iniguez MA, Cacheiro-Llaguno C, Cuesta N. Prostanoid function and cardiovascular disease. Arch Physiol Biochem. 2008 Jul;114(3):201-9.
- Fresno M, Diaz-Munoz M, Cuesta N. Prostanoid actions in cardiovascular physiopathology. An R Acad Farm. 2008 May;74(4):1-23.
- Smyth EM, Grosser T, Wang M. Prostanoids in health and disease. J Lipid Res. 2009 Apr; 50:S423-8.
- Graupera M, March S, Engel P. Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005 Apr; 288(4):763-70.
- Pestel S, Schlaf G, Götze O. Differences in the involvement of prostanoids from Kupffer cells in the mediation of anaphylatoxin C5a-, zymosan-, and lipopolysaccharide-dependent hepatic glucose output and flow reduction. Lab Invest. 2003 Dec; 83(12):1733-41.
- Kinoshita G, Washizu M, Kondo M. The effect of indomethacin on liver blood flow and oxygen supply-uptake relationship in the dog. J Vet Med Sci. 1995 Apr; 57(2):193-7.
- Eglen R, Whiting R. The action of prostanoid receptor agonists and antagonists on smooth muscle and platelets. Br J Pharmacol. 1988 Jun; 94(2):591-601.
- Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. Hypertension. 1986 Apr; 8:344-8.
- Srinivasa A, Marshall JM. Effects of cyclooxygenase inhibition on vascular responses evoked in fingers of men and women by iontophoresis of 1- and 2-adrenoceptor agonists. J Physiol. 2011 Sep; 589(18):4555-64.
- Higashi Y, Sasaki S. Excess norepinephrine impairs both endothelium-dependent and -independent vasodilation in patients with pheochromocytoma. Hypertension. 2002; 39:513-18.
- Wang A, Nishihashi T, Murakami S. et al. Noradrenaline-induced contraction mediated by endothelial COX-1 metabolites in the rat coronary artery. J Cardiovasc Pharmacol. 2003 Dec; 42:S39-42.
- Roberts RE, Kendall DA, Wilson VG.  $\alpha$ 2-adrenoceptor and NPY receptor-mediated contractions of porcine isolated blood vessels: evidence for involvement of the vascular endothelium. Br J Pharmacol. 1999 Dec; 128:1705-12.
- Pasichnichenko O, Vynogradova O, Yanchuk P. Endothelium-dependent contraction of rat portal vein under the action of acetylcholine and norepinephrine. Fizyka zhivogo. 2009;17(2):127-9 [Ukrainian].
- Yanchuk P, Vynogradova O, Pasichnichenko O, Kostenko S. Participation of eicosanoids in the mechanism of contractile responses of the portal vein to the action of adrenaline and noradrenaline. Fiziol Zh. 2013; 59(6):43-48 [Ukrainian].
- Modesti P. Picotamide: an Inhibitor of the formation and effects of TxA2. Cardiovascular Drug Reviews. 1995 Dec;13(4):353-64.
- Rapoport RM, Williams SP. Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. Hypertension. 1996 Jul; 28:64-75.
- Kurashi K, Nishihashi T, Trandafir C. Diversity of endothelium-derived vasoconstricting factors arachidonic acid metabolites. Acta Pharmacol Sin. 2003 Nov; 24(11):1065-9.
- Jino H, Kurahashi K, Usui H. Possible involvement of endothelial leukotrienes in acetylcholine-induced contraction in rabbit coronary artery. Life Sci. 1996. – 59(12):961-67.

*Матеріал надійшов  
до редакції 22.10.2014*

## Порівняльне вивчення дії механічного стресу на еритроцити людини і тварин

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;  
E-mail: starling\_nataly@mail.ru

*Досліджували чутливість еритроцитів людини та тварин (бик, щур, кролик, кінь) до дії механічного стресу. Показано, що така дія призводить до часозалежного (5-60 хв) виходу катіонів калію з еритроцитів ссавців та часткового гемолітичного пошкодження клітин. При цьому рівні вивільнення іонів калію і гемолізу не збігалися для еритроцитів усіх ссавців, крім кролика. Найбільш чутливими до механічного стресу (60 хв) за гемолітичним пошкодженням були еритроцити щура (32 %), за вивільненням іонів калію – еритроцити бика (66 %), найменш чутливими за обома показниками – еритроцити кролика (близько 20 %). Проведений кореляційний аналіз показав статистично значущий негативний зв'язок між значеннями механічного гемолізу еритроцитів ссавців і поверхнево-об'ємного співвідношення клітин ( $r_s = -0,900$ ,  $P = 0,037$ ). Обговорюється можлива відповідність вмісту фосфатидилетаноламіну в мембранах еритроцитів ссавців і рівня втрати катіонів калію під час дії механічного стресу.*

*Ключові слова: еритроцити ссавців; механічний стрес; катіони калію; гемолітичне пошкодження.*

### ВСТУП

Головне функціональне навантаження еритроцитів – транспортування кисню до усіх органів та тканин. Їх найважливішою фізичною характеристикою, що забезпечує функціонування, є здатність до деформації, яка дає змогу проходити по судинах, розміри яких подібні або навіть менші за еритроцит. Здатність еритроцитів до деформації залежить від ендогенних (в'язкоеластичні властивості мембрани; в'язкість цитоплазми, розміри клітин) [1] і екзогенних факторів [2]. Так, механічний стрес, який відбувається при використанні систем штучного кровообігу, спричинює її зменшення [3]. Слід відмітити, що навіть невелике зниження цього показника супроводжується зменшенням прохідності клітин по капілярах, що призводить до тканинної ішемії [4]. Механічні напруги, що виникають у мембрані еритроцитів при їх деформації, можуть спричинити руйнування клітин [3].

© Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова, О.Є. Ніпот, Д.І. Александрова

Для вивчення механічного впливу на еритроцити використовують різні методи і способи. Деякі з них дають змогу оцінити деформацію тільки одного або декількох еритроцитів [5], інші дають інформацію про стан клітинної суспензії в цілому [6-8]. Ці способи мають деякі особливості. Так, для методу продавлювання клітинної суспензії через медичну голку властива низька відтворюваність результатів і невеликий об'єм суспензії [7], метод, запропонований Заводником із співавт. [6], характеризується досить низьким рівнем гемолітичного пошкодження клітин при тривалій дії стресу. У роботі [9] еритроцити піддають дії механічного стресу перемішуванням клітинної суспензії з пластиковими кульками за допомогою магнітної мішалки. Такий підхід дає змогу збільшити об'єм суспензії, який є достатнім для повної і всебічної характеристики клітин після дії стресу, підвищити рівень гемолітичного пошкодження еритроцитів і відтворюваність результатів.

Дослідження реакції клітин людини і різних видів тварин на дію механічного стресу є досить актуальними [10–12]. Для роботи були обрані еритроцити ссавців, що відрізняються за розмірами, транспортними характеристиками клітинної мембрани, а також за певними особливостями складу цитоплазми і цитоскелет-мембранного комплексу [13–17].

Мета нашої роботи – дослідити в порівняльному аспекті чутливість еритроцитів ссавців (людина, бик, щур, кролик, кінь) до дії механічного стресу (за рівнем гемолітичного пошкодження та вивільненням катіонів калію з клітин).

## МЕТОДИКА

Для дослідження використовували еритроцити, отримані з донорської крові людини, бика, коня, кролика та щура, заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир». Всі маніпуляції проводили відповідно до вітчизняних та міжнародних біоетичних норм.

Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали центрифугуванням (центрифуга ОПн-3У4.2, 3000 об/хв, 3 хв) у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, рН 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше 4 год при 0°C.

Клітини піддавали дії механічного стресу перемішуванням клітинної суспензії (гематокрит 20%) в ємності, що була заповнена пластиковими кульками діаметром 5 мм, при кімнатній температурі (22°C). Об'єм суспензії був 5 мл, кількість пластикових кульок – 31. Перемішували за допомогою магнітної мішалки ММ-5, швидкість обертання – 1200 об/хв [9]. Через різні часові інтервали (5-60 хв) відбирали суспензії еритроцитів для визначення виходу гемоглобіну та іонів калію з клітин.

Рівень гемолізу еритроцитів досліджували спектрофотометрично при довжині хвилі

543 нм. За 100% приймали поглинання проби, в яку додавали тритон X-100 (0,1 %).

Вихід іонів калію з еритроцитів в умовах стресу визначали за допомогою іонометра універсального ЕВ-74 з використанням іонселективного електрода ЕЛІС-121К і електрода порівняння ЕВЛ-1М3.1. Концентрацію іонів калію вимірювали в супернатанті суспензії еритроцитів (гематокрит 20%). 100 %-й вихід іонів калію з еритроцитів отримували руйнуванням клітин у результаті триразового циклу заморожування-розморожування.

Гематокрит суспензії еритроцитів визначали на мікрогематокритній центрифугі МГЦ-8 [18]. Осмоляльність розчинів речовини досліджували кріоскопічним методом із використанням осмометра ОМКА-1Ц-01.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми Statistica 6.0. Для перевірки статистичної значущості відмінностей досліджуваних числових показників застосовували критерії t Стьюдента та Манна-Уїтні. Кореляційний аналіз з використанням непараметричного коефіцієнта рангової кореляції Спірмена ( $r_s$ ) застосовували для аналізу зв'язків між досліджуваними показниками. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пошкодження клітин за умов механічного стресу оцінювали за двома показниками: вихід катіонів калію з клітин та рівень гемолізу (рис. 1). Слід відмітити, що тривала дія стресу призводить до часозалежного виходу  $K^+$  з еритроцитів людини і тварин. Однак характер втрати цих катіонів клітинами ссавців має видові особливості.

При порівнянні часового проміжку, після якого починається витік катіонів калію з еритроцитів ссавців, видно, що мінімально значуща втрата катіонів калію клітинами щура (перевищує 10 %) спостерігається після 10 хв, бика – 15 хв, кролика, людини і

коня – 30 хв дії стресу (див. рис. 1). В умовах тривалого інкубування еритроцитів при механічному стресі (60 хв) відбувається ви-

хід катіонів калію з клітин кролика на рівні 20 %. Для еритроцитів коня, людини і щура втрата калію становить 30-45 %, у той час як для клітин бика цей показник набагато вищий (65 %).

Найбільш стійкими до дії механічного стресу є клітини кролика, які містять максимальну кількість катіонів калію порівняно з еритроцитами інших досліджених ссавців

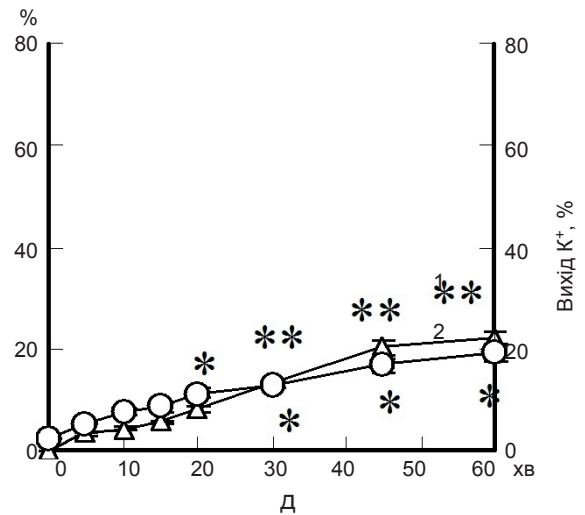
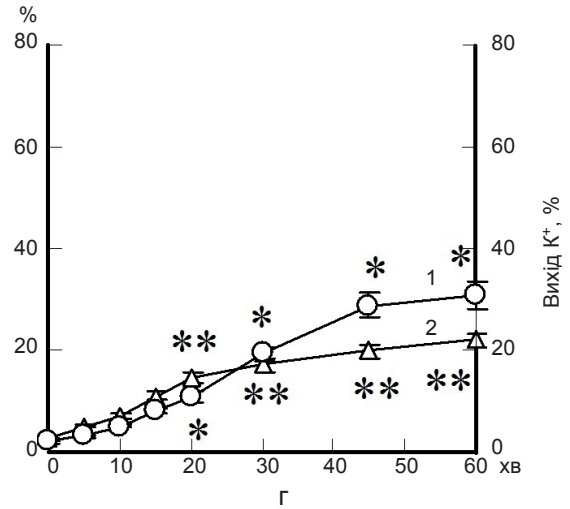
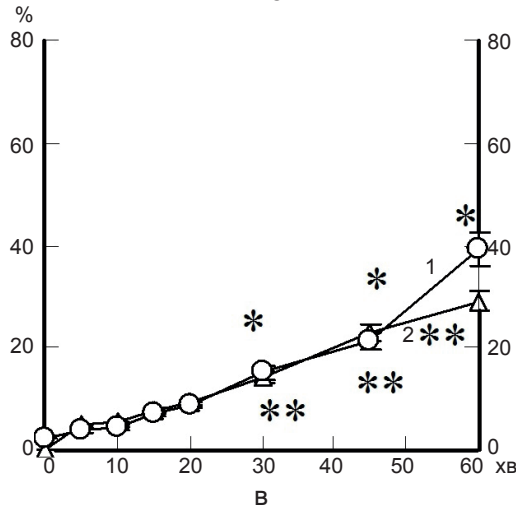
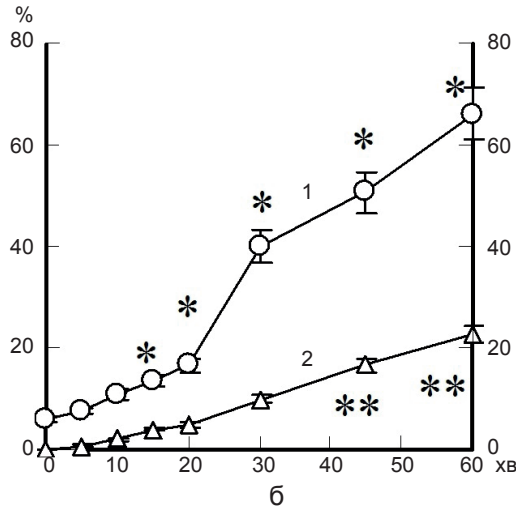
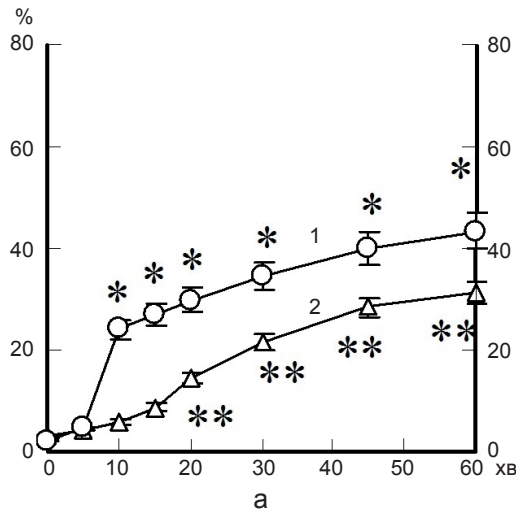


Рис. 1. Залежності виходу катіонів калію з клітин (1) і рівня гемолізу еритроцитів ссавців (2) від тривалості дії механічного стресу: а – щур, б – бик, в – людина, г – кінь, д – кролик.

\*, \*\*  $P < 0,05$  – статистично значущі відмінності порівняно з контрольними значеннями гемолізу і виходу  $K^+$  з клітин відповідно.



[14]. Клітини бика, які є натрійвмісними, характеризуються мінімальним вмістом катіонів калію [14] і високою чутливістю до дії стресу (див. рис. 1).

В умовах стресу разом з втратою еритроцитами ссавців внутрішньоклітинних катіонів калію може спостерігатися вихід макромолекул гемоглобіну (див. рис.1). Рівень гемолізу еритроцитів ссавців залежить від тривалості дії стресу на клітини. Слід відмітити вірогідні відмінності між рівнем механічного гемолізу еритроцитів людини і щура порівняно з клітинами бика, коня і кролика (за умов дії стресу протягом 60 хв;  $P < 0,05$ ).

Проведений кореляційний аналіз із використанням коефіцієнта рангової кореляції Спірмена показав статистично значущий зв'язок між значеннями механічного гемолізу еритроцитів тварин і розмірами їх клітин [4,10,12] (рис.2). Так, найбільш чутливі до дії механічного стресу еритроцити щура та людини характеризуються меншим поверхнево-об'ємним співвідношенням ( $S/V$ ) порівняно з більш стійкими клітинами бика, кролика і коня [19-21].

При вивченні гіпотонічного лізису ери-

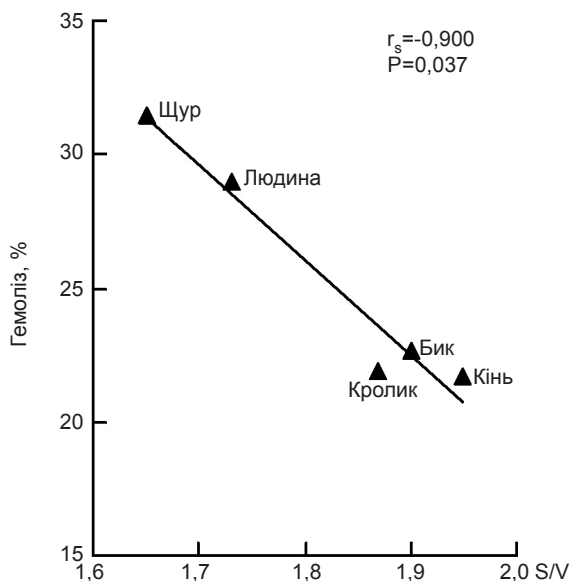


Рис.2. Взаємозв'язок рівня гемолізу еритроцитів ссавців за умов дії механічного стресу (60 хв) та їх поверхнево-об'ємним відношенням ( $S/V$ )

троцитів ссавців показано, що клітини за зниженням чутливості до гіпотонічних середовищ (оцінюється за індексом осмотичної крихкості) можна розташувати в ряд: кінь, бик, кролик, людина, щур [22]. Виходячи з результатів нашої роботи, еритроцити за зниженням чутливості до механічного стресу (оцінюється за гемолізом після 60 хв дії стресу) розташовуються в ряд: щур, людина, бик, кролик, кінь (див. рис. 1). Порівняльний аналіз послідовностей, які представлені вище, свідчить, що еритроцити ссавців, які чутливі до гіпотонічного лізису, достатньо стійкі до дії механічного стресу. Відомо, що гіпотонічне пошкодження пов'язують із розривом еритроцитарної мембрани внаслідок її розтягування при надходженні води у клітину [23]. Це говорить про те, що в наших експериментальних умовах переважним видом деформації еритроцитів є не розтягування, а стиск і зсув.

При порівнянні ступеня втрати іонів калію та молекул гемоглобіну для еритроцитів різних ссавців в умовах механічного стресу видно, що тільки для еритроцитів кролика рівні вивільнення іонів калію і гемолізу збігаються протягом усього часу дослідження. Таким чином, втрата клітинами кролика катіонів калію здійснюється тільки за рахунок руйнування клітин.

Для еритроцитів інших ссавців вихід іонів калію починає перевищувати рівень гемолітичного пошкодження після певного часу інкубування: людини – 50 хв, коня – 30 хв, щура – 5 хв, бика – 0 хв. Таким чином, для еритроцитів цих ссавців є два типи пошкодження в умовах стресу: повне та сублітичне. Останнє виявляється у вивільненні іонів калію з еритроцитів. В цілому до механічного впливу найбільш стійкими виявилися еритроцити кролика, рівень пошкодження яких за обома показниками (гемоліз та вивільнення іонів калію) був найменшим. Найбільш чутливими до стресу за рівнем гемолізу були еритроцити щура, за вивільненням іонів калію – еритроцити бика.

В основі пошкодження еритроцитів ссавців за умов дії стресу лежать процеси, що

пов'язані з формуванням трансмембранних дефектів [22,23]. Переважна більшість ліпідів мембран еритроцитів схильна до формування бішару, але деякі з них, наприклад фосфатидилетаноламін (ФЕА), утворюють гексагональні структури [24], що забезпечують мембрані додаткову «рухливість». За мембранним вмістом ФЕА (у відсотках від загального вмісту фосfolіпідів) еритроцити ссавців (за винятком клітин бика) можна розташувати в ряд: кролик (31,9), людина (27,2), кінь (24,3), щур (21,5) [17]. Слід зазначити, що мембрани еритроцитів щура, які найбільш чутливі до механічного стресу за виходом катіонів калію містять мінімальну кількість цього ліпиду, а механічно-стійкі клітини кролика характеризуються максимальним його вмістом (див. рис.1). Таким чином, чим вищий вміст ФЕА, тим менш чутливі клітини до механічного стресу. Схоже, що більш високий внутрішньомембранний вміст «небішарового» ФЕА в еритроцитах кролика дає змогу запобігати формуванню мембранних дефектів, проникних для внутрішньоклітинних катіонів калію, через транзиторну локальну реорганізацію бішару за умов дії механічного стресу.

Підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок, що рівень пошкодження еритроцитів ссавців при механічного стресу визначається не тільки видом ссавця, а і показником оцінювання. Наявність незначного пошкодження клітин за одним показником (наприклад, рівень гемолізу) не гарантує відсутності прихованих порушень, які виявлялися додатковими методами (наприклад, іонометричний метод для дослідження вивільнення іонів калію з клітин). Це ще раз підкреслює важливість всебічного вивчення клітин при дії стресових факторів. Аналізуючи такі результати, можна підібрати еритроцити тварин, реакція яких на стрес за деякими показниками буде близькою до еритроцитів людини. У цьому разі екстраполяція результатів доклінічних досліджень, що проведені на еритроцитах тварин на еритроцити людини буде обгрунтованою і правомірною.

**Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова, Е.Е. Ніпот,  
Д.И. Александрова**

## **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ МЕХАНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

Исследовали чувствительность эритроцитов человека и животных (бык, крыса, кролик, лошадь) к действию механического стресса. Показано, что такое действие приводит к времязависимому (5-60 мин) выходу катионов калия из эритроцитов млекопитающих и частичному гемолитическому повреждению клеток. При этом уровни высвобождения ионов калия и гемолиза не совпадали для эритроцитов всех млекопитающих, кроме кролика. Наиболее чувствительными к механическому стрессу (60 мин) по гемолитическому повреждению были эритроциты крысы (32%), по высвобождению ионов калия – эритроциты быка (66%), наименее чувствительными по обоим показателям – эритроциты кролика (около 20%). Проведенный корреляционный анализ показал статистически значимую отрицательную связь между значениями механического гемолиза эритроцитов млекопитающих и поверхностно-объемного соотношения клеток ( $r_s = -0,900$ ,  $P = 0,037$ ). Обсуждается возможное соответствие между содержанием фосфатидилэтаноламина в мембранах эритроцитов млекопитающих и уровнем потери катионов калия во время действия механического стресса.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих; механический стресс; катионы калия; гемолитическое повреждение.

**N.M. Shpakova, N.V. Orlova, E.E. Nipot,  
D.I. Aleksandrova**

## **COMPARATIVE STUDY OF MECHANICAL STRESS EFFECT ON HUMAN AND ANIMAL ERYTHROCYTES**

Sensitivity of human and animal (bovine, rat, rabbit, equine) erythrocytes to the effect of mechanical stress has been studied. Mechanical stress effect was demonstrated to result in a time-dependent (5-60 min) release of potassium cations out of mammalian erythrocytes and a partial hemolytic cell damage. Herewith the release levels of potassium ions and hemolysis did not coincide for erythrocytes of all the mammals except rabbit ones. The most sensitive to mechanical stress (60 min) by the parameters of hemolytic damage and potassium ion release were rat (32%) and bovine (66%) erythrocytes respectively, the lowest sensitive by both parameters were rabbit ones (about 20%). Implemented correlation analysis has demonstrated a statistically significant negative relation between the values of mechanical hemolysis of mammalian erythrocytes and surface-volumetric ratio of cells ( $r_s = -0.900$ ,  $P = 0.037$ ). A feasible relationship between the content of phosphatidylethanolamine in mammalian erythrocyte membranes and the level of potassium cation loss under mechanical stress effect is under discussion.

Key-words: mammalian erythrocytes; mechanical stress; potassium cations; hemolytic damage.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

## REFERENCES

- Plasenzotti R, Stoiber B, Posch M, Windberger U. Red blood cell deformability and aggregation behaviour in different animal species. *Clin Hematol Microcirc.* 2004;31(2):105-11. PubMed PMID: 15310945.
- Muravyov AV, Kislov NB, Tikhomirova IA, Mikhailov PB, Muravyov AA. Influence of plasma viscosity and hematocrit on deformation of erythrocytes. *Russ J Biomech.* 2013;17(2):75-83 [Russian].
- Baskurt OK, Meiselman HJ. Red blood cell mechanical stability test. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;55(1):55-62. PubMed PMID: 23445627.
- Kameneva MV, Undar A, Aniaki JM, Watach MJ, Calhoun JH, Borovetz HS. Decrease in red blood cell deformability caused by hypothermia, hemodilution, and mechanical stress: factors related to cardio pulmonary bypass. *ASAIO J.* 1999 Jul-Aug;45(4):307-10. PubMed PMID: 10445736.
- Pantaler ER, Degtyarev AV, Zhutchenko IA. Dynamic deformation of single red blood cells in hypertonic media. Theoretical and practical aspects of modern cryobiology: Collection of scientific papers. Kiev: Naukova Dumka; 1989:6-9 [Russian].
- Zavodnik IB, Piletskaya TP, Stepuro II. Mechanical lysis of human erythrocytes. Membranes stabilizing by plasma proteins. *Ukr Biochem J.* 1991;63(6):72-8 [Russian].
- Fedosova SN, Kudokotseva EV. Modifying action of curantyl on the osmotic susceptibility of red blood cells. *Problems of Cryobiology.* 1995;(1):27-31 [Russian]
- Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ. Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage. *Biorheology.* 2004;41(2):79-89. PubMed PMID: 15090678.
- Shpakova NM, Orlova NV, Alexandrova DI, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, assignee. Method of erythrocyte destruction. Ukraine patent 52701, IPC<sup>8</sup> G 01 N 33/48. № u 2010 00983. 2010 Sept 10. [Ukraine]
- Jikuya T, Tsutsui T, Shigeta O, Sankai Y, Mitsui T. Species differences in erythrocyte mechanical fragility: comparison of human, bovine, and ovine cells. *ASAIO J.* 1998 Sep-Oct;44(5):M452-5. PubMed PMID: 9804471.
- Pohl M, Wendt MO, Pelzer S. Characterization of mechanical in vitro hemolysis and sub-hemolysis. 2: Variables of state and dimensionless characteristic values of hemolysis. *Biomed Tech. (Berl.).* 2000 Mar;45(3):51-6. German. PubMed PMID: 10761285.
- Yokoyama N, Sakota D, Nagaoka E, Takatani S. Alterations in red blood cell volume and hemoglobin concentration, viscoelastic properties, and mechanical fragility caused by continuous flow pumping in calves. *Artif Organs.* 2011 Aug;35(8):791-9. PubMed PMID: 21843294.
- Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel. *Eur Biophys J.* 2013;42(1):33-46. PubMed PMID: 23104624.
- Bogner P, Sipos K, Ludány A, Somogyi B, Miseta A. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes. *Eur Biophys J.* 2002;31(2):145-52. PubMed PMID: 12012118.
- Liu L, Lei T, Bankir L, Zhao D, Gai X, Zhao X, et al. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds. *J Comp Physiol B.* 2011 Jan;181(1):65-72. PubMed PMID: 20878327.
- Matei H, Frentescu L, Benga G. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *J Cell Mol Med.* 2000 Oct-Dec;4(4):270-6. PubMed PMID: 12067461.
- Wessels JMC, Veerkamp JH. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *Biochim Biophys Acta.* 1973 Jan 2;291(1):190-6. PubMed PMID: 4684609.
- Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics: a handbook. Kondrahina SP, editor. Moscow: ColosS; 2004. 520 p. [Russian].
- Betticher DC, Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu. *Comp Biochem Physiol A.* 1989;93(2):429-32. PubMed PMID: 2573457.
- Jones DA The importance of surface area/volume ratio to the rate of oxygen uptake by red cells. *J Gen Physiol.* 1979 Nov;74(5):643-6. PubMed PMID: 512634.
- Kowluru R, Bitensky MW, Kowluru A, Dembo M, Keaton PA, Buican T. Reversible sodium pump defect and swelling in the diabetic rat erythrocyte: Effects on filterability and implications for microangiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 May;86(9):3327-31. PubMed PMID: 2541440.
- Shpakova NM. Temperature and osmotic resistance of erythrocytes of different mammalian species [dissertation]. Kharkov: Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; 2014 [Russian].
- Gordienko EA, Gordienko YuE, Gordienko OI. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon. *Cryo Letters.* 2003 Jul-Aug;24(4):229-44. PubMed PMID: 12955170.
- Ivkov VG, Berestovsky GN. Dynamic structure of lipid bilayer. Moscow: Nauka; 1981. 293 p. [Russian].

*Матеріал надійшов до редакції 09.07.2014*

## **Зміна показників тетанічного скорочення ішемізованого *m. soleus* в щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією**

**О. А. Мельничук, О. П. Мотузюк, С. Є. Швайко**

*Східноєвропейський національний університет ім. Лесі Українки;  
E-mail: olexiy.melnichuk@gmail.com*

*Вивчали зміни показників тетанусу ізолюваного ішемізованого *m. soleus* у щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією. Експерименти проводили на 15 щурах-самцях лінії Вістар, середньою масою 150 г, які були розділені на 3 групи: I група (контрольна) і дві групи, в яких індукували гостру ішемію м'язів задніх кінцівок: II група – щури без алкогольної інтоксикації, III група – з хронічною алкогольною інтоксикацією. Тензометричну реєстрацію механічної активності м'яза проводили в ізометричному режимі за умов безпосередньої електричної стимуляції м'язового препарату. Встановлено, що тетанічна сила ішемізованого *m. soleus* у щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією порівняно зі щурами без такої вірогідно не відрізняється, проте збільшується час досягнення її максимальних значень. Показано, що в досліджуваних групах порівняно з інтактними тваринами вірогідно зменшується тривалість стабільного рівня утримання тетанічної сили ішемізованим м'язом. Виявлені зміни часового ходу індивідуальних м'язових скорочень в тетанусі ішемізованого *m. soleus* у досліджуваних групах щурів, порівняно з контролем. Показано що ці зміни впливають на ефективність частотної сумачії послідовних м'язових скорочень в тетанусі ішемізованого м'яза та його швидкісно-силові характеристики.*

*Ключові слова: *m. soleus*; ішемія; алкогольна інтоксикація; контрактильні характеристики.*

### **ВСТУП**

Ішемічне ушкодження – один з найпоширеніших патологічних станів поперечно-смугастих скелетних м'язів нижніх кінцівок [1]. Це пов'язано зі значною частотою поширення облітеруючих захворювань артерій нижніх кінцівок [2], високою ймовірністю і частотою їх ушкодження й посттравматичними ускладненнями [3]. Артеріальна оклюзія – найпоширеніша причина ішемії нижніх кінцівок [2], а інші це: артеріальний тромбоз, емболія, травматичні розриви, зовнішнє стиснення [3] і хірургічні ускладнення [4].

Досить часто ішемію нижніх кінцівок діагностують в алкогользалежних людей. У них розвивається так званий синдром позиційної ішемії, спричинений стисненням

однієї з кінцівок вагою власного тіла внаслідок тривалого перебування у вимушеній позиції [3]. Обтяження ішемії нижніх кінцівок гострим чи хронічним впливом алкоголю не викликає сумніву, оскільки зловживання ним викликає біохімічні й патофізіологічні зміни у поперечно-смугастих скелетних м'язах [5] і призводить до розвитку алкогольної міопатії. Остання характеризується генералізацією атрофічного процесу в скелетних м'язах незалежно від їх гістологічної структури [6].

Більшість сучасних клініко-лабораторних досліджень присвячених вивченню ішемії нижніх кінцівок, стосуються морфогістологічних змін ішемізованих скелетних м'язів. Праці, пов'язані з вивченням їх механічних характеристик, нечисленні і ґрунтуються на моделюванні васкулярної дисфункції, зазвичай обтурації просвіту судин.

© О. А. Мельничук, О. П. Мотузюк, С. Є. Швайко



Мета нашого дослідження – виявлення ознак обтяжливого міотоксичного впливу алкоголю на зміну контрактильних показників ішемізованого *m. soleus* у щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією.

## МЕТОДИКА

Експерименти проводили на 15 щурах-самцях лінії Вістар середньою масою 150 г, яких утримували в стандартних умовах і на типовому раціоні віварію. Тварини були розділені на 3 групи по 5 у кожній: I група (контрольна) складалась з інтактних тварин; і дві групи в яких індукували гостру ішемію м'язів задніх кінцівок: II група – щури без алкогольної інтоксикації, III група – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією. Протокол експерименту був затверджений комісією з питань біоетики СНУ ім. Лесі Українки відповідно до правил “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, 1986).

Проводили хронічні (30 діб) і гострі (3 год) експерименти. Щурам III групи для індукції хронічної алкогольної інтоксикації протягом 30 діб через гастральний зонд № 12 *per os* вводили 40%-й етиловий спирт, з розрахунку 2 мл/100 г [7]. Тварини II групи аналогічним шляхом отримували еквівалентний об'єм дистильованої води.

Під час підготовки до гострого експерименту тварин наркотизували підшкірним введенням тіопенталу натрію (0,04 мг/100 г, підтримуюча доза – 0,1 мг /100 г, швидкість введення – 5-10 мл/хв). За 30 хв перед анестезією здійснювали премедикацію 0,1%-м атропіном для попередження ларинго- і бронхоспазму (0,1 мл). Евтаназію щурів проводили передозуванням анестетика (0,5 мг/100 г).

Унілатеральну 3-годинну ішемію задніх кінцівок в II і III групі щурів індукували оклюзією проксимального і дистального відділів *a. femoralis* поліамідними нитками,

у щурів з групи III – після закінчення хронічного експерименту. Провівши всі оперативні втручання, рану зашивали і дезінфікували 5%-м спиртовим розчином йоду.

Ізольований препарат *m. soleus* розміщували в камері тензометричної установки з постійно циркулюючим ізотонічним розчином Тіроде [8], при  $37 \pm 1$  °С. Проксимальний сухожильний кінець м'яза фіксували механічними затискачами нерухомо, дистальний – прикріплювали до датчика сили, який був з'єднаний з підсилювачем і комплексом АЦП-ЦАП. Аналоговий сигнал від датчика надходив на двоканальний аналого-цифровий перетворювач, розрядністю 10 біт з частотою дискретизації 0,01 Гц - 200 кГц. Вихідна сила м'яза відображалася на моніторі осцилографа.

Тетанічне скорочення камбалоподібного м'яза реєстрували в ізометричних умовах під час його безпосередньої електричної стимуляції через платинові електроди імпульсами прямокутної форми (тривалість – 0,1 мс, частота – 30 Гц, напруга – 2 В). Тривалість стимуляційного патерну становила 5 с, індіферентний період (період бездіяльності м'яза в інтервалах між стимуляційними паттернами) – 3 хв.

Аналізували такі контрактильні показники:  $F_{tet}$  (Tetanic Force) – тетанічну силу, TP (Time to Peak) – час досягнення піку тетанусу, FSL (Force Stable Level) – період стабільного утримання  $F_{tet}$  (інтервал часу, протягом якого відсутній позитивний чи негативний тренд на осцилограмі тетанусу), FuI (Fusion Index) – індекс злиття (рис. 1, а, б), FI (Fatigue Index) – індекс втоми.

$F_{tet}$  розраховували як пікову ізометричну напруженість м'яза в кожному тетанусі, за 100% приймали максимальну амплітуду першого тетанусу *m. soleus* (у мілівольтах) відносно ізолінії в I групі щурів.

TP розраховували як інтервал часу від початку механічної відповіді м'яза на перший стимуляційний імпульс в стимуляційному



патерні до досягнення піку його ізометричної напруженості.  $F_{ul}$  визначали як відношення амплітуди максимальної релаксації передостаннього м'язового скорочення в тетанусі до максимальної амплітуди останнього м'язового скорочення [9].  $F_I$  розраховували як співвідношення кінцевої м'язової сили до початкової, яку приймали за 100% [10].

Для останнього м'язового скорочення в кожному послідовному тетанусі визначали такі показники:  $CT_{tet}$  (contraction time) – час скорочення,  $HRT_{tet}$  (half-relaxation time) – час напіврозслаблення [9] (див. рис. 1, б).

Швидкісно-силові характеристики *m. soleus* оцінювали на основі розрахунку для останнього м'язового скорочення в кожному тетанусі швидкості розвитку ізометричної сили під час скорочення ( $V_{Tet/CT}$ ) і швидко-

сті її зменшення під час розслаблення ( $V_{Tet/HRT}$ ) [9].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0 (“StatSoft”, США). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували критерій U Манна–Уїтні. Вірогідними вважали відмінності при  $P \leq 0,05$ . Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  похибка середнього ( $M \pm m$ ) і вказана кількість дослідів ( $n$ ).

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проаналізувавши осцилограми тетанусів ішемізованого м'яза в дослідних групах (II і

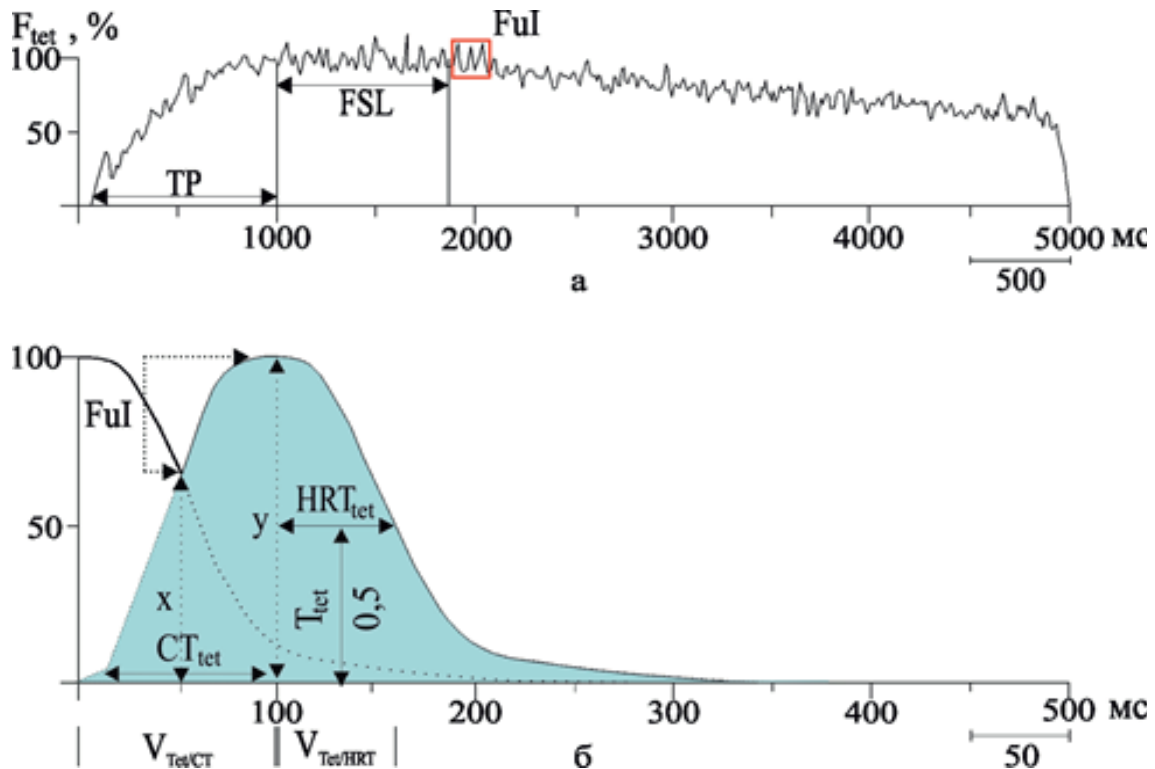


Рис. 1. Показники силової продуктивності м'яза: а – контрактильні показники, які аналізували для тетанусу *m. soleus*: тетанічна сила ( $F_{tet}$ ), час досягнення піку тетанусу (TP), період стабільного утримання  $F_{tet}$  (FSL), індекс злиття ( $F_{uI}$ ); б – параметри останнього м'язового скорочення в тетанусі камбалоподібного м'яза: час скорочення ( $CT_{tet}$ ), час напіврозслаблення ( $HRT_{tet}$ ), швидкість розвитку м'язової сили під час скорочення ( $V_{Tet/CT}$ ), швидкість зменшення м'язової сили під час розслаблення ( $V_{Tet/HRT}$ )

III) щурів ми з'ясували, що його контрактильні показники зазнають вірогідних змін порівняно з нативним м'язом у контролі. Ці зміни специфічні для кожної з експериментальних груп (рис. 2, а - е).

$F_{tet}$  камбалоподібного м'яза впродовж експерименту в усіх групах щурів зменшується рівномірно (див. рис. 2, б). В I (контрольній) групі цей показник в кожному наступному тетанусі відносно попереднього становить  $93,57 \pm 0,69\%$ . У II і III групах таке співвідношення було  $92,99 \pm 0,81$  і  $92,73 \pm 1,17\%$  відповідно.

Виявлено, що ішемізований м'яз розвиває вірогідно меншу  $F_{tet}$  порівняно з контролем ( $P \leq 0,05$ ; див. рис. 2, в). Такі результати вказують на рівномірний темп розвитку низькочастотної втоми нативного *m. soleus* у контролі й ішемізованого м'яза у II і III групах щурів. Це підтверджується однаковими значеннями FI: у I групі –  $0,55 \pm 0,04$ , у II і III групах –  $0,54 \pm 0,03$  і  $0,57 \pm 0,02$  відповідно.

У III групі щурів вірогідно збільшується TP порівняно з його значеннями в I і II. Для розвитку максимальної  $F_{tet}$  ішемізований м'яз в III групі тварин потребує більше часу, ніж нативний *m. soleus* в контролі та ішемізований в II групі (див. рис 2, г).

Окрім цього в II і III групах щурів у тетанусі ішемізованого камбалоподібного м'яза зменшується тривалість FSL порівняно з його значеннями в контролі ( $P \leq 0,05$ ; див. рис. 2, д). Проте, порівнюючи значення цього показника в III групі щурів з II, вірогідних його відмінностей не було виявлено.

Разом з цими змінами в тетанусі ішемізованого *m. soleus* в II і III групах щурів порівняно з контролем виявлено вищі значення FuI ( $P \leq 0,05$ ). Проте, в III групі порівняно з II вони не відрізняються (див. рис. 2. е). Ймовірно, це спричинене маскувальним ефектом ішемії, який унеможливорює виявлення відмінностей цього показника в III групі тварин порівняно з II.

Проаналізувавши часовий хід останнього м'язового скорочення в послідовних тета-

нусах ішемізованого м'яза в II і III групах щурів, ми виявили збільшення тривалості  $CT_{tet}$  порівняно з групою I ( $P \leq 0,05$ ). Однак, у III групі порівняно з II, вірогідне зменшення його тривалості виявлено тільки в 2 - 4, 6 й 7-му тетанусах ( $P \leq 0,05$ ; рис. 3, а).

Одночасно виявлені окремі вірогідні відмінності тривалості  $HRT_{tet}$  в цих групах щурів порівняно з контролем. Збільшення цього показника в II групі порівняно з I спостерігалось лише в 3 й 9, 10-му тетанусах, а в III – у 2 – 3, 5 і 8-му ( $P \leq 0,05$ ). Проте в III групі порівняно з II такі відмінності знайдено лише у 4 – 6-му тетанусах (див. рис. 3, б).

Зміна часового ходу індивідуальних м'язових скорочень у тетанусі ішемізованого *m. soleus* призводить до вірогідних змін його швидко-силових характеристик.  $V_{tet/CT}$  і  $V_{tet/HRT}$  ішемізованого м'яза в II та III групах тварин становить 1/3 їх значення у контролі ( $P \leq 0,05$ ). Це вказує на сповільнення його механічної активності (див. рис. 3, г).

Отже, контрактильні показники тетанічного скорочення ішемізованого *m. soleus* протягом експерименту в III групі щурів зазнають більших змін порівняно з такими в II групі. Ми розглядаємо це як ознаку алкогольсоціюваного обтяження механічної дисфункції ішемізованого м'яза.

## ОБГОВОРЕННЯ

Застосована нами частота стимуляції, викликає в камбалоподібному м'язі зубчастий тетанус [11] і є оптимальною для механічної активності повільних рухових одиниць [12], які у відсотковому співвідношенні, переважають в гістологічній структурі цього м'яза [13]. В умовах *in vivo* вони забезпечують тонічне підтримання м'язової сили і характеризуються повільною швидкістю досягнення піку скорочення при низьких частотах електричної стимуляції [12].

Важливо зазначити, що резистентність аеробних міофібрил до ішемії значно менша, ніж анаеробних [14]. Проте вона більша до

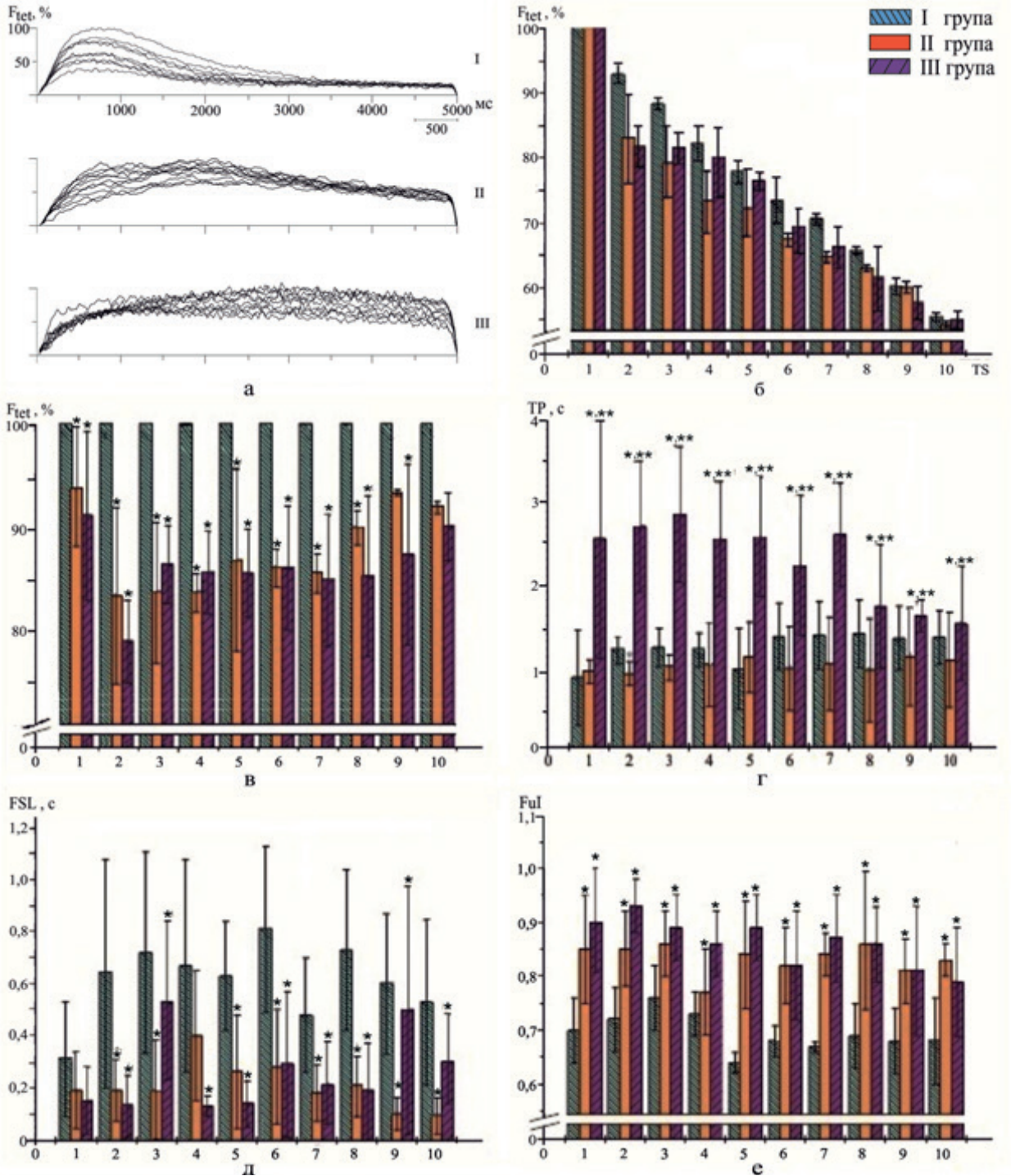


Рис. 2. Зміни показників тетанічного скорочення *m. soleus*: а – часовий хід тетанусу м'язу; б – зміна тетанічної сили ( $F_{tet}$ ); в – співвідношення  $F_{tet}$  у II і III групах до цього показника у контролі; г – зміна часу досягнення піку тетанусу; д – зміна періоду стабільного утримання  $F_{tet}$ ; е – зміна індексу злиття. TS (tetanic sequence) – послідовність тетанусів протягом експерименту. \* вірогідні відмінності в II і III групах щурів порівняно з I, \*\* вірогідні відмінності в III групі порівняно з II ( $P \leq 0,05$ )



міотоксичного впливу алкоголю, до якого анаеробні м'язові волокна чутливіші [15].

Алкогольасоційована атрофія аеробних міофібрил спостерігається тільки під час важких форм алкогольної міопатії і супроводжується дистрофією ізоформ важких ланцюгів міозину I-B, II-X і II-V та зменшенням відносного вмісту десміну, актину й тропоніну, зокрема тропоніну-С [16, 17].

Зважаючи на це, виявлені вірогідні відмінності показників тетанічного скорочення ішемізованого m. soleus протягом експерименту в III групі щурів, порівняно з II, асоціюється з ішемічною дистрофією м'яза,

яка обтяжується міотоксичним ефектом алкоголю.

За умов хронічної алкогольної інтоксикації очікується зменшення силової продуктивності ішемізованого м'яза в III групі, порівняно з II групою. Проте протягом експерименту  $F_{tet}$  ішемізованого м'яза в III групі вірогідно не змінюється щодо значень у II групі. Але в обох випадках ішемізований м'яз розвиває вірогідно меншу  $F_{tet}$ , ніж нативний m. soleus в контрольній групі.

Проведені нами раніше дослідження [18] контрактильних показників ішемізованого m. gastrocnemius (сар. мед.) у щурів з

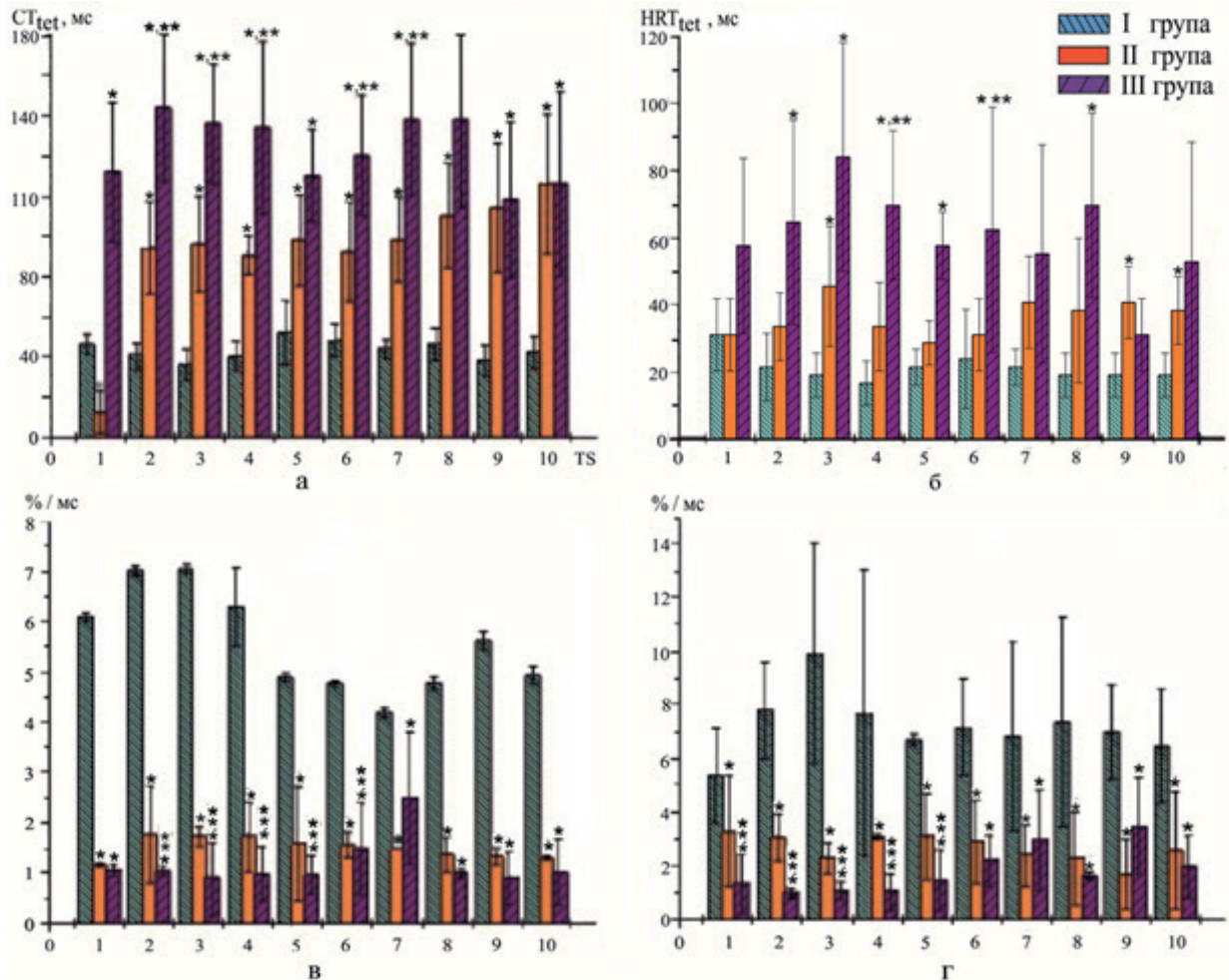


Рис. 3. Зміни показників останнього м'язового скорочення в тетанусі нативного m. soleus в інтактних тварин (I група) й ішемізованого в щурів без (II група) і з хронічною алкогольною інтоксикацією (III група): (а) – тривалість  $CT_{tet}$ ; (б) – тривалість  $HRT_{tet}$ ; (в) – зміна  $V_{tet}/CT$ ; (г) – зміна  $V_{tet}/HRT$ . TS (tetanic sequence) – послідовність тетанусів протягом експерименту. \* вірогідні відмінності в II і III групах щурів порівняно з I, \*\* вірогідні відмінності в III групі порівняно з II; ( $P \leq 0,05$ )

хронічною алкогольною інтоксикацією, попри рівномірну зміну  $F_{tet}$  впродовж тесту, показують значно більші її втрати порівняно зі щурами без алкогольної інтоксикації. Це свідчить про алкоголь асоційовану атрофію анаеробних міофібрил. Виходячи з цього, ми можемо говорити про незначні атрофічні зміни аеробних м'язових волокон *m. soleus* у III групі щурів, які суттєво не впливають на зміну силової продуктивності ішемізованого м'яза.

Водночас під час тетанічного скорочення ішемізованого камбалоподібного м'яза в дослідних групах щурів вірогідно зменшується тривалість періоду стабільного утримання  $F_{tet}$  порівняно з контролем. Швидше за все, це зумовлене ішемічним ушкодженням аеробних м'язових волокон і є проявом ішеміасоційованої втоми. Відсутність вірогідних відмінностей тривалості FSL у першому тетанусі ішемізованого м'яза в цих групах ми пояснюємо незначними механічними руйнуваннями міофібрил на цьому етапі дослідження.

Зважаючи на це, виявлені вірогідні відмінності показників тетанічного скорочення ішемізованого *m. soleus* протягом експерименту в III групі щурів порівняно з II асоціюється з ішемічною дистрофією м'яза, яка обтяжується міотоксичним ефектом алкоголю.

За умов хронічної алкогольної інтоксикації очікується зменшення силової продуктивності ішемізованого м'яза в III групі порівняно з II. Проте протягом експерименту  $F_{tet}$  ішемізованого камбалоподібного м'яза в групі щурів з алкогольною інтоксикацією вірогідно не змінюється порівняно зі значеннями у тварин без такої інтоксикації. Але в обох випадках ішемізований м'яз розвиває вірогідно меншу  $F_{tet}$ , ніж нативний *m. soleus* у контролі.

Виявлене в III групі щурів вірогідне збільшення TP, порівняно з його значеннями в I і II групах, ми пояснюємо міотоксичним впливом алкоголю, що, ймовірно, призводить до зміни кінетики актинміозинової взаємодії.

Наближення значень  $FuI$  до 1 в тетанусі ішемізованого *m. soleus* у тварин з II і III груп, порівняно з нативним м'язом, у контрольній групі, на нашу думку, відбувається через зміну часового ходу індивідуальних м'язових скорочень. В цих групах щурів вірогідно збільшується тривалість  $ST_{tet}$  і  $HRT_{tet}$  останнього м'язового скорочення в тетанусі ішемізованого м'яза, що може бути ознакою вищевисловленого нами припущення щодо ймовірної зміни взаємодії актину і міозину. Можливо, це призводить до сповільнення скорочення ішемізованого м'яза в III групі щурів. Цей факт дає змогу також пояснити збільшення TP у тетанусі ішемізованого *m. soleus* в III групі тварин порівняно з I і II.

Можливо, що механізм, який лежить в основі зміни кінетики актинміозинової взаємодії ішемізованого м'яза в III групі щурів, пов'язаний з накопиченням вільного саркоплазматичного  $Ca^{2+}$  [19] в міофібрилах і, можливо, пригніченням його зв'язування з тропоніном C у міоцитах [20]. Це значно погіршує контрактильну функцію ішемізованого м'яза, оскільки збільшення вмісту вільного саркоплазматичного  $Ca^{2+}$  в міоплазмі й дефіцит енергетичних ресурсів також є характерною ознакою ішемічного ушкодження [21, 22].

Тому зміни часового ходу м'язових скорочень у тетанусі ішемізованого *m. soleus* в II і III групах щурів порівняно з контролем, призводять до вираженого погіршення його швидкісно-силових характеристик.

Отже, вірогідне збільшення тривалості TP,  $ST_{tet}$  й частково  $HRT_{tet}$  в тетанусі ішемізованого *m. soleus* і зменшення його швидкісно-силових характеристик у щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією порівняно зі щурами без алкогольної інтоксикації може бути розглянуте як ознака обтяження хронічним міотоксичним впливом алкоголю ішеміасоційованої контрактильної дисфункції камбалоподібного м'яза в цій групі тварин.



**А. А. Мельничук, А. П. Мотузюк, С. Е. Швайко**

### **ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ТЕТАНИЧЕСКОГО СОКРАЩЕНИЯ ИШЕМИЗИРОВАННОГО M. SOLEUS В КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ**

В работе анализировались показатели тетанического сокращения изолированного ишемизированного m. soleus в крыс с хронической алкогольной интоксикацией. Эксперименты проводились на 15 крысах-самцах линии Вистар, средней массой 150 г. Исследуемые крысы были разделены на 3 группы: группа I (контрольная) и две экспериментальные группы, в которых индуцировали острую ишемию мышц задних конечностей: группа II – без алкогольной интоксикации, группа III – с хронической алкогольной интоксикацией. Тензометрические измерения контрактильных показателей m. soleus проводили в изометрическом режиме в условиях прямой электрической стимуляции. Установлено, что тетаническая сила ишемизированного m. soleus у крыс с хронической алкогольной интоксикацией сравнительно с крысами без алкогольной интоксикации достоверно не отличается, однако увеличивается время достижения пика её максимума. Показано, что в ишемизированных мышцах, сравнительно с нативной, достоверно уменьшается длительность стабильного уровня удержания тетанической силы. Обнаружены достоверные изменения часового хода индивидуальных мышечных сокращений в тетанусе ишемизированного m. soleus сравнительно с контролем. Показано, что эти изменения влияют на эффективность частотной суммации последовательных мышечных сокращений в тетанусе и ее скоростно-силовые характеристики.

Ключевые слова: m. soleus; ишемия; алкогольная интоксикация; тетаническая сила; характеристики мышечного сокращения.

**O. A. Melnychuk, O. P. Motuziuk, S. Ye. Shvayko**

### **CHANGING OF ISCHEMIC M. SOLEUS TETANIC CONTRACTION PARAMETERS IN RATS WITH CHRONIC ALCOHOL INTOXI- CATION**

This article deals with the changes of isolated ischemic m. soleus tetanus parameters in rats with chronic alcohol intoxication. The experiments were carried out on 15 male Wistar rats that were divided into three groups for 5 animals in each: group I (control) and two groups in which was induced hind limbs acute muscles ischemia: group II – rats without alcoholic intoxication, group III – rats with chronic alcoholic intoxication. Strain measurement muscle mechanical activity were conducted in isometric mode under conditions of direct electrical muscular preparation stimulation. It is proved that ischemic m. soleus tetanic force in rats with chronic alcoholic

intoxication in comparison with rats without alcoholic intoxication does not significant changes. But significantly increases the reaching tetanus peak time. It is shown that in rats without alcoholic intoxication and with chronic alcoholic intoxication in comparison with intact animals, significantly decreases the duration of ischemic m. soleus stable force level. It is showed significant changes of individual muscles contraction time course of ischemic m. soleus tetanus in this rats group in comparison to intact animal. It is shown that these changes influence on successive muscular contraction efficiency of frequency summation in ischemic m. soleus tetanus and their speed-power characteristics.

Key words: m. soleus; ischemia; alcohol intoxication; tetanic force; contractile characteristics.

*Lesya Ukrainka Eastern European National University*

### **REFERENCES**

1. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007; 33(1): 1-75.
2. Sotoudeh A, Takhtfooladi MA, Jahanshahi A, Asl AH, Takhtfooladi HA, Khansari M. Effect of N-acetylcysteine on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Histopathological study in rat model. Acta Cir Bras.* 2012; 27(2):168-71.
3. Malinoski DJ, Slater MS, Mullins RJ. Crush injury and rhabdomyolysis. *Crit Care Clin.* 2004; 20(1):171-92.
4. Odinson A, Finsen V. Tourniquet use and its complications in Norway. *J Bone Joint Surg Br.* 2006; 88(8):1090-92.
5. Preedy VR, Salisbury JR, Peters TJ. Alcoholic muscle disease: features and mechanisms. *J Pathol.* 1994 ; 173(4): 309-15.
6. Preedy VR, Peters TJ, Adachi J, Ahmed S, Mantle D, Niemela O, Parkkila S and Worrall S. Pathogenic mechanisms in alcoholic myopathy. In: *Alcohol in Health and Disease. International Titisee Symposium on Health Effects of Alcohol Intake; 1999 Dec 09-12; Titisee Germany; 2001. p. 243-59.*
7. Khalilov MH, Zakihordzhaev ShYa. The characterization of some pathochemical shifts in blood, liver and brain in experimental alcohol intoxication. *Questions alcoholism clinic: collection of scientific papers. Tashkent; 1983. p. 38-41. [Russian].*
8. Yanovskiy II, Uzhako PV. *Physiology of man and animals. Practical work: Training Handbook. - K.: High. School., 1991 – 75 p. [Ukrainian].*
9. Celichowski J, Bichler E. The time course of the last contractions during incompletely fused tetani of motor units in rat skeletal muscle. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2002; 62(1): 7-17.
10. Corsi A, Granata AL. Effect of activity on performance and morphology in ischemic rat slow muscles. *J Exp Biol.* 1990; 152: 265-79.
11. Celichowski J. Motor units of medial gastrocnemius muscle in the rat during the fatigue test. I. Time course of

- unfused tetanus. *Acta Neurobiol Exp.* 1992. 52(1): 17-21.
12. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. *Neuroscience*. 2-nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. [Internet]. *The Regulation of Muscle Force*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11021/>
  13. Desanka T, Dimov I. Muscle fiber types and muscle morphometry in the soleus muscle of the rat. *Facta Universitatis*. 2007; 14(3): 121-27.
  14. Turóczy Z, Arányi P, Lukáts Á, Garbaisz D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats. *PLoS ONE*. 2014; 9(1): e84783.
  15. Slavin G, Martin F, Ward P, Levi J, Peters T. Chronic alcohol excess is associated with selective but reversible injury to type 2B muscle fibres. *J Clin Pathol*. 1983; 36(7): 772-77.
  16. Nicolas JM, Garcia G, Fatjo F. et al. Influence of nutritional status on alcoholic myopathy. *Am J Clin Nutrition*. 2003;78(2): 326-33.
  17. Reilly ME, McKoy G, Mantle D, Peters TJ, Goldspink G, Preedy VR. Protein and mRNA levels of the myosin heavy chain isoforms I beta, IIa, IIx and IIb in type I and type II fibre-predominant rat skeletal muscles in response to chronic alcohol feeding. *J Muscle Res Cell M*; 21(8): 763-73.
  18. Melnychuk OA, Motuziuk OP, Shvayko SYe, Homa OM. Musculus gastrocnemius tetanus kinetics in alcohol-intoxicated rats with experimentally-induced hind-limb vascular ischemia under conditions of low-frequency muscle fatigue. *Visn Dnipropetr Univ. Ser Biol Ekol*. 2014; 22(1), 8-18. [Ukrainian].
  19. Oba T, Koshita M, Yamaguchi M. Ethanol enhances caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> - release channel activation in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. 1997; 272(2 Pt 1): 622-27.
  20. Kiessling K-H, Pilstrom L, Karlsson J, Piehl K. Mitochondrial volume in skeletal muscle from young and old physically retrained and trained healthy men and from alcoholics. *Clin Sc*. 1973; 44(6):P. 547-54.
  21. Tupling R, Green H, Senisterra G, Lepock J, McKee N. Effects of ischemia on sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake and Ca(2+) release in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 281(2): 224-32.
  22. Eliason JL, Wakefield TW. Metabolic consequences of acute limb ischemia and their clinical implications. *Semin Vasc Surg*. 2009; 22 (1): 29-33.

*Матеріал надійшов до редакції 15.05.2014*

# Нелінійні електроенцефалографічні кореляти слухово-моторної інтеграції у хлопчиків з набутими зоровими дисфункціями

І.В.Редька<sup>1</sup>, О.Ю. Майоров<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна; <sup>2</sup>Харківська медична академія післядипломної освіти; <sup>3</sup>ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМНУ», Харків; E-mail: iredka@yandex.ru

*Вивчено нелінійну динаміку електричної активності головного мозку хлопчиків віком від 8 до 12 років з набутими зоровими дисфункціями (n=27, vis. OS 0,70±0,04, vis. OD 0,56±0,05 з корекцією) порівняно з нормальнозорими (n=27) при виконанні складної слухово-моторної реакції вибору. Використано показники розмірності внеску, кореляційної розмірності, максимальної експоненти Ляпунова та ентропії Колмогорова–Сіная. При зорових дисфункціях в умовах слухово-моторної інтеграції виявлено активацію правої потиличної та дезактивацію лівої потиличної ділянки, що не притаманно нормальнозорим. Результати обговорюються в контексті крос-модальної пластичності та надмодальної організації головного мозку.*

*Ключові слова:* зорові дисфункції; електроенцефалограма; нелінійна динаміка; слухово-моторна інтеграція; крос-модальність; над модальність.

## ВСТУП

За умов нормального розвитку зорова аферентація – основне джерело інформації про навколишнє середовище, тому логічно передбачати, що її обмеження повинно викликати структурно-функціональну реорганізацію головного мозку. Це знаходить підтвердження в результатах позитронно-емісійної та магнітно-резонансної томографії (ПЕТ і МРТ) досліджень сліпих [1, 2]. Ці методи ґрунтуються на опосередкованому висновку про активність структур на підставі коливання гемодинамічних і метаболічних показників. Водночас прямим показником активності головного мозку є його електрична активність, що може бути досліджена у людини неінвазивним електроенцефалографічним методом. Утім нами знайдено поодинокі роботи, які висвітлюють електрофізіологічні кореляти когнітивних процесів у дітей з зоровими дисфункціями, переважно зорового сприйняття

© І.В.Редька, О.Ю. Майоров

та уваги [3]. Відзначимо, що дослідження феномену зорової депривації у людини орієнтовані на дорослих і розглядають крайній варіант атипового розвитку – повна відсутність зорової аферентації (сліпота). Однак в офтальмологічній практиці найчастіше спостерігається часткове обмеження зорової аферентації, а одним із факторів, що впливає на ефективність лікування є вік пацієнтів на момент виявлення патології та тривалість останньої.

Зазначене дає змогу стверджувати, що вивчення електроенцефалографічних (ЕЕГ-корелятів) когнітивних процесів на різних етапах онтогенезу при зорових дисфункціях з урахуванням таких факторів, як час початку, ступінь і тривалість обмеження зорової аферентації, сприятимуть поглибленню знань щодо функціональної реорганізації головного мозку під впливом зорових дисфункцій і можуть стати підґрунтям нових нейрофізіологічних методів офтальмореконструкції.

Мета нашої роботи – виявлення нелінійних ЕЕГ-корелятив слухово-моторної інтеграції у хлопчиків з набутими зоровими дисфункціями.

## МЕТОДИКА

Обстежено 54 хлопчики віком від 8 до 12 років, яких розділили на дві однакові групи. До 1-ї групи увійшли нормальнозорі хлопчики (контроль), до 2-ї – хлопчики з зоровими дисфункціями. Загальним критерієм для включення в обстеження була відсутність органічної патології ЦНС та черепно-мозкової травми в анамнезі, неврологічних чи психічних розладів, фармакологічної терапії на момент обстеження. Зорові дисфункції обох очей набуті в перші роки життя та зумовлені порушеннями рефракції та/або акомодатії, косоокістю та/або ністагмом (Н52, Н50, Н55 згідно МКХ-10). Некоригована гострота зору для лівого та правого ока становила  $0,55 \pm 0,05$  і  $0,44 \pm 0,06$ , а коригована –  $0,70 \pm 0,04$  і  $0,56 \pm 0,05$  відповідно.

Обстеження проводили з дотриманням національних норм біоетики та положень Гельсінської декларації 1975 р. (у редакції 2013 р.) за попередньою згодою самих дітей та письмовою згодою батьків після інформування про цілі, тривалість та процедуру дослідження.

ЕЕГ-потенціали відводили монополярно у 23-х відведеннях відповідно до міжнародної системи «10-20» з усередненим референтним електродом за D. Goldman. ЕЕГ реєстрували при закритих очах за двох станів (по 2,5 хв. кожний): 1) спокійне неспання; 2) виконання складної слухово-моторної реакції вибору. Для цього через колонки бінаурально пред'являлися звуки двох тональностей (500 Гц, 1 кГц), у відповідь на які обстежуваному необхідно було натискати великим пальцем правої руки на праву (для 500 Гц), а лівої руки на ліву (для 1кГц) кнопку на пульті. Тривалість експозиції тональних сигналів становила 700 мс, а міжстимульний інтервал

– від 500 до 1500 мс. Колонки розташовували на  $30^\circ$  праворуч від центру поля зору. Запису ЕЕГ передувала тренувальна вправа.

Для подальшого нелінійного аналізу відбирали 35–45-секундні безартефактні фрагменти запису для кожного стану. Для дослідження нелінійної динаміки в нейродинамічних системах мозку на основі методів детермінованого хаосу використовувався модуль NeuroResearcher Chaos® системи NeuroResearcher® Innovation Suite (Інститут медичної інформатики і телемедицини, Харків). Відновлення аттрактора у фазовому просторі здійснено методом затримки. Визначення часу затримки проводилося на основі оцінки його «форми», що реконструюється: час затримки обирали таким чином, щоб розміри реконструйованого аттрактора за всіма осями були максимально наближеними до 1 [4].

Після реконструкції аттрактора у фазовому просторі визначали такі ключові нелінійні показники: розмірність внеску (РВ, ум. од.), що дає змогу зробити припущення про те, як багато компонентів формують цю динамічну систему; кореляційна розмірність (D2, ум. од.) – міра складності (число ступенів свободи) системи, що відображає кількість періодичних режимів; ентропія Колмогорова–Сіная (метрична, динамічна ентропія, eКС, біт·с<sup>-1</sup>) – міра регулярності або впорядкованості системи; максимальна експонента (показник) Ляпунова (мЕЛ, ум.од.·с<sup>-1</sup>) – міра хаотичності, складності та гнучкості динамічної системи [5].

Електрофізіологічні результати обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики та представлені у вигляді  $\bar{x} \pm m$ . Для міжгрупових порівнянь використовувався критерій U, а для внутрішньогрупових порівнянь – критерій Т Вілкоксона-Манна-Уїтні. Кореляційний аналіз між показниками ефективності виконання слухово-моторної реакції вибору (латентний період, варіаційний розмах, кількість помилок) та нелінійними показниками ЕЕГ проводили за методом К. Пірсона. Вірогідними вважали відмінності при значеннях  $P \leq 0,05$ .



## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведене дослідження виявило особливості нелінійної динаміки електричної активності головного мозку хлопчиків з набутими двобічними зоровими дисфункціями порівняно з контролем як в умовах спокійного неспання, так і під час слухово-моторної інтеграції.

*Міжгрупові відмінності в умовах спокійного неспання.* При набутих зорових дисфункціях спостерігалися більш низькі порівняно з контролем значення мЕЛ та еКС у лівій передньо-скроневої ділянці (Т3 на 11,5 і 11,9 % відповідно,  $P \leq 0,05$ ) (рис. 1, а). Це свідчить про збільшення регулярності та впорядкованості електричної активності лівої передньо-скроневої ділянки, що відображає зменшення кількості конкуруючих нервових процесів на фоні підвищення їх інформаційного змісту.

Оскільки у цих ділянках локалізовані проєкційні зони слухового аналізатора [6], то зниження значень мЕЛ і еКС, імовірно, відображає підвищену увагу хлопчиків з набутими зоровими дисфункціями до слухових подразників. Зазначене разом з локалізацією змін у лівій півкулі, яка має переваги в аналізі не лише тональності звукових подразників, але й мови [6], дає змогу асоціювати їх з підвищеною готовністю головного мозку до сприйняття інструкції, яку чує людина з зоровими дисфункціями, що може відображати стан настороженості.

*ЕЕГ-реакція на слухово-моторну реакцію вибору.* У нормальнозорих хлопчиків слухово-моторна інтеграція супроводжувалася зниженням значень РВ у лівій центральній (С3 на 7,1 %,  $P \leq 0,05$ ) та еКС у лівій задньо-скроневої зоні (Т5 на 9,0 %,  $P \leq 0,05$ ; рис. 2). Тобто, слухово-моторна інтеграція у

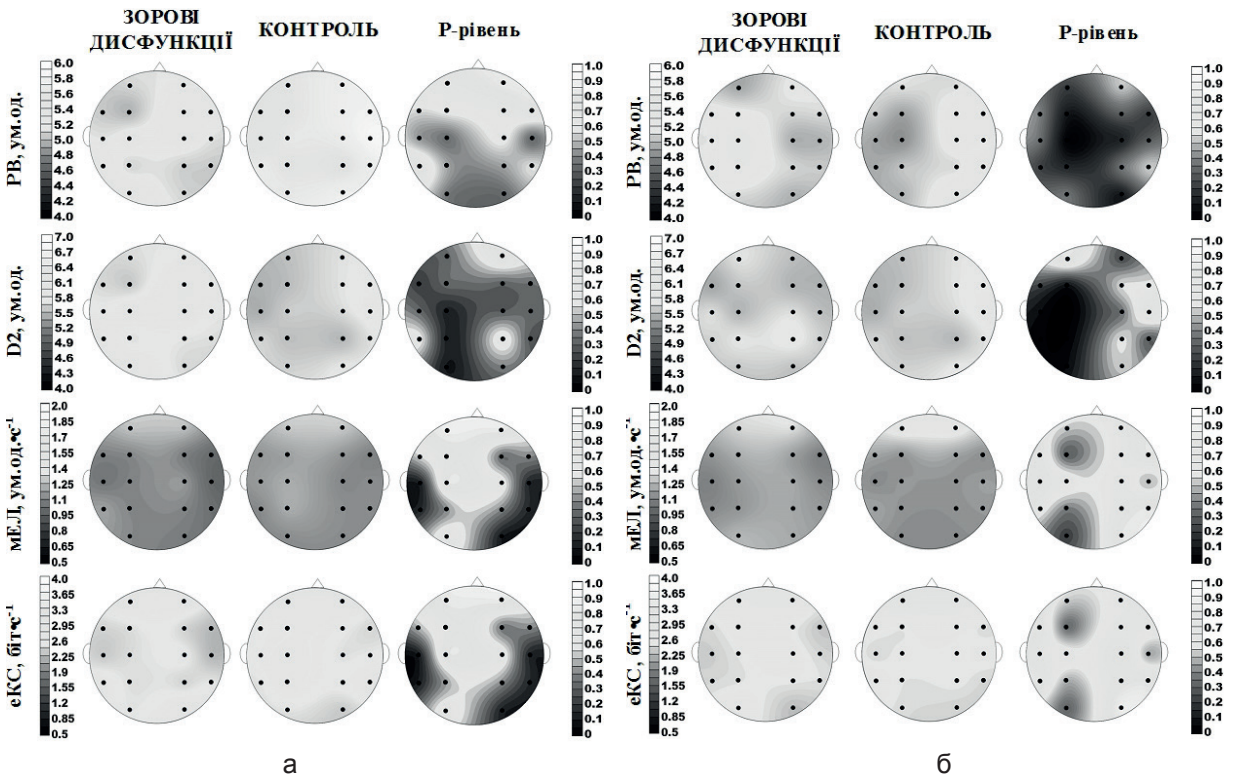


Рис. 1. Усереднені топограми значень показників нелінійної динаміки електроенцефалограми (ЕЕГ) хлопчиків з різним станом зорової функції в умовах спокійного неспання (а) та під час слухово-моторної реакції (б). РВ – розмірність внеску, D2 – кореляційна розмірність, еКС – ентропія Колмогорова–Сіная, мЕЛ – максимальна експонента Ляпунова; точками на топограмах позначені досліджувані ЕЕГ-відведення



нормальнозорих пов'язана зі зниженням рівня хаотичності в динаміці електричної активності та збільшенням інформаційного змісту нервових процесів у лівій задньо-скроневій зоні. Зважаючи на важливість цієї ділянки в інтеграції слухової та сомато-сенсорної інформації [7] виявлені зміни еКС можуть бути відображенням активізації зазначених інтеграційних процесів. Поряд із цим спостерігалось зменшення кількості компонентів нейродинамічної системи у сенсорно-моторній корі, що може відображати формування домінанти для реалізації адекватної рухової відповіді на звуковий подразник. Отже, складна слухово-моторна інтеграція викликала мінімальні зміни нелінійної динаміки електричної активності головного мозку нормальнозорих хлопчиків, що відображають формування нейродинамічної системи відповідальної за підготовку та реалізацію

моторної програми в залежності від характеристик звукового подразника.

Водночас слухово-моторна інтеграція при набутих зорових дисфункціях знижувала D2 у лівій потиличній (O1 на 5,8 %  $P \leq 0,05$ ) та еКС у правій потиличній ділянці (O2 на 20,5 %  $P \leq 0,05$ ) порівняно з фоном (див. рис. 2). Це свідчить про зменшення складності обробки й інтеграції інформації у лівій потиличній ділянці та збільшення регулярності електричної активності й інформаційного змісту нервових процесів у правій. Зазначене може вказувати на дезактивацію лівої потиличної та активацію правої потиличної зони в процесах слухово-моторної інтеграції при набутих зорових дисфункціях.

Отримані результати узгоджуються з даними функціональної МРТ і ПЕТ досліджень, що виявили активацію кіркових зорових структур (переважно правих) при вирішенні

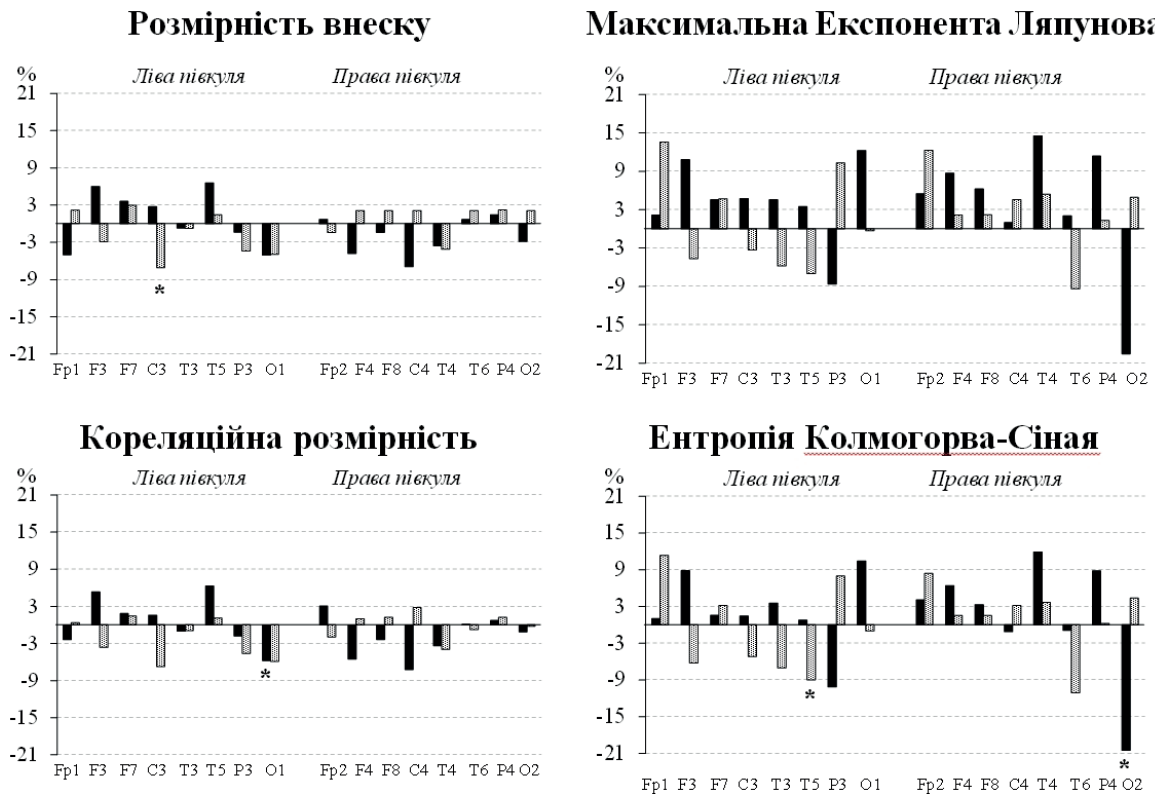


Рис. 2. Зміни показників нелінійної динаміки електроенцефалограми (ЕЕГ) хлопчиків з різним станом зорової функції під час слухово-моторної інтеграції. За віссю абсцис – відведення ЕЕГ; чорні стовпчики – зорові дисфункції, заштриховані – контроль, \*  $P \leq 0,05$  порівняно з умовами спокійного неспання

різних слухових завдань сліпими людьми [8, 9, 10].

Отже, результати дослідження вимагають пошуку відповідей на два питання: 1) можливі механізми активації потиличної кори під час слухово-моторної інтеграції; 2) причини різноспрямованої зміни нейродинаміки симетричних ділянок зорової кори.

Одне з пояснень феномена активації зорової кори під час вирішення слухових задач при зорових дисфункціях може полягати у процесах візуалізації звукового подразника та/або майбутньої рухової дії подумки. У такому разі у хлопчиків з набутими зоровими дисфункціями мало б спостерігатися збільшення тривалості реакції вибору. Всупереч цьому наші результати виявили значно коротший латентний період слухово-моторної реакції вибору серед хлопчиків з набутими зоровими дисфункціями порівняно з контролем ( $622,9 \pm 41,6$  мс і  $622,8 \pm 11,4$  мс відповідно,  $P=0,14$ ). Це дає підстави для спростування висунутого припущення, що узгоджується з повідомленням [11] про неможливість пояснення активації зорової кори сліпих людей лише уявленням форми звука.

Інше пояснення згаданого феномена пов'язують з явищами крос-модальної пластичності, коли деаферентована кора залучається до оперування інформацією нетипової для себе модальності. Реалізація крос-модальної пластичності теоретично можлива внаслідок демаскування існуючих та/або реорганізації (утворення нових) кірково-кіркових шляхів між первинною слуховою й зоровою корою та таламо-кортикальних шляхів [1, 12].

Відзначимо, що наявність у хлопчиків 2-ї групи зниженого притоку зорової аферентації до первинної зорової кори, на нашу думку, може бути лімітуючим чинником активації механізмів крос-модальної реорганізації кірково-кіркових та/або підкірково-кіркових шляхів. Тому крос-модальна пластичність при частковому обмеженні притоку зорової аферентації до мозку, імовірно, зумовлена демаскуванням існуючих церебральних шляхів.

Встановлено [13], що більшість нейронів первинної зорової кори мишей з частковою зоровою депривацією (блокування функції паличок) відповідають на звукову стимуляцію. Анатомічним підґрунтям цього можуть бути нещодавно виявлені у зрячих приматів прямі гетеромодальні зв'язки між первинною слуховою та зоровою зонами кори [14, 15]. Вони через бімодальні (мультисенсорні) та унімодальні підпорогові мультисенсорні (модуляторні) нейрони проєкційних зон кори забезпечують адитивну (підсилювальну) крос-модальну взаємодію слухової та зорової проєкційної кори, особливо за умов низької інтенсивності зорових подразників [16].

Зазначене дає змогу розглядати виявлену при набутих зорових дисфункціях активацію зорової кори під час слухово-моторної реакції вибору як наслідок синаптичної пластичності, зумовленої особливостями аудіо-візуальної взаємодії в повсякденному житті, тобто як прояв активності усталених крос-модальних (слухово-зорових) адитивних взаємодій. У такому разі під час складної слухово-моторної реакції вибору слухова аферентація активує нейрони зорової кори прямими кірково-кірковими шляхами, сприяючи їх підпороговій деполаризації. Однак за цим не слідує покращення ані зорового сприйняття, оскільки використана нами слухово-моторна координація не пов'язана з безпосереднім впливом зорового подразника, ані дискримінації звукових тонів, оскільки унімодальна зорова кора, згідно традиційних уявлень, не бере участі в цьому процесі. Проте така активація зорової кори за відсутності зорових подразників могла б сприяти додатковій модуляції слухової кори через зворотні кірково-кіркові (зорово-слухові) зв'язки [14, 15], полегшуючи процеси перцепції (зокрема, детекції) наступних звукових подразників.

Ще одними з потенційних шляхів активації зорової кори слуховими подразниками при зорових дисфункціях можуть бути прямі висхідні таламо-кортикальні та/або тектальні шляхи. Такий шлях активації призвів би до

одночасного залучення проекційної слухової та частини нейронів проекційної зорової кори до аналізу звукових подразників. Паралельно могли б відбуватися розглянуті вище кірково-кіркові адитивні крос-модальні взаємодії.

Підґрунтям такого припущення стали результати дослідження [17], в якому показано, що реакція на слуховий подразник частини нейронів первинної зорової кори шурів з двобічною енкулеацією може бути зумовлена активуючими впливами таламуса.

У літературі обговорюється можливість таламо-кортикальної активації зорової кори за умов зорової депривації внаслідок «перемонтування» слухових проекцій. Так, на тваринних моделях зорової депривації виявлено збільшення кількості слухових проекцій у латеральному колінчастому тілі від нижніх горбиків чотирогорбикового [18] та медіального колінчастого тіла [12], що далі проєктуються на первинну зорову кору [19]. На нашу думку, зазначене може бути справедливим для сліпоти. Однак у хлопчиків з набутими зоровими дисфункціями потік зорової аферентації лише суттєво знижений, тобто продовжував активувати нейрони зорової кори. Такі умови, очевидно, є недостатніми для запуску механізмів крос-модальної пластичності з явищами структурної реорганізації.

Водночас альтернативний механізм активуючих впливів таламуса на зорову кору слуховим подразником при набутих зорових дисфункціях може реалізовуватися через ретикулярне ядро таламуса. Це припущення ґрунтується на нещодавньому дослідженні [20], що встановило можливість взаємної модуляції унісенсорних ядер таламуса (у нашому випадку колінчастих тіл) через ретикулярне ядро у зрячих тварин.

Ще один із можливих механізмів аудіо-візуальної таламо-кортикальної взаємодії при набутих зорових дисфункціях може реалізовуватися через матрицю кальбіндинімумореактивних нейронів таламуса, що мають дифузні кіркові проєкції, які накладаються на сенсорні топографічні проєкції парвальбумі-

німумореактивних нейронів таламуса [21].

Очевидно, що обмеження зорової аферентації у хлопчиків 2-ї групи створює передумови для більш вираженого прояву активності наявних у контролі слухових таламо-кортикальних проєкцій на зорову кору.

Така одночасна активація проекційної слухової та зорової кори звуковим подразником через прямі висхідні проекційні шляхи таламуса при набутих зорових дисфункціях, напевно, повинна надавати поведінкові переваги у слухово-моторній інтеграції порівняно з контролем. Дійсно, нами виявлено значне вкорочення латентного періоду слухово-моторної реакції вибору серед хлопчиків з 2-ї групи порівняно з контролем.

Якщо ж таламо-кортикальні та кірково-кортикальні шляхи активації зорової кори слуховим подразником мають адаптивно-компенсаторне значення у хлопчиків з набутими зоровими дисфункціями, то логічно було б очікувати наявності кореляції між ступенем активації зорової кори та поведінковим результатом слухово-моторної реакції вибору. Утім, проведений нами кореляційний аналіз свідчить про відсутність таких кореляцій. Це узгоджується з даними Voss та співавт. [10] про наявність явищ крос-модальної пластичності у людей, які осліпли у дорослому віці, але вони не супроводжуються поведінковими перевагами.

Отже, поведінкові результати слухово-моторної інтеграції не можуть бути повністю поясненні з позиції крос-модальної пластичності.

Відзначено [22, 23] можливість активації правої зорової кори під час активних слухових задач у нормальнозорих людей. Подібність активації зорової кори у людей з зоровими дисфункціями та нормальнозорими під час виконання слухових задач наводить на думку про надмодальні властивості зорової кори, тобто її здатність активуватися не тільки при дії подразника зорової модальності, а й залежно від виконуваного завдання. Саме тому виявлена нами активація потиличної ді-

лянки в процесі слухово-моторної інтеграції у хлопчиків 2-ї групи може бути розглянута з позицій теорії перцептивно-функціональної організації мозку [24], що передбачає участь зорової кори в перебігу прихованих (ендогенних) надмодальних процесах, таких як, наприклад, просторова увага.

Слід зазначити, що можливість активації системи ендогенної просторової уваги детермінована умовами подачі звукового подразника під час експерименту: джерело звуку зміщено вправо відносно центрального поля зору. Окрім цього, у хлопчиків 2-ї групи нами знайдено ЕЕГ-кореляти (зниження мЕЛ, еКС у Т3) стану підвищеної слухової уваги в умовах спокійного неспання, що знижує функціональні резерви для підвищення сенсорно-специфічної (екзогенної) уваги у разі потреби. Як відомо, слухово-моторна реакція вибору висуває підвищені вимоги до системи уваги, що могло сприяти активації додаткових (імовірно надмодальних) церебральних структур ендогенної просторової уваги, наприклад латеральної потиличної ділянки [24].

Припущення про надмодальну природу активації зорової кори слуховими подразниками, пов'язану з функціонуванням просторової уваги, висловлювалось деякими авторами [1, 17] відносно аналогічних явищ у сліпих і зрячих людей.

Якщо зазначене припущення є правильним, то незважаючи на опосередкований вплив ендогенної уваги на перебіг слухово-моторної інтеграції, ступінь активації потиличної зони навряд чи корелюватиме з поведінковими результатами виконання слухово-моторної реакції вибору. Однак ендогенна увага може прискорювати перцепцію звукового подразника. Поведінкові результати виконання складної слухово-моторної реакції вибору підтверджують це.

Отже, активація правої зорової кори під час виконання складної слухово-моторної реакції при зорових дисфункціях може бути зумовлена взаємодією крос-модальних (явища демаскування) і надмодальних процесів.

На користь цього свідчать дані фМРТ під час слухових задач [22, 23] щодо активації ретинотопічно організованої зорової кори, що відповідає за периферичну частину поля зору (ефект ендогенної просторової уваги, оскільки джерело звуку зміщено вправо), а прямі проєкції між первинної слуховою та зоровою корою (крос-модальні шляхи) локалізуються на периферії [14, 15].

У хлопчиків 2-ї групи також спостерігалися зміни у нелінійній динаміці електричної активності лівої потиличної ділянки, які, на нашу думку, вказують на її дезактивацію (зниження D2,  $P \leq 0,05$ ). Імовірно, вони відображають антагоністичні взаємовідносини (крос-модальне гальмування) між проєкційними зонами модально-специфічних (слухових) та модально-неспецифічних (зорових) до діючого подразника структур іпсилатеральної півкулі, що полегшує процес сприйняття. Це узгоджується з інтерпретаціями дезактивації зорової кори при вирішенні слухових задач у нормальнозорих [25, 26].

*Міжгрупові відмінності в умовах слухово-моторної інтеграції.* При набутих зорових дисфункціях порівняно з контролем (див. рис. 1,б), спостерігалися більш високі значення розмірності внеску в лівій центральній ділянці (С3 на 13,7 %,  $P \leq 0,01$ ), кореляційної розмірності – у верхньо-лобовій (F3 на 9,4 %,  $P \leq 0,01$ ), центральній (С3 на 15,0 %,  $P \leq 0,001$ ) та тим'яній (P3 на 8,2 %,  $P \leq 0,05$ ) ділянках лівої півкулі, а також більш низькі значення розмірності внеску у правій потиличній ділянці (O2 на 8,2 %,  $P \leq 0,05$ ).

Це віддзеркалює більшу складність обробки та інтеграції інформації у верхньо-лобовій, центральній і тим'яній зонах хлопчиків з набутими зоровими дисфункціями. Зазначене може вказувати на більшу активність процесів, спрямованих на формування та/або реалізацію моторної програми дій у відповідь на слуховий подразник порівняно з контролем. Імовірно, цим і пояснюється більша швидкість складної слухово-моторної реакції вибору серед цих хлопчиків.

Також під час слухово-моторної реакції вибору ми спостерігали меншу кількість компонентів (більш низьке значення РВ), що формують нейродинамічну систему в правій потиличній ділянці хлопчиків 2-ї групи порівняно з контролем. У відповідності з обговореними вище явищами крос-модальної взаємодії це може бути відображенням активації лише тієї частини ретинотопічно організованої зорової кори, що відповідає периферичній частині поля зору.

Таким чином у хлопчиків з набутими зоровими дисфункціями вища швидкість слухово-моторної інтеграції зумовлена більшою активністю процесів мультисенсорної інтеграції (крос-модальне гальмування іпсилатеральної зорової кори та крос-модальна активація контралатеральної зорової кори) та активізацією надмодальних ендогенних процесів просторової уваги. Активація потиличної зони звуковим подразником при набутих зорових дисфункціях, імовірно, пов'язана зі зняттям «маскування» наявних прямих слухових таламо-кортикальних проєкцій на первинну зорову кору.

Кірково-кіркова крос-модальна пластичність, зумовлена мимовільним щоденним тренуванням одночасного аудіо-візуального сприйняття навколишнього середовища, забезпечує лише модуляцію крос-модальних взаємодій, переважно надмодального генезу.

Отримані результати також є експериментальним аргументом можливості мультисенсорної взаємодії на рівні первинних проєкційних полів.

### **И.В. Редька, О.Ю. Майоров**

#### **НЕЛИНЕЙНЫЕ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯТЫ СЛУХОВО-МОТОРНОЙ ИНТЕГРАЦИИ У МАЛЬЧИКОВ С ПРИОБРЕТЕННЫМИ ЗРИТЕЛЬНЫМИ ДИСФУНКЦИЯМИ**

Изучена нелинейная динамика электрической активности головного мозга мальчиков 8-12 лет с приобретенными зрительными дисфункциями ( $n = 27$ , vis. OS  $0,70 \pm 0,04$ , vis. OD  $0,56 \pm 0,05$  с коррекцией) по сравнению с нор-

мальновидящими мальчиками ( $n = 27$ ) при выполнении сложной слухово-моторной реакции выбора. Использованы показатели размерности вложения, корреляционной размерности, максимальной экспоненты Ляпунова и энтропии Колмогорова–Синая. При зрительных дисфункциях в условиях слухово-моторной интеграции обнаружено активацию правой затылочной и дезактивацию левой затылочной области, что не характерно для нормально-видящих. Результаты обсуждаются в контексте кросс-модальной пластичности и надмодальной организации головного мозга.

Ключевые слова: зрительные дисфункции; электроэнцефалограмма, нелинейная динамика; слухово-моторная интеграция; кросс-модальность; надмодальность

### **I.V. Redka, O.YU. Mayorov**

#### **NONLINEAR ELECTROENCEPHALOGRAPHIC CORRELATES OF AUDITORY-MOTOR INTEGRATION IN BOYS WITH OBTAINED VISUAL DYSFUNCTION**

This research aims to study the nonlinear dynamics of the brain electrical activity in the performance of complex auditory-motor choice reaction. The boys with obtained visual dysfunction ( $n = 27$ , vis. OS  $0,70 \pm 0,04$ , vis. OD  $0,56 \pm 0,05$  with correction) and normal sighted ( $n = 27$ ) boys aged from 8 to 12 years were examined. Nonlinear parameters such as embedding dimension, correlation dimension, Lyapunov maximum exponent and Kolmogorov-Sinai entropy were determined. The auditory-motor integration are induced the activation of the right occipital area and the deactivation of the left occipital area in boys with obtained visual dysfunction. This is not typical for the sighted boys. The results are discussed in the context of cross-modal plasticity and supramodal brain organization.

Keywords: visual dysfunction, EEG, nonlinear dynamics, auditory-motor integration, cross-modality, supramodality.

*V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine;*

*Kharkiv Medical Academy, Ukraine Postgraduate*

*Education, Ukraine;*

*Institute of Health of children and adolescents NAMS of Ukraine.*

### **REFERENCES**

1. Noppeney U, Friston KJ, Ashburner J., Frackowiak R, Price CJ. Early visual deprivation induces structural plasticity in gray and white matter. *Curr. Biol.* 2005 Jul; 15(13):488-90.
2. Veraart C, De Volder AG, Wanet-Defalque MC, Bol A, Michel C, Goffinet AM. Glucose utilization in human visual cortex is abnormally elevated in blindness of early onset but decreased in blindness of late onset. *Brain Res.* 1990 Feb; 510(1):115-21.
3. Rozhkova LA. The using EEG to assess the functional



- state of the brain of children and adolescents with sensory impairments and their correction. In: Grigoryeva LP editor. Children with developmental problems (complex diagnostics and correction). Moscow: PCC "Akademkniga"; 2002. p. 158-207. [Russian].
4. Mayorov OYu, Glukhov AB., Fenchenko VN, Prognimak AB. Realization of delay method with help of estimation of attractor axes sizes by one-dimensional realization of the brain dynamic system. *Cybernetics and Computer Science*. 2007; 153:3-11. [Russian].
  5. Mayorov OYu, Fenchenko VN. Researching of the brain bioelectrical activity from positions of multidimensional linear and nonlinear EEG analysys. *Clin Inform Telemed*. 2008 Jun; 4(5):12-20. [Russian].
  6. Moerel M, De Martino F, Formisano E. An anatomical and functional topography of human auditory cortical areas. *Front Neurosci* [Internet]. 2014 Jul [cited 2014 Dec 15];8:225: [about 14 pp.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4114190/>.
  7. Beauchamp MS, Yasar NE, Frye RE, Ro T. Touch, sound and vision in human superior temporal sulcus // *Neuroimage*. 2008 Jul; 41 (3):1011-20.
  8. Renier LA, Anurova I, De Volder AG, Carlson S, VanMeter J, Rauschecker JP. Preserved functional specialization for spatial processing in the middle occipital gyrus of the early blind. *Neuron*. 2010 Oct; 68(1):138-48.
  9. Van der Lubbe RH, Van Mierlo CM, Postma A. The involvement of occipital cortex in the early blind in auditory and tactile duration discrimination tasks. *J. Cogn Neurosci*. 2010 Jul; 22(7):1541-56.
  10. Voss P, Gougoux F, Zatorre RJ, Lassonde M, Lepore F. Differential occipital responses in early- and late-blind individuals during a sound-source discrimination task. *NeuroImage*. 2008 Apr; 40(2):746-58.
  11. Striem-Amit E, Dakwar O, Reich L, Amedi A. The large-scale organization of "visual" streams emerges without visual experience. *Cereb Cortex*. 2012 Jul; 22(7):1698-1709.
  12. Karlen SJ, Kahn DM, Krubitzer L. Early blindness results in abnormal corticocortical and thalamocortical connections. *Neuroscience*. 2006 Oct; 142(3):843-58.
  13. Larsen DD, Luu JD, Burns ME, Krubitzer L. What are the effects of severe visual impairment on the cortical organization and connectivity of primary visual cortex? *Front Neuroanat* [Internet]. 2009 Dec [cited 2014 Dec 15];3:30:[about 16 pp.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2802552>.
  14. Cappe C, Barone P. Heteromodal connections supporting multisensory integration at low levels of cortical processing in the monkey. *Eur. J. Neurosci*. 2005 Dec; 22(11):2886-902.
  15. Falchier A, Clavagnier S, Barone P, Kennedy H. Anatomical evidence of multimodal integration in primate striate cortex. *J. Neurosci*. 2002 Jul; 22(13):5749-5759.
  16. Allman BL, Keniston LP, Meredith MA. Not just for bimodal neurons anymore: The contribution of unimodal neurons to cortical multisensory processing. *Brain Topogr*. 2009 May; 21(3-4):157-67.
  17. Piché M, Chabot N, Bronchti G, Miceli D, Lepore F, Guillemot JP. Auditory responses in the visual cortex of neonatally enucleated rats. *Neurosci*. 2007 Mar; 145(3):1144-56.
  18. Chabot N, Charbonneau V, Laramée M, Tremblay R, Boire D, Bronchti G. Subcortical auditory input to the primary visual cortex in anophthalmic mice. *Neurosci Lett*. 2008 Mar; 433(2):129-34.
  19. Bronchti G, Rado R, Terkel J, Wollberg Z. Retinal projections in the blind mole rat: aWGA-HRP tracing study of a natural degeneration. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991 Feb; 58(2):159-70.
  20. Crabtree JW, Isaac JT. New intrathalamic pathways allowing modality-related and cross-modality switching in the dorsal thalamus. *J. Neurosci*. 2002 Oct; 22(19):8754-61.
  21. Jones EG. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci*. 2001 Oct;24(10):595-601.
  22. Cate AD, Herron TJ, Yund EW, Stecker GCh, Rinne T, Kang X, et al. Auditory attention activates peripheral visual cortex. *PLoS One* [Internet]. 2009 Feb [cited 2014 Dec 15];4(2):e46453:[about 12 pp.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2644787/>.
  23. Feng W, Störmer VS, Martinez A, McDonald JJ, Hillyard SA. Sounds activate visual cortex and improve visual discrimination. *J. Neurosci*. 2014 Jul; 34(29):9817-24.
  24. James TW, Stevenson RA, Kim S, VanDerKlok RM, James KH. Shape from sound: evidence for a shape operator in the lateral occipital cortex. *Neuropsychologia*. 2011 Jun; 49(7):1807-15.
  25. Johnson JA, Zatorre RJ. Attention to simultaneous unrelated auditory and visual events: behavioral and neural correlates. *Cereb. Cortex*. 2005 Oct;15(10):1609-20.
  26. Laurienti PJ, Burdette JH, Wallace MT, Yen YF, Field AS, Stein BE. Deactivation of sensory-specific cortex by cross-modal stimuli. *J Cogn Neurosci*. 2002 Apr; 14(3):420-29.

Матеріал надійшов до редакції 11.12.2014

# Remote ischemic preconditioning versus intermittent hypoxia training: a comparative analysis for cardioprotection

T.V. Serebrovska<sup>1</sup>, V.B. Shatilo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine, sereb@biph.kiev.ua

<sup>2</sup> D.F. Chebotarev State Institute of Gerontology, Kyiv, Ukraine

*Ischemic preconditioning (IPC) is an adaptive phenomenon that occurs after one or more short periods of ischemia / reperfusion, and consists in increasing the tolerance of an organ or tissue to the damaging effect of a long period of ischemia / reperfusion. Although IPC was shown to have a protective effect in animal models or during operative interventions, the obvious difficulties involved in subjecting the heart to direct IPC restrict its potential clinical applications. In this perspective, the phenomenon of remote ischemic preconditioning (RIPC: ischemia/reperfusion cycles in the arm or leg) appears extremely encouraging. Intermittent hypoxic training (IHT, periodic exposure of an organism to hypoxic gas mixtures, or stay in the chamber or altitudes) also has powerful adaptogenic effect increasing the resistance to subsequent episodes of severe hypoxia / ischemia. This review discusses main mechanisms and clinical applications of RIPC in cardiology versus IHT technologies. Benefits and disadvantages of both methods are under consideration. Positive and negative effects of hypercapnia during the RIPC technology are also examined. We wish to stimulate a comprehensive understanding of such a complex physiological phenomenon as intermittent hypoxia and ischemic preconditioning in order to prevent or reduce their harmful consequences, while maximize their potential utility as an effective therapeutic tools.*

*Key words: remote ischemic preconditioning, intermittent hypoxia training, hypoxic-hyperoxic training, cardiovascular diseases, adaptation to hypoxia, hypercapnia*

## I. INTRODUCTION

Hypoxia is a fundamental stimulus that evokes both adaptive and maladaptive responses. Prabhakar & Semenza [1] define hypoxia as a reduction in O<sub>2</sub> availability in one state or condition compared with another; as such, it is a highly relative term. Over the past two decades, the term “intermittent hypoxia” (IH) actively entered into scientific practice. IH refers to repeating periods of hypoxia (from seconds to several hours or even days) that are followed by similar periods of normoxia.

A broad interpretation of this term led Greg Semenza to put a question: “What is “intermittent hypoxia”? Does it play pathogenic roles in disease states, such as sleep-disordered

breathing, chronic pulmonary disease, cardiovascular disease, and cancer? Or, quite to the contrary, does exposure to intermittent hypoxia induce protective responses?” [2]. It is appropriate to mention here the ancient wisdom well expressed by Paracelsus in the XVI<sup>th</sup> century: “Sola dosis facit venenum” (Only the dose makes the poison). So, the mode of hypoxic influence (depth, duration, and intermittence) appeared to be critical for the determination of healing or harmful result.

Great confusion in the concept of intermittent hypoxia makes the fact that different authors identify it with completely different influences. These include such paradigms of hypoxia as preconditioning effects of brief

episodes of low-frequency IH; exercise training in hypoxic conditions; maladaptation to IH in patients with obstructive sleep apnoe (OSA) and many others [3]. Moreover, some authors identify the notion “hypoxic preconditioning” with “ischemic preconditioning” (IPC). Hypoxic preconditioning refers to the periodic exposure of organisms, systems, organs, tissues or cells to moderate hypoxia/ischemia that results in increased resistance to a subsequent episode of severe hypoxia/ischemia, thus putting an equal sign between hypoxia and ischemia [4-7].

Some authors use the term “hypoxic preconditioning” to refer to a single exposure of inhalation of hypoxic mixture or stay at barochamber. For example, Portnichenko et al [8] have shown that single exposure of acute hypoxia (inhalation of 10% O<sub>2</sub> during 3 hours) prevents the induction and activation of 5-lipoxygenase during ischemia and reperfusion of rat heart. In addition, in the papers associated with diving, the term “preconditioning” used to describe the procedure of hyperbaric oxygenation before deep sea diving [9]. Terms “pretreatment” and “preconditioning” also found in the literature as synonyms. Some authors identify the term “adaptation to intermittent hypoxia” (daily periodic exposures to hypoxia for two to four weeks) with “hypoxic preconditioning” [4-5, 10].

In an attempt to clarify this issue, other authors propose different classifications of IH species. For example, Milano et al [11] describe three different models of hypoxia, each with its own specific effects on myocardial tolerance to ischemia: 1) *chronic hypoxia (CH)* - high altitude; chronic obstructive pulmonary and congenital heart disease; anemia; blood O<sub>2</sub> carrying abnormalities; CO poisoning; chronically decreased tissue perfusion; 2) *chronic hypoxia with aeration (CHA)* - repetitive short-term reoxygenation episodes during hypoxia (studies whereby animals are housed in hypoxic or hypobaric chambers that are routinely opened to allow operations such as cleaning and animal feeding); 3) *intermittent hypoxia (IH)* - obstructive sleep apnea; sickle

cell anemia, crises; asthma; live high train low; therapeutic intermittent exposure to normobaric or hypobaric hypoxia. Severe chronic hypoxia invariably leads to depressed myocardial tolerance to ischemia, but moderate chronic hypoxia may be considered as cardioprotective. Chronic hypoxia with aeration is almost always protective. By contrast with the IH pattern associated with obstructive sleep apnea, other forms of IH the authors consider as protective.

Besides, depending of type of hypoxic exposure (high altitudes, barochamber, inhalation of gas mixtures, or breath holding and ischemia), the unfolding events are accompanied by hypocapnia and alkalosis or hypercapnia and acidosis. But the physiological consequences of elevated or reduced CO<sub>2</sub> levels under intermittent hypoxic technologies are very poorly elucidated. All these facts suggest that the common terminology on the issue of IPC and adaptation to hypoxia has not yet taken shape.

However, despite all the confusions and disagreements, all the authors believe that both intermittent hypoxic exposures in different modes and different types of ischemic preconditioning can be successfully used for the treatment and prevention of many diseases, particularly cardiovascular disorders. Mechanisms of protective actions of hypoxic and ischemic impacts have been investigated during last decades at different levels – from genomic to systemic.

Methodological approaches to the implementation of the preconditioning are extremely broad. In recent years, researchers are paying great attention to searching for alternative to IPC approaches to increase the tolerance of organs and tissues to ischemia/reperfusion. Among these attempts, remote ischemic preconditioning (RIPC) is known as a more convenient model for clinical usage. RIPC is the application of a transient and brief ischemic stimulus to a distant site from the organ or tissue that is afterward exposed to injury ischemia, and has been found to reduce ischemia-reperfusion injury in various animal models [12]. The standard protocols

normally used to deliver RIPC involve a number of short cycles (about 5 min) of inflation of a blood pressure (BP) cuff on the arm and/or leg to an inflation pressure of 200 mmHg followed by cuff deflation for a short period of time [13].

In present review we will try to compare the effects of RIPC with the effects of intermittent hypoxia training/treatment (namely IHT - periodic inhalation of hypoxic gas mixtures) in terms of the potential use of these two methods in cardiological practice.

## II. ISCHEMIC PRECONDITIONING

How ischemia may play ‘preconditioning’, that is “preparatory” action? Preconditioning is assumed as a natural adaptive process whereby a subthreshold stimulus can promote protection against a subsequent lethal stimulus. Preconditioning has been observed in multiple organisms and can occur in different organs and tissues [14, 15]. According to first definition [16], myocardial IPC is a phenomenon when multiple, brief nonlethal ischemic episodes pre-condition the heart and reduce infarct size caused by a subsequent ischemic insult. Authors exposed anesthetized open-chest dogs to four periods of 5 minute coronary artery occlusions followed by a 5 minute period of reperfusion before the onset of a 40 minute sustained occlusion of the coronary artery. The control animals had no such period of IPC and had much larger infarct sizes compared with the dogs that did. Since then, more than 1400 reviews have been published starting with a review of Schott & Schaper [17] until today. Pre-, post-, and remote conditionings of the myocardium are well described as adaptive responses that provide therapeutic paradigms for cardioprotection [13].

IPC involves several factors that are usually divided into three groups: triggers, mediators, and effectors [18-20]. The signaling pathways are complex and not yet fully understood. According to different sources, signaling pathways of immediate cytoprotection activate the

synthesis of vasodilators (NO) and opening of  $K_{ATP}$  channels in mitochondria for the reduction of oxidative processes. Induction of genes that follows the conduction of cell signaling to the nucleus intensifies these defense mechanisms due to the synthesis of powerful enzymes iNOS and COX-2, activates the mitochondrial biogenesis and regulates their function using  $K_{ATP}$  - and  $K_{Ca}$  channels. These mechanisms are target-oriented at the prevention of oxidative stress and apoptosis.

Hypoxia-inducible factor HIF-1 activates multiple protective pathways in response to ischemia. Direct IPC of the heart was shown to be dependent upon functional interaction of HIF-1 $\alpha$  with the circadian rhythm protein PER2 [21]. However, most investigators consider that our understanding of the sequence of steps is still fragmented.

Brief episodes of ischemia result in the release of initiating factors such as adenosine, opiates and bradykinin which are all endogenously released by ischemic cells [22, 23]. They activate G-protein coupled pathways, which carries a protective signal to an end-effector [24]. Bradykinin is involved in the inflammatory response by regulating the expression of adhesion molecules and the infiltration of leucocytes into the tissues. Bradykinin in low doses attenuates IR-induced leucocyte recruitment and microvascular dysfunction through B2 receptor complex-dependent nitric oxide production [25].

Ischemic preconditioning has been described not only for the myocardium [16] but also for the kidney [26], skeletal muscle [27], brain [28], and liver [29].

Although IPC was shown to have a protective effect in animal models, the obvious difficulties involved in subjecting the heart to direct IPC restrict its potential clinical applications. Both ischemic preconditioning and postconditioning require an invasive intervention applied directly to the myocardium in order to achieve cardioprotection and may therefore be impractical or even harmful, particularly in the setting of an acute myocardial infarction (AMI) [19]. In this perspective, the RIPC phenomenon appears extremely encouraging.



### III. REMOTE ISCHEMIC PRECONDITIONING

It has been known long ago that brief coronary artery occlusion preconditioned the myocardium not only within but also outside its perfusion territory [30]. Applying this phenomenon to humans was possible after discovering that the RIPC effect is reproducible after inflating–deflating a cuff placed around the limbs. Thus, there is a non-invasive method to trigger ischemia–reperfusion episodes in remote organs and muscles.

Remote forms of ischemic pre- and post-conditioning are started to be used in clinical studies, as the remote application reduces the risk of injuring the target tissue for which protection is pursued [31]. Limb transient ischemia is the preferred method of induction of remote conditioning with evidence supporting its safety. Clinically, RIPC stimulus is generally delivered by inflating the blood pressure cuff tied on the upper arm 20mm greater than the systolic blood pressure, rendering the forearm ischemic for 5min, followed 5min reperfusion by deflating the cuff. This cycle is repeated for 3-4 consecutive periods to precondition the tissue and improve the survival.

#### *Mechanisms*

The mechanisms underlying RIPC cardioprotection are similar to those described for classical ischemic preconditioning [32]. But the pathways that links remote organs, on which the preconditioning stimulus is applied, to the target organ or tissue remains mostly unclear.

Potential mechanisms of RIPC are good described in recent reviews [20, 33]. Authors consider that despite the uncertainty in fundamental RIPC mechanisms, they can be divided into three main components: (1) humoral, (2) neural, and (3) systemic factors of cardioprotection.

For today, actual identity of the *humoral mediators* remains unknown despite the fact that many applicants have been proposed for this role. More than ten years ago such RIPC mediators as adenosine, bradykinin, and calcitonin

gene-related peptide was described that enter the bloodstream and activate their respective receptors in the myocardium [34-37]. Later on, the role of endocannabinoids was described [38].

Numerous studies unveiled an activation of opioid receptors as a regulatory mechanism in tissues that have been exposed to reperfusion ischemia injury, suggesting that endogenous opioids can confer both acute and chronic ischemic protection [39, 40]. NO, a known major adenosine-induced vasodilator, has also been associated with the protective effects of preconditioning [12, 41]. Apart from locally induced vasodilation, NO may trigger other signal pathways and induce hepatic heme oxygenase-1 (HO-1), a stress inducible protein with anti-inflammatory effects.

Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), a metabolite generated by cells under ischemia, has similar properties with NO and thus could be another possible mediator of the RIPC stimulus [42]. Mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels are thought to be a plausible target of the RIPC [43, 44]. Other authors suggest other agents such as heat shock protein 70 (HSP 70), IL-6, IL-8, IL-10, nuclear factor kappa B (NFκB) and TNF-α [25, 45-47].

*Neuronal factors.* Gill and coauthors [33] characterize these factors as substances that act locally at the remote ischemic territory via afferent neural pathways. The same adenosine or bradykinin acts not directly, but through the afferent nerve fibers, which then relay to efferent nerve fibers terminating on the myocardium to confer cardioprotection. Neurogenic role to cardioprotection via capsaicin, PKC-ε, and KATP signaling was elucidated by Jones et al [48].

RIPC appears to offer two distinct phases of endothelial IRI protection, both of which are mediated from the autonomic nervous system [12]. The early, short phase is activated immediately after preconditioning and vanishes within 4 h, whereas the second, prolonged phase presents 24 h after the preconditioning stimulus and lasts for at least 48 h [49, 50].

Under the *systemic factors* Gill et al [33] implies genes encoding proteins involved in



cytokine synthesis, leukocyte chemotaxis, adhesion and migration, exocytosis, innate immunity, signaling pathways, and apoptosis. Ten years before that Konstantinov et al. [51] have shown that RIPC suppressed pro-inflammatory gene transcription in human leukocytes, helping to confer the protective role of RIPC against ischemia/reperfusion.

Mitogenactivated protein kinase pathways might also have a significant role in the preconditioning-induced protection from ischemia [52-55]. Thielmann et al. [55] conducted a randomized clinical trial in which patients who received a RIPC stimulus consisting of three cycles of short 5-min episodes of ischemia/reperfusion of the arm before coronary artery bypass graft surgery were found to have significantly reduced postoperative serum levels of cardiac troponin I, which is indicative of cardioprotection.

Saxena et al [25] investigated the impact of RIPC on kinin receptor expression in neutrophils in patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG). Authors concluded that RIPC down-regulated the expression of both kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors which persisted for at least 24 h. However, whether this consistent down-regulation translates into clinically measurable decrease in post-cardiopulmonary bypass inflammatory response or not is yet to be established.

Kalakech [56] tested whether RIPC-induced cardioprotection requires HIF-1 $\alpha$  upregulation to be effective. In the first study, wild-type mice and mice heterozygous for HIF-1 $\alpha$  (gene encoding the HIF-1 $\alpha$  protein) were subjected to RIPC immediately before myocardial infarction. Authors concluded that HIF-1 $\alpha$  upregulation is unnecessary in acute RIPC. But another research in mice [57] has led to the opposite result: data indicated that HIF-1 is required for RIPC. Albrecht et al. [58] provided investigation on patients undergoing cardiopulmonary bypass and also demonstrated the involvement of HIF-1 $\alpha$  in RIPC-induced cardioprotection.

Connexin 43 (Cx43), an integral membrane protein which expression and phosphorylation

after RIPC might have a protective role, is also involved in the list of possible molecular mechanisms [33]. These authors also mention extracellular vesicles as membrane-bound structures containing a high concentration of RNAs and proteins, as well as microRNAs such as miR-144 and miR-1. Authors emphasize that further studies are needed to establish the direct cause and effect relationship of the various active molecules involved in the cardioprotective effect of RIPC.

Thus, most experimental studies on RIPC cardioprotection described above are similar to classical myocardial IPC. They involve the activation of adenosine, opiates and bradykinin action which in turn activate G-protein coupled pathways, synthesis of vasodilators (NO and H<sub>2</sub>S), opening of sarcolemmal and mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels, the mPTP, etc. The participation of free radicals and HIFs as trigger mechanisms to preconditioning, other agents such as HSP 70, interleukins, and TNF- $\alpha$  are also considered. But there is no evidence about pathways that links remote and target organs.

### ***Clinical applications of RIPC in cardiac surgery***

In recent years, remote ischemic conditioning has become the most popular form of mechanical cardioprotection, because the procedure is noninvasive, predictable, precise, safe, and notably avoids manipulation of the coronary culprit lesion [59]. According to Bousselmi et al [20], the first clinical trial in humans was negative [60]. Later on Cheung et al. [61] randomized 37 children scheduled for surgical repair of congenital heart defects. Seventeen children were included in the RIPC group and received four five-minute cycles of ischemia/reperfusion achieved by inflation–deflation of a cuff placed on the lower limb. Twenty children were included in the control group. The postoperative levels of troponin I and the postoperative inotropic requirement were significantly higher in the control group. It was the first study to demonstrate the cardioprotective effect of RIPC in humans.

Meanwhile, regarding neonates undergoing cardiopulmonary bypass surgery some authors consider that RIPC does not provide myocardial, renal, or neuronal protection [62].

Takagi & Umemoto [63] conducted a meta-analysis, drawn from nine randomized controlled trials including 482 patients. The conclusions were that RIPC reduces postoperative myocardial injury, but is not associated with either a reduction in early postoperative mortality or with a reduction in the incidence of postoperative myocardial infarction. In another investigation [19] RIPC was performed after the induction of anesthesia but prior to surgery and occurred within 1 hour. Those patients randomized to receive RIPC had a standard blood pressure cuff placed on the upper arm, inflated to 200 mmHg for 5 min and then deflated for 5 min, a cycle which will be performed four times in total. For patients with systolic blood pressures above 185 mmHg, the cuff was inflated to at least 15 mmHg above the patient's systolic blood pressure. The sham RIPC protocol was also carried out in a control group. Authors stated that RIPC can improve clinical outcomes in higher-risk patients undergoing CABG and valve surgery.

Hausenloy et al [19] also provided the ER-ICCA trial - multicentre randomized double-blinded controlled clinical trial- which recruited 1,610 high-risk patients undergoing CABG and valve surgery using blood cardioplegia via 27 tertiary centres over 2 years. The primary combined endpoint was cardiovascular death, non-fatal myocardial infarction, coronary revascularization and stroke at 1 year. Secondary endpoints included peri-operative myocardial and acute kidney injury, intensive care unit and hospital stay, inotrope score, left ventricular ejection fraction, changes of quality of life and exercise tolerance. Patients were randomized to receive after induction of anesthesia either RIPC (4 cycles of 5 min inflation to 200 mmHg and 5 min deflation of a blood pressure cuff placed on the upper arm) or sham RIPC (4 cycles of simulated inflations and deflations of the blood

pressure cuff). The authors underline that the findings from the ERICCA trial have the potential to demonstrate that RIPC can improve clinical outcomes in higher-risk patients undergoing CABG ± valve surgery. But the concrete results of this trial were not published yet.

Vasdekis [12] reviewed a total of 24 randomized clinical trials evaluating the safety and efficacy of RIPC in different atherosclerotic diseases including abdominal aortic aneurysm, open heart surgery, percutaneous coronary intervention, and intracranial or extracranial atherosclerosis. The findings indicate that an optimal protocol for the induction of RIPC has not been established.

Recent studies of Manchurov and coauthors [64] from Russia demonstrated that RIPC prior to primary percutaneous coronary intervention (PCI) significantly improves endothelial function in patients with acute myocardial infarction and this effect remains constant at least for a week. Forty eight patients with AMI were enrolled. RIPC (intermittent arm ischemia-reperfusion through four cycles of 5-min inflation and 5-min deflation of a blood-pressure cuff to 200 mm Hg) was performed prior to primary PCI. Authors suppose that the improvement of endothelial function may be one of the possible explanations of the effect of RIPC.

In another investigation [65], 60 patients undergoing CABG surgery were randomized to RIPC (n=30) or control (n=30). RIPC was performed preoperatively by inflating a blood pressure cuff on the upper arm to 200 mm Hg for 3×5 minutes, with 5 minutes reperfusion intervals. Maximal mitochondrial respiration was preserved throughout surgery after RIPC but significantly reduced after aortic cross-clamping in control. Incidence of postoperative atrial fibrillation was lower after RIPC versus control. Myocardial expression of microRNAs miR-133a and miR-133b (important regulators of mitochondrial function) increased after aortic cross-clamping in both RIPC and control, whereas miR-1 was upregulated in control only. MiR-338-3p expression was higher

in RIPC versus control after aortic cross-clamping. The authors conclude that RIPC preserves mitochondrial respiration and prevents upregulation of miR-1 in the right atrium during coronary artery bypass graft.

Pavione et al [66] evaluated in randomized controlled trial whether RIPC performed the day before surgery for congenital heart disease with cardiopulmonary bypass attenuates the postoperative inflammatory response and myocardial dysfunction. Authors concluded that late RIPC did not provide clinically relevant cardioprotection. As Yang et al [4] suggest, repetitive hypoxic preconditioning may provide long-lasting protection than single preconditioning against ischemia/reperfusion injury.

Some authors suggested the prospective possibility of using RIPC for the treatment of other diseases, such as type-2 diabetes [67], chronic kidney disease [68] or prevention of transfusion-related acute lung injury [69]. But the evidence is virtually non-existent in these studies.

There are some attempts to use RIPC in sport practice. For example, Jean-St-Michel et al [70] indicate that RIPC improves maximal performance in highly trained swimmers. This simple technique may be applicable to other sports and, more importantly, to other clinical syndromes in which exercise tolerance is limited by tissue hypoxemia or ischemia. Another authors have also been looked at RIPC as a means of improving performance in highly trained athletes [71-73]. Barbosa [74] testify that RIPC applied to the lower limbs delayed the development of fatigue during handgrip exercise, prolonged time to task failure, but was not accompanied by changes in forearm hemodynamics and deoxygenation.

In children, RIPC has also been applied in the lower limb by using a cuff inflation pressure that was 15 mm of Hg above the resting systolic pressure [75].

Recent study [76] demonstrates that RIPC (four cycles of lower limb ischemia (5 min) and 5 min of reperfusion) transiently reduces symptoms of acute mountain sickness. However,

Lalonde [77] investigating the effect of the same RIPC regimen on anaerobic performance in healthy participants, concluded that remote ischemic preconditioning does not offer any significant benefits for anaerobic performance. According to Twine et al [78], the largest powered randomised trial in cardiac surgery showed no benefit to RIPC, meta-analyses are generally underpowered. The technique is physiologically sound but remains lacking in clear clinical benefit. Vasdekis et al [12] also conclude that most of the trials focused on postoperative cardiac or renal function after RIPC with conflicting results. However, no severe local adverse events were observed in any patient undergoing limb or arm preconditioning.

So, for today RIPC is used mainly for short-term cardioprotection in cardiac surgery to reduce postoperative myocardial injury after CABG and valve surgery, percutaneous coronary intervention, abdominal aortic aneurysm as well as in children scheduled for surgical repair of congenital heart defects. Several attempts have been made to show the potential effectiveness in sports as well as for the treatment of other diseases such as type-2 diabetes, chronic kidney disease, acute mountain sickness.

## **IY. Intermittent hypoxia treatment in cardiology**

Intermittent hypoxia training (IHT, periodic exposure of an organism to hypoxic gas mixtures, or recurrent stay in a barochamber) has powerful adaptogenic effect. This drug-free method, which is almost without contraindications, 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 [79, 80]. The number of publications indexed in PUBMED under the key-word “Intermittent Hypoxia” increased from 15 in 1983 to 335 in 2014 of total 2900. Several monographs have been published [81, 82]. Beneficial results of IHT application were obtained for the treatment and prevention of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease, cardiological disorders, type

II diabetes as well as for preparation of patients to surgery. In many other areas of medicine, such as hematology, neurology, gastrointestinal diseases, professional diseases, post radiation disorders of immune system, male reproductive system this method is also successfully used.

Basic investigations led to the proliferation of various methods of IHT exposure and the development of different medical equipment – hypoxicators – for its implementation in sport practice and military operations and also for clinical application, including treatment of cardio-vascular disorders.

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. In practice, normobaric hypoxic regimens vary broadly from 3-12 short hypoxic sessions (2-10 min) with 2-20 min normoxic breaks during 7-30 days to hypoxic influences lasting from 1 - 12 hours during 2-90 days [83]. As Navarrete-Opazo et al [84] describe, modest hypoxia (9-16% inspired  $O_2$ ) and low cycle numbers (3-15 episodes per day) most often lead to beneficial effects without pathology, whereas severe hypoxia (2-8% inspired  $O_2$ ) and more episodes per day (48-2,400 episodes/day) elicit progressively greater pathology. Serebrovskaya et al [83] investigating 5 modes of IHT on gastrocnemius muscle  $PO_2$ , heart and liver mitochondrial respiration in rats, concluded that the most effective IHT regimen is 5 min 12%  $O_2$  with 5 min breaks, five cycles per day during two or three weeks depending on the task of IHT. Accumulating evidence suggests that “low dose” IHT (modest hypoxia, few episodes) may be a simple, safe, and effective treatment with considerable therapeutic potential for multiple clinical disorders.

Intermittent hypobaric hypoxia is also used for treatment of patients with cardiovascular disorders [85-88]. But the use of barochambers are not entirely without risk. Besides, it is very expensive procedure. The disadvantages of hypobaric chambers have prompted increased

study of normobaric hypoxia training, and in recent years normobaric breathing of hypoxic gas mixtures has become a practical means of producing IH.

In this review we will elucidate traditional IHT protocols elaborated mostly by scientists from Eastern Europe comprise alternating brief periods (minutes) of breathing with hypoxic gas mixtures followed by a subsequent oxygenation periods (breathing with ambient air or hyperoxic gas mixtures).

### ***Mechanisms***

Numerous modern studies collectively show that IHT stimulates regenerative processes in an organism via several mechanisms:

(1) elicits upregulation of cytoglobins (myoglobin and neuroglobin), which constitute intracellular  $O_2$  buffer and provide protection against ROS and RNS [89, 90];

(2) stimulates insulin-independent glucose transport and accumulation of glycogen in the oxygen-sensitive cells (cardiomyocytes and neurons), thus increasing instantly available intracellular energy reserves [91, 92];

(3) incites activator protein-1 and HIFs, the master proteins responsible for numerous adaptational pathways [93, 94];

(4) stimulates erythropoietin (EPO) production having multiple protective and neuroregenerative effects [95, 96];

(5) stimulates HSP70, one of the key members in the chaperons family providing protection against injury and facilitating successful recovery after damage [97, 98];

(6) incites growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) release [99, 100];

(7) enhances antioxidant defense system and increases the resistance of  $Na^+K^+$  ATPase to oxidative stress [101, 102];

(8) stimulates endothelial NO production provoking vasodilation, opening of reserve capillaries and preventing  $Ca^{2+}$  overload, which has multiple protective and adaptogenic effects [103];

(9) modulates humoral and cellular immunity [104];



(10) stimulates brain-derived growth factor (BDGF) and glial cell-derived growth factor (GDNF) that provide neuronal protection and stimulate neuroregeneration [105];

(11) supports mitochondrial biogenesis and induces selection of non-mutated mtDNA [97];

(12) induces changes within mitochondria increasing the O<sub>2</sub> utilization efficiency of ATP production [106];

(13) stimulates activity of natural mesenchymal and hematopoietic stem-cells responsible for repair [104, 107].

When exposed to IHT, the increase in the total number of mitochondria, the reduction of the number of structurally modified organelles, the appearance of energetically active mitochondria is observed [108]. Several protocols of therapeutic, non-damaging intermittent hypoxia, particularly IHT and intermittent hypoxic-hyperoxic training (IHHT) have been demonstrated to significantly increase proliferation, circulation and homing of bone-marrow derived mesenchymal (stromal) stem cells [109, 110].

### *Use of IHT in cardiac clinic*

Links to reviews devoted to IHT usage for the treatment of cardiovascular diseases, such as systemic hypertension, atherosclerosis, coronary heart disease, metabolic disturbances are available in many papers and monographs [81, 82, 85, 86, 111, 112]. Valuable studies have been conducted to prove beneficial effects of IHT for preoperative preparation of coronary artery bypasses grafting [113], patients with oncological problems [114] as well as pregnant women to planned abdominal delivery [115].

Special attention deserves the assessment of safety and efficacy of IHT implementation in elderly patients with stable angina, chronic coronary artery disease and hypertension. Besides, it was proved that IHT decreases functional age of cardiovascular system in elderly people with accelerated aging. The principles of individual dosing of hypoxic load for elderly patients were developed [116-118].

Collectively, effects of IHT on human

cardiovascular system are described as the following: 1) improvement of metabolic processes in the myocardium; 2) enhancement of the myocardial ischemia/reperfusion sustainability (anti-ischemic effect); 3) reduction of free radical damage; 4) improvement of endothelial function and microcirculation; 5) enhancement of inotropic cardiac function; 6) normalization of blood pressure; 7) reduced activity of the sympathetic nervous system; 8) reduced blood viscosity and platelet aggregation.

A variety of technical implementations for IHT has been tested and used in recent decades, including hypobaric chambers, normobaric reduced oxygen rooms and mask-system hypoxicators, which produce hypoxic air in various ways. On the basis of hypoxicators classification, the overview of their design, medical and technical requirements is presented, and the perspectives of their development and industry trends are described as well as advantages and disadvantages of their operation [119].

In most cases gas mixture is formed from atmospheric air using deoxygenating method. Deoxygenation can be carried out by one of the following approaches: (1) gas separation on membranes or fibres [120]; 2) separation of oxygen and nitrogen by solid electrolytes [121]; 3) temporary binding of nitrogen by zeolites with further emission of nitrogen into the mixture [121]; and 4) breathing in semi-closed flow circuit (rebreathing) [119]. Most of the currently manufactured hypoxicators use the methods of gas separation or rebreathing.

In practice, hypoxic regimens that are used for the study of hypoxic adaptations vary broadly from 3-12 short hypoxic sessions (2-10 min) with 2-20 min normoxic breaks during 7-30 days to hypoxic influences lasting from 1 - 12 hours during 2-90 days [83].

The advantages of intermittent hypoxic-hyperoxic training (IHHT)

Recently, a new mode of adaptive training was explored, which combines periods of hypoxia and hyperoxia [122-125]. 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.

This technology utilizes portable equipment, similar to the widely used oxygen concentrators, but specially designed for delivery of precisely controllable, intermittent flow of hyperoxic and hypoxic breathing mixture to the patient via facemask [126, 127]. Using this platform for clinical research opens new exciting perspectives in fighting the multitude of cardiovascular, degenerative and age-related diseases [80].

#### ***Y. RIPC versus IHT: benefits and disadvantages***

So, both RIPC and IHT technologies at defined doses provide positive effects on the cardiovascular system. These effects have mostly similar mechanisms of protection and share the same signaling pathways. At the same time, they differ in many ways.

RIPC are mainly used for patients undergoing heart surgery whereas IHT is mostly used in therapeutic clinics. RIPC technologies designed generally for one-day course (about 3-4 times for 5 minutes in 5-minute intervals). IHT involves training for 2 - 3 weeks. There is no reliable evidence about the duration of positive effects of RIPC technology, while researchers involved in IHT suggest 3 to 6 month period of improvements.

Besides the great differences in timeframe of the two methods, one very important parameter is evident: the presence or absence of hypercapnia.

Indeed, the physiological and molecular consequences of elevated  $\text{CO}_2$  levels under RIPC technology are very poorly elucidated. Meanwhile, carbon dioxide is an important gaseous molecule that maintains homeostasis

and is an important cellular signaling molecule in an organism.  $\text{CO}_2$  accumulates in the tissues during each episode of cuff inflating, which causes acidemia. On the contrary, during IHT, systemic hypoxia activates ventilation, resulting in hypocapnea and alkalemia.

Almost twenty years ago it was shown that the return from acidotic to normal pH after reperfusion caused myocytes to lose viability [128]. Recent analysis of physiological changes in the limb during ischemia demonstrated a reduction in  $\text{sO}_2$  (%),  $\text{pO}_2$  levels and pH as well as an increase in the levels of  $\text{CO}_2$  and lactate, but without any change in the base excess or  $\text{HCO}_3^-$  levels at all cuff inflation pressures in the upper limb [129].

In the literature there are few papers concerning the changes in gas exchange during remote preconditioning, although the role of  $\text{CO}_2$  and pH is not discussed. For example, Xia et al [130] in experiments on sheep showed that three episodes of five-minute occlusion and five-minute reperfusion of the iliac artery increased pulmonary vascular resistance and pulmonary arterial pressure and decreased  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  ratio. Authors concluded that RIPC by transient occlusion of the iliac artery improves lung gas exchange. These data were later confirmed by studies of patients undergoing heart surgery [131]. The authors compared protective effect of remote ischemic preconditioning (RIPCpre) and post-conditioning (RIPCpost) (three 10-min cycles of right-side lower-limb ischemia of 250 mm Hg) in patients undergoing complex valvular heart surgery. In both groups, the ratio between  $\text{PaO}_2$  and  $\text{FiO}_2$  at 24 h postoperation was significantly decreased compared with each corresponding baseline value. Unfortunately,  $\text{pCO}_2$  and other parameters of acid-base balance have not been investigated.

In the whole body the higher  $\text{CO}_2$  level causes dyspnoea, headache, restlessness, faintness, dulling of consciousness, greatly elevated alveolar ventilation, muscular rigidity and tremors [132]. Systemic intermittent hypercapnia causes long-term ventilatory potentiation [133].

PaCO<sub>2</sub> alterations may affect vascular dynamics via activation or inactivation of vasoactive factors such as nitric oxide, angiotensin II, endothelin and bradykinin [134]. Hypercapnia is inversely correlated with renal blood flow and causes renal constriction. In kidney cells it rapidly stimulates renal H<sup>+</sup> secretion [135]. In neuronal cells HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> causes direct activation of a soluble adenylyl cyclase (sAC) protein which is targeted to intracellular compartments regulating cell metabolism [136]. Elevated CO<sub>2</sub> levels lead to the increase in cyclic AMP (cAMP) level which, in turn, activates PKA, that leads to opening of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and influx of Ca<sup>2+</sup> into cells. Several reports confirmed a cell-damaging effect of severe acidosis [137, 138]. There are other pathophysiological consequences of elevated CO<sub>2</sub> which could take place during cuff inflating.

On the other hand, the hypercapnic acidosis may, paradoxically, be helpful in patients with organ failure due to ischemia/reperfusion-related cellular injury. The mechanisms of such effects could be partly related to the suppression of formation of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species in neutrophils, and with the increases in arterial blood oxygenation through improved ventilation-perfusion matching at the lungs [133].

Moreover, some authors consider hypercapnia as a therapeutic remedy. Experiments on invertebrates have shown that moderate acidosis could result in adaptive responses for cell survival and increase tolerance to harmful stress. Acidic treatment significantly increased the gene expression of hypoxia inducible factor (HIF) [139]. According to Dunlop [140], inhalation of CO<sub>2</sub> (“therapeutic hypercapnia”) may limit oxidative stress and upregulate cytokine expression in the lung and other organs, prevent the adverse effects of sustained exposure to inhaled nitric oxide on right ventricular (RV) systolic function by limiting IL-1-mediated NOS-2 upregulation and consequent nitration. Authors consider that intermittent acidic preconditioning is more effective in preventing oxygen-deprivation injury,

compared with prolonged act. The exogenous inhalation of CO<sub>2</sub> has been also shown to have beneficial effects on the pulmonary circulation and cardiac function [141-143]. It was even demonstrated that preconditioning with hypercapnic acidosis protects against ischemia-induced cardiomyocytes injury [144, 145].

By analogy with the RIPS, studies of the IHT effects also paid little attention to the role of CO<sub>2</sub>, although vasoconstrictive action of hypocapnia secondary to hypoxic hyperventilation takes place. Zhang et al [146] investigating experimental hypocapnia and hypercapnia following 14-day IHT (10% O<sub>2</sub>) concluded that repetitive normobaric IH exposures significantly diminish variations of cerebral perfusion in response to both hypercapnia and hypocapnia without compromising cerebral tissue oxygenation. Similar results were obtained by Fan & Kayser [147]. Snow et al. [148] in experiments on rats have shown that hypocapnic but not eucapnic IH increases hematocrit and causes a more profound increase in right ventricular mass than does eucapnic IH.

In general, the meager data on the role of hypocapnia in adaptive processes at IHT do not allow for any practical advice on manipulation with CO<sub>2</sub> during IHT and to compare RIPC and IHT in terms of benefit or detrimental role of CO<sub>2</sub> in clinical practice. Some authors consider that hypercapnia treatment might be a novel strategy to prevent brain injury in surgically induced circulation arrest. Meanwhile, intracellular acidosis due to hypercapnia raises concerns about potential harmful effects of intermittent hypercapnia. To the regret, this question has not been investigated according to dose-response curves both in RIPC and IHT technologies.

Another approach to compare the two methods is their simplicity, convenience and cost in use. The biggest advantage of RIPC is the simplicity of application and low cost. The disadvantages concern both the methodology for conducting and the severity of the impact. Clamping arm cuff for 5 minutes with the pressure about 200 mm Hg causes severe patient

discomfort, numbness of a limb and other extremely unpleasant sensations. There is limited data on how well the various RIPC protocols may be tolerated by nonanesthetized individuals. Sharma et al [129] investigated the perception of pain associated with RIPC using different cuff inflation pressures. In both the upper and lower limbs, there was a significant increase in the pain score from baseline with all three cuff inflation pressures used for RIPC (140, 160 and 180 mm Hg). RIPC was better tolerated in the upper limb compared with the lower limb at higher cuff inflation pressures. In this regard, IHT is associated with a more comfortable breathing through a mask, although provision of such procedures is more expensive.

Further, potential effects of age, race, drugs, and comorbidity on RIPC response have not been adequately investigated as well as optimal protocols have not been established. There is conflicting evidence regarding the effectiveness of RIPC in patients undergoing different interventions. According to different authors, meta-analyses are generally underpowered; the RIPC technique is physiologically sound but remains lacking in clear clinical benefit.

IHT has a much larger history of development than RIPC, and accumulates much more information about its use in wide areas of medicine other than cardiology. Most achievements in IHT practical implementation are based on a thorough study of the mechanisms of both positive and negative IHT actions. Various types of equipment that allows dosing the degree of hypoxic stress depending on the purpose of training/treatment have been developed and introduced into clinical and sports practice. This equipment is comfortable to use, most devices are equipped with a feedback system to prevent the negative effects of hypoxic overdose. The benefit effects of IHT course last three to six months. There is evidence that some types of diseases can be completely cured with IHT.

The main negative aspect of IHT concerns first of all the lack of accurate development of

methods for individual selection of hypoxic regimens for different patients with different groups of diseases. The proper choice of the hypoxic dosage must be titrated for each patient to avoid negative effects of hypoxia and to augment the favorable ones. Extensive multicentre trials for each type of disease have not conducted yet. Optimal protocols for the procedure need to be further determined. The equipment is mainly expensive and requires skilled personnel for its service. Cheap devices such as rebreathers are still not included in the common practice.

We wish to stimulate a comprehensive understanding of such a complex physiological phenomenon as intermittent hypoxia and ischemic preconditioning, in order to prevent or reduce their harmful consequences, while maximize their potential utility as an effective therapeutic tools.

*Acknowledgments* This study was supported in part by CellGym (Berlin, Germany).

**Т.В. Серебровская<sup>1</sup>, В.Б. Шатило<sup>2</sup>**

### **ДИСТАНЦИОННОЕ ИШЕМИЧЕСКОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ И ИНТЕРВАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ В КАРДИОПРОТЕКЦИИ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ**

Под ишемическим преко́ндиционированием понимают адаптивный феномен, возникающий после одного или нескольких коротких промежутков ишемии/реперфузии и заключающийся в повышении устойчивости органа или ткани к повреждающему действию длительного периода ишемии/реперфузии. Хотя на животных моделях и в ходе хирургических операций доказано, что ишемическое преко́ндиционирование производит защитный эффект на сердечную мышцу, клиническое применение этого метода чрезвычайно затруднительно. С этой точки зрения, метод дистанционного ишемического преко́ндиционирования (ДИП – периодическое пережатие манжетой предплечья или ноги) представляется крайне обнадеживающим. Интервальные гипоксические тренировки (ИГТ - периодическое воздействие на целый организм, орган или ткань гипоксическими газовыми смесями, либо пребывание в барокамере или высокогорье) также обладают мощным адаптогенным эффектом, повышающим устойчивость к последующим эпизодам тяжелой гипоксии / ишемии. В обзоре обсуждаются основные механизмы и

клиническое применение метода ДИП в кардиологии по сравнению с технологиями ИГТ. Рассматриваются преимущества и недостатки обоих методов, а также положительные и отрицательные эффекты гиперкапнии во время технологии ДИП. Мы хотим стимулировать всестороннее исследование такого сложного физиологического явления, как прерывистая гипоксия и ишемия для предотвращения или уменьшения их отрицательных последствий и максимизации их потенциальной пользы в качестве эффективных терапевтических средств.

<sup>1</sup> *Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, Киев;*

<sup>2</sup> *Государственное учреждение “Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины”, Киев, Украина*

**Т.В. Сребровська<sup>1</sup>, В.Б. Шатило<sup>2</sup>**

### **ДИСТАНЦІЙНЕ ІШЕМІЧНЕ ПРЕКОНДИЦІОНУВАННЯ І ІНТЕРВАЛЬНА ГІПОКСІЯ В КАРДІОПРОТЕКЦІЇ: ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ**

Під ішемічним прекодиціонуванням розуміють адаптивний феномен, що виникає після одного або декількох коротких проміжків ішемії / реперфузії і полягає в підвищенні стійкості органа або тканини до шкідливої дії тривалого їх періоду. Хоча на тваринних моделях і під час хірургічних операцій доведено, що ішемічне прекодиціонування спричиняє захисний ефект на серцевий м'яз, клінічне застосування цього методу надзвичайно складне. З цієї точки зору, метод дистанційного ішемічного прекодиціонування (ДИП - періодичне стискання манжетою передпліччя або ноги) є вкрай обнадійливим. Інтервальні гіпоксичні тренування (ІГТ - періодичний вплив на цілий організм, орган або тканину гіпоксичними газовими сумішами, або перебування в барокамері чи високогір'ї) також мають потужний адаптогенний ефект, підвищуючи стійкість до подальших епізодів важкої гіпоксії / ішемії. В огляді обговорюються основні механізми та клінічне застосування методу ДИП в кардіології в порівнянні з технологіями ИГТ. Розглядаються переваги та недоліки обох методів, а також позитивні і негативні ефекти гіперкапнії під час ДИП. Ми хочемо стимулювати всебічне дослідження такого складного фізіологічного явища, як інтервальна гіпоксія та ішемія для запобігання або зменшення їх негативних наслідків і максимізації потенційної корисності як ефективних терапевтичних засобів.

<sup>1</sup> *Институт физиологии им. О.О.Богомольца НАН Украины, sereb@biph.kiev.ua;*

<sup>2</sup> *Державна установа “Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарьова НАМН Украины”, Київ.*

### **REFERENCES**

1. Prabhakar N.R., Semenza G.L. (2012). Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol. Rev.* 92: 967–1003.
2. Semenza GL (2012) Foreword. In: Xi L, Serebrovska TV (eds). *Intermittent Hypoxia and Human Diseases / Springer, UK, 2012, p. v.*
3. 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.
4. Yang C.C., Lin L.C., Wu M.S., Chien C.T., Lai M.K. Repetitive hypoxic preconditioning attenuates renal ischemia/ reperfusion induced oxidative injury via upregulating HIF-1 dependent bcl-2 signaling. *Transplantation.* 2009; 88: 11: 1251–1260.
5. Chen W.J., Chen H.W., Yu S.L. et al. Gene expression profiles in hypoxic preconditioning using cDNA microarray analysis: altered expression of an angiogenic factor, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Shock.* 2005; 24: 2: 124–131.
6. Semenov D.G., Samoilov M.O., Lazarewicz J.W. Preconditioning reduces hypoxia-evoked alterations in glutamatergic Ca<sup>2+</sup> signaling in rat cortex. *Acta Neurobiol. Exp.* 2008; 68: 2: 169–179.
7. Maslov LN, Lishmanov IuB, Emel'ianova TV, Prut DA, Kolar F, Portnichenko AG, Podoksenov IuK, Khalulin IG, Wang H, Pei JM. Hypoxic preconditioning as novel approach to prophylaxis of ischemic and reperfusion damage of brain and heart]. *Angiol Sosud Khir.* 2011;17(3):27-36.
8. Portnichenko AG, Vasilenko MI, Moïbenko AA. [Hypoxic preconditioning prevents the induction and activation of 5-lipoxygenase during ischemia and reperfusion of rat heart]. *Fiziol Zh.* 2012;58(4):21-9.
9. Camporesi EM, Bosco G. Hyperbaric oxygen pretreatment and preconditioning. *Undersea Hyperb Med.* 2014 May-Jun;41(3):259-63
10. Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E. et al. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-κB in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia. *J. Neurochem.* 2008; 106: 3: 1450–1458.
11. Milano G, Corno AF, Samaja M, Morel S, Vassalli G, von Segesser LK. Daily reoxygenation decreases myocardial injury and improves post-ischaemic recovery after chronic hypoxia. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010 Apr;37(4):942-9.
12. Vasdekis SN, Athanasiadis D, Lazaris A, Martikos G, Katsanos AH, Tsvigoulis G, Machairas A, Liakakos T. The role of remote ischemic preconditioning in the treatment of atherosclerotic diseases. *Brain Behav.* 2013 Nov;3(6):606-16.
13. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardiopro-



- tection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev.* 2014 Oct;66(4):1142-74.
14. Stetler RA, Leak RK, Gan Y, Li P, Zhang F, Hu X, Jing Z, Chen J, Zigmond MJ, Gao Y. Preconditioning provides neuroprotection in models of CNS disease: paradigms and clinical significance. *Prog Neurobiol.* 2014 Mar;114:58-83.
  15. Golpich M, Rahmani B, Mohamed Ibrahim N, Dargahi L, Mohamed Z, Raymond AA, Ahmadiani A. Preconditioning as a potential strategy for the prevention of Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.* 2015 Feb;51(1):313-30.
  16. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5):1124-1136.
  17. Schott RJ, Schaper W. Ischemic preconditioning and myocardial stunning: related consequences of brief coronary occlusion and reperfusion? *Adv Cardiol.* 1990;37:32-41
  18. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Nov;33(11):1897-918.
  19. Hausenloy DJ, Candilio L, Laing C, Kunst G, Pepper J, Kolvekar S, Evans R, Robertson S, Knight R, Ariti C, Clayton T, Yellon DM;ERICCA Trial Investigators. Effect of remote ischemic preconditioning on clinical outcomes in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery (ERICCA): rationale and study design of a multi-centre randomized double-blinded controlled clinical trial. *Clin Res Cardiol* (2012) 101:339-348.
  20. Bousselmi R, Lebba MA, and Ferjani M. Myocardial ischemic conditioning: Physiological aspects and clinical applications in cardiac surgery. *J Saudi Heart Assoc.* Apr 2014; 26(2): 93-100.
  21. Eckle T, et al. (2012) Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. *Nat Med* 18(5):774-782
  22. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AWH, Olsson RA, and Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84: 350-356, 1991.
  23. Philipp S, Yang X-M, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res.* 2006;70:308-314.
  24. Goto M, Liu Y, Yang X-M, Ardell JL, Cohen MV, and Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 77: 611-621, 1995.
  25. Saxena P, Aggarwal S, Misso NL, Passage J, Newman MA, Thompson PJ, d'Udekem Y, Praporski S, Konstantinov IE. Remote ischaemic preconditioning down-regulates kinin receptor expression in neutrophils of patients undergoing heart surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2013 Oct;17(4):653-8.
  26. Zager RA, Baltes LA, Sharma HM, Jurkowitz MS. Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events. *Kidney Int.* 1984;26:689-700.
  27. Mounsey RA, Pang CY, Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992;107:549-552
  28. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, Kamada T. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 1990;528:21-24.
  29. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc.* 1993;25:3303-3304
  30. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD (1996) Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 94(9):2193-2200.
  31. Dezfulian C1, Garrett M, Gonzalez NR Clinical application of preconditioning and postconditioning to achieve neuroprotection. *Transl Stroke Res.* 2013 Feb;4(1):19-24.
  32. Hausenloy DJ, Yellon DM (2008) Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 79:377-386.
  33. Gill R, Kuriakose R, Gertz ZM, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC. Remote ischemic preconditioning for myocardial protection: update on mechanisms and clinical relevance. *Mol Cell Biochem.* 2015 Apr;402(1-2):41-9.
  34. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM (1998) Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 275:H1542-H1547.
  35. Tang ZL, Dai W, Li YJ, Deng HW (1999) Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359:243-247
  36. Schoemaker RG, van Heijningen CL (2000) Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1571-H1576.
  37. Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ (2002) Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 34:1317-1323
  38. Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M, Jabehdar-Maralani P, Sadeghipour H, Ebrahimi F, Dehpour AR (2008) Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 579:246-252
  39. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, Forrest CR, Pang CY Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Oct;285(4):H1435-43.
  40. Peart JN, Gross ER, Gross GJ. Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives. *Vascul. Pharmacol.* 2005;42:211-218.
  41. Corti P, Gladwin MT (2014) Is nitrite the circulating endocrine effector of remote ischemic preconditioning?



- Circ Res 114:1554–1557.
42. Osswald H, Moerike K. Remote conditioning in clinical practice: a type of distant healing? *Cardiology*. 2011;119(4):214-6
  43. Kristiansen SB, Nielsen-Kudsk JE, Bøtker HE, Nielsen TT. Effects of KATP channel modulation on myocardial glycogen content, lactate, and amino acids in nonischemic and ischemic rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005 May;45(5):456-61.
  44. Hausenloy DJ (2013) Cardioprotection techniques: preconditioning, postconditioning and remote conditioning (basic science). *Curr Pharm Des* 19:4544–4563.
  45. Zhou B, Zhang PJ, Tian T, Jin C, Li Y, Feng M, Liu XY, Jie L, Tao LD. Role of vascular endothelial growth factor in protection of intrahepatic cholangiocytes mediated by hypoxic preconditioning after liver transplantation in rats. *Transplant Proc*. 2010 Sep;42(7):2457-62
  46. Li J, Xuan W, Yan R, Tropak MB, Jean St Michel E, Liang W, Gladstone R, Backx PH, Kharbanda RK, Redington AN. Remote preconditioning provides potent cardioprotection via PI3K/AKT activation and is associated with nuclear accumulation of beta-catenin. *Clin Sci (Lond)*. 2011; 120:451-462.
  47. Diwan V, Kant R, Jaggi AS, Singh N, Singh D (2008) Signal mechanism activated by erythropoietin preconditioning and remote renal preconditioning-induced cardioprotection. *Mol Cell Biochem* 315:195–201.
  48. Jones WK, Fan GC, Liao S, Zhang JM, Wang Y, Weintraub NL, Kranias EG, Schultz JE, Lorenz J, Ren X (2009) Peripheral nociception associated with surgical incision elicits remote nonischemic cardioprotection via neurogenic activation of protein kinase C signaling. *Circulation* 120:S1–S9
  49. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschitzky JA, et al.. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 2002;106(23):2881–3.
  50. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A, Deanfield JE, MacAllister RJ. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Aug 2;46(3):450-6.
  51. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, Downey GP, Liu PP, Cukerman E, Coles JG, Redington AN. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics*. 2004 Sep 16;19(1):143-50.
  52. Park KM, Chen A, Bonventre JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *J Biol Chem*. 2001 Apr 13;276(15):11870-6.
  53. Heidbreder M, Naumann A, Tempel K, Dominiak P, Dendorfer A. Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cardiovasc Res*. 2008 Apr 1;78(1):108-15.
  54. Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM (2011) Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin. *Antioxid Redox Signal* 14:893–907.
  55. Thielmann M, et al. (2013) Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: A single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 382(9892):597–604.
  56. Kalakech H, Tamareille S, Pons S, Godin-Ribuot D, Carmeliet P, Furber A, Martin V, Berdeaux A, Ghaleh B, Prunier F. Role of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in remote limb ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Dec;65:98-104
  57. Cai Z, Luo W, Zhan H, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 22;110(43):17462-7.
  58. Albrecht M, Zitta K, Bein B, Wennemuth G, Broch O, Renner J, Schuett T, Lauer F, Maahs D, Hummitzsch L, Cremer J, Zacharowski K, Meybohm P (2013) Remote ischemic preconditioning regulates HIF-1 $\alpha$  levels, apoptosis and inflammation in heart tissue of cardio-surgical patients: a pilot experimental study. *Basic Res Cardiol* 108:314
  59. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev*. 2014 Oct;66(4):1142-74.
  60. Günaydin B, Cakici I, Soncul H, Kalaycioglu S, Cevik C, Sancak B, Kanzik I, Karadenizli Y. Does remote organ ischaemia trigger cardiac preconditioning during coronary artery surgery? *Pharmacol Res*. 2000 Apr;41(4):493-6.
  61. Cheung M.M., Kharbanda R.K., Konstantinov I.E., Shimizu M., Frndova H., Li J. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(11):2277–2282
  62. Jones BO, Pepe S, Sheeran FL, Donath S, Hardy P, Shekerdemian L, Penny DJ, McKenzie I, Horton S, Brizard CP, d'Udekem Y, Konstantinov IE, Cheung MM. Remote ischemic preconditioning in cyanosed neonates undergoing cardiopulmonary bypass: a randomized controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013 Dec;146(6):1334-40.
  63. Takagi H., Umemoto T. Remote ischemic preconditioning for cardiovascular surgery: an updated meta-analysis of randomized trials. *Vasc Endovascular Surg*. 2011; 45(6):511–513.
  64. Manchurov V, Ryazankina N, Khmara T, Skrypnik D, Reztsov R, Vasilieva E2, Shpektor A. Remote ischemic preconditioning and endothelial function in patients with acute myocardial infarction and primary PCI. *Am J Med*. 2014 Feb 21
  65. Slagsvold KH, Rognum O, Høydal M, Wisløff U, Wahba A. Remote ischemic preconditioning preserves mito-

- chondrial function and influences myocardial microRNA expression in atrial myocardium during coronary bypass surgery. *Circ Res.* 2014 Feb 28;114(5):851-9.
66. Pavione MA, Carmona F, de Castro M, Carlotti AP. Late remote ischemic preconditioning in children undergoing cardiopulmonary bypass: a randomized controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012 Jul;144(1):178-83.
  67. Wider J, Przyklenk K. Ischemic conditioning: the challenge of protecting the diabetic heart. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2014 Oct;4(5):383-396.
  68. Savaj S, Savoj J, Jebraili I, Sezavar SH. Remote Ischemic Preconditioning for Prevention of Contrast-induced Acute Kidney Injury in Diabetic Patients. *Iran J Kidney Dis.* 2014 Nov;8(6):457-60.
  69. Camara-Lemarrroy CR. Remote ischemic preconditioning as prevention of transfusion-related acute lung injury. *Med Hypotheses.* 2014 Sep;83(3):273-5.
  70. Jean-St-Michel E, Manlihot C, Li J, Tropak M, Michelsen MM, Schmidt MR, McCrindle BW, Wells GD, Redington AN. Remote preconditioning improves maximal performance in highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2011 Jul;43(7):1280-6.
  71. de Groot PC, Thijssen DH, Sanchez M, Ellenkamp R, Hopman MT. Ischemic preconditioning improves maximal performance in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2010 Jan;108(1):141-6.
  72. Bailey TG, Birk GK, Cable NT, Atkinson G, Green DJ, Jones H, Thijssen DH. Remote ischemic preconditioning prevents reduction in brachial artery flow-mediated dilation after strenuous exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Sep 1;303(5):H533-8.
  73. Kjeld T, Rasmussen MR, Jattu T, Nielsen HB, Secher NH. Ischemic preconditioning of one forearm enhances static and dynamic apnea. *Med Sci Sports Exerc.* 2014 Jan;46(1):151-5.
  74. Barbosa TC, Machado AC, Braz ID, Fernandes IA, Vianna LC, Nobrega AC, Silva BM. Remote ischemic preconditioning delays fatigue development during handgrip exercise. *Scand J Med Sci Sports.* 2014 Apr 15 [Epub ahead of print].
  75. Cheung M.M., Kharbanda R.K., Konstantinov I.E., Shimizu M., Frndova H., Li J. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(11):2277-2282.
  76. Berger MM, Köhne H, Hotz L, Hammer M, Schommer K, Bärtsch P, Mairbäurl H. Remote ischemic preconditioning delays the onset of acute mountain sickness in normobaric hypoxia. *Physiol Rep.* 2015 Mar;3(3). pii: e12325.
  77. Lalonde F, Curnier DY. Can anaerobic performance be improved by remote ischemic preconditioning? *J Strength Cond Res.* 2015 Jan;29(1):80-5.
  78. Twine CP, Ferguson S, Boyle JR. Benefits of remote ischaemic preconditioning in vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2014 Aug;48(2):215-9.
  79. 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.
  80. 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. 253-269.*
  81. Xi L, Serebrovskaya TV (Eds). *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications.* Nova Science Publishers NY. 2009; 602 pp.
  82. Xi L, Serebrovskaya T (eds) (2012) *Intermittent hypoxia and human diseases.* Springer, London, 316 pp.
  83. 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):280-8.
  84. 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.
  85. Rafibekova Zh, Dzhumangulova AS, Usubaliev NN, Abramovich EM. Treatment of hypertension disease by hypobaric barochamber hypoxia and middle altitudes. In: IX Congress of Therapeutists, abstract vol. 3, Tashkent, pp. 29-31, 1987.
  86. Meerson F.Z., Tverdokhlib V.P., Soev V.M. (1989). [Adaptation to periodic hypoxia in therapy and prophylaxis]. Moscow: Nauka, 70 pp [Russian].
  87. Ushakov IB, Cherniakov IN, Shishov AA, Olenev NI. [Hypobaric variant of interval hypoxic training in aerospace medicine]. *Voen Med Zh.* 2003 Feb;324(2):54-7.
  88. Gao L, Chen L, Lu ZZ, Gao H, Wu L, Chen YX, Zhang CM, Jiang YK, Jing Q, Zhang YY, Yang HT. Activation of  $\alpha 1B$ -adrenoceptors contributes to intermittent hypobaric hypoxia-improved postischemic myocardial performance via inhibiting MMP-2 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014 Jun 1;306(11):H1569-81.
  89. Esteva S, Panisello P, Ramon Torrella J, Pages T, Viscor G. Enzyme activity and myoglobin concentration in rat myocardium and skeletal muscles after passive intermittent simulated altitude exposure. *J Sports Sci.* 2009 Apr;27(6):633-40.
  90. Li RC, Lee SK, Pouranfar F, Brittan KR, Clair HB, Row BW, Wang Y, Gozal D. Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain. *Brain Res.* 2006 Jun 22;1096(1):173-9.
  91. Mackenzie R, Watt P & Castle P. Acute hypoxia and exercise improve insulin sensitivity S12\* in individuals with type 2 diabetes. *Endocrine Abstracts* (2009) 19 P162.1
  92. Zhang JZ BA, Ismail-Beigi F. Regulation of glucose transport by hypoxia. *Am J Kidney Dis.* 1999 Jul;34(1):189-202.
  93. Prabhakar NR FR, Baker T, Fletcher EC. Intermittent hypoxia: cell to system. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Sep;281(3):L524-8.
  94. Nanduri J, Vaddi DR, Khan SA, Wang N, Makarenko V, Semenza GL, Prabhakar NR. HIF-1 $\alpha$  activation by intermittent hypoxia requires NADPH oxidase stimulation by xanthine oxidase. *PLoS One.* 2015 Mar

- 9;10(3):e0119762.
95. Brugniaux JV, Pialoux V, Foster GE, Duggan CT, Eliasziw M, Hanly PJ, Poulin MJ. Effects of intermittent hypoxia on erythropoietin, soluble erythropoietin receptor and ventilation in humans. *Eur Respir J*, 2011 Apr;37(4):880-7
  96. Dale EA, Mitchell GS. Spinal vascular endothelial growth factor (VEGF) and erythropoietin (EPO) induced phrenic motor facilitation after repetitive acute intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013 Feb 1;185(3):481-8.
  97. Zhong N, Zhang Y, Zhu HF, Zhou ZN.. Intermittent hypoxia exposure prevents mtDNA deletion and mitochondrial structure damage produced by ischemia/reperfusion injury. *Sheng Li Xue Bao*. 2000 Oct;52(5):375-80.
  98. Yeh CH, Hsu SP, Yang CC, Chien CT, Wang NP. Hypoxic preconditioning reinforces HIF-alpha-dependent HSP70 signaling to reduce ischemic renal failure-induced renal tubular apoptosis and autophagy. *Life Sci*. 2010 Jan 16;86(3-4):115-23.
  99. Xinghe Wang JD, David W Boyle, Jin Zhong and Wei-Hua Lee. Potential Role of IGF-I in Hypoxia Tolerance Using a Rat Hypoxic-Ischemic Model: Activation of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ . *Pediatric Research* (2004) 55, 385–394.
  100. Wang X, Deng J, Boyle DW, Zhong J, Lee WH. Potential role of IGF-I in hypoxia tolerance using a rat hypoxic-ischemic model: activation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Eur Respir J*. 2011 Apr;37(4):880-7.
  101. Steshenko MM, Gonchar OO, Mankovska MI. Mitochondrial oxidative violations during hypoxia and its correction by means of interval hypoxic-hyperoxic training. *Exper & Clin Physiol and Biochem*. 2010; (1): 12-17.
  102. Mankovska IM, Serebrovska TV. Mitochondria as a target of intermittent hypoxia: a review . *Fiziol.Zh*, 2014, 60 (6):75-86.
  103. Manukhina EB, Pshennikova MG, Malyshev IYu, Mallet RT, and Downey HF. Protective Effects of Adaptation to Hypoxia in Experimental Alzheimer's Disease. In: Lei Xi & Tatiana V. Serebrovska (Eds). *Intermittent Hypoxia and Human Diseases / Springer, UK, 2012, Chapter 13, p. 155-171.*
  104. Serebrovska TV, Nikolsky IS, Nikolska VV, Mallet RT, Ishchuk VA . Intermittent hypoxia mobilizes hematopoietic progenitors and augments cellular and humoral elements of innate immunity in adult men. *High Alt Med Biol*. 2011;12(3):243-52.
  105. Wang H, Yuan G, Prabhakar NR, Boswell M, Katz DM. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from PC12 cells in response to oxidative stress requires autocrine dopamine signaling. *J Neurochem*. 2006 Feb;96(3):694-705.
  106. Lukyanova L.D., Kirova Yu. I., and Germanova E.L. Energotropic Effects of Intermittent Hypoxia: Role of Succinate-Dependent Signaling. In: Lei Xi & Tatiana V. Serebrovska [Eds]. *Intermittent Hypoxia and Human Diseases. Springer, UK, 2012, Chapter 20, pp. 239-252.*
  107. Muscari C GE, Bonafe F, Govoni M, Pasini A, Guarnieri C. Priming adult stem cells by hypoxic pretreatments for applications in regenerative medicine. *J Biomed Sci*. 2013 Aug 29;20:63.
  108. Rozova K.V., Mankovska I.N. [2012]. Effect of intermittent hypoxic training on lung and heart tissues of healthy rats. *Pneumonologia i Alergologia Polska*. 80[4]: 296-300.
  109. Lane SW DAWD, and Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nature Biotechnology*, 2014, 32: 795–803.
  110. Rennert RC SM, Garg RK, Gurtner GC. Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine. *Regen Med*. 2012 Nov;7(6):833-50.
  111. Wee J, Climstein M. Hypoxic training: Clinical benefits on cardiometabolic risk factors. *J Sci Med Sport*. 2015 Jan;18(1):56-61.
  112. Serebrovska TV, Shatilo VB. Use of intermittent hypoxia for the prevention and treatment of cardiovascular diseases. Review. *Circulation and hemostasis*, 2014, # 1-2, 16-33 [in Ukrainian].
  113. Rachok LV, Dubovik TA, Bulgak AG, Ostrovsky YP, Kolyadko MG, Belskaya MI, Zhujko EN, Russkikh II. The effects of using normobaric intermittent hypoxia training as a method of preoperative preparation for coronary bypass surgery of the ischemic cardiomyopathic patients. *Cardiology in Belarus*. 2011; 17:28-45.
  114. Nudelman LM. Interrupted normobaric hypoxotherapy in preoperational preparation of the patients. In: Normobaric hypoxotherapy in oncology (Strelkov RB, ed.). *Bumazhnaya galereia Publishers, Moscow, Russia, 2003; pp. 61-69.*
  115. Pilyavskaya AN, Adiyatullin AI, Tkachouk EN. Interval hypoxic training in preparation to planned abdominal delivery. 2. Effect of the free radical-mediated oxidation parameters in blood plasma of pregnant women, in umbilical blood and in placenta. *Hypoxia Medical Journal*. 1997; 5:14-17.
  116. Korkushko O.V., Shatilo V.B., Ishchuk V.A. Efficacy of intermittent normobaric hypoxic trainings in elderly patients with essential hypertension. *Bulletin of Hygiene and Epidemiology*. 2007; 11(1):14–17. [In Ukrainian]
  117. Korkushko OV, Shatilo VB, Ishchuk VA, Tourta MI. USE OF intermittent normobaric hypoxia trainings in elderly people. In: Xi L, Serebrovska TV (Eds). *Intermittent hypoxia: from molecular mechanisms to clinical applications*. Nova Science Publishers, Inc, New York, 2009; Chapter 28, p. 537-548.
  118. 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.
  119. Lopata VA and Serebrovska TV. Hypoxicators: Review of the Operating Principles and Constructions. In: Lei Xi & Tatiana V. Serebrovska (Eds). *Intermittent Hypoxia and Human Diseases / Springer, UK, 2012, Chapter 24, 281-289.*

120. Tkachouk EN, Tsyganova TN, Staebler R. Apparatus for producing a hypoxic gaseous mixture using hollow fibers of poly-4-methylpentene-1. US Patent 5,383,448, A62B 7/10, 24 Jan 1995.
121. Nemerovski LI. Construction principles of apparatus for intermittent normobaric hypoxia. *Med Technika*. 1992;1:3–8 [In Russian].
122. 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.
123. Glazachev OS, Zvenigorodskaja 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; 7:51-56.
124. 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.
125. 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.
126. Arkhipenko YuA, Sazontova TG, Glazachev OS, Platonenko VI. Method of increasing the non-specific adaptive capacities of a person based on hypoxic-hyperoxic gas mixtures. The patent for the invention RU № 2289432, published 20.12.2006.
127. Kostin A.I., Glazachev O.S., Platonenko A.V., Spirina G.K. Device for carrying out complex interval normobarichypoxic-hyperoxic trainings of the person. Patent of the Russian Federation for the invention N2365384 from August, 27th, 2009 (the Application 2008104330).
128. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E et al (1996) The pH paradox in ischaemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* 76:99–114.
129. Sharma V, Cunniffe B, Verma AP, Cardinale M, Yellon D. Characterization of acute ischemia-related physiological responses associated with remote ischemic preconditioning: a randomized controlled, crossover human study. *Physiol Rep*. 2014 Nov 20;2(11).
130. Xia Z, Herijgers P, Nishida T, Ozaki S, Wouters P, Flameng W. Remote preconditioning lessens the deterioration of pulmonary function after repeated coronary artery occlusion and reperfusion in sheep. *Can J Anaesth*. 2003 May;50(5):481-8.
131. Kim JC, Shim JK, Lee S, Yoo YC, Yang SY, Kwak YL. Effect of combined remote ischemic preconditioning and postconditioning on pulmonary function in valvular heart surgery. *Chest*. 2012 Aug;142(2):467-75.
132. Levitzky M. The control of breathing. In: Levitzky MG, editor. *Pulmonary physiology*. 7th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2007, pp. 49–56.
133. Pokorski M. & Serebrovskaya T. . Intermittent Hypercapnia. In: *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications*/. Editors: Lei Xi & Tatiana V. Serebrovskaya/ Nova Science Publishers, 2009: 261-273.
134. Sharabi K., E. Lecuona, I.T. Helenius, G.J. Beitel, J.I. Sznajder, Y. Gruenbaum, Sensing, physiological effects and molecular response to elevated CO2 levels in eukaryotes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (2009) 4304–4318.
135. Eiam-ong S, Laski ME, Kurtzman NA, et al. Effect of respiratory acidosis and respiratory alkalosis on renal transport enzymes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1994; 267: F390–9.
136. Zippin JH, Farrell J, Huron D, et al. Bicarbonate-responsive “soluble” adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain. *J Cell Biol*. 2004; 164: 527–34.
137. Jankov,R.P.;Lewis,P.;Kantores,C.;Ivanovska,J.;Xu,E.Z., VanVliet,T.;Lee,A. H.; Tanswell A.K., McNamara,P.J. Peroxynitrite mediates right-ventricular dysfunction in nitric oxide-exposed juvenile rats. *Free Radic.Biol.Med*. 2010, 49:1453–1467.
138. Vadasz I, Dada LA, Briva A, et al. AMPactivated protein kinase regulates CO2- induced alveolar epithelial dysfunction in rats and human cells by promoting Na,KATPase endocytosis. *J Clin Invest*. 2008; 118: 752–62.
139. Fu P, Sheng B, Li G. Enhancement of hypoxia tolerance and survival rate of Daphnia in severe hypoxia based on acidic preconditioning. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2012 Dec;29(6):1160-7.
140. Dunlop K, Gosal K, Kantores C, Ivanovska J, Dhaliwal R, Desjardins JF, Connelly KA, Jain A, McNamara PJ, Jankov RP. Therapeutic hypercapnia prevents inhaled nitric oxide-induced right-ventricular systolic dysfunction in juvenile rats. *Free Radic Biol Med*. 2014 Apr;69:35-49.
141. Belik J.; Stevens,D.;Pan,J.;Shehnaz,D.;Ibrahim,C.;Kantores,C.;Ivanovska, J. Grasemann,H.;Jankov,R.P.Chronic hypercapnia downregulates arginase expression and activity and increases pulmonary arterial smooth muscle relaxation in the newborn rat. *Am. J.Physiol.LungCell. Mol.Physiol* 297:L777–784; 2009.
142. Sewing AC, Kantores C, Ivanovska J, Lee AH, Masood A, Jain A, McNamara PJ, Tanswell AK, Jankov RP. Therapeutic hypercapnia prevents bleomycin-induced pulmonary hypertension in neonatal rats by limiting macrophage-derived tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am. J.Physiol. Lung.Cell.Mol.Physiol*. 2012, 303:L75–87.
143. Wu X, Liu X, Zhu X, Tang C. Hypoxic preconditioning induces delayed cardioprotection through p38 MAPK-mediated calreticulin upregulation. *Shock*. 2007 May;27(5):572-7.
144. Zhang CH, Fan YY, Wang XF, Xiong JY, Tang YY, Gao JQ, Shen Z, Song XH, Zhang JY, Shen Y, Li Q, Zhang X, Chen Z. Acidic preconditioning protects against ischemia-induced brain injury. *Neurosci Lett*. 2012 Aug 8;523(1):3-8.
145. Ladilov Y. Preconditioning with hypercapnic acidosis: hope for the ischemic brain. *Neurosci Lett*. 2012 Aug

- 8;523(1):1-2.
146. Zhang P, Shi X, Downey HF. Two-week normobaric intermittent-hypoxic exposures stabilize cerebral perfusion during hypocapnia and hypercapnia. *Exp Biol Med* (Maywood). 2014 Dec 11 [Epub ahead of print].
147. Fan JL, Kayser B. The effect of adding CO<sub>2</sub> to hypoxic inspired gas on cerebral blood flow velocity and breathing during incremental exercise. *PLoS One*. 2013 Nov 21;8(11):e81130.
148. Snow JB, Kitzis V, Norton CE, Torres SN, Johnson KD, Kanagy NL, Walker BR, Resta TC. Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on pulmonary vasoreactivity. *J Appl Physiol*. 2008;104:110–118.

*Received 10.10.2014*



## ХРОНІКА



### Пам'яті О.О. Мойбенка

8 травня 2015 р. пішов з життя Олексій Олексійович Мойбенко – видатний український вчений-патолофізіолог, ім'я якого широко відоме за межами нашої країни, академік НАН України, доктор медичних наук, професор, завідувач відділу загальної та молекулярної патолофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, президент Наукового товариства патолофізіологів України, двічі лауреат Державних премій України в галузі науки і техніки, премій НАН України ім. О.О.Богомольця та М.Д. Стражеска.

Вже перші кроки наукової діяльності Олексія Олексійовича були пов'язані з вивченням патогенезу найбільш розповсюджених захворювань – патології серцево-судинної системи. У 1956 р., працюючи лікарем у відділі патолофізіології Інституту клінічної медицини ім. М.Д. Стражеска, О. Мойбенко самостійно проводив наукові дослідження з

проблем кровообігу малого кола та в 1964 р. захистив дисертацію на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук на тему «Гемодинамічні відносини між великим та малим колом кровообігу при гострій артеріальній гіпертензії». Подальший шлях Олексія Олексійовича, лікаря-науковця, нерозривно був пов'язаний із Інститутом фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, де він працював на посаді старшого наукового співробітника, а з 1974 р. – очолював відділ експериментальної кардіології, що згодом отримав нову назву – відділ загальної та молекулярної патолофізіології. У 1973 р. під керівництвом академіка М.М. Горєва Олексій Олексійович захистив докторську дисертацію на тему «Роль рецепторних зон серця в регуляції кровообігу». З 1992 р. він очолював Наукове товариство патолофізіологів України, був членом ради Міжнародного товариства патолофізіологів, членом Міжнародного товариства з вивчення серця.

О.О. Мойбенко зробив значний внесок у розвиток фізіології та патолофізіології серцево-судинної системи та імунopatології серця. Значних успіхів йому вдалося досягти при вивченні кардіогенних рефлексів, патогенезу гострого інфаркту міокарда, ішемічно-реперфузійного синдрому та у розробці нових методів фармакотерапії зазначених патологічних станів. Важливою рисою академіка Мойбенка була унікальна здатність поєднувати теоретичні надбання експериментальної патолофізіології із запитами клінічної медицини. Близкучим прикладом цього є створення ним нових методів моделювання гострої ішемії та реперфузії серця, розробка та впровадження в клінічну практику нових методів терапії гострого інфаркту міокарда. Зокрема, під керівництвом О.О.Мойбенка було створено перший в світі водорозчинний препарат кверцетину, що успішно пройшов клінічні випробування та знайшов широке застосування в кардіологічній практиці в Україні та закордоном. Ретельні дослідження дали змогу на молекулярно-генетичному

рівні пояснити механізми лікувальної дії та розширити спектр застосування біофлавоноїду кверцетину, що є активною речовиною препарату Корвітин. Окрім антиоксидантного ефекту та здатності пригнічувати ліпоксигеназу було доведено здатність препарату пригнічувати протеасомну активність, змінювати експресію білків теплового шоку та модулювати активність експресії багатьох генів. Значним теоретичним здобутком наукової праці академіка Мойбенка останніх років було створення оригінальної концепції ендогенних механізмів кардіопротекції та переважного ураження гальмівних ланок функціональних систем при розвитку різноманітних патологій. Ці погляди узагальнені у великій колективній монографії за редакцією О.О. Мойбенка «Эндогенные механизмы кардиопротекции». В цілому Олексій Олексійович є автором 7 монографій та близько 450 наукових публікацій у вітчизняних і закордонних виданнях. Велику увагу О.О. Мойбенко приділяв підготовці наукових кадрів – під його керівництвом захищено 6 докторських та 33 кандидатських дисертації. Особливістю Олексія Олексійовича як керівника великого наукового колективу був його справжній демократизм, простота, доступність, вміння

розпізнавати в молодому науковці найкращі здібності для розкриття його наукового ядра. З ним можна було дискутувати, обговорювати будь-яку тему. Як писав Л. Бланкі: «Можна поступитися силі, але, беззаперечно, підкоряються лише розуму». Саме у відділі академіка Мойбенка завжди панує атмосфера справжнього наукового пошуку, відданості науці, доброзичливості та взаєморозуміння.

Олексій Олексійович, безумовно, був лідером у галузі патологічної фізіології як основного напрямку медичної науки, що створює її міцний фундамент. Наукову діяльність О.О.Мойбенко успішно поєднував з науково-організаційною та суспільною роботою. Він керував Науковим товариством патофізіологів України (з 1992 р.), брав участь у роботі ВАК СРСР (1983 – 1988 рр.), ВАК України (1995 – 1997 рр.) та комітету з присудження державних премій України, був членом бюро відділення НАН України та членом деяких редакційних колегій медичних журналів, зокрема «Фізіологічного журналу».

Світла пам'ять про людину, яка чесно і гідно прожила своє життя, залишивши по собі плоди своїх добрих справ, завжди буде в наших серцях.

# ДОДАТКОВІ ТЕЗИ ДО 19-ГО З'ЇЗДУ УКРАЇНСЬКОГО ФІЗІОЛОГІЧНОГО ТОВАРИСТВА ІМ. П.Г. КОСТЮКА (24-26 ТРАВНЯ 2015 р.)

## МОЛЕКУЛЯРНА І КЛІТИННА ФІЗІОЛОГІЯ

### ВПЛИВ ГІПОКСІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ Kv4.2 В НЕЙРОНАХ ГІПОКАМПА ЩУРІВ

О.П.Бурлак<sup>1,2</sup>, М.П.Бурлак<sup>1,2</sup>, О.О.Лук'янець<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лабораторія біофізики іонних каналів, Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, <sup>2</sup>Міжнародний Центр молекулярної фізіології, НАН України, Київ, Україна, [burlak.oleksii@gmail.com](mailto:burlak.oleksii@gmail.com)

Потенціалзалежні  $K^+$  ( $K_v$ ) канали є ключовими учасниками регуляції збудливості нейронів, у формуванні потенціалу спокою мембрани, форми потенціалу дії, та впливу на синаптичну передачу. Серед великої родини  $K_v$ -каналів особливу роль відіграють калієві канали А-типу ( $K_A$ ).  $K_A$  складаються із чотирьох субодиниць, які формують гомомерний або гетерогенний канал.  $K_A$  відносяться до порогових каналів, що активуються при значеннях мембранного потенціалу, близького до порогового, при якому генерується потенціал дії (ПД). Загальною властивістю  $K_A$  є їх швидка динаміка роботи. Ці канали мають швидку активацію (мілісекунди) та повільну (близько 30 мс). На відміну від  $K_v1.2$  та  $K_v1.4$ , які розташовані в основному в аксонах і беруть участь у регуляції синаптичної передачі,  $K_v4.2$  розташовані в сомі та дендритах та відіграють роль у інтеграції дендритів. Активність  $K_v4.2$  суттєво регулюється різними чинниками, включаючи протеїнкінази А та С, а також регуляторними білками:  $K_v$ -каналвзаємодіючі протеїни ( $K_v$  Channel Interacting Proteins, KChIP) і дипептидил амінопептидазаподібний білок (dipeptidyl aminopeptidase – like protein, DPPX) тощо. Як правило, такі висорегульовані структури також можуть бути мішенню для багатьох факторів, що виникають при патологіях мозку, включаючи ішемію/гіпоксію. Метою нашої роботи було дослідження експресії генів  $K_v4.2$  при гіпоксичних умовах. Для визначення механізмів впливу гіпоксії на активність цих каналів ми досліджували рівень експресії цільових генів, які кодують їх під час гіпоксії. Для цього ми використали напівкількісний метод зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-нкПЛР). У результаті досліджень було показано зниження експресії генів каналу  $K_v 4.2$  (нормалізованих до експресії гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази – ГАФД) у культурі нейронів гіпокампа 8-добових щурів при гіпоксії. Ми встановили, що після впливу дитіоніту натрію (хімічна гіпоксія) протягом 1 та 2 год експресія генів цього каналу знижувалася на 5,86 та 25,98% відповідно. Це може свідчити про чутливість  $K_v4.2$  до гіпоксії, експресія та, відповідно, функція яких суттєво зменшується при гіпоксичних станах.

### MOLECULAR MECHANISMS OF SLOW AFTERHYPERPOLARIZATION IN HIPPOCAMPAL NEURONS

A. Dovgan<sup>1</sup>, V. Cherkas<sup>1</sup>, A. Bozhenko<sup>2</sup>, N. Kononenko<sup>1</sup>, P. Belan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>O.O. Bogomolets Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine; <sup>2</sup>Department of Biophysics and Molecular Physiology, MIPT, Russia. [rasboinik@mail.ru](mailto:rasboinik@mail.ru)

Hippocalcin (HPCA) is a neuronal  $Ca^{2+}$  sensor protein that mediates many cellular functions. In particular, it is thought that HPCA mediates expression of a slow afterhyperpolarization (sAHP) in response to an increase in a intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration in a neuronal dendritic arbor. In the current work, we studied molecular mechanisms of sAHP induction by HPCA in cultured hippocampal neurons. First, we pharmacologically and electrophysiologically characterized channels underlying sAHP in these neurons. We demonstrated that sAHP was mediated by potassium  $Ca^{2+}$ -dependent conductance, which was not significantly reduced by a specific KCNQ channel blocker, XE991, indicating that this class of potassium channels does not contribute to sAHP current (IsAHP). Interestingly, well-known sAHP inhibitors, UCL2077 or UCL1848 also did not affect IsAHP. At the same time, IsAHP was almost completely inhibited by activation of M1 cholinoreceptors. By means of loss of function and

overexpression strategies we demonstrated that amplitude of IsAHP is strongly correlated with a level of HPCA expression implying that HPCA does function as a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for the sAHP in the hippocampal neurons. Simultaneously recording IsAHP and HPCA-YFP translocation induced in the same neuron by activation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels we demonstrated overlapping of their time courses in certain sites of dendritic arbor. It suggested that HPCA insertion into the plasma membrane in these sites may induce IsAHP. All these findings demonstrate that sAHP is a complex phenomenon, in which HPCA integrates spatio-temporal changes of intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration into its widespread insertion into the dendritic plasma membrane.

## SITE SPECIFICITY OF HIPPOCALCIN SIGNALING IN DENDRITES OF HIPPOCAMPAL NEURONS

**V. P. Cherkas<sup>1</sup>, A. V. Dovgan<sup>1</sup>, N. I. Kononenko<sup>1</sup>, D. Y. Morderer<sup>3</sup>, L. P. Haynes<sup>2</sup>, R. D., Burgoyne<sup>2</sup>, P. V. Belan<sup>1</sup>;**

<sup>1</sup>*O.O. Bogomolets Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine;* <sup>2</sup>*Physiol., University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom;* <sup>3</sup>*Institute of Molecular Biology and Genetics, Kyiv, Ukraine, cherkas@biph.kiev.ua*

Hippocalcin, a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein, which is a key mediator of many cellular functions, may decode neuronal activity into hippocalcin translocation from a cytosol to plasma membrane in dendrites of hippocampal neurons. For better understanding of hippocalcin signalling properties we have examined the biophysical mechanisms that lead to hippocalcin translocation in dendrites. Lux-FRET approach was used to measure spatio-temporal pattern of hippocalcin insertion to the plasma membrane during translocation. We found some specific sites on the dendritic plasma membrane, sized from diffractionally limited to several microns, where the local hippocalcin insertion to the plasma membrane was higher than in neighbouring sites. We checked whether translocation at these specific sites are associated with regions of higher intracellular free calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Creating spatially uniform  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients in dendritic segments, we showed that hippocalcin translocation was significantly different in neighbouring sites having the same (in terms of kinetics and amplitude) patterns of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  changes. Producing long-lasting elevations of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by activation of different  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizing mechanisms, we also demonstrated that hippocalcin translocation was observed in the same set of sites independently of  $\text{Ca}^{2+}$  sources. These results indicate that  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  is not the only determinant of hippocalcin translocation and that local differences in the plasma membrane affinity for hippocalcin are an important biophysical mechanism of hippocalcin signaling. Furthermore we have also developed original approaches for quantitative separate and simultaneous measurement of hippocalcin concentration in cytosolic and membrane cellular fractions of single living hippocampal neurons. Based on these approaches and simulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and hippocalcin diffusion in the dendrites and spines of hippocampal neurons we have shown that the hippocalcin concentration in dendritic membranes can be many times locally increased during intrinsic patterns of neuronal activity. We conclude that hippocalcin may serve as a site specific messenger with a high dynamic range allowing precise modulation of its targets.

## INFLUENCE OF THE LIPID COMPOSITION OF THE PLASMA MEMBRANE ON HIPPOCALCIN PROTEIN SIGNALING.

**E. Grushevsky<sup>1,2</sup>, A. Dovgan<sup>1</sup>, N. Kononenko<sup>1</sup>, P. Belan<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine;*

<sup>2</sup>*Department of Biophysics and Molecular Physiology, MIPT, RF., fuse92@rambler.ru*

Hippocalcin is a neuronal calcium sensor protein, which is a key mediator of many cellular functions including NMDARs-dependent long-term depression and slow afterhyperpolarization. Hippocalcin signals in the hippocampal neurons by means of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent translocation from the cytosol to the plasma membrane that can be induced by depolarization-induced activation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. It was suggested that the lipid composition of the plasma membrane influences  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent hippocalcin translocation being in this way extremely important for intracellular signaling. Here we studied whether hippocalcin translocation depends upon  $\text{PIP}_2$  concentrations in the plasma membrane. In order to measure  $\text{PIP}_2$  concentration in the plasma membrane we co-expressed in the cells cytosolic Cyan Fluorescent



Protein (CFP) and Pleckstrin Homology Domain of Phospholipase C (PLC) tagged by Yellow Fluorescent Protein (PHD-YFP). The latter has high affinity to  $PIP_2$  and translocates from the plasma membrane to the cytosol upon a decrease in  $PIP_2$  concentration in the membrane. Contrasting PHD-YFP fluorescence against CFP one allowed us to develop a quantitative approach to measure relative  $PIP_2$  concentration in the plasma membrane. Inducing  $PIP_2$  hydrolysis by PLC activation we observed a transient decrease of  $PIP_2$  concentration in the plasma membrane. Depolarization-induced hippocalcin translocation to the plasma membrane was significantly decreased upon PLC activation indicating that  $PIP_2$  is important for hippocalcin translocation. Since PLC activation regulates many signaling pathways influencing hippocalcin translocation we developed another approach to efficiently manipulate  $PIP_2$  concentration in the plasma membrane. For that voltage-sensitive phosphatase (Dr-VSP), converting  $PIP_2$  into PIP, was co-expressed with PHD-YFP and CFP. We demonstrated a fast transient decrease of  $PIP_2$  concentration in the plasma membrane when Dr-VSP was activated by means of depolarization. Now we study hippocalcin translocation in PC12 cells and hippocampal neurons managing  $PIP_2$  concentration using Dr-VSP in order to reveal a relationship between plasma membrane lipid composition and signaling properties of hippocalcin.

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ НІФЕДИПІНУ НА КАЛЬЦІЄВУ СИГНАЛІЗАЦІЮ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПУ ЩУРА ПРИ ГІПОКСИЧНИХ ВПЛИВАХ**

**К.В.Гуржій<sup>1</sup>, О.О.Лук'янець<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup>Лабораторія біофізики іонних каналів, Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, <sup>2</sup>Міжнародний Центр молекулярної фізіології, НАН України, Київ, Україна*

Головний мозок людини або тварини виявляє високу чутливість до дефіциту кисню. Важка гіпоксія може стати причиною коми і навіть летального результату, причому смерть може настати дуже швидко, протягом декількох хвилин. Може спостерігатися декілька форм гіпоксії – миттева, гостра або хронічна. Форма гіпоксії залежить від чинників, миттева розвивається протягом декількох секунд або хвилин, гостра – в результаті отруєнь, інфарктів, важкої крововтрати - в цьому разі кров втрачає здатність постачати кисень до тканин. Хронічна гіпоксія спостерігається при серцевій недостатності, кардіосклерозі, пороках серця. Найбільш чутливим органом до нестачі кисню є головний мозок. Метою наших досліджень було моделювання гострої гіпоксії на культивованих нейронах гіпокампа щура та вивчення впливу дигідропіридину ніфедипіну на кальційзалежні прояви, що спостерігаються у нейронах в умовах гіпоксії. Ніфедипін є селективним блокатором кальцієвих каналів L-типу (Cav1). Відомо декілька підтипів цих каналів, серед них у нейронах експресуються головним чином L-канали підтипу Cav1.3. Робота була проведена на 12-добовій первинній культурі нейронів гіпокампа, ізольованих з новонароджених щурів. В експериментах використовували метод мікрофлуоресцентної мікроскопії та флуоресцентного барвника Fura-2M для визначення вмісту внутрішньоклітинного кальцію. Для створення гіпоксичних умов використовували 2 ммоль/л гіпосульфату натрію, який знаходився у розчині, що омивав клітини. Нами було встановлено, що гостра гіпоксія індукувала зростання внутрішньоклітинної концентрації кальцію у нейронах гіпокампа. При використанні блокатора кальцієвих каналів L-типу ніфедипіну у концентрації 10 мкмоль/л спостерігалось значне зменшення гіпоксичного ефекту на 58%. Отримані результати вказують на суттєву роль кальцієвих каналів L-типу в механізмах дії гіпоксії на нейрони гіпокампа та суттєву протективну роль антагоністів кальцієвих каналів класу дигідропіридинів при гіпоксичних умовах.

## **ЗМІНИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЩУРА ЗА ДІЇ РІАНОДИНУ**

**Н.І. Купиняк<sup>1</sup>, О.В. Іккерт<sup>2</sup>, С.Г. Шликов<sup>3</sup>, Л.Г. Бабіч<sup>3</sup>, В.В. Манько<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Львів; <sup>2</sup>Львівський національний університет ім. Івана Франка, Львів; <sup>3</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ; [nadiya.kurpnyak@gmail.com](mailto:nadiya.kurpnyak@gmail.com)*

Мітохондріальні ріанодинчутливі  $Ca^{2+}$ -канали (RuRs) кардіоміоцитів з високою провідністю і відносно низькою селективністю за умов активації деполяризують мітохондріальну мембрану,



що, відтак, змінює процеси клітинного дихання (Beutner, 2005). Згідно з попередніми дослідженнями ріанодин змінює споживання кисню ізольованими мітохондріями печінки (Купиняк та ін. 2013), хоча даних про наявність RyRs у їхній мембрані немає. З огляду на це дослідження впливу ріанодину на мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів є важливим для ідентифікації мітохондріальних ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів та їхньої ролі у енергетичному стані цих клітин. Дослідження проводили на білих щурах-самцях (200–230 г,  $n = 4$ ). Тварин анестезували інгаляційним 10 %-м ефірним наркозом. Мітохондрії печінки отримували методом диференціального центрифугування (Jonson, Lardy, 1967). Для активації ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів до пробірки з суспензією ізольованих мітохондрій додавали ріанодин (0,05, 0,1 або 1 мкмоль/л). Суспензію мітохондрій інкубували з ріанодином 5 хв при 20°C. Експерименти з визначення мембранного потенціалу проводили на проточному цитометрі COULTER EPICS XL™ («Beckman Coulter», США) з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM (tetramethylrhodaminemethyl ester, 100 нмоль/л;  $\lambda_{\text{збуд.}}$  = 488 нм,  $\lambda_{\text{фл.}}$  = 590 нм). Інтенсивність флуоресценції реєстрували на 5-ту хвилину інкубації з зондом. Для оцінки інтактності мітохондрій використовувався протоніофор СССР (10 мкмоль/л). Як субстрати окиснення використовували піруват,  $\alpha$ -кетоглутарат або сукцинат (по 5 ммоль/л кожного). Показано, що інкубація мітохондрій з СССР після навантаження їх флуоресцентним зондом TMRM, призвела до швидкої деполаризації мітохондріальної мембрани. Мембранний потенціал ізольованих мітохондрій гепатоцитів виявився дещо вищим за використання сукцинату (як екзогенного субстрату окиснення), ніж пірувату чи  $\alpha$ -кетоглутарату. За окиснення пірувату під впливом ріанодину у концентрації 0,05 мкмоль/л мембранний потенціал мітохондрій печінки щурів зменшився на 38,45±1,37 %. За дії ріанодину у вищій концентрації (0,1 мкмоль/л) він зменшився на 51,7±1,72 %, а у концентрації 1 мкмоль/л – на 42,8±1,10 %. На відміну від цього, за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату вплив ріанодину у концентрації 0,05 мкмоль/л призвів до зростання мембранного потенціалу мітохондрій на 16,8±0,80 %. Проте за цих умов ріанодин у концентраціях 0,1 та 1 мкмоль/л спричиняв зниження мембранного потенціалу на 42,5±1,07 та 31,0±1,49 %. І, нарешті, за окиснення сукцинату ріанодин не змінював мембранний потенціал мітохондрій печінки щурів. Отже, ефект ріанодину в активуючій RyRs концентрації на мембранний потенціал ізольованих мітохондрій залежить від субстрату окиснення, дози та тривалості інкубації. Такі зміни мембранного потенціалу за дії ріанодину свідчать про наявність RyRs у їхній мембрані.

## ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ TRPV1 КАНАЛІВ В ХРОМАФІННИХ КЛІТИНАХ ЩУРА

О.В.Лукаш<sup>1</sup>, О.П.Бурлак<sup>1,2</sup>, О.О.Лук'янець<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лабораторія біофізики іонних каналів, Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, <sup>2</sup>Міжнародний Центр молекулярної фізіології, НАН України, Київ, Україна

Відомо, що капсаїцин, гострий інгредієнт перцю чилі, активує підтип TRP каналів - ванілоїдний рецептор 1 (TRPV1), який є катіоннеселективним каналом з високою кальцієвою проникністю. Хоча TRPV1-рецептори високо експресуються в сенсорних нейронах, вони також представлені в нейрональних клітинах в мозку і периферичних нейронах. Також була показана його експресія в клітинах PC12, феохромоцитомі щура. В наших експериментах ми досліджували, чи експресується TRPV1 в хромафінних клітинах щура. Робота була проведена на 2-4-добовій первинній культурі хромафінних клітин, ізольованих з мозкової речовини надниркової залози щурів віком 5-6 міс. В експериментах використовували метод мікрофлуоресцентної мікроскопії та флуоресцентного барвника Fura-2M для визначення вмісту внутрішньоклітинного кальцію. Для визначення експресії TRPV1-каналів у хромафінних клітинах ми досліджували рівень експресії цільових генів, кодуючих ці канали. Для цього ми використали напівкількісний метод зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (3T-нкПЛР). В результаті досліджень було показана експресія генів каналу TRPV1 (нормалізована до експресії гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази ГАФД) у хромафінних клітинах щура. Дослідження активності TRPV1-каналів вимірюванням кальцієвих транз'єнтів мікрофлуоресцентним методом показали, що при низьких концентраціях капсаїцину (2-8 мкмоль/л) не всі хромафінні клітини генерували кальцієві транз'єнти. При підвищенні концентрації агоніста (20 мкмоль/л) кальцієві транз'єнти були більш вираженими, але генерувалися не у всіх тестованих клітин. Таким чином, отримані результати демонструють, що TRPV1-канали

експресуються у хромафінних клітинах, хоча рівень їх експресії значно нижчий, ніж в сенсорних нейронах. Крім того, ми встановили, що в хромафінних клітинах концентраційна залежність капсаїцину суттєво відрізняється від такої у сенсорних нейронів і для активації TRPV1-каналів у хромафінних клітин необхідні значно вищі концентрації цього агоніста.

## NEW METHODS OF DETECTION OF INTRACELLULAR CONCENTRATIONS OF FLUORESCENTLY-LABELED TARGETS IN LIVING CELLS.

M. Yedutenko<sup>1,2</sup>, E. Grushevsky<sup>1,2</sup>, V. Cherkas<sup>1</sup>, A. Dovgan<sup>1</sup>, N. Kononenko<sup>1</sup>, T. Tsugorka<sup>1</sup>, P. Belan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine; <sup>2</sup>Department of Biophysics and Molecular Physiology, MIPT, Russia. yedutenko@gmail.com

Fluorescent microscopy is commonly used for the qualitative analysis of protein distribution in fixed and living cells and organisms. Over the last two decades, real time imaging techniques used to study a role of various molecules in living cells have become well established and commonly used in a laboratory practice. The groundbreaking event in the protein distribution studies was the discovery and farther refinement and application of green fluorescent protein (GFP). Genetically encoded fluorescent reporter-tagged proteins have been developed as the tracing tool for localization of the expressed proteins within a cell. The proteins tagged with GFP can be not only traced to determine their location within the cell in real time, but its mobility and concentration can also be determined. Here we propose simple and universal method for quantitative analysis of intracellular concentration of fluorescently tagged molecules. The method exploits the simple fact that the fluorescence detected from preparation depends on a) concentration and optical properties of the fluorescent molecules and b) spectral properties of the optical equipment used to record fluorescent signals. We introduce, so called, *equipment factor*, that embodies optical function of the imaging system, describe how to calculate or measure it, and how to use it for protein concentration measurements in single living cells.

## МОДУЛЮВАЛЬНА ДІЯ НИЗЬКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ КАПСАЇЦИНУ НА TRPV1-КАНАЛИ СЕНСОРНИХ НЕЙРОНІВ ЩУРІВ

О.А.Петрушенко<sup>1</sup>, О.О.Лук'янець<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лабораторія біофізики іонних каналів, Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, <sup>2</sup>Міжнародний Центр молекулярної фізіології, НАН України, Київ, Україна, petrushenko@biph.kiev.ua

TRPV-канали є полімодальними детекторами сигналів, які реагують на широкий діапазон фізичних і хімічних подразників. Відомо, що місце зв'язування для капсаїцину цих каналів утворює специфічну «кишеню» в цитозольній частині рецептора і забезпечує їх взаємодію з ванілоїдами, які мають гідрофобні властивості. Механізм цього процесу дотепер повністю не з'ясовано. Відомо, що внаслідок повторних аплікацій однакових концентрацій капсаїцину виникає тахіфілаксія TRPV1-рецептора, яка проявляється у зниженні максимальної амплітуди відповіді без повної її інактивації. Вивчення цього процесу може бути корисним з точки зору розуміння процесу взаємодії рецептора з ванілоїдами. Ми дослідили феномен тахіфілаксії на нейронах дорсального корінцевого ганглія (ДКГ) щурів в умовах аплікації низьких концентрацій капсаїцину. Робота була проведена на 1-2-добовій первинній культурі нейронів, ізольованих з ДКГ щурів віком 8-10 діб. В експериментах використовували метод мікрофлуоресцентної мікроскопії та флуоресцентного барвника Fura-2М для визначення вмісту внутрішньоклітинного кальцію. Досліджувались нейрони малого діаметра (22-35 мкм). В експериментах капсаїцин у концентрації 100 нмоль/л періодично аплікували на мембрану нейронів з тривалістю однієї аплікації 5-10 с. Такі повторні аплікації проводили протягом 30-50 хв. Нами було встановлено, що у 54% капсаїцинчутливих нейронів відбувалось поступове, впродовж 10 хв збільшення відповіді, що виявлялось у підвищенні амплітуди і тривалості кальцієвих транзєнтів, зумовлених активацією TRPV1-рецепторів. У 23% нейронів відбувалось спочатку швидке, впродовж 1-5 хв, зростання амплітуди кальцієвих транзєнтів, за

яким слідувало тривале наростання відповіді впродовж 20-40 хв без десенсibiliзації рецептора. Після досягнення максимальної відповіді, тільки половина з капсаїцинчутливих нейронів виявляла здатність до десенсibiliзації, яка проявлялась у вигляді тафілаксії, за якої амплітуда кальцієвих транзєнтів становила 43% від максимального рівня. Майже 46% досліджуваних нейронів при послїдовній аплїкації 100 нмоль/л капсаїцину не виявляли десенсibiliзації. Таким чином, нами було встановлено, що аплїкація низьких концентрацій капсаїцину може спричиняти модульовальну дію на властивості TRPV1-каналів.

## HIPPOCALCIN TRANSLOCATION IN DENDRITES AND DENDRITIC SPINES OF RAT HIPPOCAMPAL NEURONS

Y.Y. Sheremet<sup>1</sup>, V. P. Cherkas<sup>1</sup>, A. V. Dovgan<sup>1</sup>, N. I. Kononenko<sup>1</sup>, T.M. Tsugorka<sup>1</sup>, \*P. V. Belan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of General Physiology of the Nervous System, O.O.Bogomolets Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine

Hippocalcin, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein which is a key mediator of many cellular functions, may decode neuronal activity into hippocalcin translocation in dendrites of hippocampal neurons. Lux-FRET approach was used to measure spatio-temporal pattern of hippocalcin insertion to the plasma membrane during translocation. We found some specific sites on the dendritic plasma membrane, where the local hippocalcin insertion to the plasma membrane was higher than in neighbouring sites. We checked whether translocation at these specific sites are associated with regions of higher intracellular free calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Creating spatially uniform [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients in dendritic segments, we showed that hippocalcin translocation was significantly different in neighbouring sites having the same (in terms of kinetics and amplitude) patterns of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes. Producing long-lasting elevations of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> by activation of different Ca<sup>2+</sup> mobilizing mechanisms, we also demonstrated that hippocalcin translocation was observed in the same set of sites independently of Ca<sup>2+</sup> sources. These results indicate that [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is not the only determinant of hippocalcin translocation and that local differences in the plasma membrane affinity for hippocalcin are an important biophysical mechanism of hippocalcin signaling. Furthermore we have also developed original approaches for quantitative separate and simultaneous measurement of hippocalcin concentration in cytosolic and membrane cellular fractions of single living hippocampal neurons. Based on these approaches and simulation of Ca<sup>2+</sup> and hippocalcin diffusion in the dendrites and spines of hippocampal neurons we have shown that hippocalcin concentration in dendritic membranes can be many times locally increased during intrinsic patterns of neuronal activity. Using FRAP-studies, we have obtained diffusion coefficients of hippocalcin in the cytosol and in the plasma membrane of dendrites, the kinetic constant of hippocalcin insertion into the plasma membrane and other parameters. These data allowed us to construct a quantitative biophysical model of hippocalcin cellular signaling in hippocampal neurons, which will be simulated for further applications. We conclude that hippocalcin may serve as a site specific messenger with a high dynamic range allowing precise modulation of its targets.

## ФІЗІОЛОГІЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

### ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ОРГАНІВ ТРАВЛЕННЯ У СОБАК ПРИ ЗАСТОСУВАННІ КОМПЛЕКСУ «ПАРКЕС-Л»

О. М. Бобрицька, К. Д. Югай

*Харківська державна зооветеринарна академія, olga.bobritskaya2410@gmail.com*

Останнім часом у ветеринарній медицині використовуються нетрадиційні методи діагностики і лікування різних порушень в організмі. Безперечним фактом є те, що будь-який орган або система органів виділяє енергію у формі електромагнітних випромінювань, що відрізняються своїми характеристиками: довжиною хвилі, значенням, інтенсивністю і частотою коливань. Частотно-резонансна терапія полягає в корекції функцій організму електромагнітними випромінюваннями певних параметрів, з якими структури організму входять у резонанс. При цьому корекція здійснюється на усіх рівнях організму (клітинному, органному, системному). Серед захворювань шлунково-кишкового тракту у собак провідне місце займають гастроентерити. Метою нашої роботи було вивчення ефективності використання лікувального комплексу "ПАРКЕС-Л" при комплексній терапії гастроентеритів у собак. Дослідження проводили на 16 собаках у чотирьох ветеринарних клініках міста Харкова. У тварин були виключені інфекційні і інвазійні хвороби. Для здійснення досліду були сформовані за принципом аналогів дві групи хворих тварин: по 8 у кожній групі. У дослідних тварин був встановлений діагноз гастроентерит за результатами анамнезу, клінічного, гематологічного, біохімічного дослідження крові, а також мікроскопії калу. Собак першої групи лікували за класичною схемою. Собакам другої групи, крім цього, додавали щоденно лікувальний комплекс «ПАРКЕС-Л» через біологічно активні точки. Аналіз результатів проведених досліджень дає змогу зробити такі висновки. Призначені схеми лікування собак, хворих на гастроентерит, є досить ефективними, що забезпечують у наших дослідах 100% відновлення функції травної системи дослідних собак обох груп. Вже з п'ятої доби лікування відзначається помітне поліпшення загального стану у собак обох груп, з відновленням клінічних і гематологічних показників і порушених обмінних процесів. Комплексна корекція функціонального стану собак, хворих на гастроентерит, з використання лікувального комплексу «ПАРКЕС-Л» дає змогу підвищити ефективність лікувальних процедур і прискорює відновлення порушених функцій.

### ПОКАЗНИКИ ІМУНОГРАМ СОБАК ЗАЛЕЖНО ВІД СЕЗОНУ РОКУ

М. М. Брошков, Б. В. Смолянінов, В. А. Найда

*Одеський державний аграрний університет, dolinavet@gmail.com*

Імунофізіологічний стан організму тварин в більшості випадків визначається здатністю імунної системи адекватно відповідати на систематичні дії антигену. На адекватність імунної відповіді впливає вік, стать, умови утримання, сезони року та ціла низка інших факторів які змінюють активність імунокомпетентних клітин. Ми провели дослідження імунофізіологічного стану організму 60 собак і оцінили особливості показників імунограм залежно від сезону року (весна, зима, літо та осінь). У тварин вранці відбирали периферичну кров і після її стабілізації визначали абсолютну кількість лейкоцитів, лімфоцитів та їх субпопуляцій та фагоцитарну активність нейтрофілів. Отримані результати свідчать, що у собак у весняний період відмічається найвища абсолютна кількість лейкоцитів ( $11,63 \cdot 10^6 \pm 6,79$ ) щодо  $10,81 \cdot 10^6 \pm 5,07$  у літній,  $6,81 \cdot 10^6 \pm 2,25$  у осінній та  $8,61 \cdot 10^6 \pm 3,49$  у зимовий. Поряд з цим у літній період встановлена найвища фагоцитарна активність нейтрофілів, що може бути пов'язано з активацією патогенної бактеріальної мікрофлори в теплий період року, а найнижчою вона була у осінній період. При оцінці абсолютної кількості Т-лімфоцитів з хелперною активністю відмічено, що ця субпопуляція імунокомпетентних клітин суттєво знижувалася лише в осінній період. Водночас абсолютне число субпопуляції Т-лімфоцитів з супресорною активністю змінювалось аналогічно з абсолютною кількістю лейкоцитів, тобто найвищі значення відмічені на весні з поступовим зниження до осені і початком збільшення зимою. Така особливість динаміки Т-супресорів може вказувати на те, що ці клітини мають більш виражену імунорегуляторну дію. Відмічається також різке збільшення абсолютної кількості В-лімфоцитів весною, при тому, що



в інші сезону їх абсолютна кількість суттєво не змінювалась. Абсолютна кількість натуральних кілерів зростає у осінній період і майже вдвічі знижується весною. Отже, оцінка показників імунотропних у собак в різні сезони року, показала наявність особливостей і певних закономірностей у абсолютній кількості імунотропних клітин.

## **ВПЛИВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА ФОРМУВАННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОЇ РЕАКТИВНОСТІ ОРГАНІЗМУ БУГАЙЦІВ ЗА УМОВ ТЕХНОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ**

**В. О. Величко**

*ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, Львів holka13@gmail.com*

Інтенсивне техногенне навантаження на агро-екосистеми зумовлює негативний вплив на фізіологічний, клінічний, продуктивний стан тварин, та проявляє негативну дію як стрес на імунну систему організму. Проведені дослідження підтверджують, що техногенні навантаження на організм тварин загострюють проблему регулювання розладів імунної системи. У розробці заходів підвищення захисних сил організму бугайців при техногенному стресі нами у зоні інтенсивного навантаження викидами Миколаївського гірничо-цементного комбінату (Львівська область) на сільськогосподарські угіддя, був проведений науково-виробничий дослід. Бугайцям чорно-рябї породи, 4-5-місячного віку, середньою масою 123 кг згодували кормову добавку з вмістом вітамінів А, Д, а також йоду, кобальту, міді і марганцю у відповідних співвідношеннях. Отримані показники порівнювали з аналогічними, одержаними від тварин, яких утримували на стандартному раціоні. За результатами балансового дослідження встановлено, що згодовування комплексної кормової добавки тваринам, за умов дії інтенсивного техногенного навантаження, сприяло не тільки кращому поїданню кормів раціону, а й підвищенню перетравності і засвоюваності органічної речовини кормів раціону на 5,14 %, сирого жиру на 2,5 %. Результати біохімічних досліджень вказували, що згодовування кормової добавки бугайцям сприяло адаптації організму тварин, підвищенню їх резистентності за умов техногенного навантаження завдяки корекції антиоксидантного статусу. Використання комплексної кормової добавки позитивно позначилося і на продуктивності тварин. Результати контрольного забою у 18 міс показали, що передзабійна маса тіла бугайців, які одержували кормову добавку з вітамінами та мікроелементами становила  $499 \pm 11,56$  кг, тоді як у тварин, яких утримували на стандартному раціоні —  $426,67 \pm 14,55$  кг. Отже, стимулювання захисних сил організму тварин мікроелементами в умовах техногенного навантаження є складовою здоров'я сільськогосподарських тварин та їх продуктивності. Це дає можливість впливати і на формування продуктивних і адаптивних властивостей тварин, що в комплексі впливає на якість і безпечність продукції споживання.

## **ФІЗІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ І ПРОДУКТИВНІСТЬ МОЛОДНЯКА СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН ПРИ ЗАСТОСУВАННІ НАНОПРЕПАРАТІВ**

**В. В. Данчук<sup>1</sup>, В. Г. Каплуненко<sup>2</sup>, О. В. Данчук<sup>1</sup>, Т. І. Приступа<sup>1</sup>, Т. С. Токарчук<sup>1</sup>, М. Р. Ключук<sup>1</sup>, В. П. Юрковський<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Подільський державний аграрно-технічний університет, Кам'янець-Подільський,

<sup>2</sup>УкрНДІ нанобіотехнологій і ресурсозбереження, Київ, dan-vv1@ukr.net

Використання нанопрепаратів у тваринництві ставить перед дослідниками цілу низку питань, що потребують негайного вирішення. По-перше – яка їх фізіологічна доза. І по-друге – як їх застосовувати. Теоретично, нанопрепарати мікроелементів повинні проявляти свою дію через механізми, характерні для мікроелемента із якого виготовлено препарат. Отже, чому дози нижчі у 50-100 разів проявляють свою фізіологічну активність. Очевидно, мова йде про доступність самого мікроелемента у синтетичних процесах та інтенсивність синтезу ферментів та біологічно активних сполук. Слід зауважити, що на фізіологічну дію нанопрепаратів на основі цитратів, за нашими дослідженнями, впливає не так сильно доза, як кратність введення і шлях надходження в організм. Введення нанопрепаратів до раціону кролів у період інтенсивного росту протягом тривалого часу мало короткотривалий стимулювальний ефект, після чого він зникав. Проявлялося навіть



деяке зниження інтенсивності росту порівняно з контролем. Подібні результати ми отримували і на відлучених поросятах. Проте парентеральне введення наносполук із інтервалом 7-10 днів показало переконливий продуктивний ефект. Очевидно, ми зіткнулись із циклічною фізіологічною потребою організму у мікроелементах із високим рівнем доступності (забезпечення синтезу ферментів і інших біологічно активних молекул). Адже кожна молекула ферменту має свій період піврозпаду і цих 7-10 днів якраз і є саме тим терміном, щоб поповнити запаси фізіологічно активних та депонованих молекул. Але це тільки наша гіпотеза. Однак результати досліджень свідчать, що використання парентерального введення кроликам нанопрепаратів сприяє підвищенню їх середньодобового приросту на 10-15 %. У поросят спостерігається така сама тенденція, зростає стресостійкість, рухова активність, інтенсивність поїдання корму, збільшується кількість еритроцитів у крові та вміст холестерину ліпопротеїдів низької щільності. Таким чином, перспективним напрямком досліджень є визначення ефективності використання нанопрепаратів мікроелементів для підвищення продуктивності і резистентності сільськогосподарських тварин і птиці.

## **ВПЛИВ ТЕХНОЛОГІЧНОГО СТРЕСУ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ОРГАНІЗМІ ПОРОСЯТ РІЗНИХ ТИПІВ ВНД**

**О.В. Данчук**

*Подільський державний аграрно-технічний університет, м. Кам'янець-Подільський, olexdan@ukr.net*

При використанні сучасних технологій у свинарстві основними причинами зниження продуктивності і резистентності тварин є технологічний стрес, при якому на перший план виступають вроджені та набуті механізми адаптації. Адаптаційні можливості організму, очевидно, пов'язані із типом вищої нервової діяльності (ВНД), що слід враховувати при селекції та формуванні груп тварин. Стрес, як механізм адаптації характеризується активізацією пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Метою нашого дослідження було встановити інтенсивність ПОЛ в еритроцитах поросят різних типів ВНД за дії технологічного стресу. Проведені дослідження показали, що під час відносного спокою (до відлучення) вміст продуктів ПОЛ у еритроцитах свиней сильних типів ВНД вірогідно не відрізняється. Тоді як у клітинах крові свиней слабого типу ВНД встановлено вищий вміст продуктів ПОЛ. Так, вміст ТБК-активних продуктів, дієнових кон'югантів та кетодієнів у гемолізатах еритроцитів на 60-ту добу життя (до відлучення) зростав відповідно на 20,1, 43 та 30,8 % порівняно із тваринами СВР типу ВНД. Відлучення поросят від свиноматок супроводжувалось напруженням адаптаційних механізмів, що призводить до розвитку оксидативного стресу. Зокрема, після відлучення (61-ша доба) підвищується вміст проміжних продуктів ПОЛ у еритроцитах. Вміст ТБК-активних продуктів у клітинах еритроїдного ряду свиней різних типів ВНД зростав приблизно у 1,8 - 2 рази. Таким чином, інтенсифікація ПОЛ при адаптації є загальнобіологічною особливістю та не залежить від типу ВНД. Слід відмітити, що у тварин сильних типів ВНД вміст ТБК-активних продуктів у еритроцитах після відлучення був значно нижчим відповідно до такого у тварин слабого типу ВНД. Надалі до 65-ї доби життя концентрація продуктів ПОЛ у гемолізатах еритроцитів тварин сильних типів ВНД знижується у 1,2-1,6 рази, а у тварин слабого типу ВНД вміст ТБК-активних речовин вірогідно не змінюється. Таким чином, у тварин слабого типу ВНД встановлено найменшу адаптаційну здатність і стресостійкість, на що вказує високі концентрації продуктів ПОЛ у еритроцитах протягом усього періоду досліджень. Перспективи подальших досліджень полягають у розробці нових методів профілактики та корекції стресових станів сільськогосподарських тварин із урахуванням типів ВНД.

## **ІНТЕНСИВНІСТЬ ГЕМОПОЕЗУ У ОРГАНІЗМІ ПОРОСЯТ ПІД ВПЛИВОМ НАНОПРЕПАРАТУ Fe**

**В. В. Данчук, Т. І. Приступа, М. С. Ключук**

*Подільський державний аграрно-технічний університет, Кам'янець-Подільський, dan-vv1@ukr.net*

Зниження кількості еритроцитів у кровоносному руслі поросят після народження – процес фізіологічний і має свої етапи перебігу. Поряд з тим заміна «старих» еритроцитів плодового кровоо-

бігу на «молоді» клітини еритроїдного ряду інколи супроводжується проявами анемії і навіть з летальними наслідками. Використання нанопрепарату Fe для профілактики анемії поросят, згідно з нашими дослідженнями, проявляє антианемічний ефект. Проте продуктивність тварин порівняно із класичним застосуванням залізодекстрану є значно нижчою. Очевидно, використання нанопрепарату позитивно впливає на фізіологічні показники та транспорт кисню. Однак нарощення маси тіла поросят потребує наявності більшої кількості доступного Fe для синтезу гемму, посилення транспорту кисню та забезпечення інтенсивного поділу клітин. Наші дослідження показали, що комплексне застосування нанопрепарату та броваферану-100 сприяє зростанню вмісту Fe у крові 5-добових поросят у 1,8 та 1,3 раза ( $P < 0,001$ ) відповідно до показників тварин, яким препаратів не вводили, та аналогів, яким вводили лише броваферан у дозі 2 мл. Встановлено істотне збільшення вмісту гемоглобіну та кількості еритроцитів у крові 10-добових тварин на 13,8 % ( $P < 0,05$ ) та 20,2 % щодо значень тварин, яким вводили таку саму кількість броваферану-100, однак без нанопрепарату. Поряд з тим у поросят спостерігається зростання рухової активності та інтенсивності поїдання корму. Вони виборюють інколи по два соски, краще ростуть і розвиваються. Натомість тварини, яким взагалі не вводили препаратів Fe, займають соски з найнижчим рівнем лактації і характеризуються низькою руховою і кормовою активністю. Динаміка вмісту кортизолу, продуктів ПОЛ та холестерину ліпопротеїдів свідчить про підвищення стресостійкості у поросят при комплексному застосуванні нанополуки Fe і залізодекстрану. Таким чином, комплексне застосування нанопрепарату Fe та броваферану сприяє зростанню вмісту Fe, гемоглобіну та кількості еритроцитів у крові тварин. Отже, для підвищення збереження, загальної резистентності та продуктивності поросят рекомендується вводити на 3-тю та 8-му доби життя нанопрепарат Fe та броваферан-100 по 1 мл внутрішньом'язово.

## ФІЗІОЛОГІЧНИЙ ВПЛИВ НАНОАКВАЦИТРАТІВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА ОРГАНІЗМ МЕДОНОСНИХ БДЖІЛ

І. І. Двилюк, І. І. Ковальчук

*Інститут біології тварин НААН, [dvylyuk\\_ivanna@ukr.net](mailto:dvylyuk_ivanna@ukr.net)*

Одним з важливих факторів, які впливають на життєдіяльність і продуктивність медоносних бджіл, є повноцінна підгодівля. Весною за відсутності підтримуючого медозбору для поповнення кормових запасів і стимуляції розвитку бджолиних сімей у підгодівлі бджіл застосовують часткову заміну меду цукровим сиропом. Проте слід зауважити, що в останньому відсутня більшість мікроелементів, що містяться в квітковому меді. Тому виникає необхідність стабілізувати мінеральне живлення бджіл і обмін речовин у їхньому організмі додаванням до компонентів підгодівлі макро- і мікроелементів. Вони необхідні для нормального перебігу всіх біологічних процесів: побудови тканин, активування ферментів, засвоєння поживних речовин, підвищення резистентності організму. Потреба бджіл у макро- і мікроелементах забезпечується їхнім надходженням з пилом рослин, водою і нектаром, проте залежить значною мірою від синергічних або антагоністичних зв'язків між різними, у т. ч. недостатньо вивченими елементами. На сьогоднішній день відомі препарати, що містять есенціальні мікроелементи і розроблені на основі нанотехнологій для стимулювання росту і розвитку бджолиних сімей. Аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури свідчить, що додавання до корму бджіл сполук окремих елементів, як стимуляторів метаболізму, значно підвищує резистентність і продуктивність медоносних бджіл. До таких елементів відносять Co, Zn, Cr, Se, Ag та Cu. Токсичність нанокарбоксилатів вказаних металів у багато разів нижча від токсичності їхніх іонів, одержаних із застосуванням солей мінеральних кислот. Використання наноаквацитратів у підгодівлі медоносних бджіл забезпечує підвищення їхньої життєздатності та фізіологічну активність продукції. Доведена доцільність їхнього застосування не тільки для одержання біоцидного ефекту, але і як мікроелементних сполук. Відомі способи їхнього застосування в підгодівлі бджіл для корекції фізіолого-біохімічних процесів і підвищення продуктивності та резистентності медоносних бджіл. Загалом, беручи до уваги значення мікроелементів у живленні медоносних бджіл, варто робити висновок, що наноаквацитрати можна широко використовувати у підгодівлі бджіл. Їх застосування покращує фізіологічний статус бджолосімей, підвищує продуктивність, збереженість і покращить біологічну цінність та якість продукції.

## **БІОМОРФОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ КІСТОК ТАЗОСТЕГНОВОГО СУГЛОБА ЧОРНОГО СТРИЖА – *APUS APUS***

**Н. В. Друзь**

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, [druz\\_nv@nubip.edu.ua](mailto:druz_nv@nubip.edu.ua)*

Чорний стриж, або серпокрилець чорний (*Arus Arus*) специфічний птах ряду серпокрильцеподібних, здатен до швидкого польоту, але при контакті з твердим субстратом присяде на землю та не ходить по ньому, оскільки просто не вміє цього робити. Короткі сильні лапки дають змогу серпокрильцям чіплятися за шершаву поверхню вертикальних стін і навіть повзати по них. Саме такі біоморфологічні особливості, що зумовлені специфічним біпедалізмом та полягають в розташуванні осі тіла відносно тазових кінцівок і забезпечують утримання тіла між двома кінцівками, і накладають певний відбиток на розвиток кісткових елементів, що формують тазостегновий суглоб. У чорного стрижа структурні елементи, які формують тазостегновий суглоб, відрізняються за формою та розмірами, що зумовлено типом опори та способом пересування по твердому субстрату. Клубова кістка має неправильну трикутну форму. Звуження преацетабулярного відділу клубової кістки зумовлене морфо-функціональною здатністю відкладати яйця. В залежності від форми яйця, залежить і форма кістки. Перехід дорсального гребеня клубової кістки у дорсо-латеральний – плавний. Суглобова западина являє собою круглу кісткову півсферу, що переходить у невеликий суглобовий отвір. Противертлюг дуже добре виражений та має продовгуватий дорсо-каудальний виступ, який нахилений дорсально. Сіднична кістка набагато менша за клубову, що нагадує форму овалу. Сідничний та затульний отвори також неправильної овальної форми, що зумовлено силою дії функціональних навантажень. Чим більший отвір, тим менші навантаження, і навпаки. Сіднично-лобкове вікно заповнене сухожилною мембраною. Наявність або в різному ступені його вираженість зумовлена дією функціональних навантажень на цю ділянку з боку прилягаючих м'язів. Тобто, чим більше функціональне навантаження, тим менше виражене сіднично-лобкове вікно. Лобкова кістка дещо довша за сідничу. Голівка стегнової кістки дещо сплюснена з краніо-каудальних боків, на дорсальному її краї добре виражена ямка, де фіксується зв'язка голівки стегнової кістки. Шийка стегнової кістки вузька та коротка. Вертлюг та передвертлюгова ямка слабо виражені, затульне втиснення відсутнє. Розвиток вертлюга та противертлюга характеризує силу м'язів, що фіксуються в ділянці тазостегнового суглоба та впливають на його рух. Чим більш розвинутий вертлюг та противертлюг, тим більш потужні м'язи фіксуються до нього.

## **РОДОВА ДІЯЛЬНІСТЬ ТА ПОКАЗНИКИ ГЕМОСТАЗУ КОРІВ**

**А. А.Замазій<sup>1</sup>, М. Д. Камбур<sup>2</sup>, В. М. Лісовенко<sup>2</sup>, С. В. Остапенко<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Полтавська державна аграрна академія, <sup>2</sup>Сумський національний аграрний університет, [jwrum@rambler.ru](mailto:jwrum@rambler.ru)*

Збалансований стан системи згортання та протизсідуючої системи крові є обов'язковою умовою фізіологічного функціонування усіх органів в організмі тварин. Такий стан вищезазначених систем гемостазу забезпечує збереження крові у рідкому вигляді та її рух по судинах. Порушення процесу гемостазу впливає на гемостаз та енантіостаз органів. Особливе значення дана система відіграє в підтриманні нормальної діяльності плаценти, і, відповідно, росту та розвитку плода. В цей період в організмі самиць відбуваються фізіологічні зміни, пов'язані з формуванням додаткового кола кровообігу – «матково-плацентарного». Вагітність тварин, за фізіологічного його перебігу, супроводжується комплексом динамічних реакцій в системі «мати-плацента-плід» направлених на підтримання гомеостазу материнського організму в нових змінених умовах і забезпечення нормального розвитку плода. При цьому фізіологічна повноцінність процесу гестації визначається комплексом адаптаційних механізмів, до яких відносяться зміни показників гемостазу в організмі самиць. Здатність організму вагітної самиці адекватно і надійно реагувати на вплив несприятливих факторів при економії витрат функціональних резервів, дає змогу запобігти розвитку можливого преморбідного стану. Однак значні зміни в системі гемостазу вагітних самиць не тільки не бажані, але і шкідливі. Ці складні зміни властивостей крові можуть бути причиною переривання вагітності, порушення перебігу пологів та післяпологового періоду. Встановлено значний вплив

стану системи гемостазу на перебіг пологів та післяпологового періоду у корів. Встановлено, що підвищення вмісту фібриногену в крові тільних корів та активація процесу згортання крові суттєво впливає на тривалість пологів та особливо на перебіг його третього періоду (виділення посліду). Доведено, що у корів, у яких тривалість третього періоду пологів становила до 6 год, вміст фібриногену в крові та АЧТВ склали відповідно: 2,5 г та 39,08 с. Підвищення тривалості третього періоду пологів до 9 год супроводжується збільшенням вмісту фібриногену в крові корів в 1,06 раза, а активність АЧТВ на 2,76 %. Значне підвищення вмісту фібриногену встановлено в крові корів, у яких третій період пологів тривав до 12 год. У таких корів вміст фібриногену в крові підвищувався в 1,57 раза порівняно з тваринами, у яких третій період пологів тривав до 6 год і в 1,50 раза при перебігу третього періоду пологів до 9 год. АЧТВ у корів, у яких тривалість третього періоду пологів становила 9 год, була на рівні 37,40 с. У корів підвищення тривалості третього періоду пологів супроводжувалось збільшенням вмісту фібриногену в крові у порівнянні з коровами першої групи в 2,27 раза ( $P<0,001$ ), а АЧТВ в 1,12 раза ( $P<0,05$ ).

## ОКСИГЕНОВИЙ ГОМЕОСТАЗ НОВОНАРОДЖЕНИХ ТВАРИН

А. А.Замазій<sup>1</sup>, М. Д. Камбур<sup>2</sup>, В. М. Лісовенко<sup>2</sup>, С. В. Остапенко<sup>2</sup>, О. М. Натяглий<sup>2 1</sup>

*Полтавська державна аграрна академія, <sup>2</sup>Сумський національний аграрний університет, jwrum@rambler.ru*

Життєдіяльність організму, ріст і розвиток як в утробній, так і в післяутробній період супроводжується значною кількістю процесів. Нейрогуморальна регуляція біохімічних процесів у клітині та організмі забезпечуються участю гормонів і медіаторів. Регуляція функцій організму може базуватись на наявності інших, не менш важливих, однак поки що маловивчених механізмів. Наявність загального мікроциркуляторного русла всіх тканин і органів організму – підстава вважати, що таку роль виконує перед усім кисень. Кисень є тією речовиною, яка запускає окиснювально-відновлювальні реакції в тканинах і організмі. Від ступеня забезпечення плоду киснем в утробній період росту та розвитку та рівня його надходження під час першого вдиху залежить активність усіх систем організму в період постнатального розвитку. Вищезазначене свідчить про актуальність досліджень оксигенового гомеостазу новонароджених тварин. Встановлено, що рН крові клінічно здорових новонароджених телят становив  $7,374\pm 0,008$ , що відповідало вмісту іонів гідрогену в крові на рівні  $41,00\pm 0,01$  Мекв/л. Парціальний тиск кисню в крові клінічно здорових новонароджених телят виявився в 1,35 раза ( $P<0,01$ ) більше, ніж у телят, які народились у стані глибокої гіпоксії. Поряд зі зниженням парціального тиску кисню в крові телят, які народились у стані гіпоксії, виявлено підвищення парціального тиску  $CO_2$ . У телят, які народились у стані глибокої гіпоксії  $PCO_2$  підвищувався на 74%. У телят з середнім та легким рівнем гіпоксії парціальний тиск  $CO_2$  виявився в 1,37 -1,56 раза більше, ніж у клінічно здорових телят ( $P<0,01$ ). Насиченість крові киснем клінічно здорових новонароджених телят виявилась в 1,20 раза більше, ніж у телят, які народились з ознаками глибокої гіпоксії ( $P<0,01$ ), а забезпеченість тканин киснем була в 1,41 раза більша ( $P<0,01$ ). Результати досліджень свідчать, що підвищення тривалості опоросу свиноматок супроводжується збільшення кількості мертвонароджених та у стані гіпоксії поросят. У клінічно здорових народжених поросят рН крові виявився значно більше, ніж у поросят, які народились у стані гіпоксії. Парціальний тиск кисню в крові клінічно здорових новонароджених поросят виявився в 1,33-1,52 раза більше, ніж у поросят, які народились у стані гіпоксії ( $P<0,01$ ).

## ВМІСТ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА ТА ЙОГО ФРАКЦІЙ У СИРОВАТЦІ КРОВІ БУГАЙЦІВ НА ВІДГОДІВЛІ ЗА ВПЛИВУ ВІТАМІНІВ ГРУПИ В ( $V_1, V_2, V_5, V_6, V_{10}, V_{12}$ )

М.М. Змія, П.І. Головач, В.І. Цимбала

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, i\_kolotiec@mail.ru*

Різні водорозчинні вітаміни виконують життєво важливі функції, а генетичний потенціал м'ясної і молочної продуктивності великої рогатої худоби постійно зростає, тому нами була поставлена мета



дослідити вплив додаткового введення до основного раціону бугайців на відгодівлі збалансованого за поживними і мінеральними речовинами та жиророзчинними вітамінами А, D, Е комплексу основних вітамінів групи В ( $V_1, V_2, V_5, V_6, V_{10}, V_{12}$ ) у відповідних кількостях на окремі показники фізіологічного статусу, продуктивність і якість яловичини. У цьому повідомленні наводяться дані про дослідження впливу різних доз вітамінів групи В на обмін білків у бугайців на відгодівлі. У результаті проведених досліджень встановлено, що додавання до раціону дослідних груп бугайців комплексу вітамінів групи В ( $V_1, V_2, V_5, V_6, V_{10}, V_{12}$ ) у різних дозах в цілому позитивно впливає на білковий обмін, причому величина змін вмісту загального білка та співвідношення його фракцій у сироватці крові залежить від дози додатково введених до раціону бугайців вітамінів групи В. Так, наприклад, вміст загального білка у сироватці крові тварин контрольної групи становив  $71,7 \pm 0,68$  г/л, а у бугайців 1-, 2-, 3- та 4-ї дослідних груп вміст загального білка був вищим і відповідно становив  $72,6 \pm 0,70$  ( $P > 0,05$ );  $74,5 \pm 0,76$  ( $P < 0,05$ );  $75,8 \pm 0,73$  ( $P < 0,01$ ) та  $76,1 \pm 0,69$  г/л ( $P < 0,01$ ). Відмічено також статистично вірогідне зростання у сироватці крові  $\gamma$ -глобулінової фракції білків у бугайців 2, 3 та 4 дослідних груп, що було вищим на 10,6; 18,2 та 19,0 % порівняно із тваринами контрольної групи та зменшення кількості альбумінів. Водночас не виявлено впливу комплексу вітамінів групи В ( $V_1, V_2, V_5, V_6, V_{10}, V_{12}$ ) на вміст  $\alpha$ - і  $\beta$ -глобулінів у сироватці крові бугайців на відгодівлі. Так, концентрація  $\alpha$ -глобулінів у сироватці крові тварин контрольної групи становила  $19,1 \pm 0,42$  %, а у бугайців 1-, 2-, 3- та 4-ї дослідних груп відповідно  $19,4 \pm 0,32$ ;  $18,4 \pm 0,38$ ;  $18,8 \pm 0,47$ ;  $18,5 \pm 0,42$  % ( $P > 0,05$ ). Концентрація  $\beta$ -глобулінів у сироватці крові бугайців контрольної групи була  $16,4 \pm 0,67$  %, а у тварин 1-, 2-, 3- та 4-ї дослідних груп відповідно –  $15,9 \pm 0,55$ ;  $16,1 \pm 0,62$ ;  $16,0 \pm 0,58$  та  $16,9 \pm 0,64$  % ( $P > 0,05$ ). Отже, найменші зміни в показниках білкового обміну у сироватці крові встановлено у тварин 1-ї дослідної групи, а найбільші – у бугайців 3-ї та 4-ї дослідних груп.

## **УЛЬТРАСТРУКТУРА СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ КИШЕЧНИКА ПОРОСЯТ У ПЕРІОД ВІДЛУЧЕННЯ ПРИ ЗГОДОВУВАННІ ПРЕПАРАТІВ ПРОБІОТИЧНОЇ ДІЇ** **О. І. Камрацька, І. А. Коломісць**

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, Львів, kamracka@mail.ru*

Раннє відлучення поросят від свиноматки, формування груп на дорощування і відгодівлю є екстремальними подразниками, які не відповідають захисно-приспосувальним реакціям організму тварин і супроводжується розладом функції органів травлення. На електронно-мікроскопічному рівні особливості функціонування поверхні слизової оболонки кишечника поросят у період відлучення, а також при згодовуванні пробіотиків до нас не вивчались, що і було метою досліджень. Досліди проведені на клінічно здорових поросятах 5-60-добового віку полтавської м'ясної породи в умовах ННВЦ «Комарнівський» ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. Починаючи з 25-добового віку, поросят контрольної групи підгодовували престаартерним комбікормом (ПК), поросятам дослідних груп, окрім ПК, додатково згодовували: 1-й дослідній групі – симбіотик «Праймікс-Біонорм К» з розрахунку 9 г/100 кг корму; 2-й групі – пробіотик «Вітакорм-Мультиспорин» у концентрації 0,03 % у дозі 1,5 мл / гол; 3-й – пребіотик «Вітакорм-Біо» з розрахунку 300 г / 100 кг корму. На 40-ву добу життя поросят відлучали від свиноматки. Забій поросят проводили на 45- та 60-ту добу життя. Встановлено, що у поросят 45- і 60-добового віку ворсинки порожньої кишки щільно покривають її слизову оболонку і мають листочкоподібну форму, проте відрізняються об'ємом і висотою. Верхня частина ворсинок у поросят контрольної групи характеризувалася гладкою поверхнею. У поросят 2-ї дослідної групи рельєф поверхні складчастий. У поросят контрольної, 1-ї та 3-ї групи через 5 та 20 діб після відлучення на поверхні деяких ворсинок порожньої кишки виявляються виросити, не характерні для їх мікрорельєфу, що може вказувати на кишкову недостатність організму тварини при переведенні на новий тип живлення, в клубовій кишці з'являється багато секреторних крипт з відкритими каналами для виділення секрету келихоподібних клітин. У поросят 2-ї групи такі утвори виявлені не були.



## **ВПЛИВ КОРТИКО-ВЕГЕТАТИВНИХ РЕГУЛЯТОРНИХ МЕХАНІЗМІВ НА ВМІСТ ОКРЕМИХ НЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ У КРОВІ ПОРОСЯТ**

**В.В. Карповський, Р. В. Постої, В. М. Скрипкіна, В. І. Карповський, В. О. Трокоз**

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, karpovskiy@meta.ua*

Нервова та гуморальна системи формують єдині регуляторні механізми фізіологічних функцій в живому організмі. Найвищий рівень нервової регуляції в організмі здійснює кора великого мозку, тоді як поточну регуляцію фізіологічних процесів здійснює автономна нервова система. Отже, метою даної роботи було вивчення впливу кортико-вегетативних регуляторних механізмів на вміст окремих ненасичених жирних кислот в плазмі крові поросят. Досліди проводили на 12 поросятах великої білої породи 4-місячного віку. Типи вищої нервової діяльності (ВНД) у поросят визначали за експрес-методикою, розробленою кафедрою фізіології, патофізіології та імунології тварин НУБіП України. За результатами вивчення умовно-рефлекторної діяльності у поросят було сформовано 4 дослідні групи. До першої групи входили тварини сильного врівноваженого рухливого (СВР), до другої – тварини сильного врівноваженого інертного (СВІ), до третьої – сильного неврівноваженого (СН), до четвертої – слабкого (С) типів ВНД. Потім у дослідних тварин досліджували тонус автономної нервової системи за допомогою тригеміновагального тесту, за результатами якого тварину відносили до нормотоніків, симпатикотоніків чи ваготоніків. Для біохімічних досліджень проводили відбір крові з яремної вени із дотриманням правил асептики та антисептики. Серед ненасичених жирних кислот важливе значення має лінолева. Установлено, що найвищий її вміст відмічався у поросят СВР-типу ВНД –  $12,81 \pm 0,33$  %. У тварин СВІ-типу ВНД вміст лінолевої кислоти в плазмі крові був нижчим на 1,7 %, ніж у тварин СВР-типу, та становив  $12,59 \pm 0,71$  %. У поросят СН- та С-типів ВНД досліджуваний показник був нижчим відповідно на 3,7 та 3,3 % порівняно з тваринами СВР-типу. При дослідженні вмісту лінолевої кислоти в плазмі крові тварин з різним типом вегетативної регуляції встановлено, що найвищий її вміст був у нормотоніків –  $12,97 \pm 0,28$  %. У ваготоніків досліджуваний показник був меншим на 3,9 % порівняно з нормотоніками, але вищим на 2,4 %, ніж у симпатикотоніків. У симпатикотоніків вміст лінолевої кислоти в плазмі крові був нижчим на 6,2 % порівняно з нормотоніками. Таким чином, одержані результати вказують на те, що тип вищої нервової діяльності та вегетативної регуляції впливають на вміст лінолевої кислоти в плазмі крові поросят.

## **УЧАСТЬ КОРТИКАЛЬНИХ І ВЕГЕТАТИВНИХ МЕХАНІЗМІВ У РЕГУЛЯЦІЇ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ІМУНІТЕТУ СВИНЕЙ**

**П. В. Карповський, В. В. Карповський, В. О. Трокоз, В. І. Карповський.**

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, tassar@bigmir.net*

За допомогою дисперсійного аналізу оцінювали силу впливу кортикальної та вегетативної регуляції на показники імунітету свиней до перегрупування тварин (технологічне подразнення – ТП), через 1, 20, 30 та 60 діб після нього. Встановлено, що найбільший ефект на бактерицидну активність сироватки крові свиней до ТП здійснювала нормотонія, а також, на дещо нижчому рівні, – рухливість кіркових процесів. Вплив інших показників кортико-вегетативної регуляції був мінімальним. Подразник викликав зниження нормотонії та рухливості, а на першу добу після цього достовірно зріс вплив симпатикотонії. Упродовж 60 діб спостерігали зниження впливу на бактерицидну активність усіх механізмів регуляції. На лізоцимну активність сироватки крові до ТП достовірно впливала врівноваженість кіркових процесів, а також вегетативна рівновага і симпатикотонія. Стрес-фактор збільшував вплив сили та рухливості кіркових процесів і знижував дію чинників вегетативної регуляції та врівноваженості цих процесів. Схожу тенденцію спостерігали на 20-ту добу за винятком сили, яка ставала нижчою, ніж рухливість. На 30-ту добу вплив врівноваженості, рухливості та ваготонії був відсутній. На 60-ту добу після ТП спостерігали достовірне підвищення впливу рухливості кіркових процесів та нормотонії. Достовірну дію на фагоцитарну активність нейтрофілів до подразнення здійснювала сила кіркових процесів та, дещо менший, – їх рухливість. Інші регуляційні чинники на фагоцитарну активність нейтрофілів не впливали. ТП знижував ефект сили кіркових процесів та підвищував вплив рухливості до 30-ї доби. На 60-у

добу вплив сили значно підвищився, а рухливості – знизився до мінімального. Стосовно циркулюючих імунних комплексів сироватки крові, до ТП спостерігали вплив сили, врівноваженості процесів збудження і гальмування та нормотонії. Стрес-фактор підвищував вплив сили, рухливості коркових процесів та ваготонії, а врівноваженість вегетативних процесів свій вплив втрачала. На високому рівні на 20–60-ту доби після ТП знаходився вплив врівноваженості кіркових процесів. На кінець дослідів вплив рухливості та ваготонії знижувався до мінімуму з підвищенням впливу сили кіркових процесів та нормотонії. Таким чином, неспецифічний імунітет у свиней досить тонко регулюється кірковими механізмами із залученням автономної нервової системи. Вплив регуляційних чинників змінюється залежно від умов довкілля і може як посилюватися, так і послаблюватися для окремих механізмів.

## **ВПЛИВ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА РІВЕНЬ ГЕНЕТИЧНОЇ СТАБІЛЬНОСТІ КЛІТИН ПЕРВИННОЇ ПУХЛИНИ МИШЕЙ C57BL/6 З ПЕРЕЩЕПЛЕНОЮ КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНЬ ЛЬЮІС**

**Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, Л. В. Гарманчук, С. В. Величко, В. В. Ковпак**

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, kladlarisa@yandex.ru*

Однією з характеристик пухлинного процесу є генетична нестабільність клітин. Вона характеризується анеуплоїдією, зниженням рівня апоптозу – запрограмованої загибелі клітин, та підвищенням їх проліферативної активності. Оцінка рівня генетичної нестабільності дає можливість прогнозування перебігу туморогенезу. Досліди проводили на самцях мишей C57BL/6 2-3-місячного віку, масою 20-22 г. Алогенні мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) отримували культивуванням первинного матеріалу, що був виділений з кісткового мозку мишей C57BL/6. Культивування клітин проводили при 37°C, 100% вологості і 5% CO<sub>2</sub> у середовищі DMEM із додаванням 20% фетальної сироватки телят та 1% антибіотика-антимікотика. Мишам внутрішньом'язово інюкулювали клітинну суспензію метастатичної карциноми легень Льюїс (LLC) у концентрації 1x10<sup>6</sup>/0,1 мл розчина Хенкса. Після інюкуляції пухлинних клітин миші були розділені на контрольну і дослідну групи по 8 тварин у кожній. Мишам дослідної групи на 8-му добу після інюкуляції пухлинних клітин вводили МСК 4-го пасажу в кількості 1,25x10<sup>4</sup>. На 20-ту добу від початку дослідів визначали кількість анеуплоїдів та кількість клітин проліферативного пулу методом проточної цитофлуориметрії. Встановлено, що застосування алогенних МСК на 8-му добу після перещеплення метастатичної карциноми легень Льюїс призводить до збільшення вмісту анеуплоїдних клітин у 1,3 раза в тканині первинної пухлини і становить у мишей дослідної групи 76,68±1,99\*\*\* при P<0,001, тоді як у мишей, яким не вводили МСК – 59,20±0,80 %. Вплив МСК на збільшення показника анеуплоїдії клітин пухлинної тканини підтверджує дисперсійний аналіз  $\eta^2_x=0,86$  при P<0,001. За впливу алогенних МСК змінюється розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу. Підтверджено, що за впливу алогенних МСК вірогідно зростає кількість анеуплоїдних клітин проліферативного пулу (S+G<sub>2</sub>/M) первинної пухлинної тканини до 68,02±3,42\* проти цього показника тварин контрольної групи 56,17±2,90 % (P<0,05). Рівень апоптозу пухлинних клітин за впливу МСК вірогідно знижується і становить 41,82±1,37% (P<0,001) проти 56,59±0,92% тварин контрольної групи, що підтверджено дисперсійним аналізом –  $\eta^2_x=0,88$  при P<0,001.

## **МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВІДМІННОСТІ ІМУННИХ СТРУКТУР КИШЕЧНИКА РІЗНИХ ВИДІВ ДОМАШНЬОЇ ПТИЦІ**

**І. А. Коломієць**

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького*

Відомо, що ступінь місцевої імунної відповіді в кишечнику і стабільність набутого імунітету багато в чому підпорядковується життєдіяльності нормальної мікрофлори. Проте визначальною в імунних реакціях на рівні травного каналу, є лімфоїдна тканина, асоційована зі слизовою оболонкою. Літературні дані про її формування і функціонування у різних видів домашньої птиці у

віковому аспекті носять фрагментарний характер. Досліди проведені в умовах птахофабрики ТзОВ «Агро» та ПП «Залізний» Львівській області на клінічно-здоровій птиці 5 – 180-добового віку: курчатах яєчного напрямку продуктивності кросу „Хайсекс коричневий“, індиках породи „Біла широкогруда” та японських перепелах. Матеріалом для досліджень слугували відрізки тонких та товстих кишок, відібрані після забою птиці у критичні періоди постнатального онтогенезу. Встановлено, що у 60 % досліджуваних видів домашньої птиці після анатомічного згину дванадцятипалої кишки починаючи з 15-добового віку виявлялася одна Пейєрова бляшка (ПБ). У краніальній частині порожньої кишки починаючи з 5-добового віку реєструвалися  $2,5 \pm 0,06$  –  $3,4 \pm 0,12$  ПБ із середньою довжиною: кури  $0,27 \pm 0,03$  –  $2,25 \pm 0,19$  см, індики  $1,0 \pm 0,07$  –  $2,5 \pm 0,11$  см, перепели  $0,15 \pm 0,02$  –  $0,70 \pm 0,08$  см. Остання ПБ у порожній кишці розташовувалася за  $4,4 \pm 0,19$  –  $6,5 \pm 0,17$  см до дивертикула Меккеля, який в 80 % досліджуваних нами видів домашньої птиці після настання періоду несучості не виявлявся. Нижче дивертикула на  $1,5 \pm 0,09$  –  $2,5 \pm 0,08$  см у 100 % особин домашньої птиці реєстрували одну ПБ середньою довжиною  $0,82 \pm 0,03$  –  $2,5 \pm 0,11$  см. У слизовій оболонці клубової кишки через  $2,5 \pm 0,08$  –  $6,2 \pm 0,17$  см від її початку у 100 % всіх досліджуваних особин птиці реєструвалася одна ПБ довжиною  $0,41 \pm 0,21$  –  $2,1 \pm 0,72$  см. Структура цієї ПБ відрізнялася від такої в інших ділянках тонких кишок, що, на нашу думку, може вказувати на її іншу функцію. Виявлено, що тонзила сліпих кишок функціонувала у всіх видів птиці до 180-добового віку. У слизовій оболонці тонких і товстих кишок виявлялися поодинокі лімфоїдні вузлики, при цьому їх кількість на одиницю площі зростала в каудальному напрямку. Отже, в кишечнику різних видів домашньої птиці 5-180-добового віку наявні імунні структури всіх функціональних рівнів з відмінностями за формою, лінійними розмірами, топографією.

## ФІЗІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КРОВІ КОНЕЙ ВЕРХОВИХ ПОРІД

**Я.П. Криця**

*Національний університет біоресурсів та природокористування України, Київ, argo37@yandex.ru*

Одним з чинників підвищення життєздатності і продуктивності тварини є належне функціонування імунної системи. Встановлено, що при народженні у лошат морфологічні і біохімічні показники крові нестабільні і знаходяться на низькому рівні. Починаючи з 40 діб вони збільшуються до загальноприйнятих норм. Вивчення спонтанної розеткоутворюючої здатності лімфоцитів показало, що у дорослих коней вміст Т-лімфоцитів становить – 24,22%; їх субпопуляції: теофілінчутливі – 4,83%, теофілінрезистентні – 18,51%; вміст В-лімфоцитів – 12,92% (Кріштофорова Б.В., 2001). Лейкоцити, різноманітні за морфологічними ознаками і функціями клітини, є одним з важливих компонентів крові. Кількість лейкоцитів у новонароджених лошат більша ( $9,0 \pm 0,5$ ,  $10^9$ /л), ніж у 1-місячних ( $7,1 \pm 0,7$ ,  $10^9$ /л) тварин. Це так званий фізіологічний лейкоцитоз. У 6-місячному віці тварин кількість білих кров'яних клітин знову збільшується до  $7,9 \pm 0,7$ ,  $10^9$ /л. Не менш важливим показником морфологічного складу крові є лейкоцитарна формула. Її аналіз показує, що у новонароджених тварин окремі види лейкоцитів знаходяться в оптимальному співвідношенні і відповідають лейкоцитарній формулі дорослих коней. У лошат 10-добового віку спостерігали знижену кількість нейтрофілів як паличкоядерних (1,3%), так і сегментоядерних (57,3%) порівняно з кіньми старшого віку (1 місяць – 1,5 і 64,2%; 6 місяців – 2,3 і 60,0% відповідно). Кількість моноцитів і лімфоцитів у новонароджених, навпаки, більша (6,3 і 32,0%), ніж у дорослих тварин (1 і 6 місяців). Аналізуючи імунологічні показники крові, відзначимо, що тварини української верхової характеризуються розвиненішою, ніж коні чистокривної верхової породи клітинною ланкою імунітету в різні вікові періоди. Стосовно гуморальної ланки імунітету такої тенденції не встановлено. Кількість В-лімфоцитів у новонароджених і 1-місячних лошат української верхової породи нижча, ніж у аналогів чистокривної верхової. Але вже в 6-місячному віці коні української верхової перевершують за цим показником однолітків чистокривної верхової в середньому на 2%. Таким чином, у новонароджених лошат більш розвиненою є мієлоїдна ланка кровотворення, а з віком розвивається лімфоїдна і за рахунок цього відбувається перерозподіл різних видів лейкоцитів. В процесі онтогенезу тварини української верхової породи в порівнянні з чистокривною верховою характеризуються розвиненішою клітинною ланкою імунітету, а зниження фагоцитарної активності нейтрофілів у коней цієї породи відбувається на користь клітинної і гуморальної ланок імунітету.

## **ВПЛИВ КСЕНОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ СИСТЕМНОМУ ВВЕДЕННІ ТВАРИНАМ-РЕЦИПІЄНТАМ**

**А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, Ю. О. Маркевич**

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, nikolai\_malyuk@mail.ru*

Дослідженнями *in vitro* продемонстровано, що мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) здатні супресувати активацію та проліферацію імунокомпетентних клітин і ця властивість є універсальною. Разом з тим достеменно невідомо, які реакції виникають *in vivo* після введення мезенхімальних стовбурових клітин у кров. З огляду на це, багато питань щодо імуносупресивних властивостей МСК залишаються відкритими, і тому досить актуальним є вивчення реакції імунної системи тварин-реципієнтів на введення клітин чужорідного походження. Мета роботи – дослідити показники абсолютної кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій у крові кролів, а також імунорегуляторний індекс після введення їм у кровеносне русло ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин. В досліді використовували кролів віком 8 міс. Тварини були розділені на дві групи по 4 тварини в кожній: перша – контрольна, друга – дослідна. Тваринам контрольної групи у яремну вену вводили 2 мл фізіологічного розчину, дослідної – 2 мл фізіологічного розчину з імобілізованими в ньому мезенхімальними стовбуровими клітинами кісткового мозку собаки у кількості  $1,5 \times 10^6$  клітин/мл. Встановлено, що ксеногенні мезенхімальні стовбурові клітини не мають імуногенних властивостей та проявляють недовготривалу імуносупресивну дію, що проявляється зниженням на 3-тю добу експерименту у їх крові абсолютної кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій. Імуносупресивний вплив введених *in vivo* ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин найбільш виражено позначається на популяції В-лімфоцитів. Показник імунорегуляторного індексу при введенні *in vivo* ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин підвищується.

## **РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ОРГАНІЗМУ ПОРОСЯТ У РІЗНІ СТАДІЇ СТРЕСУ НА ТЛІ ЗГОДОВУВАННЯ ДОБАВОК БЕТА-ГЛЮКАН ТА БІОВІР**

**О. І. Мацюк, В. Г. Стояновський, І. А. Коломієць, В. А. Колотницький**

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького, i\_kolomiec@mail.ru*

Встановлено, що найбільш несприятливим періодом постнатального онтогенезу поросят є період відлучення, коли в результаті дії комплексу негативних факторів навколишнього середовища відбувається розбалансування імунної системи та природного співвідношення нормофлори шлунково-кишкового тракту тварин. У даному аспекті, актуальними є дослідження застосування добавок на основі мікробних клітин для усунення імунодефіцитних станів організму та порушення мікробіоценозу кишечника поросят. Досліди проведені на клінічно здорових поросятах 5-90-добового віку полтавської білої породи в умовах ННВЦ «Давидівський» ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. На 28-му добу життя поросят відлучали від свиноматки. Контрольна група поросят отримувала стандартний комбікорм, а поросят дослідних (2 групи) з 5- до 45-добового віку згодовували відповідно кормову добавку Бета-глюкан і Біовір у кількості 10 мг/кг маси тіла на добу. Кров відбирали на 25 добу життя, а також через 1, 7, 20 і 60 діб після відлучення. Отримані результати свідчать про достатньо високий рівень гуморальної і клітинної ланки неспецифічної резистентності, а також дещо знижений рівень імунологічної реактивності організму поросят контрольної групи на 25-ту добу життя. Через одну добу після відлучення, що відповідає стадії тривоги (за Г. Сельє) у поросят контрольної групи встановлено послаблення гуморальної і клітинної ланки неспецифічної резистентності, яке супроводжувалося зниженням величини ЛАСК, БАСК, ФА, ФІ. У наступні періоди досліду на 7-му, 20-ту та 60-ту доби після відлучення, що відповідали стадії резистентності, стан неспецифічної резистентності організму поросят цієї групи поступово стабілізувався. У дослідних групах тварин, які отримували добавки Бета-глюкан та Біовір виявлено підвищення ЛАСК в середньому на 30,4 % ( $P < 0,05$ ), БАСК – на 24,4 % ( $P < 0,01$ ), ФА – на 24,5 % ( $P < 0,05$ ), ФІ – на 35,5 % ( $P < 0,01$ ) та зростання кількості Т- і В-лімфоцитів в середньому на 25,4 % ( $P < 0,05$ ) у різні періоди стресу. Отже, використання в годівлі поросят раннього віку кормової добавки Бета-



глюкан чи Біовір сприяє зниженню негативної дії стресу-відлучення на резистентність організму на стадії тривоги та підвищує активність факторів специфічного і неспецифічного імунітету на стадії резистентності.

## **ОСОБЛИВОСТІ БІЛКОВОГО ОБМІНУ У КУРЧАТ-БРОЙЛЕРІВ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ ГУМІЛІДУ**

**Є.О. Михайленко, В.Г. Грибан, Л.М. Степченко**

*Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, [stepchenko@rambler.ru](mailto:stepchenko@rambler.ru)*

Регулятори росту курчат-бройлерів, які містять речовини гумінової природи, при додаванні їх до загального раціону як кормову добавку впливають на процеси метаболізму білка активізуючи як анаболічну, так і катаболічну фази. Нова кормова добавка Гумілід отримана активацією гумінових субстанцій при кислотно-лужному гідролізі торфу, який відбирали за широким спектром біологічних ефектів з використанням скринінгової системи оцінки сировинного торфу, розробленої в лабораторії гумінових речовин ім. проф. Л. А. Христової Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. До складу Гуміліду крім натрієвих солей гумінових кислот входять пептиди, амінокислоти, полісахариди, хінони, окиснені феноли, карбонові кислоти, деякі мікро- і макроелементи. Мета роботи – оцінка ефективності кормової добавки Гумілід в раціоні курчат-бройлерів за показниками обміну білка та продуктивністю. Досліди проводили на курчатах-бройлерах кросу Cobb-500, яких вирощували в пташниках на підлозі. Контрольна група курчат різнилася від дослідної лише тим, що останнім в раціон разом з водою вводили Гумілід за допомогою медикатора. У кожній з груп кількість тварин, племінні характеристики, умови утримання, годівлі та лікувально-профілактичні заходи були однаковими. Про рівень білкового обміну судили за біохімічними показниками крові (загальний білок і його фракції), а також за балансом амінокислот. Рівень продуктивності визначали за зоотехнічними показниками. Встановлено, що середня маса тіла одного бройлера наприкінці терміну вирощування курчат в дослідній групі, які отримували з водою Гумілід, в середньому збільшилася на 5,5 % порівняно з контролем, а середньодобовий приріст маси у бройлерів виріс за весь період майже на 2,5 г. При цьому кількість полеглої птиці зменшилось у дослідній групі на 12 %, а санітарний забій знизився на 6 %. Одночасно в крові дослідних курчат було зареєстровано підвищення кількісних характеристик як загального білка в середньому на 15 %, так і його фракцій. Крім того, в експерименті визначали 17 амінокислот у кормах і посліди від контрольних і дослідних курчат, які отримували з водою Гумілід. Встановлено, що загальний вміст амінокислот в посліди від дослідних бройлерів був нижче на 10 % в порівнянні з кількістю амінокислот в посліди від курчат, що не отримували з раціоном біологічно активну добавку. Цей факт може свідчити про краще засвоєння амінокислот корму дослідними курчатами. Можна зазначити, що загальна кількість незамінних амінокислот знизилася при цьому на 10 %, а заміних – на 9,4 % порівняно з контролем. Однак коефіцієнти засвоєння окремих амінокислот варіювали в достатньо широких межах. Отже, Гумілід, при включенні його до раціону як кормової добавки, впливає на засвоєння окремих амінокислот організмом курчат, забезпечуючи вищий рівень обміну білків, що призводить до збільшення виходу продукції в середньому на 5–6 %.

## **ПОКАЗНИКИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ ПЕРЕПЕЛІВ У ЕМБРІОНАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ РОЗВИТКУ ЗА ДІЇ РОЗЧИНУ АКВАХЕЛАТУ СЕЛЕНУ**

**М. П. Ніщенко, А. А. Ємельяненко**

*Білоцерківський національний аграрний університет, [nat.nick@mail.ru](mailto:nat.nick@mail.ru)*

Практичне значення має підтримка високого рівня антиоксидантного захисту організму під час ембріонального розвитку перепелів, коли відбувається закладання захисних систем організму. Враховуючи біологічні особливості перепелів, зокрема, їх природну стійкість до інфекцій, а також причетність антиоксидантної системи до функціонального стану ключових систем організму, у тому числі і імунної, дослідження активності АОС тканини печінки перепелів за дії аквахелату селену є досить перспективним. Перекисне окиснення ліпідів у організмі є важливою ланкою



обміну речовин. Проте збільшення активності ПОЛ призводить до дезорганізації структури біологічних мембран та пригнічення активності життєво важливих ферментів, а їх гальмування, може бути причиною порушення синтезу деяких біологічно активних речовин в організмі птиці. Метою досліджень було вивчення впливу аквахелату селену на окремі показники ПОЛ, антиоксидантного захисту та рівня інтоксикації в тканині печінки перепелів у ембріональному розвитку. Регуляція інтенсивності ПОЛ відбувається за допомогою ферментів антиоксидантного захисту під впливом аквахелатного розчину селену в дозі 0,05 мкг/кг. Так, активність такого ферменту як супероксид-дисмутаза була в 1,3 рази менша, ніж у контролі, а каталази у тканині печінки дослідних перепелів вірогідно зросла в 1,5 рази порівняно з контролем, що, ймовірно, вказує на позитивний вплив аквахелату селену. На нашу думку, це свідчить про більш високу функціональну активність стану АОС ембріонів птиці на фоні зменшення активності такого важливого ферменту як глутатіон пероксидази у дослідній групі порівняно з контрольною.

## **МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ТЕЛЯТ ВОЛИНСЬКОЇ ТА ПОЛІСЬКОЇ М'ЯСНИХ ПОРІД У РІЗНІ ПЕРІОДИ РАНЬОГО ОНТОГЕНЕЗУ**

**М. З. Паска**

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій  
ім. С.З. Гжицького, i\_kolomiec@mail.ru*

Важливою передумовою успішного ведення сучасного тваринництва є максимальне врахування індивідуальних особливостей організму тварин, використання на практиці закономірностей фізіологічних і біохімічних процесів в організмі тварин, їх поведінки дає можливість створювати сприятливі умови для реалізації генетичного потенціалу. Експериментальна частина роботи виконана на бугайцях волинської і поліської м'ясних порід у господарствах ТзОВ «АгроДобросин» і «Клен» Жовківського району Львівської області. Матеріалом для досліджень слугувала венозна кров, яку відбирали на 1-шу, 30-ту, 60-ту і 180-ту доби після народження. На основі аналізу динаміки змін кількості еритроцитів в крові телят волинської та поліської м'ясних порід від одно- до 180-добового віку виявилось, що у теличок, на відміну від бугайців, впродовж дослідного періоду спостерігалось нижче значення цього показника. На 180-ту добу життя кількість еритроцитів у крові бугайців та теличок обох порід була нижчою відповідно на 9,3-11,1% і 11,6-10,2% при  $P < 0,05$ , ніж у 30-добовому віці. Аналогічна динаміка характерна для вмісту гемоглобіну в крові бугайців і теличок волинської та поліської м'ясних порід від 1-но- до 180-добового віку. До 180-добового віку спостерігалася тенденція до зниження концентрації гемоглобіну в крові бугайців і теличок волинської та поліської м'ясних порід на 24,1-21,8% ( $P < 0,001$ ) та 19,6-21,1% ( $P < 0,001$ ) порівняно з однодобовим віком. Кількість лейкоцитів у крові бугайців волинської та поліської м'ясних порід в однодобовому віці була найвищою, але на 11,3% ( $P < 0,05$ ) меншою у крові бугайців, ніж в крові теличок. До 180-ї доби життя кількість лейкоцитів зменшувалася ( $P < 0,001$ ) у бугайців і теличок відповідно на 34,0 і 27,1% порівняно з однодобовим віком, на 20,8 і 14,4% порівняно з 30-добовим віком, на 14,7% порівняно з 60-добовим віком. Отже, динаміка морфологічних показників крові телят волинської та поліської м'ясних порід характеризується найвищими значеннями на 30 добу життя з поступовим зниженням до нижньої межі фізіологічної норми у 180-добовому віці; виявлені міжстатеві відмінності у кількості еритроцитів, лейкоцитів і концентрації гемоглобіну телят обох порід з переважанням їх числового значення в бугайців.

## **ВПЛИВ ДОВГОТРИВАЛОГО ЗГОДОВУВАННЯ ГМ СОЇ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ЩУРІВ І ПОКОЛІННЯ**

**І. М. Самсонюк**

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій  
ім С. З. Гжицького, inga.veklisch@gmail.com*

Досягнення біотехнології докорінно змінили не тільки біологію і медицину, а й породили нові проблеми і суперечки у суспільстві. На початок 2013 р., за даними щорічного огляду, присвяченого культивуванню генно-модифікованих сільськогосподарських культур, сумарні площі посівів під трансгенними культурами становили 170 млн. га. Соя – найпопулярніша культура, продукти якої

широко використовуються в харчовій промисловості і як кормова добавка при відгодівлі тварин. Найпопулярнішою є соя «Roundup Ready» (RR), яка має геном стійкості до гербіциду. Масштабне запровадження методів трансформації геному рослин призвело до необхідності ретельної перевірки можливих віддалених негативних наслідків їх використання. Цей процес незворотний і вимагає досконалого дослідження. Своєрідним центром регуляції секреторної, моторної та евакуаторної діяльності шлунково-кишкового тракту є дванадцятипала кишка. Мета дослідження – вивчення впливу тривалого згодовування кормів з 20%-м вмістом ГМ сої на стан келихоподібних клітин як основного джерела формування слизового бар'єра від дії зовнішніх факторів. Дослідження проводили на щурах лінії Вістар масою 160-180 г, віком 3,5-4 міс. Було сформовано 3 групи тварин, по 14 у кожній (8 самиць і 6 самців). Отримано три покоління щурів, які споживали корм з 20%-м вмістом ГМ і традиційної сої. Проводили гістологічні, морфометричні та гістохімічні дослідження. В результаті морфометрично встановлено вірогідне збільшення глибини крипт та зростання висоти стінки слизової оболонки дванадцятипалої кишки щурів першого покоління, яким згодовували корми з 20%-м вмістом ГМ сої. Гістохімічно виявлено зниження вмісту глюкозаміногліканів у келиховидних клітинах дванадцятипалої кишки щурів I покоління цієї ж групи. Очевидно, введення в корми 20 % ГМ сої, багатой на білок, вимагало для подальшого розщеплення більшого вмісту травних ферментів, що призводило до гіперплазії структурних елементів і відобразилось на зростанні потреби утворення більшої кількості епітеліальних клітин при їх інтенсивнішому зношуванні. Зниження вмісту глюкозаміногліканів, ймовірно, є наслідком інтенсивного функціонального навантаження дванадцятипалої кишки і, як результат, зниження захисно-бар'єрної функції клітин кишечника.

## **ВПЛИВ ГУМІЛІДУ НА АДАПТАЦІЙНІ ПРОЦЕСИ У КРОЛЕНЯТ ПІСЛЯ ВІДЛУЧЕННЯ** **Л. М Степченко, Ю. О. Коробкова**

*Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, [stepchenko@rambler.ru](mailto:stepchenko@rambler.ru)*

Відомо, що відлучення молодняка викликає в організмі кроленят реактивні зміни, що спрямовані на збереження фізіологічних процесів і структур в змінених умовах. В останні десятиріччя все більш актуальними стають пошук, розробка і впровадження екологічно чистих, низько токсичних та високоефективних препаратів та кормових добавок, які можна було б застосовувати тваринам з кормами. Такими препаратами є продукти життєдіяльності рослинних і тваринних організмів – похідні гумінових речовин, які застосовуються в тваринництві та птахівництві. Гумінові речовини відомі своїми регуляторними та антиоксидантними властивостями, тобто вони можуть застосовуватися як адаптогени. Проте у літературі зустрічаються лише окремі роботи щодо впливу природних метаболітів на показники продуктивності кролів та відсутні дослідження щодо впливу цих препаратів на обмінні процеси, які супроводжують процеси адаптації кролематок та кроленят після відлучення. Тому метою роботи було дослідити особливості росту та процеси адаптації у кроленят після відлучення за впливу гуміліду. Дослідження проводили на кролематках та кроленятах різної вікової групи порід Білий панон та Каліфорнія у кролівницькому господарстві ПП «Синяєв» с. Кулебівка Новомосковського району Дніпропетровської області. Було сформовано дві групи тварин (контрольну і дослідну), по 9 кролематок у кожній групі за принципом аналогів. Кролематкам контрольної групи не застосовували препарат, а в дослідній вони отримували гумілід в оптимальній дозі з кормом. Тривалість досліду становила 152 доби, у т. ч. підготовчий період – 20 діб, дослідний – 132 доби. Для визначення показників динаміки росту та середньодобового приросту кроленят їх зважували після народження та на 30-, 60-, 90-ту доби життя. Для морфологічних та біохімічних досліджень кров у кроленят відбирали з крайової вушної вени в ці самі строки. У крові визначали вміст гемоглобіну, кількість еритроцитів та гематокрит, вміст глюкози. Результати проведених досліджень показали, що маса кроленят дослідної групи у 30-, 60- та 90-добовому віці була в середньому на 7,0 % більшою, ніж у тварин контрольної групи. Відсоток збереженості кроленят дослідної групи до 90-ї доби був вищим за контрольний варіант в середньому на 18,2 %. Крім того, в крові кроленят дослідної групи збільшилася кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну за цей період в середньому на 5,0 %, що свідчить про збільшення кисневої ємності крові. Отже, введення до раціону кроликів біологічно активної добавки гумілід викликає активацію системи захисту організму, що регулює адаптаційні процеси у кроленят після відлучення.

## **ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ ЛІМФОЇДНИХ СТРУКТУР СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ КИШЕЧНИКА ПЕРЕПЕЛІВ**

**С. І. Коретчук<sup>1</sup>, В. Г. Стояновський<sup>2, 1</sup>**

<sup>1</sup>*Інститут біології тварин НААН, м. Львів;*

<sup>2</sup>*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій  
ім. С. З. Гжицького, svitlana\_korechuk@ukr.net*

Для перепелів характерний високий темп росту. Проте він нерівномірний впродовж постембріонального періоду розвитку птахи. Пришвидшення росту перепелят (на 14 %) відбувається між 3-ю і 7-ю добою розвитку і в другій половині першого місяця життя (на 9 %). Зниження темпів росту у перші три доби після вилуплення, очевидно, пов'язано з недосконалою терморегуляцією та поганим засвоєнням нового корму. Наступна затримка приросту перепеленят спостерігається між 7-ю і 17-ю добою, що, очевидно, пов'язано з розвитком пір'яного покриву і з процесами посиленої диференціації спеціалізованих тканинних утворень. Найінтенсивніший ріст травної системи, на відміну від росту самих перепелів, спостерігається в 1-шу добу розвитку і продовжує триматися на високому рівні 7 діб, що, ймовірно, зумовлено переходом на активне харчування об'ємною їжею. В подальшому інтенсивний розвиток кишечника спостерігається з 9-ї до 17-ї доби разом із формуванням складових стінки кишечника. Починаючи з 29-ї до 71-ї доби спостерігається період відносно стабільності у рості травної системи перепелів. Важливими складовими кишечника перепелів є лімфоїдні утворення, асоційовані зі слизовою оболонкою. Завдяки особливостям будови і функції тонкого кишечника, всі клітини макроорганізму отримують необхідну кількість поживних речовин. Тому не випадково слизова оболонка і підслизовий шар органів травного каналу мають добре розвинену сітку лімфатичних капілярів, власні лімфоепітеліальні структури у вигляді поодиноких лімфоїдних вузликів, пейєрових бляшок (ПБ) і сліпокишкових мигдаликів. Макроскопічно ПБ кишечника перепелів являють собою утворення, що піднімаються над поверхнею слизової оболонки. Поверхня бляшки нерівна, горбкувата. В стінці тонких кишок реєстрували три або чотири ПБ, що були розташовані на місці прикріплення брижейки до кишечника та на різній відстані від початку тонкого кишечника. Форма ПБ кишечника була неоднаковою, проте характерною для кожної ділянки. Краї ПБ дещо припідняті, утворюють невеликий валик довкола бляшки, що візуально відділяє територію бляшки від слизової оболонки кишки. Згідно з проведеними дослідженнями, розташування лімфоїдних структур у перепелів між відділами шлунково-кишкового тракту можна вважати загальною закономірністю в їх топографії, що, ймовірно, пов'язане з особливістю травлення, нерівномірним ростом та розвитком травної системи у постембріональний період, розвитком мікробоценозу, активністю ферментів та процесами всмоктування поживних речовин.

## **ФІЗІОЛОГІЧНА РОЛЬ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК ГЕРМАНІЮ**

**М. І. Храбко, О. П. Долайчук**

*Інститут біології тварин НААН, Львів, khrabko95@gmail.com*

Германій – один із небагатьох ультрамікроелементів, що за даними ВООЗ есенціальний для фізіологічного функціонування в організмі людини і тварин у мікрокількостях. Доведено, що водорозчинні сполуки Ge мають високу фізіологічну активність, проте окремі його мінеральні комплекси виявляють токсичну дію. Тоді як органічні сполуки Ge, що містяться в багатьох лікарських рослинах і продуктах харчування чи отримані синтетично не токсичні і є ефективними індукторами продукції інтерферону у ссавців. Науковий інтерес до органічних сполук Ge зріс у зв'язку з одержанням карбоксилатів Ge, у тому числі з використанням нанотехнологій, що характеризуються високою фізіологічною активністю та широким спектром біологічної дії. Доведено, що координаційні сполуки Ge з різними біолігандами виявляють в організмі різновекторну дію, зокрема, каталітичну, мембраностабілізуючу, біоенергетичну, регуляторну. Дослідженнями фізіологічного впливу органічних сполук Ge на організм людей і тварин встановлено, що цей елемент накопичується в шлунку, тонкому кишечнику, кістковому мозку, селезінці і крові. Високий вміст Ge у шлунку і кишечнику вказує, що процес його всмоктування в кров має пролонгований період. Встановлено, що в крові органічний Ge виконує функції передачі O<sub>2</sub> аналогічно гемоглобіну, оскільки бере участь у процесі перенесення кисню

в тканинах організму, попереджаючи розвиток гіпоксії на тканинному рівні. Органічні сполуки Ge (гідроксигерматрани), як і карбоксилати, мають імуностимулюючу дію. За цих умов виникає індукція вироблення  $\gamma$ -інтерферону, який бере участь в активації Т-лімфоцитів, клітин-кілерів і макрофагів, або формується імуносупресивний ефект за рахунок здатності до пригнічення синтезу антитіл. Молекули германійорганічних сполук інгібують згубну дію на клітини, у тому числі крові ссавців, іонів водню, доставляючи до них кисень і стимулюючи їхню взаємодію, проте руйнують ракові клітини, зменшуючи їх електричний заряд. Отже, органічні сполуки германію виконують в організмі низку фізіологічних впливів, що зумовлені імуностимулюючими, гепатопротекторними, протизапальними, антиоксидантними, протипухлинними та анестезуючими властивостями. Вони захищають організм від електромагнітного та радіаційного випромінювання, сприяють засвоєнню вітамінів, регулюють процеси травлення, підвищують працездатність і прискорюють відновлення організму після важких фізичних навантажень. Однак механізми такого широкого спектра фізіологічного впливу нині вивчені недостатньо.

## **МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЯЄЧНИКІВ ТЕЛИЦЬ ПРИ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

**М. І. Шкіль**

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій  
ім. С. З. Гжицького, Львів, schkilmarta@gmail.com*

Проблема нейрогуморальної регуляції фізіологічної функції яєчників має велике значення для процесів відтворення. Серед причин, що викликають порушення плодючості, значна частина припадає на функціональні розлади яєчників. Ми в своїх дослідях поряд із гормональними препаратами застосовували такі біологічно активні речовини, як вітаміни групи В та мікроелементи йод і цинк. Досліди проводили на телицях віком 14-18 міс живою масою 330-360 кг. Було відібрано 4 групи тварин. Перша група служила контролем. Другій групі вводили вітаміни групи В. Третій групі - препарат, який містив йод і цинк. Четвертій групі - вітаміни групи В, цинк і йод. Усім тваринам вводили препарат фолікотропін у стимулюючій дозі (20-30 ОД). Безпосередньо після забою тварин відбирали яєчники. Маса яєчників телиць при застосуванні фолікотропіну з мікроелементами (J, Zn) зростає на 29,4 %, а при поєднаному застосуванні фолікотропіну з вітамінами групи В та мікроелементами йодом і цинком збільшується на 70,5 %. Гістоморфологічними дослідженнями яєчників тварин контрольної та дослідних груп показано, що при застосуванні як вітамінів групи В, так і мікроелементів знижується відсоток атретичних фолікулів відповідно на 30 і 37,5 %, а при поєднаному застосуванні гормону, вітамінів і мікроелементів відсоток атрезії фолікулів ще понизився до 28,0 %. Морфологічними дослідженнями центральної зони яєчників тварин третьої дослідної групи виявлено активне формування дрібних, вторинних фолікулів, при цьому атрезія була виявлена лише на ранніх стадіях, а васкуляризація органу була добре виражена, що відповідало функціональному навантаженню яєчників. Отже, як засвідчили наші гістоморфологічні дослідження, під дією мікроелементів (J і Zn) та вітамінів групи В ( $B_1 + B_2 + B_6 + B_C + B_{12}$ ) у поєднанні із стимулюючими дозами фолікотропіну підвищується морфогенна активність білкової оболонки та стромальної тканини периферичної зони кіркової речовини. Це позитивно впливає на посилення росту примордіальних і первинних фолікулів, а також знижувало відсоток атрезії цих фолікулів та значно збільшує кількість повноцінних яйцеклітин, що може мати важливе значення в технології трансплантації ембріонів худоби.



## ВІКОВА ФІЗІОЛОГІЯ

### ЧАСТОТА ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ K121Q ГЕНА ЕКТОНУКЛЕОТИД ПІРОФОСФОТАЗИ/ФОСФОДІЕСТЕРАЗИ 1 У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ ЗА ВІКОМ ВИЯВЛЕННЯ ЗАХВОРЮВАННЯ

**I.В. Грибова, О.А. Обухова**

*Сумський державний університет, Суми, Україна, vasilisa-gribova@yandex.ua*

Серед генетичних чинників важливе значення у розвитку цукрового діабету 2 типу (ЦД 2 типу) займає ген ектонуклеотид пірофосфатази/фосфодіестерази 1 (*ENPP1*), фермент якого каталізує гідроліз 5' фосфодієфірних зв'язків у структурі аденінових нуклеотидів. Доведений зв'язок поліморфізму четвертого екзону K121Q (rs1044498) з ЦД 2 типу. Вік – є одним із факторів ризику, чим старшою є людина, тим більшою є загроза виникнення в неї діабету. Ймовірність появи захворювання зростає у людей після 45 років. Метою нашої роботи було вивчення частоти алельних варіантів гена *ENPP1* поліморфного варіанту K121Q у хворих на цукровий діабет 2 типу за віком виявлення захворювання. У дослідженні була використана венозна кров 163 хворих на ЦД 2 типу. ДНК виділяли з цільної крові з використанням наборів D1Atom DNA Prep 200 («Isogen»). Поліморфізм K121Q гена *ENPP1* вивчали методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. В результаті проведеної роботи було вивчено розподіл генотипів поліморфного варіанта K121Q гена *ENPP1* у хворих на ЦД 2 типу за віком виявлення захворювання. Виявлено, що середній вік пацієнтів був 65,2±0,64 роки. Всіх хворих було розділено на чотири групи: I – до 45 років, II – 45-59 років, III – 60-74 років, IV – після 75 років. З'ясовано, що співвідношення генотипів KK та KQ+QQ у I становило 77,8 і 22,2%, у II – 64,0 і 36,0%, у III – 67,7 і 39,3%, та у IV – 100 і 0% відповідно (P=0,334). Таким чином, можемо зробити висновок, що не існує зв'язку між поліморфізмом K121Q гена *ENPP1* і віком виявлення захворювання у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу.

## ПСИХОФІЗІОЛОГІЯ

### ЗОРОВІ ВИКЛИКАНІ ПОТЕНЦІАЛИ У РІЗНІ ФАЗИ ДИХАЛЬНОГО ЦИКЛУ ПІД ЧАС СПРИЙНЯТТЯ ЕМОЦІЙНИХ ЗОБРАЖЕНЬ У ЛЮДЕЙ З СЕРЕДНІМ ТА ВИСОКИМ РІВНЕМ НЕЙРОТИЗМУ

**С.О. Собіщанський, А.О. Чернінський, М.Ю. Макарчук**

*Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Україна, s.sobishchanskyi@gmail.com*

Під час реєстрації електричної активності нюхової цибулини на низхідній фазі респіраторних хвиль можна спостерігати високочастотну активність, що дає підстави припустити неоднорідність протікання нейрональних процесів у різні фази дихального циклу. Подібна електрична активність спостерігається практично у всіх структурах лімбічної системи. Водночас робота лімбічних структур може впливати на загальний рівень реактивності та лабільності нервової системи. Відомо, що шкала нейротизму є однією з основних характеристик емоційної реактивності людини. Зважаючи на це, метою нашої роботи було проаналізувати залежність характеристик зорових викликаних потенціалів головного мозку людини від фаз зовнішнього дихання у людей із середнім та високим рівнем нейротизму під час сприйняття емоційних зображень. Обстежено 24 добровольці обох статей 17–18 років які за рівнем нейротизму були поділені на дві групи по 12 осіб кожна. Завданням добровольця було стежити за появою емоційно забарвлених зображень (International Affective Picture System – IAPS) на моніторі, під час чого реєстрували викликані потенціали (ВП). Аналізували середні значення амплітуд ВП у часових інтервалах: -200-0, 0-50, 50-80, 80-140, 120-200, 180-240, 200-300, 250-400, 400-650, 650-900, 900-1000 мс відносно початку експозиції стимулу. Фази дихання реєстрували за допомогою приладу на основі термочутливого елемента, розміщеного біля ніздрі. Викликані потенціали накопичувалися залежно від фази дихання, на яку припадало



пред'явлення стимулу. Порівнювали показники ВП, накопичені у фазах вдиху і видиху у людей з середнім та високим рівнем нейротизму. З'ясовано, що викликані потенціали, зареєстровані під час вдиху та видиху, практично не відрізнялися за формою коливань, проте їх амплітуда дещо різнилася в осіб з середнім та високим рівнем нейротизму. В обох групах амплітуда ВП була більшою під час вдиху в порівнянні з фазою видиху в часових діапазонах: 80-140 мс у відведеннях Т3 і О2; 120-200 мс у відведенні Fp2; 180-240 мс у відведеннях F4 та Т3. В осіб з високим рівнем нейротизму середні значення амплітуд були більшими під час фази вдиху у порівнянні з фазою видиху у часових діапазонах: -200-0 мс у відведенні Т5; 0-50 мс у відведеннях Т5 і О1. В осіб з середнім рівнем нейротизму середні значення амплітуд були більшими під час фази вдиху у порівнянні з фазою видиху у часовому діапазоні -200-0 мс у відведенні Т6, в той же час у часовому проміжку 0-50 мс у відведеннях Fp2, С4 та Сz амплітуди ВП були більшими під час фази видиху у порівнянні з фазою вдиху. Отримані нами результати вказують на те, що викликані потенціали у різні фази зовнішнього дихання не є однаковими за амплітудою, що в свою чергу може свідчити про різну кількість одночасно активованих нейронних мереж під час фази вдиху та видиху в осіб з середнім та високим рівнем нейротизму.

## КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ

### АНАЛІЗ ЗВ'ЯЗКУ T2255C ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА ВІТАМІН К-ЕПОКСИДОРЕДУКТАЗИ (VKORC1) З ГОСТРИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ В ОСІБ З НОРМАЛЬНИМ І ПІДВИЩЕНИМ АРТЕРІАЛЬНИМ ТИСКОМ

**В.Ю. Гарбузова, О.В. Атаман, Є.І Дубовик.**

*Сумський державний університет, Україна, v.garbuzova@med.sumdu.edu.ua*

У роботі представлений аналіз асоціації T2255C-поліморфізму гена VKORC1 з розвитком гострого коронарного синдрому (ГКС) в осіб з нормальним і підвищеним артеріальним тиском. Використано венозну кров 118 хворих на ГКС (22% жінок і 78% чоловіків) віком від 40 до 73 років. Контрольна група - 234 пацієнти. T2255C (rs2359612)-поліморфізм гена VKORC1 визначали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Показано, що і у контрольній групі, і серед хворих з ГКС, розподіл генотипів за T2255C-поліморфізмом гена VKORC1 не відрізнявся у пацієнтів з артеріальною гіпертензією і в осіб з нормальним АТ. Не виявлено відмінностей і при порівнянні хворих з ГКС та пацієнтів контрольної групи, що мали як нормальний артеріальний тиск ( $P=0,574$ ), так і артеріальну гіпертензію ( $P=0,681$ ). Встановити статистично значиму відмінність між частотою артеріальної гіпертензії у пацієнтів з різним генотипом не вдалося і при об'єднанні наведених вище двох груп в одну ( $P=0,216$ ). Аналіз зв'язку між артеріальним тиском і ГКС у підгрупах пацієнтів, утворених на підставі їхнього генотипу (Т/Т, Т/С, С/С) виявив статистично значиму залежність між рівнем АТ і ймовірністю розвитку ГКС в усіх підгрупах пацієнтів. В осіб з артеріальною гіпертензією усіх генотипів ГКС виявлявся частіше, ніж у пацієнтів з нормальним артеріальним тиском. Такиим чином, T2255C-поліморфізм гена VKORC1 істотним чином не впливає на зв'язки між артеріальним тиском та ГКС. Будучи доведеним фактором ризику, артеріальна гіпертензія є асоційованою з ГКС незалежно від генотипу пацієнтів за цим однонуклеотидним поліморфізмом.

### ЗВ'ЯЗОК T134967G-ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА ANKH ІЗ РОЗВИТКОМ ГОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМУ У ОСІБ ЖІНОЧОЇ ТА ЧОЛОВІЧОЇ СТАТІ

**І.О. Розуменко, С.М. Півень**

*Сумський державний університет, Україна, inchik-27486@yandex.ua*

У роботі наведено аналіз зв'язку T134967G-поліморфізмом гена ANKH із розвитком гострого коронарного синдрому в осіб жіночої і чоловічої статі. У дослідженні використано венозну кров 118 хворих із ГКС (22% жінок і 78% чоловіків) середнім віком  $55,9 \pm 0,89$  років. Контрольна група

становила 110 практично здорових осіб. T134967G (rs187483)-поліморфізм гена *ANKH* визначали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів. Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. Достовірність відмінностей визначали за  $\chi^2$ -критерієм. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним. Виявлено, що не існує достовірної відмінності у розподілі алельних варіантів за T134967G-поліморфізмом серед хворих із ГКС та здорових пацієнтів як в осіб жіночої ( $\chi^2 = 1,951$ ;  $P = 0,163$ ), так і чоловічої ( $\chi^2 = 2,919$ ;  $P = 0,088$ ) статі. Статистично значимого зв'язку між генотипами (T/T і T/G+G/G) за вивченим поліморфізмом і статтю пацієнтів в контролі ( $\chi^2 = 1,224$ ;  $P = 0,269$ ) і серед хворих із ГКС ( $\chi^2 = 0,355$ ;  $P = 0,551$ ) встановлено не було. Також не виявлено достовірного зв'язку між статтю пацієнтів і розвитком ГКС у гомозигот за основним алелем (T/T) ( $\chi^2 = 1,120$ ;  $P = 0,290$ ) і у носіїв мінорного алелю (T/G+G/G) ( $\chi^2 = 0,089$ ;  $P = 0,765$ ). Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок, що не існує зв'язку між поліморфізмом T134967G гена *ANKH* і розвитком ГКС в осіб жіночої і чоловічої статі.

## ФІЗІОЛОГІЯ ТРАВЛЕННЯ

### EFFECT OF ETHANOL ON CHOLECYSTOKININ-STIMULATED MITOCHONDRIAL RESPIRATION AND AMYLASE SECRETION OF RAT PANCREATIC ACINAR CELLS

**O.O. Sidorova, D.M. Voloshyn, B.O. Manko, V.V. Manko**

*Ivan Franko National University of Lviv, mankobo@gmail.com*

Acute pancreatitis morbidity is rapidly growing in Ukraine (Dronov, Kovalska, 2010) due to high alcohol consumption. Mitochondria are one of most important targets of negative factors, contributing to development of this disease (Odinokova et al., 2009; Gerasimenko et al., 2011). The influence of ethanol on mitochondrial function of pancreatic acinar cells in rest and in state of active secretory activity was the aim of this study. Experiments were carried out on 8 wild-type white male rats (250–300 g). Pancreatic acini were isolated with modified method of Williams (1978) and incubated in modified Eagle's medium. The rate of oxygen consumption was measured at 37 °C using a Clark Oxygen electrode. Amylase activity was determined by Smith, Roe (1949). Differences were considered statistically significant with  $P \leq 0.05$  by paired t-test. Ethanol (20 mM) increased the rate of basal respiration of acinar cells by 25.8% after incubation for 30 min, and by 29.2% – after 60 minutes of incubation, but did not affect the FCCP-uncoupled respiration. Ethanol had no effect on basal amylase release over 30–60 min. Physiological stimulation of secretion with cholecystokinin (0.1 nM, 30 min) resulted in increase of the basal respiration rate by 32.8%, FCCP-uncoupled respiration – 15.2% and amylase secretion – by 481%. Hyperstimulation with cholecystokinin (10 nM, 30 min) had no effect on the basal respiration rate of acinar cells, but reduced the rate of FCCP-stimulated respiration by 22.6% and stimulated amylase release by 251% after 30 min. Similar results were obtained after 60 min of cholecystokinin action. Ethanol after 30 minutes of its action reduced stimulated by cholecystokinin (0.1 nM) respiration by 23.2%, maximal oxidative capacity – by 17.3% and amylase secretion – by 25.0%. After 60 min of incubation the decreases were similarly observed. Ethanol did not influence the respiration of cells, hyperstimulated by cholecystokinin, yet decreased the amylase release by 19.4% after 60 minutes of its action. While both ethanol action and physiological stimulation with cholecystokinin increase the respiration rate of pancreatic acinar cells, the interaction of these agents has negative implications on mitochondrial respiration.

### TiO<sub>2</sub> NANOPARTICLES AS MODULATORS OF STOMACH SMOOTH MUSCLES FUNCTION

**O.V. Tsybalyuk, A.Yu. Nyporko, A.M. Naumenko, T.L. Davidovska, V.A. Skryshevsky**

*Taras Shevchenko Kyiv National University, Institute of High Technology, Ukraine, otsymbal@bigmir.net*

Owing unique properties (huge internal surface area, surface chemical reactivity) the nano TiO<sub>2</sub> is attractive materials for chemical and biosensors applications. The aim of our work consisted in investigation of the

effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles (average size 21±5 nm) on contractile activity of circular smooth muscles (SM) from rat stomach. The cumulative increase in the concentration of TiO<sub>2</sub> ( $2 \cdot 10^{-4}$  -  $5 \cdot 10^{-2}$  mg/ml) is accompanied by a dose-dependent inhibition of high-K<sup>+</sup>- and acetylcholine-induced contractions. However, when using single TiO<sub>2</sub> high concentrations ( $2.5 \cdot 10^{-2}$  or  $5 \cdot 10^{-2}$  mg/ml) the significant increase of acetylcholine- and K<sup>+</sup>-induced contractions are observed. The activation of acetylcholine-induced contractions is essentially inhibited by gallopamil, and *vice versa* – the atropine presence didn't eliminate TiO<sub>2</sub>-stimulated activation of high-K<sup>+</sup>-induced contractions. Nanoparticles didn't affect the contractions caused by the release of Ca<sup>2+</sup> from sarcoplasmic reticulum, but their effects are essentially eliminated via previous inhibition of mitochondria function by sodium aside. These results let to suppose that presence of TiO<sub>2</sub> in high concentrations activates the Ca<sup>2+</sup> income through plasma membrane. Because of effects of TiO<sub>2</sub> are essentially eliminate via inhibition of mitochondria function, it's possible to assume the importance of these organelles to realize TiO<sub>2</sub>-mediated modulation of contractile activity of gastric SM.

## АВТОРАМ ПРО ЖУРНАЛ

Для публікації в «Фізіологічному журналі» приймаються оригінальні статті з основних розділів фізіології, а також огляди (на замовлення редакції), які відображають найбільш актуальні її проблеми, статті з історії вітчизняної та світової фізіологічної науки, які висвітлюють генезис і еволюцію ідей, виникнення та розвиток наукових шкіл, творчі портрети вчених, забуті імена науки, дискусійні статті, рецензії на статті та нові видання, наукову хроніку, оформлені відповідно наступних вимог.

### Подання та робота з рукописами

Автор подає рукопис статті у друкованому вигляді (два примірники, разом з оформленим ліцензійним договором) та в електронній формі.

Друковані примірники рукопису можна надіслати звичайною поштою (простим листом) або особисто принести до редакції.

В електронному форматі рукопис можна подати на компакт-диску (у разі відправлення поштою вкласти його до конверта разом з друкованими примірниками), на USB-накопичувачі (тільки під час подання особисто!) або електронною поштою як прикріплені файли.

Компакт-диск і USB-накопичувач мають бути попередньо перевірені надійною антивірусною програмою і містити тільки файли рукопису.

Правила оформлення рукопису подано нижче.

### Поштова адреса редакції:

Редакція “Фізіологічний журнал”, Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, вул. Богомольця, 4, Київ 24, 01024

Телефон для довідок: 256-25-27; 253-07-45

Адреса електронної пошти:

fiziol\_z@biph.kiev.ua

Матеріали статті – текст, резюме, список літератури, підписи до рисунків і таблиці – оформлюються одним файлом. Окремим файлом оформлюється кожний рисунок. Усі сторінки рукопису нумеруються. Крім того, в тексті слід указати де саме треба розмістити рисунки/таблиці. Формат файлів для тексту і таблиць – документ MS Word (doc, docx або rtf), для рисунків та іншого ілюстративного

матеріалу – tif, bmp, wmf, gif, jpg, eps або ps

На окремій сторінці варто навести відомості про авторів: прізвище, ім'я, по батькові поштову і обов'язково електронну адресу номери службових й домашніх телефонів кодом міста, номери мобільних телефонів. Якщо авторів кілька і вони працюють у різних установах, слід позначити арабськими цифрами (індексами) у кінці прізвищ авторів відповідність установам, в яких вони працюють.

Датою отримання рукопису вважається дата надходження його до редакції. У разі одержання статті, оформленої з порушенням цих правил, редакція залишає за собою право статтю не приймати, не рецензувати не повертати авторам, про що їх повідомлять.

Поданий до журналу рукопис обов'язково рецензується провідними спеціалістами у відповідній галузі. У разі необхідності рукопис направляється авторам на доопрацювання. Після доопрацювання рукопису згідно із зауваженнями рецензентів автор надсилає його до редакції разом із відповідями рецензентів протягом одного місяця. Рукопис, що отримав недостатньо високу оцінку рецензентів відхиляється як невідповідний профілю вимогам до рівня публікацій журналу.

Для контрольного ознайомлення з відредагованою статтею редакція надсилає авторові електронною поштою верстку яку треба терміново вичитати і не пізніше трьох наступних днів електронною поштою повідомити редакцію про виявлені помилки (зазначивши сторінку, колонку, абзац, рядок де слід зробити виправлення) або про їх сутність. На цій стадії роботи з рукописом не дозволяється заміна тексту, рисунків, таблиць. Якщо відповідь від авторів вчасно надійшла, редакція залишає за собою право затримати публікацію статті.

### Загальні вимоги до рукописів

Обсяг експериментальної роботи зі списком цитованої літератури, таблицями та рисунками з підписами, що пояснюють одержані результати (все на окремих сторінках), не перевищувати 20 сторінок (40 тис. знаків огляду – 30 сторінок (60 тис. знаків), надрукованих на принтері.

Рисунки, фотографії, схеми тощо можуть бути чорно-білими або кольоровими.

---

## ЛІЦЕНЗІЙНИЙ ДОГОВІР НА ВИКОРИСТАННЯ ТВОРУ

м. Київ

«\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_ р.

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України як засновник та видавць журналу «Фізіологічний журнал (далі – «Виконавець»)» в особі директора академіка НАН України О.О.Кришталія, що діє на підставі Статуту, з одного боку, та Автор(и)

---

(Прізвище, імя , по-батькові автора(ів))

(далі – «Автор», з іншого боку, разом іменовані «Сторони», підписали цей Договір (майнове виключне право) про наступне:

1. Автор(и) безоплатно надають Видавцю виключну ліцензію на друк та використання письмового твору (далі «Стаття»)

---

---

---

в тому числі права дозволяти або забороняти використання Статті або її частини третіми особами у будь-якій формі і будь-якими способами.

2. З моменту підписання цього договору (за умови прийняття Статті «до друку») Видавцеві належить право оприлюднити, редагувати, адаптувати і модифікувати, перекладати на іншу мову, видавати, а також розповсюджувати Статтю необмеженим накладом у будь-якому вигляді та форматі на різних носіях інформації і будь-якими способами.

3. Ліцензія на використання Статті надається Видавцю на весь термін дії авторського права на зазначену вище Статтю і має силу на території всіх країн світу.

4. Виконавець набуває право субліцензувати права, отримані за цим Договором, іншим установам та особам.

5. Всі копії Статті як паперові, так і електронні (включаючи CD, DVD та інші електронні засоби масової інформації, Інтернет і інші мережі передачі даних і бази даних), мають містити інформацію про авторські права Видавця і повне бібліографічне посилання на Статтю.

6. У разі, якщо рукопис Статті не буде прийнято до друку протягом 18 місяців (про що Автору буде повідомлено в письмовій формі) або відкликано Автором до прийняття Статті «до друку», цей Договір втрачає силу і анулюється, а авторські права повертаються Автору.

7. Видавець підтверджує збереження за Автором наступних прав:

- авторське немайнове право згідно з чинним законодавством України;
- патентні права, права на торгівельні марки і права на будь-які процеси, речовини, матеріали та методи, описані у Статті;
- права на виготовлення різних копій, зокрема електронних, винятково для власного використання або колегами Автора за умови, що копії Статті не будуть використані ним для продажу та для систематичного розповсюдження;
- права наступного використання Автором всієї Статті або будь-яких її частин в оглядах, дисертаційних роботах, книгах, лекціях.



8. Автор гарантує, що Стаття не була раніше надрукована і не буде надрукована будь-де до її публікації Видавцем, а також те, що авторські права на її публікацію не передавались іншим видавництвам.

9. Автор гарантує, що Стаття є оригінальною роботою Автора і не є копією будь-якої іншої роботи. Автор гарантує, що ним одержано всі необхідні дозволи на використання матеріалів у своїй Статті, що охороняються авторським правом.

10. Автор гарантує, що використання Видавцем авторських прав, набутих внаслідок цього Договору, не спричинить порушення авторських прав будь-яких осіб або організацій, а також не призведе до розголошення секретних або конфіденційних відомостей.

11. Видавець має право встановлювати правила (умови) прийому та опублікування матеріалів Журналу. Редколегії журналу належить виключне право відбору та/або відхилення матеріалів, що надсилаються до редакції з метою їх опублікування. Рукопис, що спрямовується Автором (Співавторами) до редакції, поверненню не підлягає. Листування щодо відхилення статті редколегією Журналу не підтримує. Видавець не несе відповідальність за неправдиву інформацію надану авторами.

12. Договір є чинним з дати його підписання Сторонами та укладається на термін чинності авторського права на Статтю. Відносини, що не врегульовані цим Договором, регулюються чинним законодавством України.

13. Автори виключно для цілей виконання даного договору надають для внутрішнього користування Видавця згоду на обробку та використання зазначених у цьому Договорі персональних даних згідно з Законом України "Про захист персональних даних". Усі положення цього Закону роз'яснені Видавцем Автору.

14. Всі доповнення, додатки, акти складаються Сторонами в письмовому вигляді і підписуються вповноваженими представниками Сторін.

15. Цей Договір складено у двох примірниках українською мовою, тексти яких автентичні, по одному для кожної зі Сторін.

#### **Підписи Сторін:**

##### **Автор**

П.І.Б. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Установа: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Тел. \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_

Підпис \_\_\_\_\_

МП

##### **Видавець**

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця  
НАН України

вул. Богомольця, 4, 01024, Київ, Україна

Тел. (044) 256-25-27

E-mail: [fiziol\\_z@biph.kiev.ua](mailto:fiziol_z@biph.kiev.ua)

Директор Інституту,

академік НАН України

О.О. Кришталь

Підпис \_\_\_\_\_

МП

## CONTENTS

A.V.Kotsuruba, N.A.Dorofeyeva, V.F.Sagach. NOS uncoupling is accompanied with induction of the oxidative stress and the cardiohemodynamics disturbances in hypertension	3
N.A.Dorofeyeva, A.V.Kotsuruba, L.A.Mogilnitskaya, A.E.Malyna, A.I.Kornelyuk, V.F.Sagach. Endothelial monocyteactivating factor II (EMAP II) cancels oxidative stress, constitutive nos uncoupling and induced violations of cardiac hemodynamics in hypertension (part II)	11
V.A. Yavorsky, E.A. Lukyanetz. Using the serial ramp recordings for rapid testing of the generating ability of impulse activity of isolated hippocampal neurons	19
P.I. Yanchuk, L. A. Slobodanyk. The role of hydrogen sulfide in regulation of circulation blood liver	28
V.A. Berezovskyi, L.M. Lisukha, Ye.I, Stepanova , I.Ye Kolpacov. The influence of the normobaric hypoxia for the breathing indexes of the children lived in radioactive contaminated territories	35
O.Yu Iefimenko, I.O. Savchenko, T.M. Falalyeyeva, T.V. Beregova, N.M. Zholobak, O.B. Shcherbakov, Yu.V. Malyukin, M. Ya Spivak. The influence of nanodisperse cerium dioxide on ontogenetic changes of antioxidant system in the mucosa of the stomach and colon in rats	44
Yu. Shevchenko, L. Vesnina, I. Kaydashev. Features of eating behavior in persons with normal and increased body weight	51
V. A. Kovaleva, D. V. Shelest, L.I. Ostapchenko. The content of lipids and products of their peroxidation of rat thymocytes in experimental ulcerogenesis	59
V.A.Berezovskyi, I.G.Litovka,S.P.Veselskyi, R.V.Janko, U.A.Zhernoklev. The effect of exogenous melatonin on bone remodeling	64
O.O. Vinogradova, P.I. Yanchuk, O.M. Pasichnichenko. Role of thromboxane and leukotrienes in mechanisms of contractile reactions of portal vein, induced by acetylchline and phenylephrine	70
N.M. Shpakova, N.V. Orlova, E.E. Nipot, D.I. Aleksandrova. Comparative study of mechanical stress effect on human and animal erythrocytes	75
O.A Melnychuk, O.P. Motuziuk , S.Ye. Shvayko. Changing of ischemic m. soleus tetanic contraction parameters in rats with chronic alcohol intoxication	81
I.V. Redka, O.YU. Mayorov. Nonlinear electroencephalographic correlates of audio-motor integration in boys with obtained visual dysfunction	90
<b>REVIEWS</b>	
T.V. Serebrovska and V.B. Shatilo. Remote ischemic preconditioning versus intermittent hypoxia training: a comparative analysis for cardioprotection	99
<b>Further proceedings until the 19th Congress of P.G. Kostyuk Ukrainian Physiological Society. (24-26 May 2015)</b>	120