

Фізіологічний журнал

ТОМ 61 № 4 2015

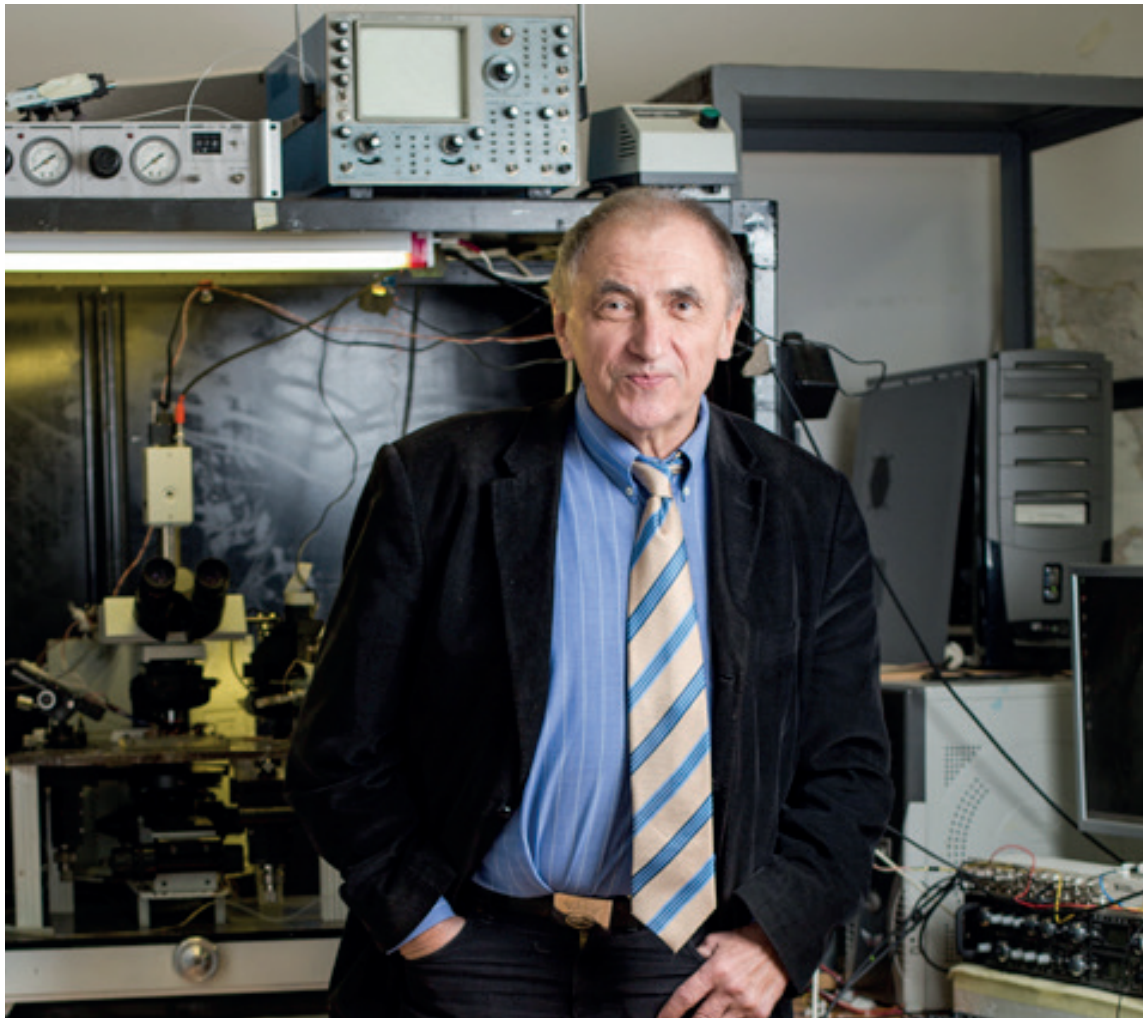
Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Lunko O.O., Isaev D.S., Krishtal O.O., Isaeva E.V.</i> Thrombin modulates persistent sodium current in cal pyramidal neurons of young and adult rat hippocampus	5
<i>Дорофеева Н.О., Коцюруба А.В., Коп'як Б.С., Сагач В.Ф.</i> Фізичне тренування відновлює спряження конститутивних NO-синтаз та кардіогемодинаміку при гіпертензії (частина III)	11
<i>Кулик В.Б., Чижмаков І.В., Волкова Т.М., Максимюк О.П., Кришталь О.О.</i> Роль фосфоінозитидного сигнального шляху в опіоїдному контролі P2X ₃ -рецепторів первинних сенсорних нейронів	22
<i>Риков С.О., Биць Ю.Ю., Гончаров С.В., Досенко В.Є.</i> Поліморфізм G ⁻⁴⁷ →A промотору гена γ-кристаліну впливає на рівень його експресії у тромбоцитах	30
<i>Драчук К.О., Дорофеева Н.О., Коцюруба А.В., Сагач В.Ф.</i> Вплив модуляції синтезу H ₂ S пропаргілгліцином на показники кардіогемодинаміки у старих щурів	35
<i>Резніков О.Г., Носенко Н.Д., Тарасенко Л.В., Лимарєва А.А.</i> Зміни метаболізму тестостерону в мозку та статевої поведінки самців щурів після пренатальної дії метилдофу та іммобілізаційного стресу	41
<i>Шипшина М.С., Веселовський М.С., М'ясоєдов М.Ф., Шрам С.И., Федулова С.А.</i> Вплив пептиду семакс на синаптичну активність і короточасну пластичність глутаматергічних синапсів ко-культивованих нейронів спінальних гангліїв і дорсального рогу спинного мозку	48
<i>Владімірова І.В., Філіппов І.Б., Падурару О.Н., Шуба Є.Я., Кулієва Є.М. Шуба Я.М.</i> Вплив ускладнень діабету на нервово-м'язову передачу в гладеньких м'язах сечового міхура щурів	56
<i>Любич Л.Д., Лісяний М.І.</i> Вплив супернатанта прогеніторних нейроклітин на цитотоксичну функцію лімфоцитів у щурів з гліомою	63

<i>Белінська І.В., Линчак О.В., Цивінська С.М., Рибальченко В.К.</i> Морфофункціональна характеристика клітин крові за хронічного впливу похідного малеїміду - інгібітора протеїнкіназ	71
<i>Паталах І.І., Таланов С.А., Ревка О.В., Дроботько Т.Ф.</i> Активація протеїну С в процесі модельного тромболізису in vitro	78
<i>Бречка Н.М., Невзоров В.П., Бондаренко В.А., Малова Н.Г., Селюкова Н.Ю.</i> Дослідження субмікроскопічної архітекtonіки клітин Сертолі й Лейдіга після впливу серотоніну гідрохлориду та можливості корекції метаботропними засобами	85
<i>Король Л.В.</i> Шляхи активації перекисного окиснення ліпідів і білків при хронічній хворобі нирок	92
<i>Гулька О.В.</i> Спектральні показники варіабельності ритму серця у студентів з різним ступенем навчального навантаження	98
<i>Коровіна Л.Д., Запорожець Т.М.</i> Стан автономної нервової системи студентів і його зв'язки з фізичною та інтелектуальною працею	105
ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ	
Олег Олександрович Кришталь: до 70-річчя з дня народження	111
До 75-річчя з дня народження В.М. Києнка	114



**Видатному українському вченому-біофізику, нейрофізіологу, дійсному члену
Національної академії наук України, члену-кореспонденту РАН, члену
Європейської академії наук Олегу Олександровичу Кристалю 5 липня 2015 р.
виповнилося 70 років**

Thrombin modulates persistent sodium current in CA1 pyramidal neurons of young and adult rat hippocampus

O. O. Lunko, D. S. Isaev, O. O. Krishtal, E. V. Isaeva

*O. O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
E-mail: lunko@biph.kiev.ua*

Serine protease thrombin, a key factor of blood coagulation, participates in many neuronal processes important for normal brain functioning and during pathological conditions involving abnormal neuronal synchronization, neurodegeneration and inflammation. Our previous study on CA3 pyramidal neurons showed that application of thrombin through the activation of specific protease-activated receptor 1 (PAR1) produces a significant hyperpolarizing shift of the activation of the TTX-sensitive persistent voltage-gated Na^+ current (I_{NaP}) thereby affecting membrane potential and seizure threshold at the network level. It was shown that PAR1 is also expressed in CA1 area of hippocampus and can be implicated in neuronal damage in this area after status epilepticus. The aim of the present study was to evaluate the effect of thrombin on I_{NaP} in CA1 pyramidal neurons from adult and young rats. Using whole cell patch-clamp technique we demonstrate that thrombin application results in the hyperpolarization shift of I_{NaP} activation as well as increase in the I_{NaP} amplitude in both age groups. We have found that I_{NaP} in pyramidal neurons of hippocampal CA1 region is more vulnerable to the thrombin action than I_{NaP} in pyramidal neurons of hippocampal CA3 region. We have also found that the immature hippocampus is more sensitive to thrombin action which emphasizes the contribution of thrombin-dependent pathway to the regulation of neuronal activity in immature brain.

Key words: hippocampus, persistent sodium current, thrombin.

INTRODUCTION

The role of blood coagulation factor thrombin is well characterized in the processes of hemostasis, proliferation and inflammation [1]. In addition to these functions serine protease thrombin also acts as a hormone-like neuromediator and together with serpins regulates the protease-activated receptors (PAR) in the CNS [2]. PARs belong to the superfamily of 7-domain transmembrane G-protein coupled receptors which include four subtypes (PAR1-4). They are involved in the regulation of nerve cells morphology [3], and play an important role in learning and memory [4]. Through PAR serine proteases also regulate synaptic plasticity [5] and modulate neuronal activity [6]. Among four types of PAR family thrombin preferentially activates PAR1, which is also a

major thrombin receptor in the brain [7]. The prominent expression of PAR1 mRNA is found in the hippocampus, as well as in the cerebellum, thalamic nuclei and cerebral cortex [8].

It was shown that in low concentrations thrombin exerts neuroprotective properties, while at high concentrations PAR1 activation leads to the damage of neurons and astrocytes [9]. Elevation of thrombin activity is marked after ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury (TBI) [9]. However, the molecular mechanism of thrombin-induced neuropathology is still remains unclear. Recent finding showed that thrombin activation of PAR1 leads to the epileptiform activity in CA3 area of hippocampal slices [10]. Our group revealed that one of the mechanisms that could contribute to the increased excitability produced by application of thrombin in CA3 pyramidal neurons is the

hyperpolarization shift of persistent sodium current (I_{NaP}) activation induced by PAR1-dependent pathway [11]. I_{NaP} activates near resting membrane potentials and slowly inactivates during prolonged depolarizations. This TTX-sensitive sodium current have been shown to modulate subthreshold oscillations and is responsible for repetitive action potential generation [12]. I_{NaP} regulates excitability of neurons in different brain areas and modulates synaptic plasticity contributing intrinsic pacemaking activity [13]. Up-regulation of I_{NaP} in temporal lobe structures such as entorhinal cortex and hippocampus is known to be one of molecular mechanisms underlying epilepsy condition. For example, an increase of I_{NaP} after status epilepticus (SE) contributes to prevalence of intrinsically bursting phenotypes among CA1 pyramidal neurons [14]. Our recent paper have also shown that using the potent PAR1 antagonist SCH79797 in adult rats after lithium-pilocarpine SE have neuroprotective and antiepileptogenic effect [15]. These findings suggest that thrombin through PAR1 signaling plays an important role in hyperexcitation and neuronal damage in CA1 area. We hypothesize that I_{NaP} modulation could be possible mechanism of thrombin pathogenesis. Because studies of PAR1 participation in neuropathology of CA1 region were performed on adult rats and the study of the effect of thrombin on I_{NaP} was focused on CA3 pyramidal neurons of young rats [16] we aimed to evaluate the effect of thrombin on I_{NaP} obtained from isolated hippocampal CA1 pyramidal neurons of both ages.

METHODS

Experiments were carried out using Wistar rats P12-16 and P60-75. All experimental procedures were conducted in accordance with guidelines set by National Institutes of Health for the humane treatment of animals and approved by the Animal Care Committee of Bogomoletz Institute of Physiology. The experimental method was described previously in our paper

[17]. Briefly, rats were anaesthetised with sevoflurane and after decapitation the brain was quickly transferred to ice-cold (0-4°C) solution contained (in millimoles per 1 L): NaCl – 130, KCl – 5, CaCl₂ – 0.1, MgCl₂ – 5, NaH₂PO₄ – 1, Na₂HPO₄ – 1, NaHCO₃ – 26, glucose – 10 (pH 7.35). Hippocampal slices (400 μm thick) were obtained using vibratome (Campden Instruments, Loughborough, UK) and were left for one hour (temperature 20-22°C) in the solution contained (in millimoles per 1 L): NaCl – 130, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, NaH₂PO₄ – 1, Na₂HPO₄ – 1, NaHCO₃ – 26, glucose – 10 (pH 7.35). During these procedures solutions were bubbled with carbogen gas mixture (95% O₂/5% CO₂).

Enzymatic treatment of hippocampal slices was done during 15 min (32°C) with pronase E (2 mg/ml) in sucrose-based solution which contained (in millimoles per 1 L): sucrose – 290, KCl – 5, CaCl₂ – 0.5, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, glucose – 15 (pH 7.35). Previously we have shown that enzymes used for cell dissociation do not alter I_{NaP} kinetics [18]. After enzymatic treatment slices were washed in basic solution and vibrodissociated [19] in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) with following content (in millimoles per 1 L): NaCl – 140, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 20 (pH 7.35).

Electrophysiological experiments were done using patch-clamp technique in whole cell configuration using patch-clamp amplifier (A-M Systems, Calrsborg, WA). The resistance of pipettes was 3-4 MΩ. Pipettes were filled by intracellular solution (in millimoles per 1 L): CsF – 120, NaCl – 5, TEA-Cl – 30, EGTA – 10, TRIS – 10 (pH 7.2-7.3).

I_{NaP} activation was induced by slow depolarizing voltage ramp (30 mV/s) from holding potential of -80mV to 0 mV. The effect of thrombin on I_{NaP} was evaluated after 40 s of thrombin application. After registration recordings were analyzed using Origin 8.0. (“Origin Labs”, USA). Corrections of liquid junction potential errors were made as described

[20]. The subtraction of sodium current traces evoked by ramp-protocol before and after 1 μ M TTX reveals I_{NaP} . Voltage dependence of I_{NaP} conductance (G) was calculated from

$$G = \frac{I}{V - E_{Na}}$$

where I is the amplitude of I_{NaP} induced by potential V , and E_{Na} – calculated Nernst potential for Na^+ . Normalized activation curves were fitted by Boltzmann function. Statistical analysis was performed using Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA). All data are presented as mean \pm standard error. Unpaired Student's t test and two-way ANOVA test were used for statistical analysis. Differences in intergroup comparisons were acknowledged statistically significant if $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

We estimated the effect of thrombin application (10 U/ml) on I_{NaP} in isolated pyramidal CA1 neurons. Fig.1.A and Fig.2.A show representative current traces of I_{NaP} registration in rats two weeks and two months old, respectively. In young rats (Fig.1.B) thrombin induced the hyperpolarization shift of I_{NaP} activation ($V_{1/2}$ shifted from -49.6 ± 1.4 mV to -52.9 ± 0.8 mV, $n = 7$, $P < 0.005$). The same effect of thrombin was revealed in the group of adult rats ($V_{1/2}$ of I_{NaP} activation shifted from -51.4 ± 1.0 mV to -54.1 ± 1.3 mV, $n = 7$, $P < 0.001$, Fig.2.B). The difference of the effect of thrombin on I_{NaP} activation between age groups was not significant ($F(1, 12) = 0.97$, $P = 0.35$). Up-regulation of I_{NaP} amplitude after thrombin exposure was more pronounced in the group of young rats (Fig.3). I_{NaP} amplitude was increased from 30.7 ± 5.6 pA to 56.1 ± 7.6 pA ($194 \pm 16\%$, $P < 0.0005$, $n=7$) in young rats and from 68.7 ± 12.7 pA to 99.1 ± 14.9 pA ($149 \pm 7\%$, $P < 0.0005$, $n=7$) in adult ones. The effect of age on up-regulation of I_{NaP} amplitude, induced by thrombin, was significant ($F(1, 12) = 7.12$, $P < 0.05$).

In the current study we show that the effect of thrombin on I_{NaP} is age-dependent. Interest-

ing that expression of PAR1 decreases with age with the most marked decrease during a period between the second and third postnatal week [8, 21]. This finding could explain the age-related difference in the thrombin effect on I_{NaP} .

Our previous findings in hippocampal slices revealed that thrombin induces hyperpolarization shift of I_{NaP} activation in CA3 pyramidal neurons. This effect is mediated by PAR1 and requires PKC activation. In the current study we use isolated neurons to reduce space clamp errors. We show that thrombin produces not only a change in activation kinetics but also a significant I_{NaP} peak amplitude up-regulation. Such ef-

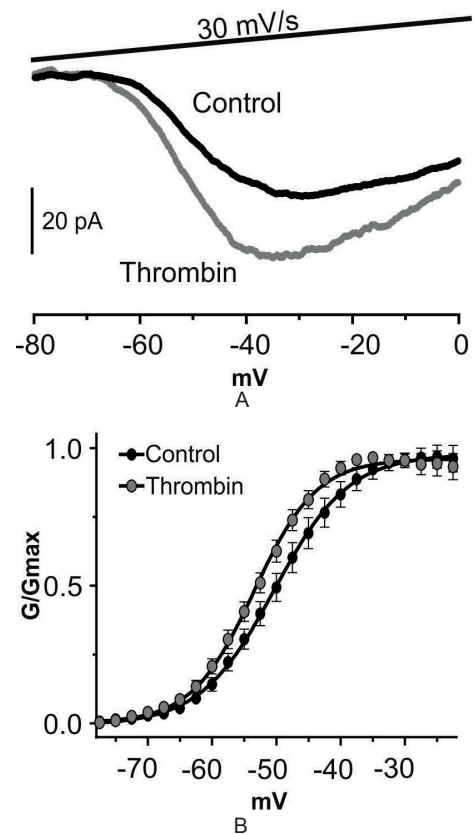


Fig. 1. Effect of thrombin application on I_{NaP} in CA1 pyramidal neurons isolated from young rats. (A) Representative smoothed sodium current traces obtained using slow depolarizing ramp protocol shown in the upper panel. Ramp stimulation was elicited from holding potential -80 mV to 0 mV. Thrombin application results in the increase of I_{NaP} peak amplitude. (B) Boltzmann fit of summarized curve of normalized activation voltage dependences before and after thrombin application. Thrombin induces hyperpolarization shift of I_{NaP} activation

fect could be a basis for neuronal hyperexcitation and capability for long-lasting generating action potentials. For example, it was shown in sensorimotor cortex that depolarization shift of voltage dependency of inactivation and higher current density of I_{NaP} in layer V compared to layer II/III was associated with generation of long depolarization plateau in response to depolarization impulse [22]. Increased I_{NaP} amplitude is also determined in rats with temporal lobe epilepsy after lithium-pilocarpine injection [23]. In CA1 region of hippocampus status epilepticus (SE)-induced modulation of I_{NaP} is associated with increase of fraction of bursting neurons [14].

In conclusion, this and previous findings [11] show that thrombin action on neuronal

excitability at least in part is mediated by I_{NaP} regulation in both CA3 and CA1 hippocampal areas. Taking together with studies on the synaptic transmission [24] these findings elucidate diverse molecular mechanisms of thrombin action on CNS, which may contribute to pathological conditions associated with BBB dysfunction.

**А.А. ЛУНЬКО, Д.С. ИСАЕВ,
О.А. КРЫШТАЛЬ, Е.В. ИСАЕВА**

ВЛИЯНИЕ ТРОМБИНА НА ПОСТОЯННЫЙ НАТРИЕВЫЙ ТОК В ПИРАМИДАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ CA1 ЗОНЫ ГИППОКАМПА МОЛОДЫХ И ВЗРОСЛЫХ КРЫС

Сериновая протеаза - тромбин, ключевой фактор свертывания крови, участвует во многих нейронных процессах, важных для нормального функционирования мозга и при патологических состояниях, сопровождающихся аномальной нейрональной синхронизацией, нейродегенерацией и воспалительными процессами. Наши предыдущие исследования на пирамидальных нейронах зоны CA3 показали, что аппликация тромбина приводит к увеличению постоянного натриевого тока (I_{NaP}) через активацию

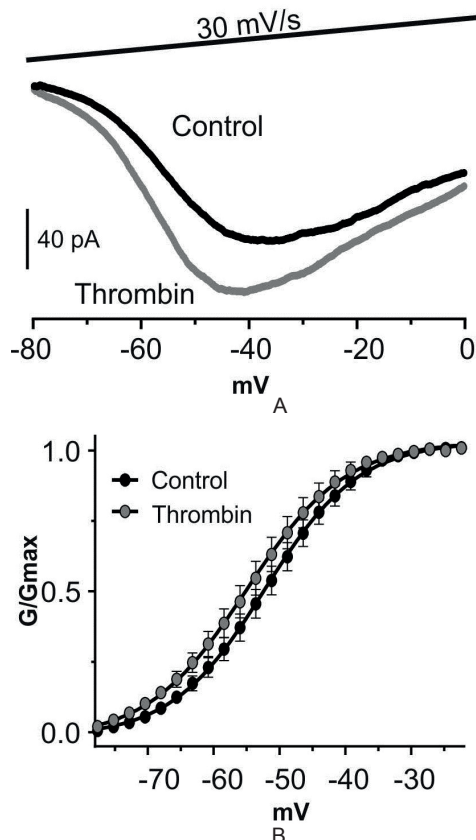


Fig. 2. Effect of thrombin application on I_{NaP} in CA1 pyramidal neurons of adult rats. (A) The traces demonstrate I_{NaP} registration in adult rats in control conditions and in the presence of thrombin. (B) Effect of thrombin on I_{NaP} activation curve. Straight curves represent a Boltzmann fits of normalized voltage dependent conductance

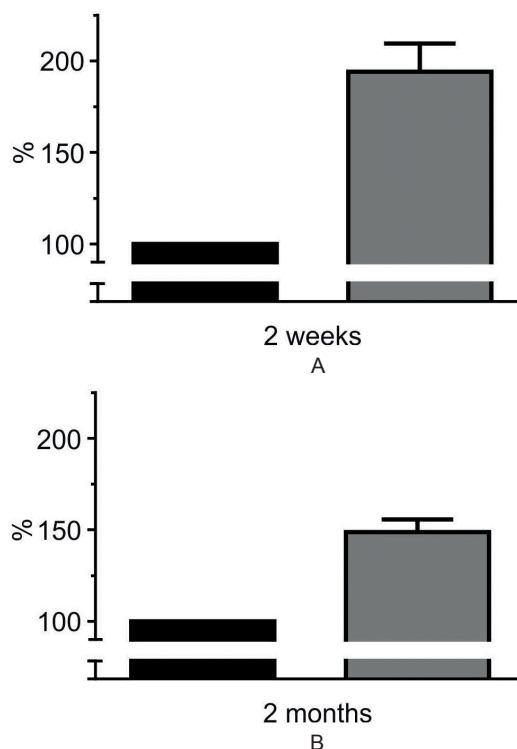


Fig. 3. Comparison of thrombin effect on I_{NaP} peak amplitude in 2-week-old (A) and 2-months-old rats (B)

протеазаактивированого рецептора 1 (ПАР1) и, таким образом, влияет на мембранный потенциал, а также порог эпилептиформной активности на уровне нейрональной сети. Было показано, что ПАР1 также экспрессируется в СА1-зоне гиппокампа и вовлечен в процесс повреждения нейронов после эпилептического статуса. Цель данной работы состоит в установлении эффекта тромбина на I_{NaP} в пирамидальных нейронах СА1-зоны гиппокампа взрослых и молодых крыс. С использованием методики patch-clamp в конфигурации «целая клетка» мы показали, что аппликация тромбина вызывает гиперполяризационный сдвиг активации и увеличение амплитуды I_{NaP} в обеих возрастных группах. Наши результаты также свидетельствуют о том, что I_{NaP} в пирамидальных нейронах СА1-зоны гиппокампа является более уязвимым к действию тромбина, чем в нейронах СА3-зоны. Также нами было установлено, что гиппокамп молодых крыс более чувствителен к действию тромбина, что в свою очередь приводит к усилению вклада тромбинзависимого пути в регуляцию нейрональной активности в незрелом головном мозгу. Ключевые слова: гиппокамп; постоянный натриевый ток; тромбин.

**О.О. Лунько, Д. С. Ісаєв,
О. О. Кришталь, О. В. Ісаєва**

ВПЛИВ ТРОМБІНУ НА ПОСТІЙНИЙ НАТРІЄВИЙ СТРУМ В ПІРАМІДАЛЬНИХ НЕЙРОНАХ СА1 ЗОНИ ГІПОКАМПА МОЛОДИХ І ДОРОСЛИХ ЩУРІВ

Серинова протеаза - тромбін, ключовий фактор згортання крові, бере участь у багатьох нейронних процесах, важливих для нормального функціонування мозку і в патологічних станах, що супроводжуються аномальною нейрональною синхронізацією, нейродегенерацією і запальними процесами. Наші попередні дослідження на пірамідальних нейронах СА3-зони показали, що аппликація тромбіну призводить до збільшення постійного натрієвого струму (I_{NaP}) через активацію протеазаактивованого рецептора 1 (ПАР1) і, таким чином, впливає на мембранный потенціал, а також на поріг епілептиформної активності на рівні нервової мережі. Було показано, що ПАР1 також експресується в СА1-зоні гіпокампа і залучений до процесу пошкодження нейронів після епілептичного статусу. Мета нашої роботи полягає у встановленні ефекту тромбіну на I_{NaP} в пірамідальних нейронах СА1-зони гіпокампа дорослих та молодих щурів. З використанням методики patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» ми показали, що аппликація тромбіну викликає гіперполяризаційний зсув активації та збільшення амплітуди I_{NaP} в обох вікових групах. Наші результати також свідчать про те, що I_{NaP} в пірамідальних нейронах СА1-зони гіпокампа є більш уразливим до дії тромбіну, ніж в нейронах СА3-зони. Також нами було встановлено, що гіпокамп незрілих щурів чутливіший до дії тромбіну, що у свою чергу призводить до

збільшення внеску тромбінзалежного шляху в регуляцію нервової активності в незрілому головному мозку. Ключові слова: гіпокамп; постійний натрієвий струм; тромбін.

REFERENCES

1. Siller-Matula JM, Schwameis M, Blann A, Mannhalter C, Jilma B. Thrombin as a multi-functional enzyme: Focus on in vitro and in vivo effects. *Thromb Haemost.* 2011; 106:1020–33.
2. Lukasiuk K, Wilczynski GM, Kaczmarek L. Extracellular proteases in epilepsy. *Epilepsy Res.* 2011; 96:191–206.
3. Ramachandran R, Hollenberg MD. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol.* 2008; 153 Suppl: S263–82.
4. Almonte AG, Sweatt JD. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: Roles in synaptic function and behavior. *Brain Res.* 2011; 1407:107–22.
5. Almonte AG, Qadri LH, Sultan F a., Watson J a., Mount DJ, Rumbaugh G, Sweatt JD. Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity. *J Neurochem.* 2013; 124:109–22.
6. Han K-S, Mannaioni G, Hamill CE, Lee J, Junge CE, Lee CJ, Traynelis SF. Activation of protease activated receptor 1 increases the excitability of the dentate granule neurons of hippocampus. *Mol Brain.* 2011; 4:32.
7. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-Activated Receptors. 2001; 53:245–82.
8. Niclou SP, Suidan HS, Pavlik A, Vejsada R, Monard D. Changes in the expression of protease-activated receptor 1 and protease nexin-1 mRNA during rat nervous system development and after nerve lesion. *Eur J Neurosci.* 1998; 10:1590–607.
9. Xi G, Reiser G, Keep RF. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: Deleterious or protective? *J Neurochem.* 2003; 84:3–9.
10. Maggio N, Shavit E, Chapman J, Segal M. Thrombin induces long-term potentiation of reactivity to afferent stimulation and facilitates epileptic seizures in rat hippocampal slices: toward understanding the functional consequences of cerebrovascular insults. *J Neurosci.* 2008; 28:732–6.
11. Isaeva E, Hernan A, Isaev D, Holmes GL. Thrombin facilitates seizures through activation of persistent sodium current. *Ann Neurol.* 2012; 72:192–8.
12. Stafstrom CE. Persistent Sodium Current and Its Role in Epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2007; 7:15–22.
13. Yamada-Hanff J, Bean BP. Persistent sodium current drives conditional pacemaking in CA1 pyramidal neurons under muscarinic stimulation. *J Neurosci.* 2013; 33:15011–21.
14. Chen S, Su H, Yue C, Remy S, Royeck M, Sochivko D, Opitz T, Beck H, Yaari Y. An increase in persistent sodium current contributes to intrinsic neuronal bursting after

- status epilepticus. *J Neurophysiol.* 2011; 105:117–29.
15. Isaev D, Lushnikova I, Lunko O, Zapukhliak O, Maximyuk O, Romanov A, Skibo GG, Tian C, Holmes GL, Isaeva E. Contribution of protease-activated receptor 1 in status epilepticus-induced epileptogenesis. *Neurobiol Dis.* 2015; 78:68–76.
 16. Kubova H, Lukasiuk K, Pitkänen A. New Insight on the Mechanisms of Epileptogenesis in the Developing Brain. 2012; 3–44.
 17. Lunko O, Isaev D, Maximyuk O, Ivanchick G, Sydorenko V, Krishtal O, Isaeva E. Persistent sodium current properties in hippocampal CA1 pyramidal neurons of young and adult rats. *Neurosci Lett.* 2014; 559:30–3.
 18. Lun'ko OO, Isaiev DS, Maxymiuk OP, Kryshchal' OO, Isaieva OV. The effect of enzymatic treatment using proteases on properties of persistent sodium current in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. *Fiziol Zh.* 2014; 60:75–9. [Ukrainian]
 19. Vorobjev VS. Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue. *J Neurosci Methods.* 1991; 38:145–50.
 20. Neher E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol.* 1992; 207:123–31.
 21. Weinstein JR, Gold SJ, Cunningham DD, Gall CM. Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J Neurosci.* 1995; 15:2906–19.
 22. Aracri P, Colombo E, Mantegazza M, Scalmani P, Curia G, Avanzini G, Franceschetti S. Layer-specific properties of the persistent sodium current in sensorimotor cortex. *J Neurophysiol.* 2006; 95:3460–8.
 23. Agrawal N, Alonso A, Ragsdale DS. Increased Persistent Sodium Currents in Rat Entorhinal Cortex Layer V Neurons in a Post-Status Epilepticus Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia.* 2003; 44:1601–4.
 24. Maggio N, Cavaliere C, Papa M, Blatt I, Chapman J, Segal M. Thrombin regulation of synaptic transmission: Implications for seizure onset. *Neurobiol Dis.* 2013; 50:171–8.

Received 13.04.2015

Фізичне тренування відновлює спряження конститутивних NO-синтаз та кардіогемодинаміку при гіпертензії (частина III)

Н.О.Дорофєєва, А.В. Коцюруба, Б.С.Коп'як, В.Ф.Сагач

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; E-mail: dorofeyva@mail.ru

У серці та його мітохондріях щурів зі спонтанною гіпертензією дослідили вплив періодичних фізичних навантажень (тренування плаванням помірної і надмірної інтенсивності) на фізіологічні показники кардіогемодинаміки і біохімічні показники, що характеризують рівень оксидативного та нітрозативного стресу. На основі останніх розраховували індекс спряження конститутивних кальційзалежних NO-синтаз (cNOS=eNOS + nNOS) і біохімічний індекс дисфункції. Установили, що за обох режимів тренування повністю відновлюється і навіть перевищує контрольні значення у нетренованих щурів лінії Вістар спряжений стан cNOS і кальційзалежний синтез оксиду азоту (NO). Виявили, що великі фізичні навантаження на межі функціональних можливостей тварин неефективні для покращення функціонального стану серцево-судинної системи при гіпертензії і можуть провокувати її подальший розвиток. Помірний режим фізичних тренувань поліпшував функцію розслаблення серця внаслідок збільшення максимальної швидкості зниження тиску, зменшення кінцевого діастолічного тиску і кінцево-діастолічної жорсткості міокарда. Помірні фізичні тренування знижували кінцево-систолический тиск і артеріальну жорсткість, що сприяло більш ефективній й енергоекономній роботі серця, про що свідчить зменшення ударної роботи при збільшенні ударного об'єму. Покращення фізіологічних показників кардіогемодинаміки і функціонального стану серця за помірного режиму тренувань корелювало зі змінами обох розрахованих індексів. Періодичні інтенсивні фізичні навантаження рекомендовано як простий фізіологічний засіб прекодиціювання для профілактики розвитку кардіальної дисфункції за гіпертонії внаслідок розвитку неспряженого стану cNOS та викликаної ним надмірної генерації супероксиду і навпаки, пригнічення кальційзалежного синтезу NO.

Ключові слова: спонтанна гіпертензія; фізичне тренування; неспряження cNOS; серце; мітохондрії серця; щури.

ВСТУП

Адаптація до фізичних навантажень (тренування) має різноманітний вплив на організм, підвищуючи функціональні можливості його систем, насамперед тих, що забезпечують киснетранспортні процеси. Тому фізичне тренування часто використовується з кардіопротекторною метою [1,2]. Дослідження останніх років показали, що основну роль у впливі тренування на серцево-судинну систему відіграє активація ендотелію [3-5] та ендотеліальної NO-синтази (eNOS) за допо-

могою збільшення фосфорилування залишку серину у положенні 1177 та зменшення фосфорилування залишку треоніну у положенні 495 [6,7]. Тому, можливо, позитивний вплив фізичних тренувань на серцево-судинну систему виявляється сильніше при патологічних процесах у цій системі, пов'язаних із пригніченням eNOS, а саме при гіпертензії, атеросклерозі, серцевій недостатності тощо [8,9]. Пригнічення продукції оксиду азоту (NO) при таких захворюваннях у похилому віці можуть бути пов'язані як із порушенням його синтезу de novo чи внаслідок реутилі-

© Н.О.Дорофєєва, А.В. Коцюруба, Б.С.Коп'як, В.Ф.Сагач

заційних процесів, так і з його інактивацією супероксидом (O_2^-) в умовах окисного стресу. Висловлюються гіпотези про залучення до цих процесів неспряження eNOS [10], яке також є результатом оксидативного та нітрозативного стресу, часто через її глутатіонування [11,12]. Таке неспряження cNOS (сумарних конститутивних NO-синтаз eNOS і/чи nNOS) раніше показано нами в серці і аорті при спонтанній гіпертензії.

Мета нашої роботи – з'ясування впливу фізичного тренування різної інтенсивності на реверсний процес спряження – неспряження cNOS, редокс-статус тканин серця та зміни кардіогемодинаміки у тварин при гіпертензії.

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). Фізичні навантаження забезпечувалися плаванням тварин при 32–34 °С. Режим фізичного навантаження був такий: тренування проводили 5 днів на тиждень упродовж 5 тиж. Були виділені 2 групи. Помірні тренування (ПТ)– фізичне навантаження починалося з 2 хв, тривалість збільшувалася кожен день на 1 хв і на 25-ту добу становила 20 хв і наступні 5 днів зберігалася незмінною. Для надмірного режиму тренувань (НТ) навантаження починалося з 2 хв, збільшувалося кожної доби на 2 хв і на 25 добу склала 40 хв і ще 10 днів не змінювалося. Слід зазначити, що 15,4% щурів зі спонтанною гіпертензією в режимі НТ загинули, під час виконання фізичних навантажень, 7,6% щурам проводили реанімаційні заходи, що може свідчити про те, що навантаження було на межі функціональних можливостей тварин. Показники контрольної групи (нетреновані щури лінії Вістар із нормальним артеріальним тиском і функцією серця), приймали за 100%. Після курсу фізичних тренувань щурів анестезували за допомогою

уретану (1,25 г/кг, внутрішньоочеревинно). Функціональні показники кардіогемодинаміки у щурів *in vivo* реєстрували за допомогою ультрамініатюрного катетера 2F. Катетер вводили через сонну артерію ретроградно у лівий шлуночок, що давало змогу одночасно реєструвати сигнали тиску й об'єму з візуалізацією кривих залежності цих показників протягом серцевого циклу [13]. Співвідношення тиску й об'єму лівого шлуночка визначали за допомогою програми PVAN 3,6 («Millar Instruments», США). Кінцево-діастолічну жорсткість (для оцінки здатності міокарда до розтягнення) визначали під час оклюзії черевної порожнистої вени в умовах зниженого притоку крові до серця. Артеріальну жорсткість розраховували як відношення значення кінцево-сistolічного тиску до ударного об'єму.

У мітохондріях серця та в надосадовій фракції після виділення мітохондрій методом центрифугування (яку ми позначали як гомогенат серця) визначали показники, які тестують наявність комбінованого окисного стресу (надлишкового синтезу O_2^- , NO і пероксинітриду). Показники оксидативного стресу (швидкість генерації супероксидного (O_2^-) і гідроксильного (OH) радикалів, пули стабільного пероксиду водню (H_2O_2), ейкозаноїдів тромбоксану B_2 (TxB_2) і пептидолейкотрієну C_4 (LTC_4), сечової кислоти та маркера перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) дієнових кон'югатів (ДК) визначали як описано [14]. Показники нітрозативного стресу – кальційзалежну активність cNOS, як суму ендотеліальної (eNOS) і нейрональної (nNOS) NO-синтаз, кальційнезалежну активність індукбельної NO-синтази (iNOS), НАДН-залежну активність нітратредуктази, пули стабільних метаболітів NO – нітрит (NO_2^-)– і нітрат (NO_3^-)–аніонів, низькомолекулярних (НМНТ) і високомолекулярних (ВМНТ) нітрозотіолів, вміст регулятора активності cNOS сірководню (H_2S) виміряли як описано [15]. Умовне значення індексу спряження (coupling) cNOS розраховували як відношення активності cNOS до швидко-

сті генерації $\cdot\text{O}_2^-$ в присутності її інгібітора L-NAME. Цей індекс характеризує наявність субстратів (L-аргінін, O_2) і кофактора тетрагідробіоптерину (BH_4) для утворення NO, а не $\cdot\text{O}_2^-$ при окисному метаболізмі L-аргініну. Розраховували також умовний біохімічний індекс дисфункції (БІД) в серці і аорті як величину, що визначається за формулою: $\text{БІД} = (\text{вміст нітриту} / (\text{вміст нітрату} + \text{вміст нітриту})) \cdot (\text{індекс неспряження sNOS})$. Перший компонент формули відображає частку нітрит-аніона в сумі нітрит і нітрат, таким чином, відображає рівень оксигенації в органах серцево-судинної системи. Відомо, що NO_2^- спонтанно утворюється при окисненні NO лише в окисгенованих розчинах, в той час як NO_3^- лише в умовах інтегрального (як оксидативного, так і нітрозативного) окисного стресу при нерадикальному розпаді пероксинітриту. Другий компонент формули відображає рівень неспряження sNOS, який зростає в умовах оксидативного стресу. Отже, БІФ показує як ступінь оксидативного і нітрозативного стресу, так і вміст синтезованих sNOS пулів NO, необхідних для нормального функціонування серця й аорти. Загальний білок 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

На рис. 1–3 показано зміни біохімічних показників у серці і його мітохондріях у нетренованих і тренуваних в ПТ- і НТ-режимах щурів зі спонтанною гіпертензією. Визначали вплив тренувань на показники оксидативного (рис. 1,а, 2,а) і нітрозативного (рис. 1,б, 2,б) стресу, які необхідні для встановлення джерел утворення супероксид-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) і оксиду азоту (NO), рівня спряження sNOS (за якого конститутивний кальційзалежний *de novo* синтез NO превалює над генерацією цими ферментами $\cdot\text{O}_2^-$). Ступінь розвитку оксидативного і нітрозативного стресу є

ключовою причиною неспряження sNOS (за якого генерація $\cdot\text{O}_2^-$ превалює над синтезом NO) і, тим самим, як показано нами в частині I цієї роботи за спонтанної гіпертензії, вважається нині важливою причиною розвитку кардіальної дисфункції.

Як видно з рис 1,а, рівень генерації $\cdot\text{O}_2^-$ в мітохондріях серця усіх щурів зі спонтанною гіпертензією був стабільно високим. Дисмутація нестабільного радикала $\cdot\text{O}_2^-$ в стабільний H_2O_2 при цьому перевищувала контрольні значення майже вдвічі і знижувалася відносно вихідного рівня в 5 разів, а відносно контролю майже в 3 рази незалежно від режиму тренувань. Перетворення стабільного H_2O_2 в токсичний $\cdot\text{OH}$ -радикал, в мітохондріях щурів зі спонтанною гіпертензією було в 3 рази вищим порівняно з контролем, а після тренувань, залежно від їх режиму, знижувалося в 4,5–7 разів до значень удвічі нижчих від контрольних. Внаслідок зниження генерації $\cdot\text{OH}$ зменшувалася інтенсивність вільнорадикального ПОЛ до рівнів лише в 2 рази вищих від вихідного рівня. Про це свідчить значне (майже в 10 разів) зниження пулів ДК, які в мітохондріях тварин зі спонтанною гіпертензією були вищими від контролю. Причиною такої значної антиоксидантної дії фізичних навантажень у мітохондріях серця (див. рис. 1,а) не може бути зниження активності жодної із досліджених нами оксидаз – циклооксигенази, ліпоксигенази чи ксантиноксидази, про що свідчить відсутність змін у пулах маркерів цих генераторів $\cdot\text{O}_2^-$: TxV_2 , LTC_4 і сечової кислоти відповідно. Вірогідною причиною послаблення інтенсивності оксидативного стресу в мітохондріях може бути, як не дивно, зниження активності якоїсь із мітохондріальних супероксиддисмутаз, які перетворюють $\cdot\text{O}_2^-$ в H_2O_2 , і, навпаки, підвищення активності NO-залежного фермента каталази, що перетворює H_2O_2 в H_2O із виділенням O_2 . Цей процес може підвищувати оксигенацію мітохондрій, що підтверджується значними стабільними рівнями генерації $\cdot\text{O}_2^-$ в дихальному ланцюзі мітохондрій у

тренуваних щурів (див. рис.1,а) і зниженням активності нітратредуктази (див. рис.1,б), активної виключно в гіпоксичних умовах.

Як видно з рис. 1,б, нітратредуктазна активність у мітохондріях щурів зі спонтанною гіпертензією більше ніж у 5 разів перевищувала контрольні значення, а після тренувань, незалежно від їх режиму, суттєво знижувалася, що вказує, з одного боку, на підвищення оксигенації мітохондрій, а з іншого – на значне зниження надлишкового реутилізаційного синтезу NO, що спостерігається в них за гіпоксичного стану, який виникає в умовах гіпертензії, тобто на пригнічення нітрозативного стресу. Послідовне відновлення нітрат-аніона до NO в мітохон-

дріях може здійснюватися «реверсним» (див. частину II) ферментом ксантинооксидазою або нітритредуктазною активністю eNOS, «вмонтованою» в комплекс I дихального ланцюга [16]. Два інші шляхи утворення надлишкового NO – внаслідок de novo синтезу кальційнезалежним ферментом iNOS і декомпозиції низькомолекулярних нітрозотіолів, що є донорами NO в мітохондріях серця, за дії тренувань, не зазнають змін. Водночас, конститутивний de novo синтез NO достовірно зростає за обох режимів тренувань (див. рис. 1,б) про що свідчить підвищення активності cNOS (eNOS і/чи nNOS). Наслідком підвищення оксигенації за тренування є також збільшення мітохондріальних пулів

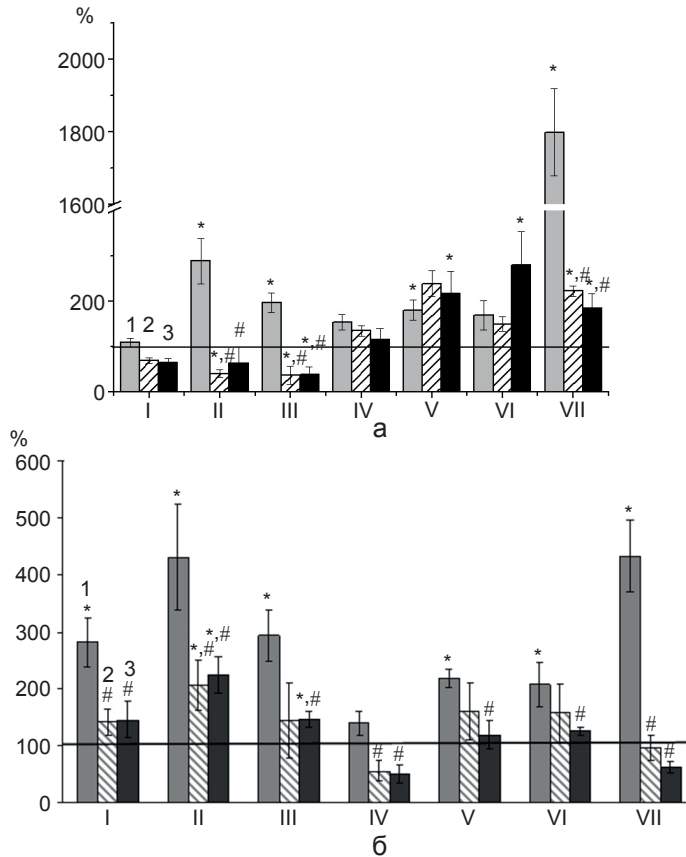


Рис 1. Відносні показники оксидативного (а) та нітрозативного (б) стресу в мітохондріях серця у щурів зі спонтанною гіпертензією (1), і тренуваних в помірному (2) і надмірному (3) режимах тренувань: на а: I – швидкість генерації $\cdot O_2^-$, II – швидкість генерації $\cdot OH$, III – вміст H_2O_2 , IV – тромбоксану B2, V – пептидолейкотрієну C4, VI – сечової кислоти, VII – дієнових кон'югатів. На б: I – активність конститутивних NO-синтаз, II – активність індукційної NO-синтази, III – нітратредуктазна активність, IV – вміст NO_2^- , V – NO_3^- , VI – низькомолекулярних нітрозотіолів, VII – високомолекулярних нітрозотіолів, VIII – H_2S , * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно контролю, # $P < 0,05$ відносно значень у щурів зі спонтанною гіпертензією

нітрит-аніона (NO_2^-), яке сильно залежало від режиму тренування. Значне (майже в 4 рази) зростання пулів нітрат-аніона (NO_3^-) в мітохондріях за більш тривалого режиму тренування, на наш погляд, зумовлюється підвищенням нерадикального розпаду пероксинітриту, альтернативного до його вільнорадикального розпаду на два токсичні радикали – $\cdot\text{OH}$ і $\cdot\text{NO}_2$ (див. рис.1,б). Слід відмітити також значне (у 5–8 разів залежно від режиму тренування) зниження пулів H_2S у мітохондріях тренуваних щурів зі спонтанною гіпертензією, причини якого нам невідомі. Зміни пулів H_2S у мітохондріях серця корелюють зі змінами індексів спряження cNOS та біохімічного індексу дисфункції. Таким чином, ці результати підтверджують

нашу гіпотезу (див. частину II) про велике значення підтримання мінімальних пулів H_2S для збереження L -цистеїну як субстрату синтезу глутатіону. При цьому роль відновленого глутатіону полягає в запобіганні глутатіонування окисненою формою глутатіону конститутивних NOS (eNOS і/чи nNOS), яке викликає їх неспряження.

На рис. 2 показано зміни показників оксидативного і нітрозативного стресу в гомогенатах серця. В серці тренуваних щурів зі спонтанною гіпертензією знижується швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$ як ліпідними (циклооксигеназа і ліпоксигеназа), так і нуклеотидною (ксантиноксидаза) його генераторами (див. рис. 2,а), що може зумовлювати, як і в мітохондріях, але з інших причин, зниження пулів H_2O_2 та

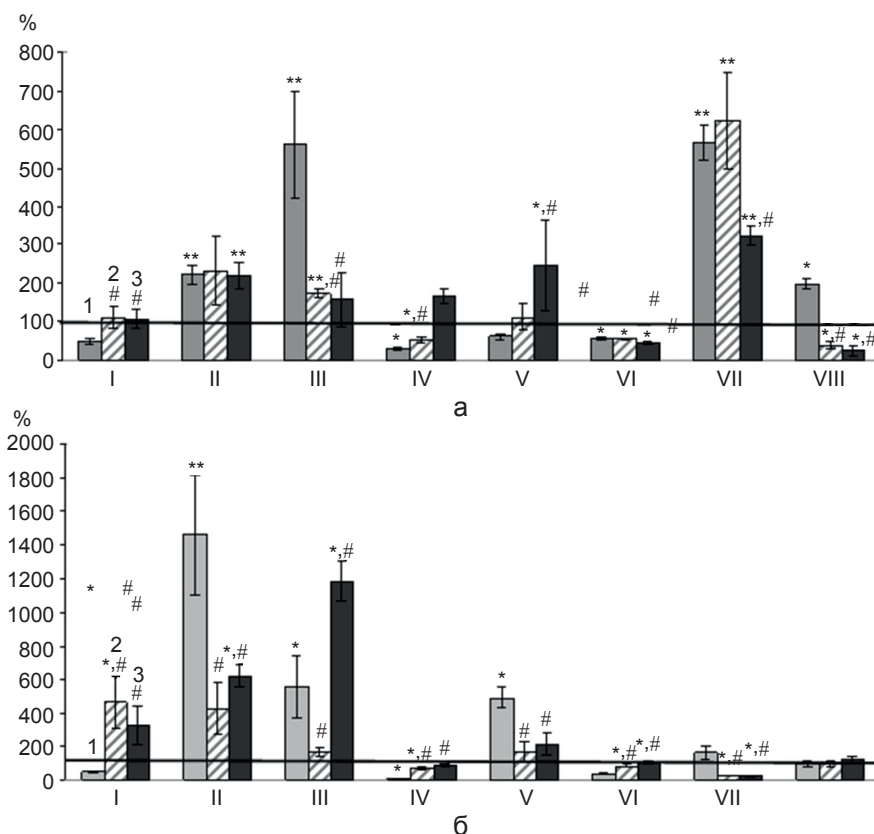


Рис 2. Відносні показники оксидативного (а) та нітрозативного(б) стресу в серці щурів зі спонтанною гіпертензією (1), тренуваних в помірному (2) і надмірному (3) режимах тренувань: на а: I – швидкість генерації $\cdot\text{O}_2^-$, II – швидкість генерації $\cdot\text{OH}$, III – вміст H_2O_2 , IV – тромбоксану B_2 , V – пептидолейкотрієну C_4 , VI – сечової кислоти, VII – дієнових кон'югатів. На б: I – активність конститутивних NO-синтаз, II – активність індукцибельної NO-синтази, III – нітратредуктазна активність, IV – вміст NO_2^- , V – NO_3^- , VI – низькомолекулярних нітрозотіолів, VII – високомолекулярних нітрозотіолів, VIII – H_2S , * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно контролю, # $P < 0,05$ відносно значень у щурів зі спонтанною гіпертензією

інгібування швидкості генерації $\cdot\text{OH}$ і викликаного ним вільнорадикального ПОЛ.

У тренуваних щурів зі спонтанною гіпертензією зростає конститутивний *de novo* синтез NO в серці та його мітохондріях (див. рис.1,б і 2,б) внаслідок відміни неспряженого стану cNOS, в якому вони знаходилися до початку тренувань (рис.3). Одночасно із цим внаслідок тренувань знижувався синтез надлишкового NO, який викликає нітрозативний стрес, утворюючи пероксинітрил. Так, за обох режимів тренування в серці (див. рис. 2,б), але не в його мітохондріях (див. рис.1,б), знижувалась активність iNOS – головного генератора надлишкового NO. Лише в серці також знижувалось і вивільнення NO із «депо» при декомпозиції низькомолекулярних нітрозотіолів, на що вказує підвищення їхніх пулів до контрольного рівня. Нітратредуктазна активність знижувалась до контрольного значення лише за помірного режиму тренування. Це вказує як на пригнічення реутилізаційного синтезу NO, так і на відновлення нормальної оксигенації серця лише за помірних, але не надмірних тренувань. Водночас за більш тривалого режиму тренування активність нітратредуктази в серці навпаки, підвищувалась, що вказує на можливе «перетренування», яке викликає гіпоксичний стан, який і призводить до активації фермента. Вагомим доказом зниження рівня нітроза-

тивного стресу (синтезу надлишкового NO і пероксинітрилу) за обох режимів тренування в серці щурів зі спонтанною гіпертензією може бути значне зниження пулів NO_3^- , який утворюється при розпаді пероксинітрилу і зниження здійснюваного ним нітрозилування по SH-групах цистеїну білків (доказом цього є зниження пулів VMHT) (див. рис.2,б). Особливо яскраво демонструє кардіопротекторну дію тренувань підвищення пулів NO_2^- в серці щурів зі спонтанною гіпертензією, можливе лише за умов нормальної оксигенації серця.

Підтверджується наше припущення про важливу роль нітрозоглутатіону (основна складова НМНТ) і H_2S у відновленні спряженого стану cNOS. Стабільність пулів H_2S в серці контрольних щурів і щурів зі спонтанною гіпертензією і при тренуванні в двох режимах (див. рис.2,б), згідно з нашою гіпотезою, є проявом реалізації ефекту «цистеїнового шунта» – адаптаційного кардіопротекторного використання L-цистеїну не для синтезу *de novo* H_2S , а для альтернативного синтезу відновленого глутатіону. Нітрозилування останнього з утворенням нітрозоглутатіону забезпечує «запобігання» глутатіонування по залишках цистеїну димерних молекул cNOS (eNOS або nNOS) окисненим глутатіоном, тим самим запобігаючи їх неспряженню.

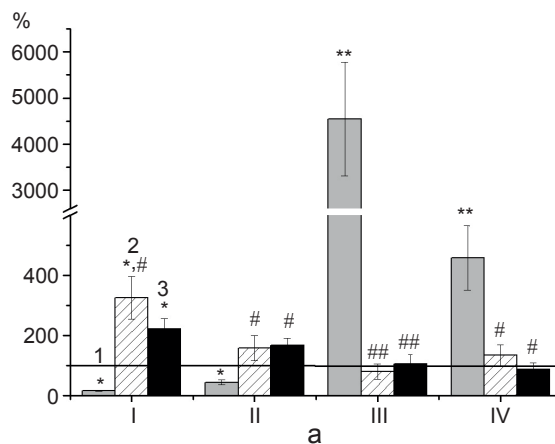


Рис.3. Відносні значення індексів спряження конститутивних NO-синтаз (IC) і біохімічний індекс функції (БІФ) в серці і в мітохондріях серця щурів зі спонтанною гіпертензією до (1) і після помірного (2) і надмірного (3) режиму тренувань: I - IC у серці, II - IC у мітохондріях серця, 3 - БІФ у серці, 4 - БІФ у мітохондріях серця, *P<0,05 відносно контролю, #P<0,05 відносно значень у щурів зі спонтанною гіпертензією

З рис.2,б і рис.3 видно, що підвищення активності кальційзалежних NOS у серці щурів зі спонтанною гіпертензією внаслідок фізичних навантажень корелює із підвищенням індексу спряження цих NO-синтаз. Як результат, індекс кардіальної дисфункції зменшувався, що підтверджується покращенням фізіологічних показників кардіогемодинаміки за помірному режиму тренувань (рис.4).

Нами виявлено, що різні режими фізичного навантаження мають різноспрямований вплив на показники кардіодинаміки у щурів зі спонтанною гіпертензією (див. рис. 4,а). Після помірному режиму тренувань кінцево-діастолічний тиск зменшився на 32,7 % і достовірно не відрізнявся від контролю, тоді як після посиленого режиму він збільшився в 1,5 раза ($P < 0,05$). Кінцево-систолічний тиск

після помірного режиму тренувань знизився на 23,8 % і достовірно не відрізнявся від контролю, а після посиленого режиму залишався на попередньому рівні.

Різнострамований вплив різних режимів тренувань ми спостерігали при аналізі показників функції розслаблення серця. Так, за помірного режиму тренувань збільшувалася максимальна швидкість зниження тиску, в той час як за посиленого режиму – знижувалась на 39 % ($P < 0,05$), що може вказувати на порушення функції розслаблення (див. рис. 4,б). Після курсу помірного режиму кінцево-діастолічна жорсткість міокарда знизилася в 8,3 раза, тоді як за посиленого – лише в 2 рази. Після помірного режиму тренувань спостерігалось зменшення в 2,8 раза артеріальної жорсткості, що свідчить про

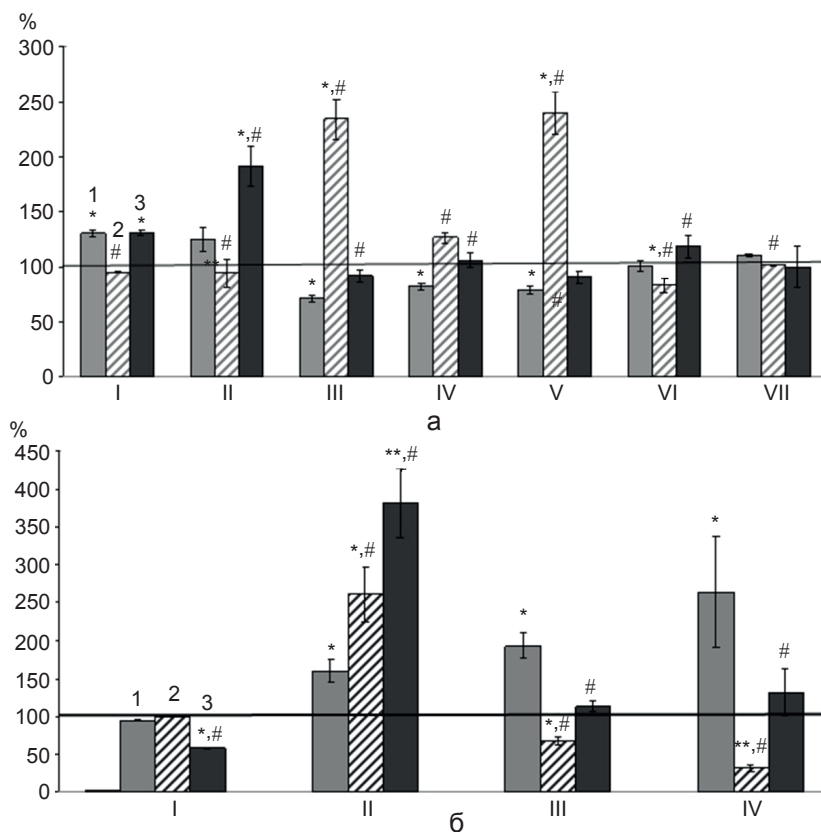


Рис.4. Зміна показників кардіогемодинаміки у щурів зі спонтанною гіпертензією (1), після помірного (2) і надмірного (3) режиму тренувань. На а: I – кінцево-систолічний тиск, II – кінцево-діастолічний тиск, III – ударний об'єм, IV – фракція викиду, V – хвилинний об'єм крові, VI – ударна робота, VII – частота серцевих скорочень. На б: I – $dP/dt \text{ min}$, II – споживання кисню серцем, III – артеріальна жорсткість, IV – кінцево-діастолічна жорсткість міокарда. * $P < 0,05$ відносно контролю, # $P < 0,05$ відносно значень у щурів зі спонтанною гіпертензією

зниження постнавантаження на серце. Після посиленого режиму вона зменшилася лише в 1,7 раза. Таким чином, помірне навантаження покращувало функцію розслаблення серця внаслідок збільшення максимальної швидкості зниження тиску і розтяжності лівого шлуночка, а зменшення артеріальної жорсткості за цього режиму тренувань свідчить про зниження загального периферичного опору судин.

Після обох режимів фізичного навантаження ми спостерігали зростання показників насосної функції серця (див. рис.4,а), але воно було більш виражене після помірних тренувань. Так, за цих умов хвилинний об'єм крові збільшився в 3 рази, а за надмірного – лише в 1,15 раза, ударний об'єм в 3,3 і 1,3 раза відповідно. Таким чином, збільшення ударного об'єму після НТ було в 2,5 раза меншим, ніж після ПТ, ($P < 0,05$). За обох режимів тренувань фракція викиду збільшилася (в 1,5 і в 1,28 раза відповідно). Слід зазначити, що після ПТ при збільшенні в 3,3 раза ударного об'єму, ударна робота зменшувалася на 17,2%, що вказує на збільшення ефективності роботи серця при менших енерговитратах. Після НТ ударна робота, навпаки, збільшилася на 17,8% порівняно зі щурами зі спонтанною гіпертензією і на 35% відносно тренуваних у помірному режимі тварин. Крім того, спостерігалось вірогідно більше підвищення споживання кисню міокардом після надмірних навантажень ($P < 0,05$), що свідчить про великі енергетичні витрати та напружену роботу серця для адаптації до них (див. рис.4,а). Виявлені нами зміни кардіогемодинаміки підтверджують важливість дозованості фізичних тренувань. НТ на межі функціональних можливостей тварин є суттєво енерговитратними, на що вказує збільшення в 2,3 раза споживання кисню міокарда. Відомо, якщо рівень енергії, що утворюється, зменшується, чи занадто збільшуються енерговитрати, це насамперед порушує функцію розслаблення, в той час як скоротливість і насосна функція серця при навантаженні ще не відрізняються від норми. Виявлене нами збільшення в 1,5 раза кінцевого

діастолічного тиску, зниження максимальної швидкості зниження тиску свідчать про порушення функції розслаблення серця. Для адаптації до великих навантажень серце вимушене підтримувати високий кінцевий діастолічний тиск, що може сприяти подальшому розвитку артеріальної гіпертензії.

Отже, тренування в обох досліджених режимах відновлювало спряжений стан кальційзалежних ферментів cNOS, можливо, завдяки запобіганню їх глутатіонування. Водночас за НТ спостерігали і надмірну оксигенацію мітохондрій серця, яка викликала в них надпродукцію окиснених метаболітів NO – як нітрит-, так нітрат-аніонів (див. рис.1,б). Це негативно вплинуло на фізіологічні показники. Виявилось, що великі фізичні навантаження на межі функціональних можливостей тварин неефективні для покращення функціонального стану серцево-судинної системи при гіпертензії і можуть провокувати її подальший розвиток (див. рис.4). Ще одним наслідком «переоксигенації» мітохондрій за надмірних тренувань є підвищення активності реверсного ферменту ксантинооксидази (див. рис. 1,б), про що свідчить зростання пулів сечової кислоти. Отже, надмірні фізичні навантаження на серце і викликана ними «переоксигенація» мітохондрій призводять до надмірного синтезу аденозинтрифосфату (АТФ), що викликає зростання не тільки «глибокої» деградації аденінових нуклеотидів (АТФ---АДФ---АМФ---ІМФ---гіпоксантин---ксантин---сечова кислота), але і генерації O_2^- , який утворюється при окисненні гіпоксантину і ксантину ксантинооксидазою [17]. На основі цих результатів можна зробити два висновки: по-перше, ксантинооксидаза за нормоксії і гіпероксії «працює» переважно як оксидаза, генеруючи O_2^- , в той час як в умовах гіпоксії – як нітрат- і нітрит-редуктаза, синтезуючи NO (аналогічно cNOS, можна говорити про неспряжений стан ксантинооксидази за оксигенації і, навпаки, спряжений стан при гіпоксії) [18–20]. По-друге, ксантинооксидаза, як і cNOS, зараховується до адап-

тивної системи швидкого взаєморегулювання пулів NO й $\cdot\text{O}_2^-$. Крім того, ми припустили функціональну компартменталізацію не лише різних пулів NO, але і пулів $\cdot\text{O}_2^-$ (можливі різні – регуляторна і токсична – функції різних пулів супероксиду, синтезованих, наприклад, ксантинооксидазою і неспряженими cNOS).

Механізм швидкого регулювання генерації $\cdot\text{O}_2^-$, про який ми говорили в II частині роботи, працює і в процесі адаптації до тривалих фізичних навантажень, чим і треба користуватися замість пошуку фармакологічних регуляторів реверсного неспряженого стану cNOS. Важливою для кардіопротекції за гіпертензії, як показують наші дослідження, може бути відновлення спряженого стану cNOS «симуляцією» фізичних навантажень, особливо тим, кому останні протипоказані, внаслідок фармакологічної регуляції «цистеїнового шунта». Аналогічно аргініновому шунту – конкурентне використання L-аргініну для синтезу NO різними NOS або аргіназою для синтезу сечовини, дієвість якого інгібуванням аргінази для профілактики і лікування артеріальної гіпертензії була передбачена і доведена в наших попередніх роботах [21,22]. У III частині роботи ми постулюємо важливе значення «цистеїнового шунта» (одночасне конкурентне використання L-цистеїну для індукцйбельного de novo синтезу H_2S і для синтезу de novo відновленого глутатіону) для потреб практичної кардіології. Основою для такого твердження є встановлення нами залежності спряженого стану cNOS від стабільності невисоких кардіальних пулів H_2S . Цю залежність ми спостерігали за дії EMAP II (див. частину II) та за фізичного навантаження на серце (див. частину III). Раніше у відділі фізіології кровообігу було виявлено, що інгібування пропаргілгліцином de novo синтезу H_2S індукцйбельним ферментом цистатіонін γ -ліазою в аорті старих щурів не тільки відновлює конститутивний синтез NO (очевидно, внаслідок відміни неспряженого стану cNOS), але і короткочасно повністю відновлює ендотеліязалежне скорочення гладеньких м'язів

аорти [23]. Отже, маємо уже три факти які підтверджують важливу роль «цистеїнового шунта» для відновлення порушених фізіологічних функцій. Нам видається доцільним для нормалізації роботи серцево-судинної системи використання помірному режиму фізичних тренувань або фармакологічного препарату нітрозоглутатіону (нині існує лише як хімічний реактив). Нітрозоглутатіон може бути ефективним інгібітором глутатіонування cNOS, а, отже, і їх неспряження.

ВИСНОВКИ

1. Помірні фізичні навантаження в серці щурів зі спонтанною гіпертензією зменшують інтенсивність генерації супероксиду, його токсичного похідного $\cdot\text{OH}$ -радикала, який викликає оксидативний стрес, пулів стабільного H_2O_2 і процесу ПОЛ внаслідок зниження активності ліпоксигенази, циклооксигеназ і ксантинооксидази, але не за рахунок мітохондріального супероксиду.

2. У мітохондріях серця щурів зі спонтанною гіпертензією за інтенсивних фізичних навантажень в надмірному режимі швидкість генерації супероксиду не знижується внаслідок стабільної активності ліпоксигенази й циклооксигеназ та підвищення активності ксантинооксидази, але значно знижується його ферментативне перетворення в H_2O_2 й неферментативне утворення токсичного $\cdot\text{OH}$ -радикала і викликаного ним процесу ПОЛ.

3. У серці щурів зі спонтанною гіпертензією за фізичних навантажень активність кальційзалежних NOS (eNOS і/чи nNOS), а, значить, і конститутивного de novo синтезу NO, надмірно підвищується, тоді як пули стабільних метаболітів NO змінюються реципрокно – пули нітрит-аніона підвищуються, тоді як пули нітрат-аніона – знижуються майже до його невисоких контрольних значень.

4. За різних режимів тренувань у серці щурів зі спонтанною гіпертензією зникають передумови виникнення нітрозативного стресу внаслідок зниження генерації над-

лишкового оксиду азоту кальційнезалежною iNOS і нітратредуктазою за помірного, але не надмірного режиму, за якого (внаслідок зниження оксигенації) реутилізаційний синтез оксиду азоту може посилюватися.

5. У мітохондріях серця щурів зі спонтанною гіпертензією за надмірних фізичних навантажень нормалізується знижена активність cNOS за рахунок відновлення її сполученого стану, але пули нітриту і нітрату при цьому надмірно зростають внаслідок збереження надлишкового синтезу NO кальційнезалежною iNOS і за рахунок декомпозиції нітрозоглутатіону.

6. Помірні фізичні тренування покращували функцію розслаблення серця щурів зі спонтанною гіпертензією за рахунок збільшення максимальної швидкості зниження тиску, зменшення кінцевого діастолічного тиску, а також постнавантаження на серце, сприяючи більш ефективній і енергоекономній роботі серця.

7. Надмірні фізичні навантаження на межі функціональних можливостей тварин не ефективні для покращення функціонального стану серцево-судинної системи при гіпертензії і можуть провокувати її подальший розвиток.

Н.А. Дорофеева, А.В. Коцюруба, Б.С. Копьяк, В.Ф. Сагач

ФИЗИЧЕСКИЕ ТРЕНИРОВКИ ВОССТАНАВЛИВАЮТ СОПРЯЖЕННОЕ СОСТОЯНИЕ КОНСТИТУТИВНЫХ NO-СИНТАЗ И КАРДИОГЕМОДИНАМИКУ ПРИ ГИПЕРТЕНЗИИ (ЧАСТЬ III)

В сердце и митохондриях сердца крыс со спонтанной гипертонией исследовали влияние периодических физических нагрузок (плавание в умеренном и чрезмерном режиме тренировок) на физиологические показатели кардиогемодинамики и биохимические показатели, характеризующие уровень оксидативного и нитрозативного стресса. На основании последних рассчитывали индекс сопряжения конститутивных кальцийзависимых NO-синтаз (cNOS=eNOS + nNOS) и биохимический индекс дисфункции. Оказалось, что за обоих режимов тренировок полностью восстанавливается и даже превышает контрольные значения у нетренированных крыс линии Вистар сопряженное состояние cNOS и кальцийзависимый синтез оксида азота (NO), нарушенный в сердце и его

митохондриях крыс со спонтанной гипертонией. Большие физические нагрузки на границе функциональных возможностей оказались неэффективными для улучшения функционального состояния сердечно-сосудистой системы при гипертонии и могут провоцировать её дальнейшее развитие. Умеренный режим физических тренировок, наоборот, улучшал функцию расслабления сердца вследствие увеличения максимальной скорости снижения давления, уменьшения конечного диастолического давления, а также значительного снижения конечно-диастолической жесткости миокарда. Умеренные физические тренировки снижали периферическое сопротивление и постнагрузку на сердце, на что указывает снижение конечного систолического давления и артериальной жесткости, что способствовало более эффективной и энергоэкономной работе сердца, о чём свидетельствует уменьшение его ударной работы при увеличении ударного объема. Улучшение физиологических показателей кардиогемодинамики и функционального состояния сердца при умеренном режиме тренировок коррелировало с изменениями обеих рассчитанных индексов. Периодические интенсивные физические нагрузки рекомендовано как простой физиологический способ прекодиционирования для профилактики развития кардиальной дисфункции при гипертонии как результат развития несопряженного состояния cNOS и вызванного им чрезмерной генерации супероксида, и наоборот, угнетение кальцийзависимого синтеза NO.

Ключевые слова: гипертония; физические тренировки; сопряжение cNOS; сердце; митохондрии сердца; крысы.

N.A. Dorofeyeva, A.V. Kotsuruba, B.S. Kopyak, V.F. Sagach

PHYSICAL EXERCISE TRAINING CANCELS CONSTITUTIVE NOS UNCOUPLING AND INDUCED VIOLATIONS OF CARDIAC HEMODYNAMICS IN HYPERTENSION (PART III)

In the heart and heart mitochondria spontaneously hypertensive rats investigated the effect of physical exercise training (swimming in a moderate and excessive training mode) on the physiological indicators of cardiac hemodynamics and biochemical parameters that characterize the level of oxidative and nitrosative stress. The index of coupling Ca^{2+} -dependent constitutive NO-synthases (cNOS = eNOS + nNOS) and biochemical index of dysfunction were calculated. It turned out that both modes of training is completely restored, and even exceed the reference values in untrained rats Wistar conjugate cNOS state and Ca^{2+} -dependent synthesis of nitric oxide (NO). Intensity regime of exercise on the border of functionality have been ineffective for improving the functional state of the cardiovascular system and hypertension can provoke it further. Moderate physical training regime, on the contrary, improves the diastolic function of the heart due to an increase dP/dt_{min} , reducing end-diastolic pressure and a significant reduction in end-diastolic stiffness. Moderate exercise decreased peripheral

resistance and cardiac afterload, as indicated by the decrease in end-systolic pressure and arterial stiffness, which contributed to more efficient and energy-saving of heart work. Improve physiological indicators of cardiac hemodynamics and functional state of the heart in moderate mode of training correlated with changes in both the calculated indices. Moderate mode of training is recommended as a simple physiological preconditioning method for the prevention of cardiac dysfunction, hypertension as a result of state uncoupling eNOS and the resulting excessive generation of superoxide and, conversely, inhibition of Ca²⁺-dependent synthesis of NO.

Key words: hypertension; exercise training; eNOS; heart; mitochondria, rats.

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

REFERENCES

- Calvert JM, Lefer DJ. Role of beta-adrenergic receptors and nitric oxide signaling in exercise-mediated cardioprotection. *Physiology (Bethesda)*. 2013; 28(4): 216-24.
- Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Quindry JC. Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. *Physiology (Bethesda)*. 2014; 29(1): 27-38.
- Di Francescomarino S, Sciarilli A, Di Valerio V, Di Daldassarre M, Gallina S. The effect of physical exercise on endothelial function. *SportVtd*. 2009; 39(10): 797-812.
- Skrypnik D, Bogdariski P, Madry E, Pupek-Musialik D, Walkowiak J. Effect of physical exercise on endothelial function, indicators of inflammation and oxidative stress. *PolMercurLecarski*. 2014; 36(212): 117-21. [Polish].
- Golbidi S, Laher I. Exercise and the aging endothelium. *JDiabetesRes*. 2013: 789607.
- Calvert JW, Condit ME, Aragon JP, Nicolson CK, Moody BF, et al. Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circ Res*. 2011; 108(12): 1448-58.
- Yang L, Jia Z, Yang L, Zhu M, Zhang J, et al. Exercise protects against chronic beta-adrenergic Remodelling of the heart by activation of endothelial nitric oxide synthase. *PLoSOne*. 2014 9(5) e96892.
- Barhoumi T, Briet M, Kasal DA, Fraulob-Aquino JC, Idris-Klodia N, et al. Erythropoietin-induced hypertension and vascular injury in mice overexpressing human endothelin-1: exercise attenuated hypertension, oxidative stress, inflammation and immune response. *J Hypertens*. 2014 32(4) 784-94.
- Mizuno M, Iwamoto GA, Vongpatanasin W, Mitchell JH, Smith SA. Exercise training improves functional sympatholysis in spontaneously hypertensive rats through a nitric oxide-dependent mechanism. *AmJPhysiolHeartCirc Physiol*. 2014 307(2) H242-51.
- Farah C, Kleindienst A, Bolea G, Meyer G, Gayard S, et al. Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *BasicResCardiol*. 2013 108(6) 389.
- 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.
- Galougahi KK, Liu C-C, Gentile C, Kok C, Andrea Nunez A, et al. Glutathionylation Mediates Angiotensin II-Induced eNOS Uncoupling, Amplifying NADPH Oxidase-Dependent Endothelial Dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:1-11.
- 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, № 9:1422-34.
- 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].
- 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].
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res*. 2007; 75(2): 283-90.
- Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*. 2004;555(Pt 3):589-606.
- 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.
- 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.
- Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, et al. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem*. 2000;275(11):7757-63.
- Sahach VF, Kotsiuruba AV, Baziliuk OV, Mehed' OF, Stepanenko LH. Inhibitors of arginase pathway in L-arginine metabolism as a new class of antihypertensive drugs: action of urea on oxidative and nonoxidative metabolism of L-arginine and vascular tone in chronic hypertension. *Fiziol Zh*. 2004;50(6):9-18. [Ukrainian].
- Sahach VF, Baziliuk OV, Kotsiuruba AV, Buzhanevich OM. Disorders of endothelium-dependent vascular reactions and of the arginase and NO-synthase pathways of L-arginine metabolism in arterial hypertension]. *Fiziol Zh*. 2000;46(3):3-13. [Ukrainian].
- Drachuk KO, Kotsiuruba AV, Bazilyuk OV, Stepanenko LG, Sagach VF. Propargylglycine restores endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle in old rats. *Fiziol Zh*. 2014;60(4):3-10. [Ukrainian].

Матеріал надійшов до редакції 05.05.2015

Роль фосфоінозитидного сигнального шляху в опіоїдному контролі $P2X_3$ -рецепторів первинних сенсорних нейронів

В.Б. Кулик, І.В. Чижмаков, Т.М. Волкова, О.П. Максимюк, О.О. Кришталь

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

Методом patch-clamp у конфігурації ціла клітина, досліджено вплив опіоїдів на $P2X_3$ -рецептори у нейронах задньокорінцевих гангліїв (ЗКГ). Показано, що активація опіоїдних G-білоксполучених рецепторів ендogenousним лігандом – лейенкефаліном, призводить до подвійного впливу на $P2X_3$ -рецепторопосередковані струми ($P2X_3$ -струми). Аплікація лейенкефаліну (1 мкмоль/л) повністю пригнічувала амплітуди $P2X_3$ -струмів. Проте після преінкубації нейронів у токсині коклюшу – блокаторі інгібувальних $G_{i/o}$ -білків, та сама концентрація лейенкефаліну викликала стимулювання $P2X_3$ -струмів. Блокування активності фосфоліпази C повністю усувало як стимулювальний, так і пригнічувальний ефекти лейенкефаліну на $P2X_3$ -струми. Таким чином, нами вперше показано, що агоністи опіоїдних рецепторів викликають два протилежно спрямовані впливи на $P2X_3$ -рецептори нейронів ЗКГ щурів, обидва з яких опосередковані активацією фосфоліпази C. Результати цих досліджень відкриють можливий молекулярний механізм добре відомого переходу від пригнічувальної дії опіоїдів (аналгезії) до стимулювальної (гіпералгезії).

Ключові слова: $P2X_3$ -рецептори; опіоїдні рецептори; лейенкефалін; фосфоліпаза C; токсин коклюшу; G-білки.

ВСТУП

Важливою складовою системи пуринергічної сигналізації ссавців є іонотропні $P2X$ -рецептори, котрі активуються зовнішньоклітинним аденозинтрифосфатом і беруть участь у генерації больового сигналу. Численні дослідження свідчать, що гомомерні $P2X_3$ - та гетеромерні $P2X_{2/3}$ -рецептори експресуються у нейронах задньокорінцевих гангліїв (ЗКГ) ссавців і беруть участь у процесах ініціації гострої больової поведінки, гіпералгезії та алодинії [1,2].

Відомо, що рецептори таких прозапальних медіаторів, як простагландин, брадикінін і субстанція P, коекспресуються з $P2X_3$ -рецепторами в периферичних терміналях сенсорних нейронів і стимулюють активність останніх, внаслідок чого посилюється больовий сигнал [3,4]. Ці рецептори сполучені з G_q -білками, що активують фосфоліпазу C

(ФЛС), котра гідролізує фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (ФІФ₂) і призводить до утворення діацилгліцеролу (ДАГ) та інозитол-1,4,5-трифосфату (ІФ₃) [5]. Інші G-білоксполучені рецептори є представниками ендogenousної опіоїдної системи (рецептори μ , δ , κ), активація яких призводить до пригнічення больового сигналу [6 – 8]. Встановлено, що активація опіоїдних рецепторів впливає на $P2X_{2/3}$ -рецептори у нейронах нижнього шийного ганглію, спричинюючи знеболення [9]. Відомо, що опіоїдна аналгетична система може модулювати больові відчуття як на рівні ЦНС, так і на периферії. Периферична опіоїдноіндукована аналгезія має перевагу над центральною, оскільки вона позбавлена таких побічних ефектів, як пригнічення дихання, депресія, наркотична залежність тощо [10].

© В.Б. Кулик, І.В. Чижмаков, Т.М. Волкова, О.П. Максимюк, О.О. Кришталь

Метою нашої роботи був пошук молекулярних механізмів взаємодії опіоїдної та пуринергічної систем у первинних ноцицепторах.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на культивованих, протягом 24 год, нейронах ЗКГ щурів, діаметром 10–30 мкм. У дослідженнях використовували білих щурів лінії Вістар віком 8 діб. Після декапітації тварини розтинали спинномозковий канал та видаляли грудні і поперекові ЗКГ. Виділені ганглії вміщували у чашку Петрі з розчином (нормальний розчин) такого складу (ммоль/л): NaCl – 130; KCl – 5; CaCl₂ – 2; MgCl₂ – 2; HEPES – 10; (рН доводили до 7,3 за допомогою NaOH). Ферментацію гангліїв проводили в середовищі MEM з додаванням колагенази (тип IV) – 1,3 мг/мл і трипсину – 4мг/мл, інкубували протягом 30 хв, при 34 °С. Ферментативну реакцію інгібували розчином середовища MEM, що містив 10 ммоль/л HEPES та 10% ембріональної сироватки крові телят, при 20 – 22 °С протягом 5 хв. Ізольовані клітини отримували механічно, застосовуючи піпетки Пастера різних діаметрів. Клітинну суспензію висівали на покривне скельце, що знаходилось у стерильних чашках Петрі, які містили 2 мл середовища MEM. Отримані в такий спосіб нейрони інкубували при 37 °С та 5% CO₂ протягом 24 год. Ці нейрони використовували у подальших електрофізіологічних дослідженнях.

Реєстрацію струмів проводили з застосуванням методу patch-clamp у конфігурації ціла клітина при кімнатній температурі (20 – 22°С). Трансмембранні струми вимірювали з використанням підсилювача Axopatch 200B (“Axon Instruments”, США), фільтрували з частотою зрізу 2 кГц за допомогою двополюсного фільтра Бесселя та оцифровували аналого-цифровим перетворювачем – Digidata 1200B (“Axon Instruments”, США). Мікропіпетки заповнювали стандартним

внутрішньоклітинним розчином, що містив (ммоль/л): KCl – 130; HEPES – 10; EGTA – 10; ГТФ – 0,5; АТФ – 5; (рН доводили до 7,3 за допомогою КОН). P2X₃-струми викликали прикладанням 30 мкмоль/л агоніста (α,β-Ме-АТФ) протягом 250 мс кожні 2 хв. Це дало змогу отримувати відтворювані P2X₃-струми протягом усього експерименту. Підтримуваний потенціал становив –80 мВ. Для з'ясування впливу опіоїдів на активність P2X₃-рецепторів, їх аплікували на досліджувані нейрони, поки зумовлений ними ефект не сягав стаціонарного рівня. Вплив опіоїду на P2X₃-рецептори виражали як відношення амплітуди струму за даної концентрації ліганда – I (після досягнення стаціонарного рівня) до амплітуди контрольного струму – I₀. Значення представлені як середнє ± стандартне відхилення. Статистичний аналіз проводили за допомогою критерію t Стьюдента. Різницю вважали значущою при P < 0,05. Статистичну обробку одержаних результатів проводили в програмному пакеті Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США). Діючі речовини (агоністи P2X₃- та опіоїдних рецепторів, налоксон) додавали до нормального розчину. Всі хімічні сполуки, вироблені компанією “Sigma” (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Прикладений α,β-Ме-АТФ (30 мкмоль/л) на досліджувані нейрони ЗКГ, при підтримуваному потенціалі –80 мВ, викликав появу трансмембранного P2X₃-струму у 62% клітин (n=56). Ендогенний опіоїд – лейенкефалін, аплікований у концентрації 1 мкмоль/л, призводив до повного інгібування P2X₃-струмів на (99 ± 1%; n = 6; P < 0,001; див. рис. 1,а,б; 2,2) у 25,8% від загальної кількості протестованих нейронів. Клітини, не чутливі до впливу опіоїдів, не використовувались у подальших дослідженнях.

Антагоніст опіоїдних рецепторів налоксон у концентрації 50 нмоль/л прикладений на тлі лейенкефаліну протягом 6–8 хв пра-

критично повністю усував пригнічувальний ефект останнього ($95 \pm 6\%$; $n = 5$, $P < 0,05$; див. рис. 2,3). Цей результат вказує на те, що вплив вищезазначеного опіюїду на P2X₃-струми здійснюється внаслідок активації його рецепторів.

Останні дослідження на високопорогових кальцієвих каналах N-типу у нейронах ЗКГ показали, що опіоїдні рецептори можуть існувати у двох конформаційних станах і бути зв'язаними з інгібувальними ($G_{i/o}$) або стимулювальними (G_s та G_q) гетеротримерними G-білками [4,5,11]. Токсин коклюшу вибірково блокує $G_{i/o}$ -білки, при цьому не впливаючи на активність G_s -білків [11]. Отже, якщо інгібувальний вплив лейенкефаліну на P2X₃-рецептори опосередкований $G_{i/o}$ -білками, то блокування останніх повинно призвести до стимулювання P2X₃-струму.

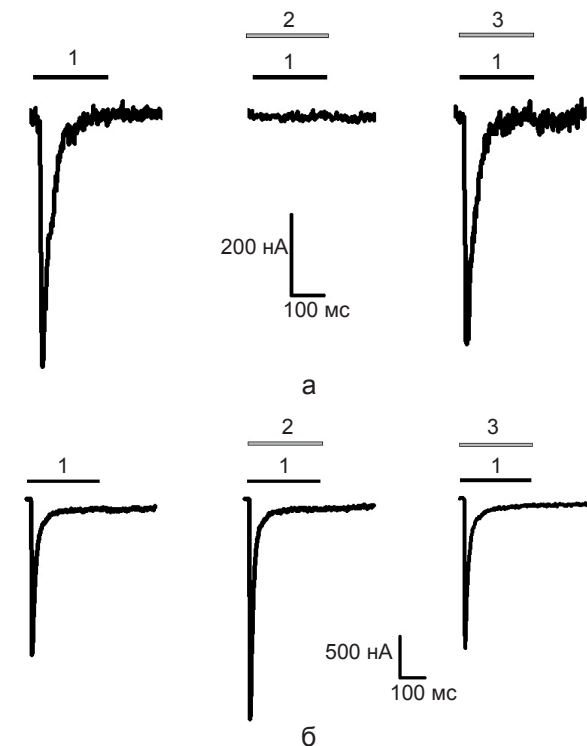


Рис 1. Подвійний вплив лейенкефаліну на P2X₃-струми в нейронах задньокорінцевих гангліїв: 1 - α,β -Me-АТФ (30 мкмоль/л); 2 - лейенкефалін (1 мкмоль/л); 3 - відмивка; а - інгібування, б - стимулювання (після інкубації з токсином коклюшу)

Для перевірки цього припущення ЗКГ нейрони інкубували з 250 нг/мл токсину коклюшу протягом 24 год. Після такої інкубації 1 мкмоль/л лейенкефаліну призводив до діаметрально протилежного ефекту: відбувалося стимулювання P2X₃-струмів на 11 – 45% ($n = 5$; див. рис. 1,б; 2,4) у всіх опіоїдчутливих нейронах. Таким чином, наші дослідження вказують на те, що активація опіоїдних рецепторів викликає подвійний вплив на P2X₃-струми і цей ефект опосередкований G-білками. Вочевидь, висока ефективність пригнічувального шляху ($G_{i/o}$ -білки) маскує стимулювальний вплив білків G_s - та G_q - типу у нормальних умовах.

Відомо, що активація $G_{i/o}$ -білків призводить до зменшення вмісту внутрішньоклітинного циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ), що може впливати на активність P2X₃-рецепторів. За цих умов внутрішньоклітинний розчин не містив цАМФ. Більше того, висока концентрація в клітині цАМФ (0,5 ммоль/л) не запобігала пригніченню активності P2X₃-струмів лейенкефаліном (див. рис. 2,5). Тому малоймовірно, що пригнічення P2X₃-струмів пов'язане зі зниженням

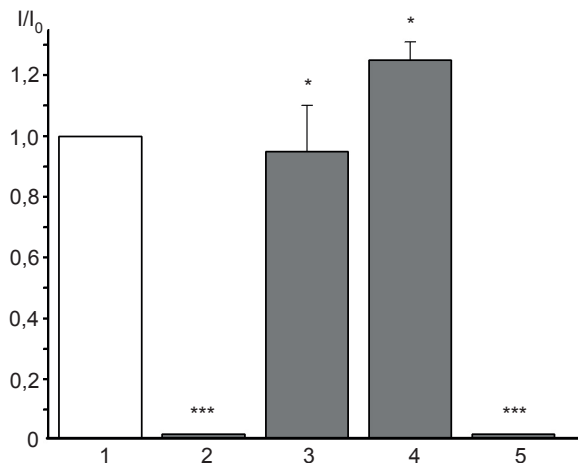


Рис 2. Вплив лейенкефаліну (1 мкмоль/л) на P2X₃-струми в нейронах задньокорінцевих гангліїв: 1 – контроль; 2 – лейенкефалін; 3 - лейенкефалін і налоксон (50 нмоль/л); 4 – лейенкефалін після інкубації нейронів у токсині коклюшу (250 нг/мл); 5 – лейенкефалін за умов внутрішньоклітинного підвищення вмісту цАМФ (0,5 ммоль/л), * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ порівняно з контролем

вмісту цАМФ, внаслідок опіоїдіндукованого інгібування активності аденілатциклази (АЦ) [12]. Отже, класичного внутрішньоклітинного шляху опіоїдної сигналізації, котрий пов'язаний з пригніченням АЦ гетеротримерними $G_{i/o}$ -білками наразі не спостерігається.

Відомо, що ліпідний компонент плазматичної мембрани -фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (ФІФ₂) чинить регуляторний вплив на мембранні протеїни та іонні канали, в тому числі і на P2X₃-рецептори. Виснаження пулу ФІФ₂ призводить до інгібування активності останніх, а додавання його до цитозолу має зворотний ефект [13]. Тому опіоїдіндукована активація ФЛС [14] і в свою чергу гідроліз ФІФ₂ може лежати в основі інгібування P2X₃-струмів. Для перевірки цієї гіпотези, нами було застосовано селективний інгібітор ФЛС – U-73122, який усував інгібувальну дію лейенкефаліну на $87 \pm 11\%$ ($n = 4$; $P < 0,05$; рис. 3,а; в,2). Цей феномен міг би виявити прихований стимулювальний компонент подвійного впливу опіоїду на P2X₃-струми. Проте U-73122 відновлював амплітуди P2X₃-

струмів, інгібовані лейенкефаліном, лише до контрольного рівня. Це спостереження дало змогу припустити, що викликані опіоїдом інгібування та стимулювання P2X₃-струмів опосередковані ФЛС. Результат експерименту (див. рис. 3,б, в,3) доводить, що стимулювальний вплив ендogenous опіоїду на P2X₃-струми у оброблених токсином коклюшу нейронах повністю інгібується U-73122.

Цей парадоксальний висновок добре узгоджується з даними [15], стосовно регуляції P2X₃-рецепторів іншими метаболічними шляхами. Наприклад, активація P2Y₂-рецепторів чинить інгібувальний вплив на P2X₃-рецептори через чутливі до токсину коклюшу $G_{i/o}$ -білки та ФЛС [15]. З іншого боку, активація не чутливих до токсину коклюшу G_q -білків, сполучених з рецепторами брадикініну та субстанції P, лежить в основі стимулювання P2X₃-струмів через каскад ФЛС/ФІФ₂/ДАГ/ПКС [16,17]. Таким чином, різні типи метаболічних, G-білоксполучених рецепторів може викликати як інгібування, так і стимулювання P2X₃-струмів. Взаємодія опіоїдних

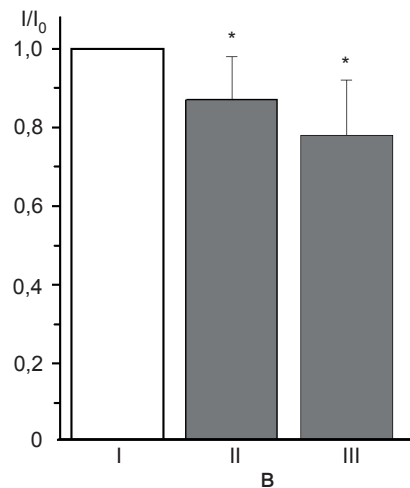
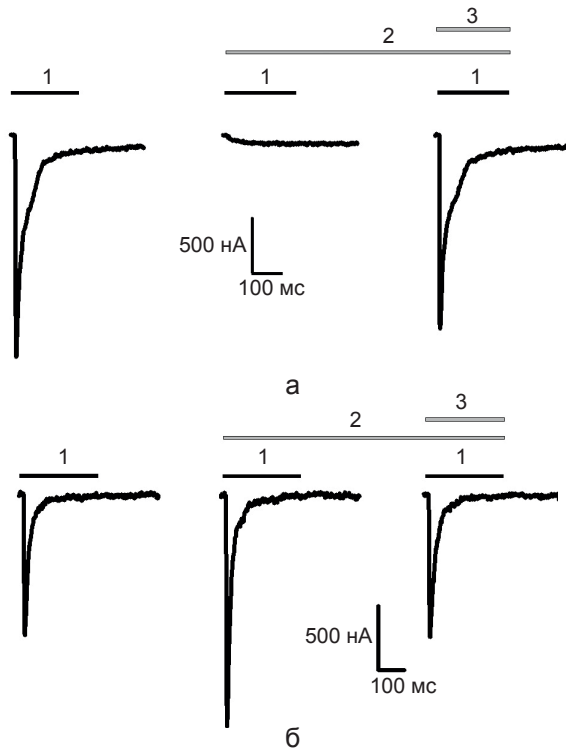


Рис 3. Усунення інгібувального (а) та стимулювального (б) впливів лейенкефаліну на P2X₃-струми блокаторм фосфоліпази С (U – 73122): 1 – α,β -Me-АТФ (30 мкмоль/л); 2 – лейенкефалін (1 мкмоль/л); 3 – U – 73122 (1 мкмоль/л), прикладений на тлі дії лейенкефаліну; в – узагальнювальні результати впливу блокатора фосфоліпази С на модуляцію P2X₃-струмів опіоїдом: 1 – контроль; 2 – лейенкефалін і U – 73122; 3 - лейенкефалін і U – 73122 після інкубації з токсином коклюшу; * $P < 0,05$ порівняно з контролем

рецепторів з G_q-білками та активація ФЛС-опосередкованого шляху, продемонстрована в клітинах нейробластоми, що були оброблені токсином коклюшу [18].

Активация ФЛС призводить до гідролізу мембранного фосфоліпиду ФІФ₂ на дві сигнальні молекули: ІФ₃, котрий мобілізує Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо і діацилгліцерол, який активує протеїнкіназу С (ПКС) [19]. З іншого боку відомо, що остання, ймовірно, впливає на активність P2X₃-рецепторів [20]. Отже, ФЛС може бути залучена до модуляторного впливу лейенкефаліну на P2X₃-струми через ПКС у оброблених і необроблених токсином коклюшу нейронах ЗКГ. Ми виявили, що інгібітор ПКС – стауроспорин повністю усуває опіоїдіндукований стимулювальний вплив на P2X₃-струми у нейронах ЗКГ, інкубованих з токсином коклюшу (рис. 4).

Показано, що ПКС може активуватися діацилгліцеролом або збільшенням Ca²⁺ у цитоплазмі [19]. Оскільки концентрація останнього була стабільною в експериментальних умовах (внутрішньоклітинний ЕГТА – 10 ммоль/л), імовірно, що ФЛС/ФІФ₂/ДАГ/ПКС-шлях залучений до стимулювального

впливу опіоїдів на P2X₃-струми. Тобто викликана опіоїдом активація ФЛС призводить як до інгібування, так і до стимулювання P2X₃-рецепторів. Такий подвійний вплив, викликаний гідролізом ФІФ₂, обговорювався раніше. Авторами було висунуто гіпотезу, що молекули ФЛС можуть просторово відокремлюватися мікродоменами [21], і розмішуватися поруч з ФІФ₂-пулами, котрі асоційовані з P2X₃-рецепторами або не асоційовані. Останні були ідентифіковані в плазматичній мембрані електронною мікроскопією [22]. Виснаження ФІФ₂-пулу, асоційованого з P2X₃-рецепторами, призводить до інгібування P2X₃-струмів [13], а гідроліз іншого ФІФ₂, відокремленого від P2X₃-рецепторів, викликає їх стимулювання через ДАГ/ПКС-шлях (рис. 5).

Ми припускаємо, що в нормі ДАГ з'являється в обох мікродоменах, однак інгібування P2X₃-струмів, спричинене виснаженням пулу ФІФ₂, настає швидше і пересильно інтенсивність синтезу ДАГ, а отже і ПКС – залежне стимулювання.

Залучення ПКС до механізму стимулювального впливу опіоїдних рецепторів на ноцицептори було показано *in vitro* та

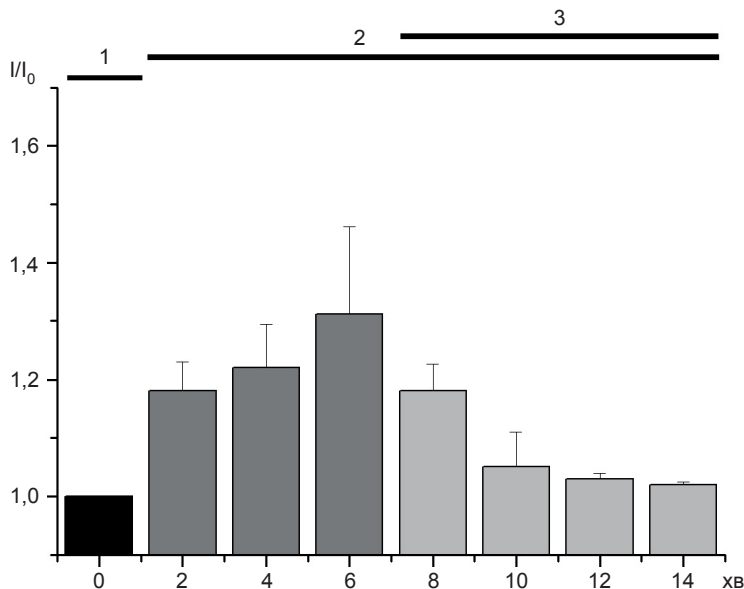


Рис.4 Усунення блокатром протеїнкінази С стимулювального впливу лейенкефаліну на P2X₃-струми: 1 – контроль; 2 – лейенкефалін (1мкмоль/л) після інкубації з токсином коклюшу, 3 – стауроспорин (1мкмоль/л) прикладений на тлі дії лейенкефаліну

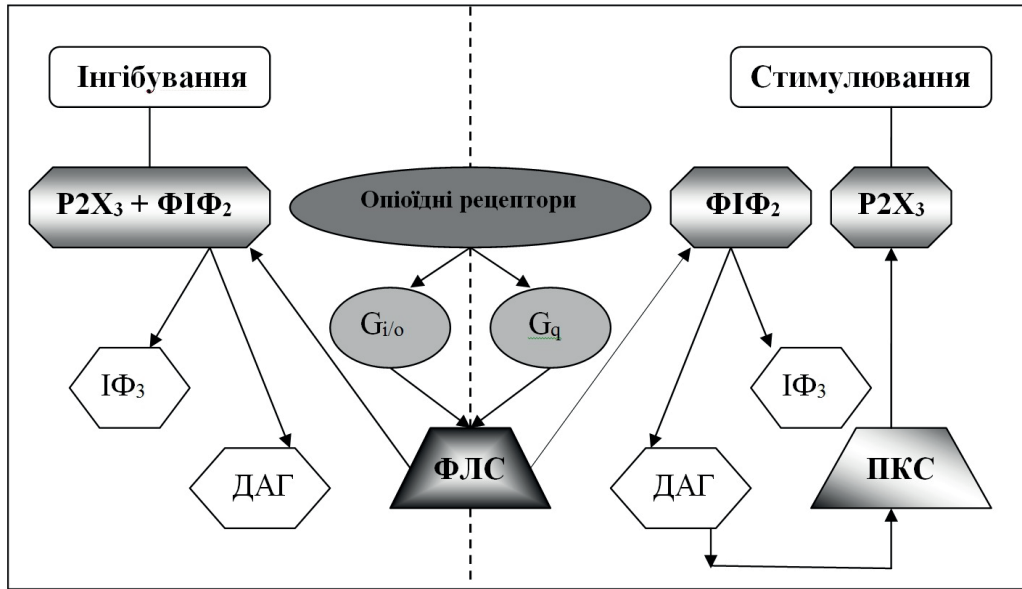


Рис.5. Загальна схема внутрішньоклітинного механізму подвійного впливу опіоїдів на P2X₃-рецептори в нейронах задньокорінцевих гангліїв (пояснення в тексті)

концептуально узгоджено з *in vivo*, згідно з якими, опіоїдіндукований ФЛС/ПКС-сигнал викликає гіпералгезію у дослідних тварин. Наприклад, супраспинальний анагетичний ефект морфіну підсилювався в нокаутних за ПКС гена мишей [23]. В інших дослідженнях застосування опіоїдів у низьких концентраціях призводить до гіпералгезії в поведінковому тесті з нагрітою пластиною [24]. Автори стверджують, що до цього ефекту залучений ФЛС/ПКС-сигнальний шлях.

Таким чином, активація опіоїдних рецепторів лейенкефаліном, викликає два протилежно спрямовані ефекти на P2X₃-рецептори. Вони реалізуються різними G-білками (G_{i/o}- або G_s-, чи G_q-), проте обидва опосередковані ФЛС. Існування цих різноспрямованих шляхів можна розглядати як молекулярну основу добре відомого переходу інгібувальної дії опіоїдів (аналгезії) до стимулювальної (гіпералгезії). З'ясування біохімічних шляхів, що змінюють чутливість до опіоїдів є важливим завданням для майбутніх досліджень у галузі фізіології та фармакології болю.

В.Б. Кулик, І.В. Чижмаков, Т.М. Волкова, А. П. Максимюк, О.А. Крышталь

РОЛЬ ФОСФОИНОЗИТОЛЬНОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В ОПИОИДНОМ КОНТРОЛЕ P2X₃-РЕЦЕПТОРОВ ПЕРВИЧНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ

Методом patch-clamp в модификации целая клетка продемонстрировано влияние опиоидов на P2X₃-рецепторы в нейронах заднекорешковых ганглиев (ЗКГ). Нами доказано, что активация опиоидных G-белкоопосредованных рецепторов эндогенным опиоидом – лейенкефалином, приводит к двойному влиянию на P2X₃-опосредованные токи (P2X₃-токи). Последние вызывались приложением α,β-Ме-АТФ. Аппликация лейенкефалина (1 мкмоль) приводит к полному ингибированию P2X₃-токов. Однако, инкубация нейронов в токсине коклюша – блокатора ингибирующих G_{i/o}-белков, вызвала стимулирующее влияние лейенкефалина (1 мкмоль). Известно, что активация опиоидных рецепторов стимулирует фосфолипазу C (ФЛС). Блокатор последней U - 73122 (1 мкмоль) полностью устранял как стимулирующий, так и ингибирующий эффекты лейенкефалина на P2X₃-токи. Таким образом, агонисты опиоидных рецепторов вызывают два противоположно направленные эффекты на P2X₃-рецепторы. Оба эффекта опосредованные активацией ФЛС. Результаты этих исследований откроют возможный молекулярный механизм хорошо известного перехода ингибирующего действия опиоидов (аналгезии) к стимулирующему (гипералгезии).

Ключевые слова: P2X₃-рецепторы; опиоидные рецепторы; лейэнкефалин; фосфолипаза C; токсин коклюша; G-белки.

**V.B.Kulyk, I.V.Chizhnikov, T.M. Volkova,
O.P. Maximyuk, O.A.Krishtal**

ROLE PHOSPHOINOSITID SIGNALING PATHWAY IN OPIOIDS CONTROL OF P2X3 RECEPTORS IN THE PRIMARY SENSORY NEURONS

Homomeric P2X₃ receptors expressed in primary nociceptive neurons are crucial elements in the pain signal generation. In turn, opioid system regulates the intensity of this signal in both CNS and PNS. Here we describe the effects of opioids on P2X₃ receptors in DRG neurons studied by using patch clamp technique. Activation of G-protein coupled opioid receptors by endogenous opioid Leu-enkephalin (Leu), resulted in the two opposite effects on P2X₃ receptor-mediated currents (P2X₃ currents). In particular, application of 1 μM Leu lead to the complete inhibition of P2X₃ currents. However, after pretreatment of the neurons with a Gi/o-protein inhibitor pertussis toxin (PT), the same concentration of Leu caused facilitation of P2X₃ currents. PLC inhibitor U-73122 at concentration of 1 μM completely eliminated both facilitating and inhibitory effects of Leu on P2X₃ currents. Thus, opioid receptor agonists cause two oppositely directed effects on P2X₃ receptors in DRG neurons of rats and both of them are mediated through PLC signaling pathway. Our results point to a possible molecular basis of the mechanism for the well-known transition inhibitory action of opioids (analgesia) to facilitating (hyperalgesia).

Key words: P2X₃-receptors; opioid receptors; Leu-enkephalin; phospholipase C; pertussis toxin; G-proteins.

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

REFERENCES

1. Ueno S, Tsuda M, Iwanaga T, Inoue K. Cell type-specific ATP-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Br J Pharmacol.* 1999;126(2): 429-36.
2. Xiang Z, Bo X, Burnstock G. Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci Lett.* 1998; 256(2):105-8.
3. Steranka LR, Manning DC, DeHaas CJ, Ferkany JW, Borosky SA, Connor JR, Vavrek RJ, Stewart JM, Snyder SH. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;85(9):3245-9.
4. Prado FC, Araldi D, Vieira AS, Oliveira-Fusaro MC, Tambeli CH, Parada CA. Neuronal P2X₃ receptor activation is essential to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathomimetic amines released during inflammation. *Neuropharmacology.* 2013; 67 (8): 252-8.

5. Thayer SA, Perney TM, Miller RJ. Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. *J Neurosci.* 1988; 8(11):4089-97.
6. Reichert JA, Daughters RS, Rivard R, Simone DA. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain.* 2001;89(2-3): 221-27.
7. Shannon HE, Lutz EA. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. *Neuropharmacology.* 2002; 42(2):253-61.
8. Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9(1): 3-8.
9. Chizhnikov I, Yudin Y, Mamenko N, Prudnikov I, Tamarova Z, Krishtal O. Opioids inhibit purinergic nociceptors in the sensory neurons and fibres of rat via a G protein-dependent mechanism. *Neuropharmacology.* 2005; 48(5): 639-47.
10. Sverdlov Y. Modern pain problem. *Medical scientific and educational - methodical journal.* 2001; 1(3) : 31-40.
11. Crain SM, Shen KF. Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine's analgesic potency and attenuate opioid tolerance/dependence liability. *Pain.* 2000; 84(2-3):121-31.
12. Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74(8): 3365-9.
13. Mo G, Bernier LP, Zhao Q, Chabot-Dore AJ, Ase AR, Logothetis D, Cao CQ, Seguela P. Subtype-specific regulation of P2X₃ and P2X_{2/3} receptors by phosphoinositides in peripheral nociceptors. *Mol Pain.* 2009; 5 (2): 47-56.
14. Xie W, Samoriski GM, McLaughlin JP, Romoser VA, Smrcka A, Hinkle PM, Bidlack JM, Gross RA, Jiang H, Wu D. Genetic alteration of phospholipase C beta3 expression modulates behavioral and cellular responses to mu opioids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(18):10385-90.
15. Mo G, Peleshok JC, Cao CQ, Ribeiro-da-Silva A, Seguela P. Control of P2X₃ channel function by metabotropic P2Y₂ utp receptors in primary sensory neurons. *Mol Pharmacol.* 2013; 83(3):640-47.
16. Park CK, Bae JH, Kim HY, Jo HJ, Kim YH, Jung SJ, Kim JS. Substance P sensitizes P2X₃ in nociceptive trigeminal neurons. *J Dent Res.* 2010; 89 (5):1154-59.
17. Paukert M, Osteroth R, Geisler HS, Brandle U, Glowatzki E, Ruppertsberg JP, Grunder S. Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X₃ subunit. *J Biol Chem.* 2001;276 (6): 21077-82.
18. Rubovitch V, Gafni M, Sarne Y. The mu opioid agonist DAMGO stimulates cAMP production in SK-N-SH cells through a PLC-PKC-Ca⁺⁺ pathway. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003; 110(2): 261-6.
19. Rebecchi MJ, Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.* 2000; 80(4):1291-1335.
20. Brown DA, Yule DI. Protein kinase C regulation of P2X₃ receptors is unlikely to involve direct re-

- ceptor phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 2007;173(9):166-75.
21. Delmas P, Crest M, Brown DA. Functional organization of PLC signaling microdomains in neurons. *Trends Neurosci*. 2004; 27(3):41-47.
22. Fujita A, Chend J, Tauchi-Sato K. A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5 – bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(2): 9256-61.
23. Newton PM, Kim JA, McGeehan AJ, Paredes JP, Messing RO. Increased response to morphine in mice lacking protein kinase C epsilon. *Genes Brain Behav*. 2007;6(4):329-38.
24. Galeotti N, Stefano GB, Guarna M, Bianchi E, Ghelardini C. Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice. *Pain*. 2006;123(3):294 -305.

*Матеріал надійшов
до редакції 09.09.2014*

Поліморфізм $G^{-47} \rightarrow A$ промотору гена γ -кристаліну впливає на рівень його експресії у тромбоцитах

С.О. Риков¹, Ю.Ю. Биць¹, С.В. Гончаров², В.Є. Досенко²

¹Київська міська клінічна офтальмологічна лікарня “Центр мікрохірургії ока”;

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця Національної академії наук України, Київ;

E-mail: byts.yuri@gmail.com

Визначення поліморфізму ($G^{-47} \rightarrow A$) промотору гена γ -кристаліну (CRYGB; rs2289917) проведено з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів. За результатами генотипування розподіл алельних варіантів значно відрізняється: G/G – 35,37% G/A – 53,66% A/A – 10,98% у хворих на катаракту та G/G – 55,06% G/A – 35,96% A/A – 8,99% у контрольній групі ($P=0,03$ за критерієм χ^2). При дослідженні рівня експресії гена у тромбоцитах показано, що кількість мРНК CRYGB у гомозигот G/G у 3,9 рази ($P < 0,05$) вища, ніж у носіїв алеля A (генотип G/A та A/A). Розподіл варіантів промотору ($G^{-47} \rightarrow A$) CRYGB суттєво відрізняється у хворих на катаракту та у контрольній групі і має функціональне значення, впливаючи на рівень експресії мРНК кристаліну.

Ключові слова: кристалін; одонуклеотидні поліморфізми; катаракта.

ВСТУП

Питання про роль спадкових факторів у розвитку найбільш розповсюджених захворювань, у тому числі вікової катаракти, є винятково актуальним у сучасній медичній генетиці [1–3]. Виходячи з даних ВООЗ, у світі нараховується близько 285 млн. людей з різноманітними порушеннями зору, з яких 39 млн. сліпі. На частку людей старших за 50 років припадає 82% від загальної кількості сліпих. За даними ВООЗ катаракта є основною причиною оборотної сліпоти у світі і знаходиться на другому місці серед чинників, що викликають зниження гостроти зору (33%). Серед факторів ризику цього захворювання розглядаються і одонуклеотидні поліморфізми (SNPs) та інші варіації [4]. Слід визнати, що досліджень одонуклеотидних поліморфізмів як факторів ризику у розвитку вікової катаракти практично немає, але роль спадкових чинників в етіології цього захворювання визнається більшістю вчених [5, 6, 2]. Мутації в гені γ -кристаліну (CRYGB), що

© С.О. Риков, Ю.Ю. Биць, С.В. Гончаров, В.Є. Досенко

кодує основний структуроутворювальний білок кришталика [7, 5], спричинюють розвиток вродженої катаракти. Проте даних про роль поліморфізмів в цьому гені, а також про функціональне значення варіацій обмаль [5]. Це й спонукало нас до проведення дослідження частоти поліморфізму гена CRYGB у хворих на вікову катаракту та рівня експресії мРНК його гена у клітинах людей із різними варіантами промотору – $G^{-47} \rightarrow A$. За даними бази даних genecards.org експресія вказаного гена не обмежується кришталиком, а спостерігається і в клітинах крові, а саме у тромбоцитах. Саме ці клітини ми і обрали для виділення у генотипованих осіб для виділення РНК та її кількісної оцінки.

Метою нашої роботи було вивчення впливу певних варіантів промотору ($G^{-47} \rightarrow A$) гена CRYGB на його експресію.

МЕТОДИКА

Матеріалом дослідження був букальний епітелій та венозна кров 96 людей, хворих

на початкову та незрілу катаракту. Букальний епітелій забирали за допомогою зонду “ЗГУ-ЦМ” (Росія). Про наявність катаракти у пацієнтів досліджуваної групи робили висновок, виходячи з даних біомікроскопії переднього відрізка ока. До контрольної групи ввійшла та сама кількість людей, що не мали ознак вікової катаракти. ДНК виділяли з використанням наборів «Isogen» (Росія).

G⁻⁴⁷→A-поліморфізм промотору визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів за власною методикою. Для цього ампліфікували ділянку промотору гена CRYGB за допомогою пари специфічних праймерів: прямий 5'-TGT CCT CGT AGA AGG TGA TCTG -3' та зворотний 5'-TAG AAC AAC CCG AAC СТА ССAG-3'. Праймери синтезовано фірмою «Метабiон» (Німеччина). Для ампліфікації брали 30-50 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буферу, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 30 пмоль/л кожного з праймерів і 0,5 ОД Dream-Taq-полімерази (“АмпліСенс”, Росія), об’єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері “Applied Biosystems 2700” (“PerkinElmer”, США). Програма ампліфікації фрагменту промотора складалася з 45 циклів: денатурація – 94°C (5 хв), гібридизація праймерів – 57°C (50 с), початкова – 72°C (1 хв) та кінцева елонгація – 70°C (7 хв). Надалі 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 год. з 5 ОД рестриктази PstI (“Ферментас”, Литва) в буфері О такого складу: 50 ммоль/л триас-ацетату (рН 7,5), 10 ммоль/л MgCl₂, 100 ммоль/л ацетату хлориду

натрію, 0,1 мг/мл альбуміну. За наявності в -47-му положенні промотору аденіну PstI розщеплює ампліфіковану ділянку (розмір 343 пар основ – п.о.) на два фрагменти – 170 та 173 п.о., які візуалізуються як одна смужка в агарозному гелі (рис. 1), при генотипі G/A візуалізуються два фрагменти наступного розміру: 343 п.о. та сумарне свічення двох фрагментів (170 та 173 п.о.). При найбільш розповсюдженному генотипі рестрикція фрагмента не відбувається і візуалізується один ампліфікат розміром 343 п.о.

Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5 %-му агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізацію ДНК після горизонтального електрофорезу (160 В протягом 40 хв) проводили за допомогою транслюмінатора (“Біоком”, Росія) та відеосистеми ViTran (Росія).

Для виділення тромбоцитів венозну кров набирали в стерильних умовах у моновети об’ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 ммоль/л) як антикоагулянта (“Sarstedt”, Німеччина), а для попередження адгезії та агрегації тромбоцитів використовували апіразу (1 ОД/мл). Виділення тромбоцитів відбувалося в три етапи: центрифугування (100 g) цільної крові протягом 5 хв (супернатант містив тромбоцити і моноцити); центрифугування (400 g) протягом 2 хв (моноцити сідають на дно пробірки, а тромбоцити залишаються у верхньому шарі); центрифугування (900 g) протягом 6 хв з наступним ресуспензування тромбоцитів у буфері Тіроде такого складу (ммоль/л): NaCl – 137, NaHCO₃ – 12, KCl – 2, Na₂HPO₄ – 0,34, MgCl₂ – 1, глюкози – 5,5, HEPES – 5; рН 7,3), що містив 0,35% сироват-



Рис. 1. Результати електрофорезу фрагмента промотору гена γ -кристаліну після рестрикції за використання фермента PstI. Смужки 2, 3, 6-8, 10, 13, 14, 16-18 відповідають G/G, 1, 4, 5, 9, 11, 12 – G/A, 15 – A/A-генотипам

кового альбуміну бика. Підрахунок кількості тромбоцитів проводили в камері Горяєва.

РНК із ізольованих тромбоцитів виділяли за допомогою набору Trizol RNA-prep («Isogen», Росія), її концентрацію визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000 («Thermo Scientific», США). Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору реагентів First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва), застосовуючи 1,2 – 1,5 мкг загальної РНК і гексамерний праймер. Отриману кДНК використовували для проведення кількісної ПЛР у реальному часі із застосуванням флуоресцентного барвника SYBR-Green та специфічної пари праймерів: прямий 5'- TAT CTC TGT TCA GGA CCG CTTC -3' та зворотний 5'- GAT ACT GCC TCC CCC TGT AGTT -3'. Програма ампліфікації складалася з 45 циклів денатурації (95°C, 5 с), приєднання праймерів та елонгації (60°C, 60 с) та проводилася за використання системи 7500 Fast Real-time PCR («Applied Biosystems», США). Експресію цих генів стандартизували відносно такої гена β-актину. Аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR Software («Applied Biosystems», США). Рівень експресії розраховували за загальноприйнятою формулою 2^{-ΔCt}.

Статистичну обробку результатів проводили у спеціалізованому пакеті SPSS версії 20.0.

Відповідність розподілу генотипів закону Харді-Вайнберга була перевірена за допомогою он-лайн калькулятора (<https://thething.shinyapps.io/SNPcalc/>). Для встановлення можливої асоціації між G⁻⁴⁷→A-поліморфізмом промотору гена CRYGB та ризиком розвитку катаракти був застосований метод χ²-критерію за Пірсоном. Статистично значущими результатами вважали при P < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генотипування пацієнтів з катарактою та без її ознак показало, що розподіл генотипів у цих групах суттєво відрізняється: G/G – 35,37%, G/A – 53,66%, A/A – 10,98% у хворих на катаракту та G/G – 55,06%, G/A – 35,96%, A/A – 8,99% у контрольній групі (рис. 2,а). Проведений статистичний аналіз із застосуванням χ²-критерію Пірсона встановив вірогідність розподілу алельних варіантів (P=0,03). Аналіз розподілу алелей (див. рис. 2,б) також відрізняє групу хворих на катаракту – частота мінорного алеля становила 0,38 (в контрольній групі – 0,27, P=0,03).

Визначення рівня експресії гена CRYGB у тромбоцитах за допомогою зворотної транскрипції з наступною ПЛР у реальному часі дало змогу встановити, що рівень мРНК CRYGB у гомозигот G/G у 3,9 раза (P < 0,05) вищий, ніж у носіїв алеля A (генотип G/A та

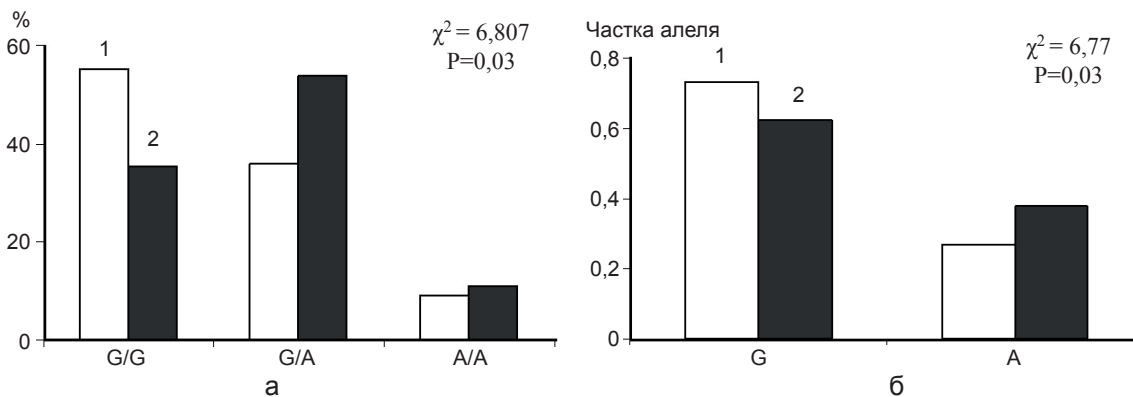


Рис. 2. Розподіл генотипів (а) та алелей (б) гена γ-кристаліну (поліморфізм промотору G⁻⁴⁷→A) у практично здорових людей без ознак вікової катаракти (1) та у хворих на катаракту (2). Вірогідність відмінностей у розподілі частот генотипів та алелей визначено за χ²-критерієм. Кількість людей з генотипом G/G - 49, G/A - 32, A/A - 8 у контрольній групі та 29, 44, 9 у дослідній відповідно

A/A). Це свідчить, що вказаний поліморфізм є функціональним, тобто зменшує експресію досліджуваного гена у тромбоцитах. Звичайно, регуляція експресії генів у різних тканинах має свої особливості і встановлена нами закономірність для тромбоцитів може не повністю реалізуватися в тканинах ока, а саме кришталіку. Проте аналогічні функціонально-генетичні дослідження інших генів дають можливість стверджувати, що можна з високою вірогідністю говорити про наявність залежності експресії мРНК CRYGB від генотипу.

Отримані нами результати повністю співпадають з отриманими індійськими вченими у пацієнтів з «педіатричною» катарактою [10]. Серед досліджених чотирьох поліморфізмів у генах CRYGA та GRYGB тільки G⁻⁴⁷→A-поліморфізм rs2289917 виявив сильну асоціацію з катарактою. Функціональних досліджень автори не проводили, але застосування біоінформаційного методу, а саме множинного вирівнювання (multiple sequence alignment), дало змогу показати, що нуклеотид у -47-му положенні знаходиться в висококонсервативному регіоні гена GRYGB як у приматів, так і у гризунів. Таким чином, отримані нами результати знаходять біоінформаційне підтвердження і доводять функціональне значення заміни G⁻⁴⁷→A. Подальший аналіз із застосуванням програмного забезпечення ALIBABA пока-

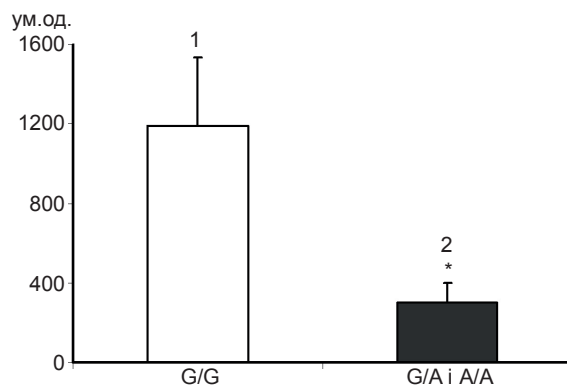


Рис. 3. Рівень експресії мРНК γ -кристаліну (CRYGB) у тромбоцитах людей із різними варіантами промотору гена CRYGB (G⁻⁴⁷→A, rs2289917). * вірогідність відмінності (P<0,05) експресії гена при генотипах G/A та A/A (2) (n=10) порівняно із G/G генотипом (1) (n=25)

зав, що послідовність, яка містить алель G, є сайтом зв'язування для двох транскрипційних факторів, а саме – ACE2 та прогестеронового рецептора, а заміна на аденін у даній позиції спричинює втрату сайту зв'язування з цими транскрипційними факторами. Перший з них у людини досі не описаний і є транскрипційним фактором у дріжджів. А прогестероновий відомий як рецептор ядерних гормонів класу NR3C, що включає в себе мінералокортикоїди, глюкокортикоїди та андрогенові рецептори. Основним сигнальним шляхом, що використовується прогестероновими рецепторами, є зв'язування ДНК і транскрипційна регуляція таргетних генів. Сигналізація за участю прогестеронового рецептора також може відбуватися через зв'язування з іншими транскрипційними факторами, такими, як NF-kB, AP-1 або STAT, проте даних, що ці білки впливають на експресію гена кристаліну, поки що немає.

Узагальнюючи результати, слід зазначити, що вони вказують на те, що G⁻⁴⁷→A-поліморфізм гена γ -кристаліну частіше зустрічається у хворих на вікову катаракту та може розглядатися як генетичний фактор ризику розвитку цього захворювання. Досить молодий вік людей, що були відібрані для участі у дослідженні, свідчить про прискорену появу вікових змін у кришталіку і, з огляду на це, вказаний генетичний маркер може бути застосований для первинного скринінгу осіб з високим ризиком розвитку катаракти і з наступним проведенням профілактичних заходів.

ВИСНОВКИ

1. Розподіл варіантів промотору (G⁻⁴⁷→A) гена γ -кристаліну (rs2289917) суттєво відрізняється у хворих на катаракту та у контрольній групі осіб, що не мають ознак вікових змін кришталіка.

2. Поліморфізм має функціональне значення – експресія мРНК кристаліну у носіїв алеля A значно нижча, ніж у гомозигот G/G.

3. Визначення G⁻⁴⁷→A-поліморфізму промотору гена γ -кристаліну може знайти

застосування у разі проведення скринінгових досліджень для формування груп підвищеного ризику розвитку катаракти.

С.А. Рыков¹, Ю.Ю. Быць¹, С.В. Гончаров², В.Е. Досенко².

ПОЛИМОРФИЗМ (G-47→A) ПРОМОТОРА ГЕНА γ-КРИСТАЛЛИНА ВЛИЯЕТ НА УРОВЕНЬ ЕГО ЭКСПРЕССИИ В ТРОМБОЦИТАХ

Определение полиморфизма G⁻⁴⁷→A промотора гена γ-кристаллина (CRYGB; rs2289917) проведено с использованием метода полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов. По результатам генотипирования распределение аллельных вариантов значительно отличается: G/G – 35,37% G/A – 53,66% A/A – 10,98% у больных катарактой и G/G – 55,06% G/A – 35,96% A/A – 8,99% в контрольной группе (P = 0,03 по критерию χ²). При исследовании уровня экспрессии гена в тромбоцитах показано, что количество мРНК CRYGB у гомозигот G/G в 3,9 раза (P < 0,05) выше, чем у носителей аллеля A (генотип G/A и A/A). Распределение вариантов промотора G⁻⁴⁷→A гена CRYGB существенно отличается у больных катарактой и в контрольной группе и имеет функциональное значение, влияя на уровень экспрессии мРНК CRYGB.

Ключевые слова: кристаллин; однонуклеотидные полиморфизмы; катаракта.

¹Киевская городская клиническая офтальмологическая больница «Центр микрохирургии глаза»;

²Институт физиологии им. А.А. Богомольца Национальной академии наук Украины, Киев

S.A. Rykov¹, Y. Y. Byts¹, S. V. Goncharov², V. E. Dosenko².

ALLELIC VARIANT FREQUENCY OF PROMOTER (G⁻⁴⁷→A) γ-CRYSTALLIN GENE AFFECTS THE LEVEL OF ITS EXPRESSION IN PLATELETS

To investigate the genetical precursors of cataract development the next groups were included: patients suffering from cataract (96) and 96 healthy persons. The determination of γ-crystallin polymorphism (G⁻⁴⁷→A) (rs2289917) was provided using PCR method and further analyses of restriction fragment length polymorphism. These allelic variants have the significant different: G/G - 35,37 %, G/A - 53,66 %, A/A - 10,98 %, and G/G - 55,06 %, G/A - 35,96 %, A/A - 8,99 % comparing with the control group (P=0,03, by χ²-test). While investigating the level of expression of γ-crystallin gene (CRYGB) in platelets, showed that the quantity of mRNA in homozygotes G/G in 3,9

times (P<0,05) higher than in carriers of A allele (genotype G/A and A/A). This paper shows the significant difference in distribution of CRYGB promoter (G⁻⁴⁷→A) genotypes in patients with cataract compared to the control group. Furthermore, here we provide the data concerning its functional meaning: level of mRNA expression of crystallin is different in carriers of various CRYGB promoter (G⁻⁴⁷→A) genotypes. Key words: crystallin; single nucleotide polymorphism; cataract.

¹ "Eye Microsurgery Center", Kyiv;

² O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Lin Q, Zhou N, Zhang N, Zhu B, Hu S, Zhou Z, Qi Y. Genetic variations and polymorphisms in the ezrin gene are associated with age-related cataract. *Mol Vis.* 2013 Jul 20;19:1572-9.
2. Su S, Yao Y, Zhu R, Liang C, Jiang S, Hu N, Zhou J, Yang M, Xing Q, Guan H. The associations between single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes, DNA damage, and age-related cataract: Jiangsu Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Feb 1;54(2):1201-7.
3. Zuercher J, Neidhardt J, Magyar I, Labs S, Moore AT, Tanner FC, Waseem N, Schorderet DF, Munier FL, Bhattacharya S, Berger W, Kloeckener-Gruissem B. Alterations of the 5' untranslated region of SLC16A12 lead to age-related cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jul;51(7):3354-61.
4. Barreiro LB, Laval G, Quach H, Patin E, Quintana-Murci L. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat Genet.* 2008 Mar;40(3):340-5.
5. Kapur S, Mehra S, Gajjar D, Vasavada A, Kapoor M, Sharad S, Alapure B, Rajkumar S. Analysis of single nucleotide polymorphisms of CRYGA and CRYGB genes in control population of western Indian origin. *Indian J Ophthalmol.* 2009 May-Jun;57(3):197-201.
6. Santhiya ST, Manisastry SM, Rawlley D, Malathi R, Anishetty S, Gopinath PM, Vijayalakshmi P, Namperumalsamy P, Adamski J, Graw J. Mutation analysis of congenital cataracts in Indian families: identification of SNPs and a new causative allele in CRYBB2 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Oct;45(10):3599-607.
7. Graw J. Genetics of crystallins: cataract and beyond. *Exp Eye Res.* 2009 Feb;88(2):173-89.
8. VanderVeen DK, Andrews C, Nihalani BR, Engle EC. Crystalline cataract caused by a heterozygous missense mutation in γD-crystallin (CRYGD). *Mol Vis.* 2011;17:3333-8.
9. Weisschuh N, Aisenbrey S, Wissinger B, Riess A. Identification of a novel CRYBB2 missense mutation causing congenital autosomal dominant cataract. *Mol Vis.* 2012;18:174-80.
10. Mehra S, Kapur S, Vasavada AR. Polymorphisms of the gamma crystallin A and B genes among Indian patients with pediatric cataract. *J Postgrad Med.* 2011;57:201-5.

Матеріал надійшов до редакції 03.12.2014

Вплив модуляції синтезу H_2S пропаргілгліцином на показники кардіогемодинаміки у старих щурів

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

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: 8701dk@ukr.net

Вивчали вплив пропаргілгліцину (ПГ) на кардіогемодинаміку при старінні у дорослих та старих щурів. Реєстрували значення тиску і об'єму лівого шлуночка з візуалізацією кривих їх залежності протягом серцевого циклу за допомогою ультрамініатюрного катетера 2F. Встановлено, що після введення ПГ (11,31 мг/кг) старим щурам артеріальна жорсткість зменшувалась у 1,5 раза, а кінцево-діастолічна жорсткість міокарда – в 2,1 раза. Також слід відмітити збільшення внутрішньомітохондріальних пулів H_2S (на 112%), NO_2^- (на 162%), активність конститутивної NO -синтази (в 3 рази) та зниження вмісту маркера утворення супероксиду (O_2^-) і деградації АТФ - сечової кислоти. Це свідчить про те, що позитивні ефекти ПГ зумовленні збільшенням синтезу H_2S і NO та, навпаки, пригніченням деградації АТФ і окисного стресу.

Ключові слова: старіння; кардіогемодинаміка; сірководень; пропаргілгліцин; окисний стрес; сечова кислота.

ВСТУП

Старіння організму супроводжується прогресуючим зменшення його адаптаційних можливостей, що призводить до підвищення ризику багатьох захворювань, зокрема, серцево-судинної системи. На молекулярному рівні в основі більшості структурно-функціональних змін, що розвиваються в серці і судинах з віком є окисний стрес. Його причина – надмірне утворення активних форм кисню та азоту, порушення в клітині співвідношення між про- та антиоксидантами.

З іншого боку, останнім часом з'являється все більше даних про кардіо- та васкулопротекторний вплив сірководню (H_2S), який, разом з NO і CO належить до родини газових трансмітерів [1–3]. Одним із ферментів синтезу H_2S в серцево-судинній системі є цистатіонін-γ-ліаза (CSE), інгібітором якої є пропаргілгліцин (ПГ) [4,5]. Показано, що введення H_2S істотно попереджує пошкодження серця при ішемії-реперфузії, покращує показники скоротливої і діастолічної

функції у щурів зі спонтанною гіпертензією [6,7]. Цікавим є і той факт, що ПГ відновлює пригнічене у старих щурів ендотелій залежне розслаблення гладеньких м'язів судин [8]. Проте вплив H_2S на показники кардіогемодинаміки при старінні і роль при цьому CSE-залежного шляху утворення не з'ясовані.

Метою нашої роботи було дослідити роль CSE-залежного шляху синтезу H_2S у регуляції кардіогемодинаміки у старих щурів та встановити можливі її механізми.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на щурах-самцях лінії Вістар, масою 280-350 г, які були розподілені на дві групи по 8 тварин у кожній: дорослі (6-8 міс) та старі (22-24 міс). 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). Тиск і об'єм лівого шлуночка (ЛШ) під час

серцевого циклу визначали за допомогою ультрамініатюрного катетера 2F («Millar Instruments», США). Катетер вводили через сонну артерію ретроградно у ЛШ, що давало змогу одночасно реєструвати сигнали тиску і об'єму з візуалізацією кривих їх залежності протягом серцевого циклу [9]. Активність CSE пригнічували за допомогою ПГ, який вводили внутрішньом'язово в концентрації 11,31 мг/кг. Реєстрували основні кардіогемодинамічні показники: кінцево-сistolічний тиск (КСТ), кінцево-діастолічний тиск (КДТ), кінцево-сistolічний об'єм ЛШ (КСО), кінцево-діастолічний об'єм ЛШ (КДО), ударний об'єм (УО), хвилинний об'єм крові (ХОК), фракцію викиду, частоту серцевих скорочень (ЧСС), максимальну швидкість наростання тиску ЛШ (dP/dt_{max}), максимальну швидкість зниження тиску ЛШ (dP/dt_{min}). Для оцінки здатності міокарда до розтягнення кінцево-діастолічну жорсткість (КДЖ) визначали під час оклюзії черевної порожнистої вени в умовах зниженого притоку крові до серця. Артеріальну жорсткість розраховували як відношення КСТ до УО. Співвідношення тиску і об'єму ЛШ реєстрували за допомогою програми PVAN 3,6 («Millar Instruments», США).

У мітохондріях серця дорослих та старих щурів визначали стаціонарні ендогенні пули H_2S , вміст стабільного метаболіту оксиду азоту (NO) – нітрит-аніона (NO_2^-) та активність конститутивної NO-синтази – cNOS [8,10]. Інтенсивність окисного стресу оцінювали за зміною маркерів ферментативного утворення супероксид-аніона (O_2^-): сечової кислоти (маркер утворення O_2^- нуклеотидною ксантиноксидазою) і ейкозаноїдів пептидолейкотрієну C_4 (маркер утворення O_2^- ліпоксигеназою) і тромбоксану B_2 (маркер утворення O_2^- циклооксигеназою). Крім стаціонарних пулів, визначали також скоординовані зміни цих показників під впливом ПГ, який вводили внутрішньом'язово в концентрації 11,31 мг/кг за 30 хв до декапітації тварин. Після цього, з тканин серця виділяли мітохондрії послі-

довним центрифугуванням гомогенату. Осад останніх суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА і зберігали при 4 °С. Вміст загального білка в суспензії мітохондрій вимірювали за методом Лоурі.

Статистичну обробку проводили програмами Microsoft Excel та OriginPro 8.5 («Microcal Inc.», США). Вірогідність показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При аналізі показників кардіогемодинаміки виявлено, що у дорослих і старих щурів введення ПГ не супроводжувалося зміною показників насосної функції серця (КСО, КДО, УО, ХОК). Водночас сприяло незначному збільшенню показника скоротливої активності міокарда dP/dt_{max} і ЧСС в обох групах. ПГ мав потужний вплив на артеріальну жорсткість, яка містить в собі такі основні елементи судинного навантаження, як загальний периферичний опір, податливість, імпеданс. У старих щурів після введення ПГ цей показник зменшувався в 1,5 раза, що свідчить про зниження постнавантаження на серце (рис. 1). Відомо, що при старінні підвищується артеріальна жорсткість як через структурне ремоделювання судинної стінки, в першу чергу за рахунок збільшення

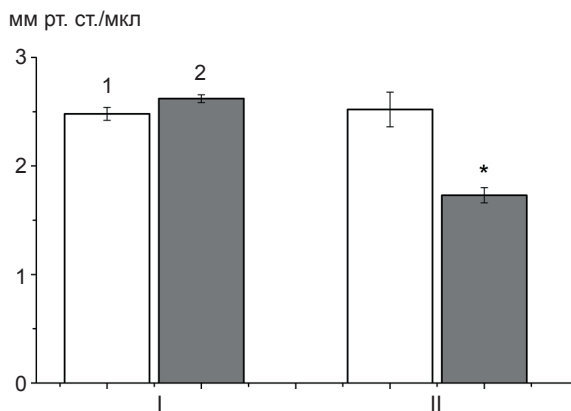


Рис. 1. Зміни артеріальної жорсткості до (1) і після (2) введення пропаргілгліцину дорослим (I) і старим (II) щурам. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем у своїй групі

відкладання колагену і зменшення – еластину, так і через функціональні зміни – підвищення тонуусу гладеньком'язових клітин судин [11]. Основним регулятором тонуусу останніх є оксид азоту, потужний ендogenous вазорелаксант. Його біодоступність, яка залежить від співвідношення утворення NO до деградації, при старінні зменшується, зокрема, через окисний стрес. Раніше проведені нами експерименти на ізольованих сегментах грудної аорти показали, що ПГ, через стимуляцію синтезу NO, здатен відновлювати ендотелій-залежне розслаблення судин за умов старіння [8]. Невирішеним залишається питання, щодо можливого впливу ПГ на окисний стрес.

Нами виявлено, що під дією ПГ покращувалось розслаблення ЛШ, як у дорослих так і у старих щурів. КДЖ, яка визначає наповнення шлуночка в період пізньої діастоли, зменшилась в 2,1 раза у старих і в 2,5 раза у дорослих щурів (рис. 2, а), а dP/dt_{\min} у дорослих щурів вірогідно збільшилась на 20% (див. рис. 2, б), а у старих не змінилась. Попередні наші дослідження показали діастолічну дисфункцію ЛШ і порушення релаксації серця у старих щурів, на що вказувало, зокрема, збільшення КДЖ [12]. Відомо, що повноцінна релаксація міокарда в ранню діастолу забезпечується енергозалежним процесом транспорту Ca^{2+} із міоплазми в саркоплазматичний ретикулум та позаклітинне середовище за участі двох

насосів – Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулума і Na^{+} - Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани, відповідно [13–15]. Енергодефіцит, порушуючи роботу цих переносників, викликає діастолічну дисфункцію. З іншого боку, при старінні саме окисний стрес спричинює зниження біосинтезу АТФ і розвиток енергодефіциту в мітохондріях [16].

Таким чином, і окисний стрес, і зниження біодоступності NO можуть бути важливими біохімічними процесами, які призводять до підвищення артеріальної жорсткості і КДЖ при старінні.

Для встановлення можливих механізмів впливу ПГ на кардіогеодинаміку у старих щурів, дослідили його дію на пули H_2S , NO_2^- , активність ферменту cNOS та маркери ферментативного утворення O_2^- в мітохондріях серця. Слід відмітити, що у старих тварин пули H_2S , NO_2^- та активність cNOS знижені, а застосування ПГ парадоксальним чином їх підвищувало (рис. 3).

Крім того, в мітохондріях серця старих щурів були підвищені пули сечової кислоти, що є одночасно плейотропним маркером і утворення O_2^- ксантинооксидазою, і гіпоксичного стану, і деградації АТФ. Вміст ейкозаноїдів пептидолейкотриєну C_4 (маркер утворення O_2^- ліпоксигеназою) і тромбоксану B_2 (маркер утворення O_2^- циклооксигеназою) в мітохондріях серця старих щурів також були

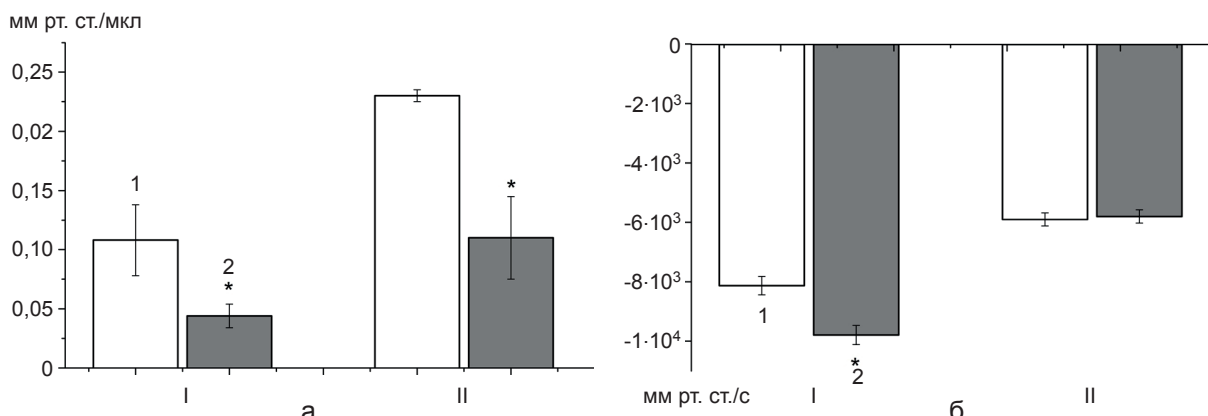


Рис. 2. Динаміка кінцево-діастолічної жорсткості (КДЖ) (а) та максимальної швидкості зниження тиску (dP/dt_{\min}) (б); до (1) і після (2) введення пропаргілгліцину дорослим (I) і старим (II) щурам. * $P < 0,05$ порівняно з вихідним рівнем у своїй групі

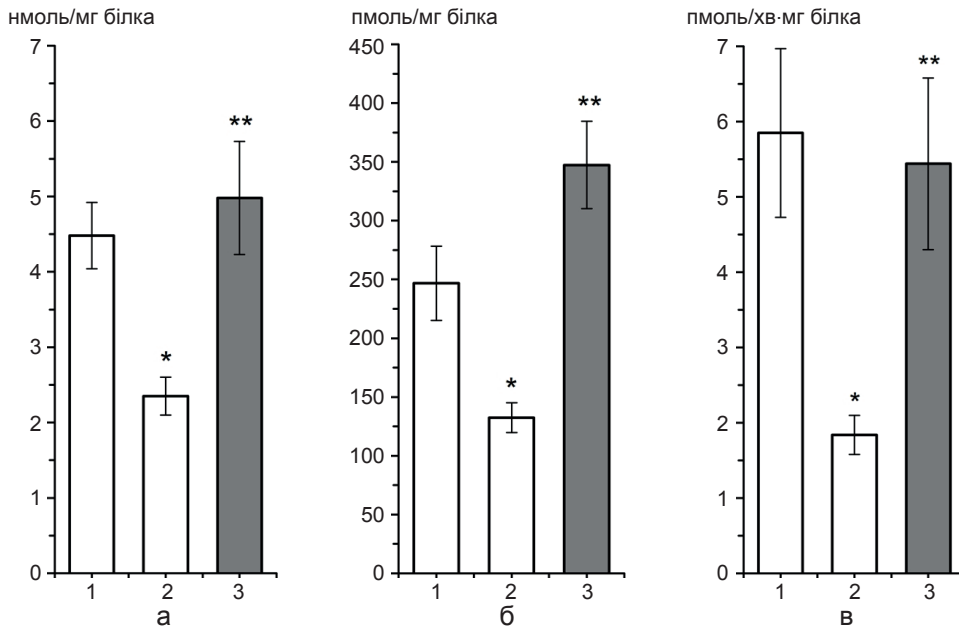


Рис. 3. Пули H₂S (а), NO₂⁻ (б) та активність конститутивної NO-синтази (в) в мітохондріях серця старих тварин за дії пропаргілгліцину (ППГ): 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури за дії ППГ. *P<0,05 відносно контролю; **P<0,05 відносно значень у старих щурів

підвищені. Після введення ППГ пули сечової кислоти та тромбоксану B₂ знижувались у 3 і 3,5 раза відповідно (рис. 4).

На основі отриманих біохімічних результатів можна зробити припущення, що в основі встановлених нами позитивних ефектів ППГ на

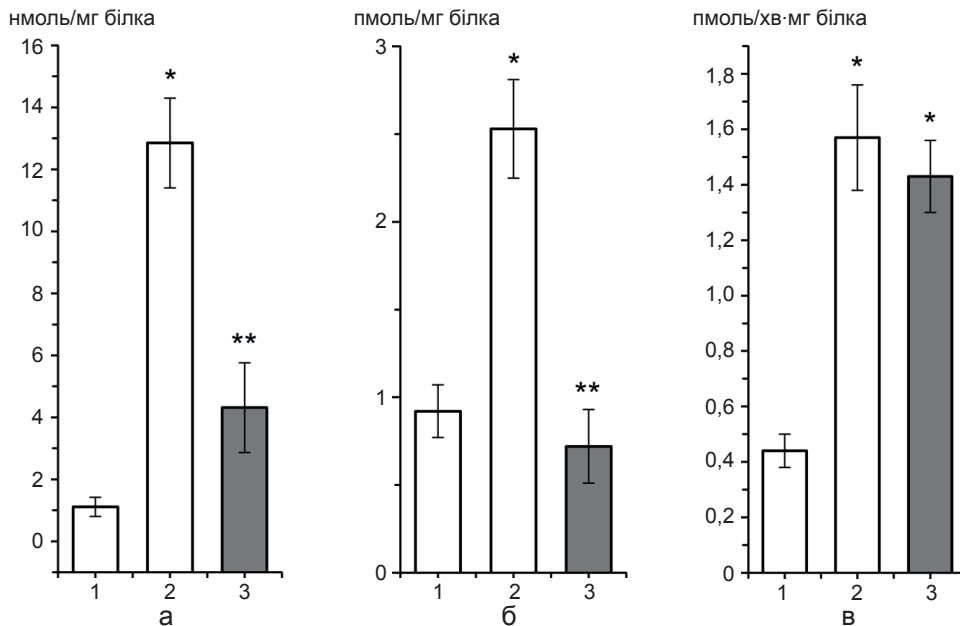


Рис. 4. Маркери ферментативного утворення O₂⁻ в мітохондріях серця старих тварин за дії пропаргілгліцину (ППГ): а – сечова кислота, б – тромбоксан B₂, в – лейкотрієн C₄; 1 – дорослі щури (контроль), 2 – старі щури, 3 – старі щури після введення ППГ. *P<0,05 відносно контролю; **P<0,05 відносно значень у старих щурів

показники кардіогемодинаміки (артеріальна жорсткість, КДЖ) у старих щурів знаходиться його здатність збільшувати продукцію як NO, так і сірководню. Перша дія ПГ зумовлюється його активацією NO-незалежного утворення циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) і наступною активацією ендотеліальної NO-синтази (eNOS) [17], друга – активацією шляху синтезу H₂S у мітохондріях за участю ферменту 3-меркаптопіруват сульфуртрансферази (3-MPST). Відомо також, що одними із головних механізмів кардіо- і васкулопротекторного ефекту сірководню, крім здатності стимулювати синтез NO, є його антиоксидантна дія [1,2]. Також він спроможен зв'язувати і нейтралізувати вільні радикали: супероксид-аніон, пероксинітрит, пероксид водню та підвищувати активність ендогенних ферментів-антиоксидантів: супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази [1].

Отримані нами біохімічні результати підтверджують здатність H₂S пригнічувати утворення вільних радикалів кисню, зокрема, супероксиду, блокуючи його нуклеотидний (ксантиноксидазу) і один з ліпідних (циклооксигеназу) генераторів. Позаяк вміст сечової кислоти відображає ступінь деградації АТФ у мітохондріях серця, можна припустити, що за дії ПГ вона знижується, тим самим зростає ефективність енергозалежних процесів у серці і зменшується загибель кардіоміоцитів через мітохондріозалежний апоптоз у старих щурів. Цікавим є встановлений нами факт, що підвищення пулів H₂S супроводжувалося зростанням утворення NO. Згідно з останніми даними, H₂S здатен збільшувати продукцію NO як через фосфорилування eNOS за PI3K/Akt сигнальним механізмом, так і незалежно від нього [2,18].

Отже, можна стверджувати, що в основі встановлених нами позитивних фізіологічних ефектів ПГ на кардіогемодинаміку у старих щурів лежить здатність його пригнічувати окисний стрес і деградацію АТФ та, навпаки, стимулювати утворення NO і H₂S.

ВИСНОВКИ

1. Блокатор ферменту de novo синтезу сірководню цистатіонін-γ-ліази ПГ зменшував показники АЖ і КДЖ у старих щурів.

2. Застосування ПГ викликало збільшення знижених у старих тварин внутрішньомітохондріальних пулів H₂S та NO₂⁻ та стимулювало активність cNOS.

3. Введення ПГ знижувало пули маркерів утворення O₂⁻ в мітохондріях серця старих тварин: сечової кислоти та тромбоксану B₂.

К.О. Драчук, Н.А. Дорофеева, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач

ВЛИЯНИЕ ПРОПАРГИЛГЛИЦИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ КАРДИОГЕМОДИНАМИКИ У СТАРЫХ КРЫС

Изучали влияния пропаргилглицина (ПГ) на кардиогемодинамику при старении у взрослых и старых крыс. Регистрировали значения давления и объема левого желудочка с визуализацией кривых их зависимости в течение сердечного цикла с помощью ультраминиатюрного катетера 2F. Установлено, что после введения ПГ (11,31 мг/кг) старым крысам артериальная жесткость уменьшалась в 1,5 раза, а конечно-диастолическая жесткость миокарда – в 2,1 раза. Также увеличивались митохондриальные пулы H₂S (на 112%), NO₂⁻ (на 162%), активность конститутивной NO-синтазы (в 3 раза) и снижались пулы маркера деградации АТФ и образования супероксида (·O₂⁻) – мочево́й кислоты. Это свидетельствует о том, что положительные физиологические эффекты ПГ при старении обусловлены стимуляцией синтеза H₂S и NO и, наоборот, угнетением деградации АТФ и окислительного стресса.

Ключевые слова: старение; кардиогемодинамика; сероводород; пропаргилглицин; окислительный стресс; мочево́я кислота.

K.O. Drachuk, N.A. Dorofeyeva, A.V. Kotsjuruba, V.F. Sagach

EFFECT OF PROPARGYLGLYCINE UPON CARDIOHEMODYNAMICS IN OLD RATS

Aging increases the risk of cardiovascular diseases. The objective of this study was to show the effect of propargylglycine (PPG) upon cardiohemodynamics in old rats. We used pressure-volume (PV) conductance catheter system (Millar Instruments, USA) in order to evaluate systolic and diastolic function in vivo. It has been shown that introduced PPG (11,31 mg/kg) decreases both arterial stiffness (by 1,5 times) and end-diastolic stiffness (by 2,1 times) in old rats. Using PPG

in heart mitochondria resulted in increasing levels of H₂S (by 112%), NO₂⁻ (by 162%) and in growing activity of cNOS (by 3 times). Additionally, PPG decreased the mitochondrial pools of the uric acid, the marker of the superoxide (*O₂⁻) formation and of the ATP degradation. These results suggest that PPG activates alternative ways of H₂S synthesis, stimulates the NO and H₂S synthesis and suppresses the ATP degradation and *O₂⁻ formation. These actions of PPG improve arterial stiffness and end-diastolic stiffness.

Key words: aging; cardiohemodynamic; hydrogen sulfide; propargylglycine; oxidative stress; uric acid

REFERENSES

1. Streeter E, HH Ng, Hart JL. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor. *Med Gas Res.* 2013;3(1):1–9.
2. Kondo K, Bhushan S, King AL, Prabhu SD, Hamid T, Koenig S, et al. H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2013;127(10):1116–27.
3. Zhou X, An G, Chen J. Hydrogen sulfide improves left ventricular function in smoking rats via regulation of apoptosis and autophagy. *Apoptosis.* 2014 Jun;19(6):998-1005.
4. Gil V, Gallego D, Jiménez M. Effects of inhibitors of hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility. *Br J Pharmacol.* 2011 Sep; 164(2b):485–98.
5. Xue H, Yuan P, Ni J, Li C, Shao D, Liu J, et al. H₂S inhibits hyperglycemia-induced intrarenal renin-angiotensin system activation via attenuation of reactive oxygen species generation. *PLoS One.* 2013;8(9).
6. Sagach VF, Shimanskaya TV, Goshovska YV. Effects of stimulation and blockade of the synthesis of endogenous hydrogen sulfide at myocardial ischemia-reperfusion. *Fiziol Zh.* 2013;59(4):8–15[Ukrainian].
7. Dorofeyeva NA, Kuzmenko MA, Sagach VF. Effects of hydrogen sulfide donor on the heart function of spontaneously hypertensive rats. *TMB Visnyk.* 2012;15(3):92–4[Ukrainian].
8. Drachuk KO, Kotsjuruba AV, Bazilyuk OV, Stepanenko LG, Sagach VF. Propargylglycine restores endothelium-dependent relaxation of aortic smooth muscle in old rats. *Fiziol Zh* 2014; 60(4):3–10 [Ukrainian].
9. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc.* 2008;9:1422–34.
10. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kopyak BS, Sagach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria of brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014;60(3):11–17 [Ukrainian].
11. López-Andrés N, Calvier L, Labat C, Fay R, Díez J, Benetos A, et al. Absence of cardiotrophin 1 is associated with decreased age-dependent arterial stiffness and increased longevity in mice. *Hypertension.* 2013;61(1):120–9.
12. Dorofeyeva NA, Drachuk KO, Sagach VF. Cardiohemodynamics and efficiency of Frank–Starling mechanism during aging. *Fiziol Zh.* 2014;60(6):22–6 [Ukrainian].
13. Asp ML, Martindale JJ, Heinis FI, Wang W, Metzger JM. Calcium mishandling in diastolic dysfunction: mechanisms and potential therapies. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(4):895-900.
14. Dai DF, Santana LF, Vermulst M, Tomazela DM, Emond MJ, MacCoss MJ, et al. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation.* 2009;119(21):2789-97.
15. Shareef MA, Anwer LA, Poizat C. Cardiac SERCA2A/B: therapeutic targets for heart failure. *Eur J Pharmacol.* 2014;724:1-8.
16. Gouspillou G, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, Calmettes G, Biran M, Deschodt-Arsac V, et al. Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle. *Aging Cell.* 2014;13(1):39–48.
17. Salloum FN, Sturz GR, Yin C, Rehman S, Hoke NN, Kukreja RC, et al. Beetroot juice reduces infarct size and improves cardiac function following ischemia-reperfusion injury: Possible involvement of endogenous H₂S. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;doi:10.1177/1535370214558024. PMID:25361774.
18. King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK, et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(8):3182-7.

*Матеріал надійшов
до редакції 03.03.2015*

Зміни метаболізму тестостерону в мозку та статевій поведінки самців щурів після пренатальної дії метилдофу та іммобілізаційного стресу

О.Г. Резніков, Н.Д. Носенко, Л.В. Тарасенко, А.А. Лимарєва

ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ;
E-mail: reznikov39@gmail.com

Досліджено зміни ароматазної та 5 α -редуктазної активності в преоптичній ділянці (ПД) та медіо-базальному гіпоталамусі (МБГ) самців 10-добових щурів, а також статеву поведінку у 3-місячних тварин – нащадків матерів, які в останній тиждень вагітності (щодобово з 15-ї по 21-шу добу) отримували антагоніст норадреналіну метилдофу (400 мг/кг, перорально) за 30 хв до початку одногодинного іммобілізаційного стресу. Пренатальне стресування спричиняло зниження ароматазної активності в ПД самців щурів раннього постнатального віку і порушувало статеву поведінку у молодих тварин за типом її фемінізації (наявність лордозних реакцій) та демаскулізації (подовження латентного періоду до перших садки, інтромісії та еякуляції, збільшення постеякуляторного рефрактерного періоду). Введення метилдофу перед стресуванням вагітних щурів перешкоджало раннім проявам впливу пренатального стресу на ароматазну активність в ПД і сприяло нормалізації чоловічої статевої поведінки у самців щурів. На це вказує скорочення латентного періоду першої еякуляції та постеякуляторного рефрактерного періоду, а також збільшення кількості еякуляцій. Отримані результати свідчать про суттєву роль норадренергічної системи головного мозку в механізмах розвитку метаболічних і поведінкових розладів у самців щурів, спричинених пренатальним стресом.

Ключові слова: пренатальний стрес; метилдофа; метаболізм тестостерону; статеву поведінку; самці щурів.

ВСТУП

Стрес під час вагітності викликає комплекс нейрогормональних зрушень в організмі матері і плоду, які з залученням імпринтингових механізмів програмують у дорослих нащадків розвиток синдрому пренатального стресу, що характеризується порушеннями статевої диференціації мозку (СДМ) і стресової реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи [1]. Віддаленими проявами впливу пренатального стресу на СДМ самців щурів є демаскулізація та/або фемінізація статевої поведінки [2]. Ці порушення пов’язують з стресіндукованими змінами вмісту катехоламінів та статевих гормонів у матері та їхніх нащадків у критичному періоді СДМ [3–5].

Дані наших попередніх досліджень встановили провідну роль кальцієвої сигналізації, ендогенних опіоїдів, андрогенів і глюкокортикоїдів у патогенезі синдрому пренатального стресу [1, 6, 7]. Визначено протекторні властивості деяких гормональних та антигормональних фармакологічних засобів (тестостерону, дексаметазону, налтрексону та німодипіну) відносно порушень СДМ і функціональних розладів систем репродукції та адаптації, спричинених пренатальним стресом [1, 8–10]. Проте механізми ранньої модифікації метаболічних процесів, а також формування статевої поведінки під впливом останнього залишаються нез’ясованими. Зокрема, це стосується участі нейромедіаторних систем головного мозку у цих процесах.

© О.Г. Резніков, Н.Д. Носенко, Л.В. Тарасенко, А.А. Лимарєва

У цій роботі вперше проаналізовано роль норадренергічної системи головного мозку у модифікації постнатальних змін метаболізму тестостерону в мозку та статевої поведінки самців щурів за умов пренатальної дії стресу на тлі блокади синтезу норадреналіну.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на самцях щурів лінії Вістар віком 10 діб та 3 міс ($n = 44$), народжених від матерів, які були розподілені на 3 групи: 1-ша – інтактні самиці; 2-га – самиці, які в останній тиждень вагітності зазнавали впливу хронічного стресу (імобілізація протягом 1 год щодобово з 15-ї по 21-шу добу), 3-тя – самиці, які в той самий термін вагітності отримували метилдофу в дозі 400 мг/кг за 30 хв до початку імобілізації. Препарат вводили перорально через металевий шлунковий зонд у вигляді суспензії таблеткової маси, для приготування якої використовували гель Дорфмана: 0,5 % карбоксиметилцелюлози у 0,9 %-му розчині натрію хлориду з доданням 0,4 % твіну-80 (об'ємна частка) та 0,9 % бензилового спирту (об'ємна частка).

Тварин утримували в однакових умовах віварію, на стандартному раціоні харчування та вільному доступі до питної води. Всі експерименти проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.).

Активність ферментів ароматазного комплексу і 5 α -редуктази у тканинах преоптичної ділянки (ПД) та медіобазальному гіпоталамусі (МБГ) самців 10-добових щурів вивчали за модифікованим методом MacLusky із співавт. [11], який полягає у розділенні у тонкому шарі силікагелю та наступній радіометрії продуктів реакції, що утворилися внаслідок інкубування надосадової фракції (після центрифугування при 1000 хв⁻¹) 10 %-го гомогенату тканини з [1,2,6,7-³H] тестостероном. Ароматазну та 5 α -редуктазну активності виражали в одиницях активності (Од), що дорівнюють 1 мкмоль

естрадіолу або 5 α -відновлених метаболітів тестостерону (сума 5 α -дигідротестостерону та 5 α -андростан-3 α ,17 β -діолу), відповідно, утворених протягом 1 год інкубування у перерахунку на 1 г сирової тканини.

Статеву поведінку за чоловічим і жіночим типами у самців щурів вивчали за методикою Holson та співавт. [12]. Досліди проводили на тваринах віком 3 міс. Статеву поведінку за чоловічим типом у самців щурів оцінювали в два тестування (раз на тиждень), поміщаючи їх на 30 хв у клітку з рецептивною самицею. Самиць заздалегідь (за тиждень) оварієктомували, еструс викликали введенням естрадіолу бензоату (0,1 мг на тварину внутрішньом'язово) за 48 год та прогестерону (0,5 мг на тварину внутрішньом'язово) за 4 год до тестування. Дослідження проводили в темній кімнаті при слабкому червоному світлі на тваринах, що перебували в темряві до моменту тестування протягом не менше як 4 год. Самця поміщали в клітку за 5 хв до тестування для його адаптування до умов дослідження. До кожного самця на 30 хв підсаджували рецептивну самицю. Послідовно реєстрували такі показники чоловічої статевої поведінки: латентний період першої садки, першої інтромісії та першої еякуляції, кількість садок без інтромісій, число інтромісій та загальну кількість еякуляцій, а також рефрактерний постеякуляторний інтервал. Часові і кількісні характеристики статевої поведінки за чоловічим типом аналізували окремо для кожного тестування, оскільки для деяких показників (латентності першої садки, інтромісії та еякуляції, кількості еякуляцій) при I і II тестуваннях у межах кожної з досліджених груп тварин було відмічено наявність вірогідної різниці, що пов'язано з надбанням сексуального досвіду і формуванням стереотипних поведінкових реакцій.

Для вивчення статевої поведінки за жіночим типом усіх самців було кастровано за тиждень до проведення дослідження. За 48 год до тестування їм вводили естрадіолу бензоат (0,1 мг на тварину внутрішньом'язово)

та за 4 год – прогестерон (0,5 мг на тварину внутрішньом'язово). Тестування проводили в темній кімнаті при слабкому червоному світлі на тваринах, що перебували в темряві до моменту тестування протягом не менше як 4 год. Сексуально досвідченого самця поміщали в клітку за 5 хв до тестування для його адаптування до умов дослідження. Згодом до нього підсаджували експериментального кастрованого самця. Дослідження тривало 10 хв або до 10 садок активного самця. Лордозну поведінку оцінювали за лордозним коефіцієнтом (співвідношенням лордозних реакцій до загальної кількості садок). Також спостерігали, але не реєстрували, наявність залицяльної поведінки.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію *t* Стьюдента і непараметричного *U*-критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні. Розрахунок середніх значень здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Excel. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $P < 0,05$.

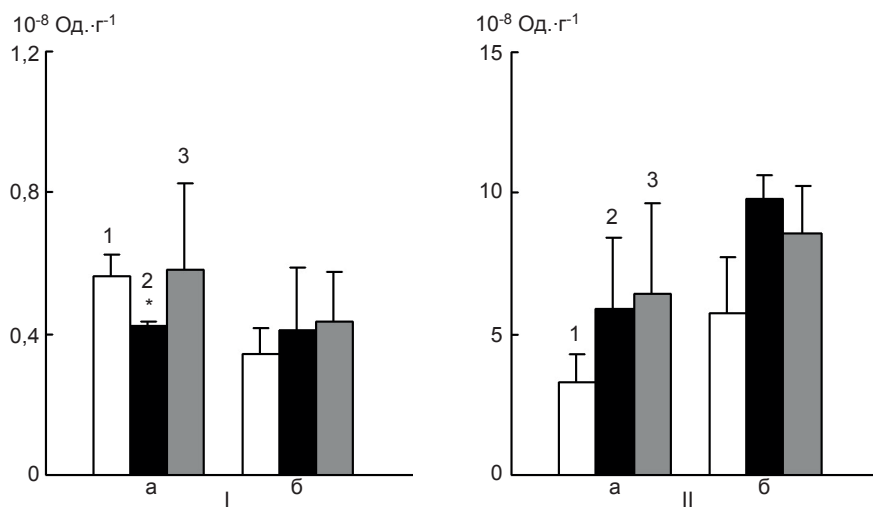
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні метаболізму тестостерону в дискретних структурах мозку встановлено, що в інтактних самців щурів віком 10 діб аромати-

зація тестостерону в ПД була інтенсивнішою, ніж в МБГ (рисунок 1, I). Пренатальне стресування спричиняло зниження ароматазної активності в ПД і не впливало на активність ферменту в МБГ самців. Це цілком узгоджується щодо змін активності ферменту в гіпоталамусі плоду та новонароджених щурів, матері яких зазнавали хронічного стресу впродовж останнього тижня вагітності [1,13,14].

Стресування вагітних щурів на фоні фармакологічної блокади синтезу норадреналіну метилдофу не спричинило суттєвих змін ароматазної активності в обох досліджених структурах мозку у їх нащадків раннього постнатального віку, що можна розцінювати як наявність протекторного впливу препарату на процеси ароматизації андрогенів у структурах мозку, причетних до регуляції статевої поведінки. На відміну від ароматазної активності, 5α -редуктазна активність, тобто перетворення андрогену на 5α -відновлені метаболіти, не зазнала змін в обох структурах мозку самців цієї дослідної групи (див. рисунок 1, II).

Вивчення статевої поведінки підтвердило наявність її порушень у пренатально стресованих самців за типом фемінізації та демаскулінізації [2]. При дослідженні статевої поведінки за жіночим типом, порушення в цій групі щурів характеризувалися появою



Ароматазна (I) та 5α -редуктазна активність (II) в преоптичній ділянці (а) і медіобазальному гіпоталамусі (б) самців щурів віком 10 діб після пренатальної дії метилдофу та стресу: 1 – інтактні (контроль), 2 – пренатально стресовані, 3 – пренатально стресовані на тлі введення метилдофу. * $P < 0,05$ порівняно з відповідним контролем

компонентів жіночої статевої поведінки, а саме лордозних реакцій, які повністю відсутні в інтактних тварин. Кількість самців з рецептивною поведінкою, тобто таких, що демонстрували лордозну реакцію у відповідь на садки активного самця, становила 100 %.

У пренатально стресованих самців на тлі дії метилдофу рецептивна поведінка проявлялася слабше: кількість лордозних реакцій зменшувалась на 31 % (з $7,5 \pm 1,0$ до $5,2 \pm 0,9$), проте ця різниця не сягала рівня вірогідності порівняно з пренатально стресованими тваринами. Водночас слід відмітити, що у переважної більшості щурів цієї дослідної групи (80 %) спостерігалася гомосексуальна поведінка, це проявлялось у садках кастрованого відносно активного самця. Крім того, 80 % тварин характеризувалися бісексуальною поведінкою, тобто демонстрували водночас і

лордозну реакцію, і садки. Зазначимо, що в групі пренатально стресованих самців не було відмічено тварин з гомо- та бісексуальною поведінкою.

Дослідження статевої поведінки за чоловічим типом показало, що у самців під впливом пренатального стресу порушується як центральний (подовження латентного періоду до першої садки, до першої інтромісії), так і периферичний (подовження періоду до першої еякуляції, збільшення постеякуляторного рефрактерного періоду) механізм регуляції чоловічої статевої поведінки (див. таблицю). За умов другого тестування ці зміни були менш виразними, що є цілком очікуваним і пов'язано з надбанням сексуального досвіду. Кількість еякуляцій вірогідно зменшувалась на 35 %, а число садок без інтромісій та кількість інтромісій суттєво не відрізнялися від контрольних значень.

Показники чоловічої статевої поведінки самців 3-місячних щурів після пренатальної дії метилдофу та стресу (M±m)

Показник	Інтактні самці (контроль) (n = 5)	Пренатально стресовані самці (n = 4)	Пренатально стресовані самці на тлі введення метилдофу (n = 5)
Перше тестування			
Латентний період, с			
першої садки	37,2±4,9	51,0±0,4*	77,0±13,3*
першої інтромісії	40,4±5,3	53,7±0,7*	77,0±13,3*
першої еякуляції	43,2±4,8	59,2±1,5*	77,4±13,0*
Постеякуляторний рефрактерний період, с	53,0±4,0	71,5±1,9*	103,0±13,8*, ***
Кількість:			
садок без інтромісій	5,8±0,9	5,7±1,5	4,8±1,4
інтромісій	17,8±3,9	13,5±0,9	24,0±4,7***
еякуляцій	15,4±3,3	12,7±0,7	23,6±4,3***
Друге тестування			
Латентний період, с			
першої садки	11,2±2,4**	22,2±1,6*, **	19,2±1,9*, **, ***
першої інтромісії	15,2±2,6**	31,7±0,6*, **	20,4±2,0*, **
першої еякуляції	18,4±3,1**	37,5±1,2*, **	25,0±1,7**, ***
Постеякуляторний рефрактерний період, с	26,2±6,1**	50,5±1,5*, **	31,8±1,7**, ***
Кількість			
садок без інтромісій	13,2±1,9**	13,5±0,9**	6,2±1,2*, ***
інтромісій	22,6±1,3	18,5±2,3	23,2±1,3
еякуляцій	27,2±1,7**	17,7±1,3*, **	22,8±3,7***

* P<0,05 - вірогідність порівняно з інтактними самцями.

** P<0,05 - вірогідність порівняно з тією ж групою тварин у першому тестуванні.

***P<0,05 – вірогідність порівняно з пренатально стресованими самцями.

У пренатально стресованих самців щурів на тлі застосування метилдофу при першому тестуванні також було продемонстровано подовження латентного періоду до перших садки, інтромісії та еякуляції (таблиця). Більше того, тривалість постєякуляторного рефрактерного періоду навіть перевищувала в 1,4 раза таку у пренатально стресованих щурів. Водночас, на відміну від пренатально стресованих тварин, у них збільшувалася кількість інтромісій та еякуляцій, що характерно для нормальних самців. Найбільше протекторні властивості метилдофу проявилися за умов другого тестування, на що вказує скорочення латентного періоду першої еякуляції та постєякуляторного рефрактерного періоду, а також збільшення кількості еякуляцій. Всі зазначені показники чоловічої статевої поведінки за своїми значеннями наближалися до норми. Лише латентний період до першої садки та першої інтромісії залишався таким самим, як у пренатально стресованих тварин.

Таким чином, узагальнюючи результати досліджень, можна дійти висновку, що фармакологічна блокада синтезу норадреналіну введенням метилдофу перед стресуванням вагітних щурів попереджає розвиток метаболічних і поведінкових порушень, характерних для ефектів пренатального стресу, а саме: зменшення ароматазної активності в ПД у критичному періоді СДМ і демаскулізація та фемінізація статевої поведінки у нащадків чоловічої статі.

Вважають, що індуковані пренатальним стресом зміни статевої поведінки у самців щурів за типом демаскулізації та фемінізації зумовлені, перш за все, відсутністю підвищення вмісту тестостерону в крові плодів чоловічої статі на 17-18-ту добу ембріонального розвитку, тобто у критичному періоді СДМ [4, 5]. Одним із безпосередніх наслідків такого гормонального дисбалансу є зниження ароматизації андрогенів у гіпоталамусі плодів [13] і новонароджених [1, 14] щурів, матері яких зазнали стресування протягом останньої третини вагітності. Ці

спостереження було підтверджено і в наших дослідженнях: індуковане пренатальним стресом зниження ароматазної активності було відмічено в ПД самців щурів раннього постнатального віку. Важливо зазначити, що виявлені зміни торкаються саме ПД (на протилежність МБГ) самців, де розташовано центр регуляції чоловічої статевої поведінки у гризунів. Морфологічним корелятом ранніх проявів впливу пренатального стресу на СДМ самців щурів є зменшення об'єму ядер нейронів супрахіазматичного та медіального преоптичного ядер гіпоталамуса [1].

За даними літератури, порушенням статевої поведінки у дорослих пренатально стресованих самців щурів можна запобігти введенням їх вагітним матерям тестостерону [15] або тирозину, амінокислотного попередника синтезу катехоламінів [16]. Превентивну дію тестостерону пов'язують як з активізацією утворення естрогенних метаболітів у мозку плодів чоловічої статі, так і з індукованим цим гормоном накопиченням катехоламінів у гіпоталамусі, а тирозину - з відновленням в гіпоталамусі вмісту норадреналіну, що знижується внаслідок стресу.

Цілком імовірно, що в наших дослідженнях протекторна дія метилдофу відносно ефектів пренатального стресу зумовлена його можливістю запобігати активації норадренергічної системи головного мозку, яка відіграє суттєву роль в реалізації стресових реакцій гіпоталамо-гіпофізарно-адренортикаральної системи (ГГАС) [17]. Це припущення стає цілком очевидним з огляду на здатність метилдофу проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр і блокувати синтез норадреналіну в закінченнях адренергічних волокон, внаслідок чого не спрацьовує норадренергічний шлях передавання стресового збудження.

Як відомо, стресова активація ГГАС спричиняє гальмівний вплив на статеву систему тварин. Вважають, що зниження продукції лютеїнізуючого гормону – рилізінг гормону, яке виникає внаслідок стресового підвищення вмісту опіюїдів і глюкокортикоїдних гормонів, призводить до зменшен-

ня секреції ЛГ гіпофізом і, відповідно, до зниження вмісту тестостерону в крові [18]. У наших дослідженнях фармакологічна блокада синтезу норадреналіну метилдофу перед стресуванням вагітних щурів перешкоджала реалізації стимулювального впливу норадреналіну на активність ГГАС, що може спричиняти зменшення її гальмівного тиску на гонадну систему самців і відновлення балансу андрогенів. Оскільки тестостерон є субстратом ароматази в нейроендокриних структурах головного мозку, цілком очікувано стає спостережуваною в наших дослідженнях нормалізація процесів ароматизації тестостерону в ПД самців щурів у критичному періоді СДМ.

Зазначимо, що пренатальне застосування метилдофу спричиняло суттєву протекторну дію щодо демаскулізуючого ефекту пренатального стресу на статеву поведінку самців, але недостатньо впливало на його фемінізуючий ефект. Крім того, у пренатально стресованих на тлі дії метилдофу тварин з'являлися прояви гомо- та бісексуальної поведінки, які були відсутні у нормальних самців. Ці факти можна пояснювати послабленням впливу норадреналіну, який, як було раніше нами показано, відіграє роль індуктора андрогензалежної СДМ [19]. Не виключено також залучення в ці процеси й інших стресових чинників, зокрема опіоїдів, вміст яких підвищується в гіпоталамусі та аденогіпофізі вагітної матері під час хронічного стресування [20]. Показано, що введення екзогенних опіатів вагітним щурам відтворює ефекти пренатального стресу відносно фемінізації статевої поведінки у їх нащадків чоловічої статі [21, 22]. Додатковим аргументом на користь цього припущення є те, що блокада опіоїдних рецепторів налтрексоном під час їх стресування перешкоджає розвитку таких порушень [23, 24].

У цілому, підсумовуючи результати проведеного дослідження, можна дійти висновку про суттєву роль норадренергічної системи головного мозку в механізмах розвитку мета-

болічних та поведінкових розладів у самців щурів, зумовлених пренатальним стресом.

А.Г. Резников, Н.Д. Носенко, Л.В. Тарасенко, А.А. Лимарева

ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ТЕСТОСТЕРОНА В МОЗГУ И ПОЛОВОГО ПОВЕДЕНИЯ САМЦОВ КРЫС ПОСЛЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕТИЛДОФА И ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

Исследованы изменения ароматазной и 5 α -редуктазной активности в преоптической области (ПО) и медиобазальном гипоталамусе самцов крыс 10-дневного возраста, а также полового поведения у животных в возрасте 3 мес – потомков матерей, которые в последнюю неделю беременности (ежедневно с 15 по 21-й день) подвергались воздействию антагониста норадреналина метилдофа (400 мг/кг, перорально) за 30 мин до начала одночасового иммобилизационного стресса. Пренатальное стрессирование вызывало снижение ароматазной активности в ПО самцов крыс раннего постнатального возраста и нарушало половое поведение у молодых животных по типу феминизации (наличие лордозных реакций) и демаскулинизации (удлинение латентного периода до первой садки, первой итромиссии, первой эякуляции, а также увеличение постэякуляторного рефрактерного периода). Пероральное введение метилдофа перед стрессированием беременных крыс препятствовало ранним проявлениям влияния пренатального стресса на ароматазную активность в ПО и способствовало нормализации мужского полового поведения у самцов крыс, на что указывает сокращение латентного периода первой эякуляции и постэякуляторного рефрактерного периода, а также увеличение количества эякуляций. Полученные результаты свидетельствуют о существенной роли норадренергической системы головного мозга в механизмах развития метаболических и поведенческих нарушений у самцов крыс, вызванных пренатальным стрессом.

Ключевые слова: пренатальный стресс; метилдофа; метаболизм тестостерона; половое поведение; самцы крыс.

A. G. Reznikov, N.D. Nosenko, L.V. Tarasenko, A.A. Limareva

CHANGES IN THE BRAIN TESTOSTERONE METABOLISM AND SEXUAL BEHAVIOR IN MALE RATS PRENATALLY EXPOSED TO METHYLDOPA AND STRESS

The changes of aromatase and 5 α -reductase activities were studied in preoptic area (POA) and medial basal hypothalamus of 10-days-old and sexual behavior in 3-month-old male offsprings of rats exposed daily to noradrenaline antagonist methylidopa (400 mg/kg *per os*) 30 minutes prior to 1-hour immobilization during the last week of pregnancy (from 15th to

21st day). Prenatal stress caused aromatase activity lowering in the POA of developing brain and feminization (appearance of lordosis) and demasculinization of sexual behavior (prolongation of latent periods to the first mounting and first intromission as well as of the first ejaculation and postejaculation refractory period) in young male offspring. Oral methyl dopa used prior to pregnant females stressing prevented early effect of prenatal stress on aromatase activity in the POA and normalized the male sexual behavior in young male rats by shortening both latent period to the first ejaculation and postejaculation refractory period, and an increase of numbers of ejaculation. The data obtained indicate that brain noradrenergic system plays significant role in the mechanisms of metabolic and behavioral disturbances developing in male rats exposed to prenatal stress. Key words: prenatal stress; methyl dopa; testosterone metabolism; sexual behavior; male rats.

State Institution "V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv

REFERENCES

1. Reznikov AG, Pyshak VP, Nosenko ND, Tkachuk SS, Myslitsky VF. Prenatal stress and neuroendocrine pathology. Tchernovtsy: Medakademia Publishers. 2004; 320 p. [Ukrainian].
2. Ward I. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science*. 1972;175:82-4.
3. Rohde W, Ohkawa T, Dobashi K, Arai K, Okinaga S, Dorner G. Acute effects of maternal stress on fetal blood catecholamines and hypothalamic LH-RH content. *Exp Endocr*. 1983;82(3):268-74.
4. Ward I, Weisz J. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science*. 1980;207:328-9.
5. Ward IL, Weisz J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology*. 1984;114:1635-43.
6. Reznikov AG, Nosenko ND, Tarasenko LV, Sinitsyn PV, Polyakova LI, Mishunina TM. Neuroendocrine effects of prenatal exposure to exogenous glucocorticoids. *Russ Physiol J*. 2006;92(2):238-48. [Ukrainian].
7. Reznikov AG, Nosenko ND, Tarasenko LV. Opioids are responsible for neurochemical feminization of the brain in prenatally stressed males. *Neuroendocrinol Letts*. 2005;26(1): 35-8. [Ukrainian].
8. Reznikov AG, Nosenko ND, Tarasenko LV, Sinitsyn PV, Lymareva AA. Prenatal dexamethasone prevents early and long-lasting neuroendocrine and behavioral effects of maternal stress on male offspring. *Fisiol. J*. 2008;54(5):28-39. [Ukrainian].
9. Nosenko ND, Limareva AA, Reznikov AG. Preventive effect of nimodipine on early postnatal modifications of the protein spectrum in the brain of rats subjected to prenatal stress. *Neurophysiology*. 2012;44(1):20-5. [Ukrainian].
10. Nosenko ND, Sinitsyn PV, Reznikov AG. Role of calcium signaling in the development of prenatal stress-induced functional modifications of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurophysiology*. 2010;42(4):251-7. [Ukrainian].
11. MacLusky ND, Philip A, Hulburt C, Naftolin F. Estrogen formation in the developing rat brain: sex differences in aromatase activity during early postnatal life. *Psychoneuroendocrinology*. 1985;77(3):355-61.
12. Holson RR, Gough B, Sullivan P, Badger T, Sheehan DM. Prenatal dexamethasone or stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats. *Neurotoxicol Teratol*. 1995;17:393-401.
13. Weisz J, Brown BI, Ward IL. [Maternal stress decreases steroid aromatase activity in brains of male and female rat fetuses]. *Neuroendocrinology*. 1982;35:374-9.
14. Murase J. The effect of maternal stress on aromatase activity in the perinatal rat brain. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi*. 1994;70:95-104.
15. Dorner G, Gotz F, Docke WD. Prevention of demasculinization and feminization of the brain in prenatally stressed male rats by perinatal androgen treatment. *Exp Clin Endocrinol*. 1983;81:88-90.
16. Rohde W, Ohkawa T, Gotz F, Stahl F, Tonjes R, Takeshita S, Arakawa S, Kambegawa A, Arai K, Okinaga S, Dorner G. Sex-specific effects on the fetal neuroendocrine system during acute stress in late pregnancy of rat and the influence of a simultaneous treatment by tyrosine. *Exp Clin Endocrinol*. 1989;94(1):23-42.
17. Douglas AJ. Central noradrenergic mechanisms underlying acute stress responses on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: adaptations through pregnancy and lactation. *Stress*. 2005;8(1):5-19.
18. Rivier C, Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod*. 1991;45:523-32.
19. Reznikov AG, Nosenko ND. It is possible that noradrenaline is the biogenic monoamine responsible for androgen-dependent sexual brain differentiation. *Exp Clin Endocrinol*. 1983;81:91-3. [Ukrainian].
20. Ohkawa T, Rohde W, Gotz F, Tonjes R, Stahl F, Arai K, Okinaga S, Dorner G. The effect of an acute maternal stress on endorphin and growth hormone releasing factor in the rat fetus. *Exp Clin Endocrinol*. 1988;91(1):35-42.
21. Kashon ML, Ward OB, Grisham W, Ward IL. Prenatal β -endorphin can modulate some aspects of sexual differentiation in rats. *Behav Neurosci*. 1992;106:555-62.
22. Ward OB, Orth JM, Weisz J. A possible role of opiates in modifying sexual differentiation. *Monogr Neural Sci*. 1983;9:194-200.
23. Keshet GI, Weinstock M. Maternal naltrexone prevents morphological and behavioral alterations induced in rats by prenatal stress. *Pharmac Biochem Behav*. 1995;50:413-9.
24. Ward OB, Monaghan EP, Ward IL. Naltrexone blocks the effects of prenatal stress on sexual behavior differentiation in male rats. *Pharmac Biochem Behav*. 1986;25:573-6.

Матеріал надійшов до редакції 03.03.2015

Вплив пептиду семакс на синаптичну активність і короткочасну пластичність глутаматергічних синапсів ко-культивованих нейронів спінальних гангліїв дорсального рогу спинного мозку

М.С.Шипшина¹, М.С.Веселовський¹, М.Ф. М'ясоєдов², С.И. Шрам², С.А. Федулова¹

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

²Інститут молекулярної генетики РАН, Москва, РФ; E-mail: shypshyna.mariia@gmail.com

Досліджено вплив тривалого культивування (12 діб in vitro) нейронів спінальних гангліїв (СГ) та нейронів дорсального рогу (ДР) з пептидом семакс на рівень синаптичної активності у ко-культурах, а також на короткочасну пластичність у сенсорних синапсах. Показано, що культивування нейронів з пептидом у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л сприяло збільшенню частоти глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів, зареєстрованих у нейронах ДР, на $71,7 \pm 1,8$ та на $93,9 \pm 3,1$ % відповідно. Семакс істотно не впливав на амплітуду та частоту мініатюрних глутаматергічних струмів, але підвищував амплітуду спонтанних постсинаптичних струмів, а також квантовий вміст. Результати свідчать про підвищення ефективності багатовезикулярного викиду глутамату в нейронних мережах ко-культур при інкубації з пептидом. Слід відмітити також зміни основних показників короткочасної пластичності у сенсорних синапсах під впливом семаксу: 1) збільшення коефіцієнта парної стимуляції від $0,53 \pm 0,028$ до $0,91 \pm 0,072$ та $0,95 \pm 0,026$; 2) зниження співвідношення коефіцієнтів варіації постсинаптичних струмів (CV2/CV1) від $1,49 \pm 0,11$ до $1,02 \pm 0,09$ та $1,11 \pm 0,13$ відповідно. Отримані результати свідчать про стимулювальний вплив семаксу на активність глутаматергічних синапсів у нейронних мережах ко-культур, а також про його здатність ефективно модулювати короткочасну пластичність у сенсорних синапсах.

Ключові слова: спінальні ганглії; дорсальний ріг спинного мозку; глутамат; постсинаптичні струми; синаптична активність; короткочасна пластичність; пептид семакс.

ВСТУП

Пептид семакс (Met-Glu-His-Pro-Gly-Pro), синтезований в Інституті молекулярної генетики РАН, є нейроактивним аналогом адренкортикотропного гормону (АКТГ), який має низку нейропротекторних властивостей. У ЦНС він сприяє підвищенню рівня проліферації нейроглії і ендотелію кровоносних капілярів, а також поліпшенню стану нервової тканини при ішемії [1]. Семакс широко використовується при лікуванні алергічних і запальних захворювань зорового нерва [2], позитивно впливає на розвиток пам'яті, навчання і уваги. Він також характеризується модулювальними ефектами на синаптичну

© М.С.Шипшина, М.С.Веселовський, М.Ф. М'ясоєдов, С.И. Шрам, С.А. Федулова

передачу [3]. Тригерним механізмом дії гептапептиду є активація синтезу нейротрофінів. Імовірно, ноотропний ефект семаксу реалізується через підвищення рівня BDNF (від англ. brain-derived neurotrophic factor) та NGF (від англ. nerve growth factor) у нервовій тканині, оскільки пептид вибірково впливає на транскрипцію генів цих нейротрофінів та їх рецепторів у корі головного мозку [4, 5].

Семакс також має місцеву анальгезивну дію, що виявляється у зниженні рівня больової поведінки у щурів у різних моделях периферичних невротатій [6, 7] і досягається модуляцією потоку ноцицептивних сигналів. Значна роль у перетворенні ноцицептив-

ного сигналу належить глутаматергічним синапсам первинних аферентних нейронів спінальних гангліїв (СГ), що здійснюють передачу сенсорних сигналів з периферії у спинний мозок, а також вторинним аферентним нейронам дорсального рогу (ДР), які інтегрують больовий сигнал і передають його у висхідному напрямку. У багатьох відділах мозку функціонування глутаматергічної нейропередачі пов'язане з викидом нейротрофінів. Рецептори останніх (trkA, trkB) широко експресуються у глутаматних синапсах, що робить цю систему придатною для дослідження динамічної регуляції збуджувальної передачі та синаптичної пластичності. У зв'язку з цим ми припустили, що антиноцицептивні та нейропротекторні ефекти семаксу частково можуть бути реалізовані через вплив на механізми передачі больового сигналу у сенсорних синапсах, а також через підвищення активності синаптичної передачі у спинному мозку.

Мета нашої роботи – визначити вплив тривалого культивування нейронів СГ і ДР з семаксом на рівень синапатичної активності *in vitro*, а також на короткочасну пластичність нейропередачі в сенсорних синапсах.

МЕТОДИКА

Ко-культура нейронів СГ і ДР. Методика сумісного культивування нейронів СГ і ДР не відрізнялася від описаної раніше [8]. СГ та ДР люмбального відділу виділяли у неонатальних щурів лінії Вістар. Сегменти ДР обробляли 0,2%-м розчином трипсину (тип XI) протягом 8 хв (37°C), СГ – 0,2%-м розчином пронази протягом 7 – 8 хв (37°C). Після механічної дезагрегації, яку проводили з використанням різних за діаметром кінчика пастерівських піпеток, нейрони висівали на покриті полі-L-орнітином чашки Петрі (щільність клітин у ко-культурах – близько 30 тис. од/см²). Культури інкубували при 37°C і 5% CO₂ у повітряному середовищі. Розчин для культивування виготовляли на базі

мінімального середовища Ігла з додаванням 10% кінської сироватки, 2,3 г/л NaHCO₃, 8 мкг/мл інсуліну, 50 од/мл бензилпеніциліну натрієвої солі та 50 мкг/мл стрептоміцину сульфату. Проліферацію гліальних клітин у культурах пригнічували цитозин-А-D-арабінофуранозидом (5 мкмоль/л). Пептид семакс у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л додавали до середовища на 4-ту добу культивування, після відміни цитозин-А-D-арабінофуранозиду. Заміну культурального середовища, що містило семакс, проводили з інтервалом у 5 діб. Протягом дозрівання ко-культури додатково не збагачували ростовими факторами. Електрофізіологічні експерименти проводили на 16-ту добу культивування.

Електрофізіологія. З використанням методу patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» у парі синаптично зв'язаних нейронів, реєстрували спонтанні і мініатюрні збуджувальні постсинаптичні струми (сВПСС і мВПСС відповідно) у нейронах ДР, а також моносинаптичні збуджувальні постсинаптичні струми (вВПСС), викликані в нейронах ДР генерацією потенціалів дії (ПД) ноцицептивними нейронами СГ. Ноцицептивний фенотип пресинаптичних нейронів СГ визначали відповідно до морфофункціональних показників (малий розмір соми, форма і параметри ПД, чутливість до капсаїцину).

Експериментальний фізіологічний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140; KCl – 3; CaCl₂ – 2; MgCl₂ – 2; глюкоза – 10; HEPES – 20; pH 7,4 (доведено NaOH); внутрішньоклітинний розчин у patch-піпетках – калію глюконату – 155; EGTA – 0,5; MgCl₂ – 1; HEPES – 20; pH 7,4 (доведено KOH). Підтримуваний потенціал на нейронах ДР був -70 мВ. Реєстрацію мЗПСС у нейронах ДР проводили у позаклітинному розчині, що містив 0,5 ммоль/л Ca²⁺, 10 ммоль/л Mg²⁺ та 0,25 мкмоль/л тетродотоксину. Експерименти проводили при 20–22°C. При реєстрації глутаматергічних постсинаптичних струмів гальмівну передачу блокували додаванням у позаклітинний розчин специфічних блокаторів ГАМК_A- та

гліцинових рецепторів (бікукуліну метіодиду, стрихніну). Заміну розчинів, які доповнювалися блокаторами іонотропних глутаматних рецепторів (DNQX, D_L-AP5), проводили зі швидкістю 2 мл/хв.

Для оцінки короткочасної пластичності в сенсорних синапсах розраховували коефіцієнт парної стимуляції (КПС) як частку від пікових значень амплітуд двох послідовно зареєстрованих (з інтервалом 200 мс) вВПСС: $KPC = \frac{v_{ВПСС2}}{v_{ВПСС1}}$. Коефіцієнти варіації (CV) розраховували як відношення стандартного відхилення амплітуд вВПСС до їх середнього значення.

Числові результати представлені як середні \pm похибка середнього; розміри вибірки усереднення подані в дужках. Перевірку гіпотези про належність вибірки до нормально розподіленої генеральної сукупності проводили за тестом Шапіро-Уїлка. Для статистичного порівняння розподілів аналізованих величин використовували критерій узгодженості Пірсона (χ^2). Для визначення рівня значущості розбіжностей між середніми значеннями в групах використовували критерій *t* Стьюдента. Рівні значущості розбіжностей позначені у тексті, в таблицях та на рисунках.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для визначення впливу семаксу на рівень синаптичної активності в ко-культури аналізували частоту виникнення, а також амплітуди сВПСС у нейронах ДР. Реєстрували сВПСС, опосередковані викидом глутамату. Вони мали швидку кінетику наростання і спаду (час наростання $2,31 \pm 0,58$ мс; спаду – $4,50 \pm 0,92$ мс; $n = 6$). Середні значення амплітуд сВПСС лінійно залежали від величин підтримуваних потенціалів на нейронах ДР. Потенціал реверсії сВПСС становив $5,12 \pm 2,31$ мВ ($n = 5$). Позаклітинна аплікація блокаторів іонотропних глутаматних рецепторів DNQX (10 мкмоль/л) та D_L-AP5 (10 мкмоль/л) призводила до повного блокування сВПСС.

Семакс викликає підвищення частоти сВПСС в нейронах ДР. Інкубація нейронів за наявності семаксу протягом 12 діб призводила до підвищення частоти виникнення сВПСС у нейронах ДР (рис. 1, 2).

При культивуванні з пептидом у концентрації 10 мкмоль/л цей показник підвищувався на $71,7 \pm 1,8$ % ($n = 6$; $P < 0,001$), а при концентрації 100 мкмоль/л – на $93,9 \pm 3,1$ % ($n = 6$; $P < 0,001$) щодо контролю. Розподіли частот

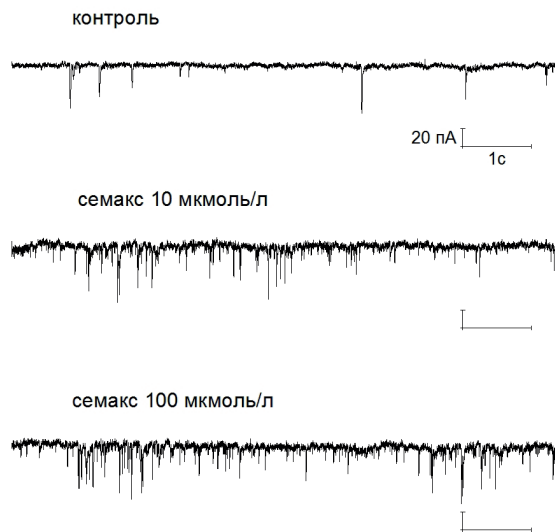


Рис.1. Зміна спонтанної активності в спільній культурі нейронів спінальних гангліїв (СГ) та дорсального рогу (ДР) спинного мозку внаслідок тривалого культивування (12 діб *in vitro*) з пептидом семакс. Приклади реєстрацій глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів у нейронах ДР: у контролі, при культивуванні з семаксом у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л

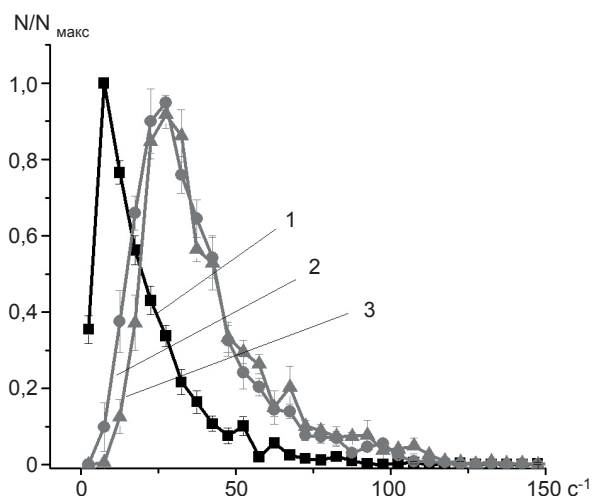


Рис.2. Підвищення частоти глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів (сВПСС) в нейронах дорсального рогу при тривалому культивуванні (12 діб *in vitro*) з семаксом. Усереднені розподіли частот сВПСС нормовані на максимальне значення (N/N_{макс}). 1 – контроль; 2, 3 – групи нейронів, культивованих з семаксом у концентрації 10 мкмоль/л і 100 мкмоль/л відповідно

сВПСС у нейронах, інкубованих з семаксом, статистично вірогідно відрізнялися від контрольних значень. Моді та медіани частотних гістограм сВПСС у нейронах, попередньо культивованих з семаксом, також були істотно вищими за контроль (табл. 1). Розподіли частот сВПСС у групах нейронів, культивованих при різних концентраціях пептиду істотно не відрізнялися ($P > 0,1$). Але середні значення частоти, а також медіани частотних гістограм сВПСС у нейронах ДР, інкубованих з семаксом у концентрації 100 мкмоль/л, були вірогідно вищими (на $12,9 \pm 3,2\%$ $n = 6$; $P = 0,02$) за такі при культивуванні з семаксом у меншій концентрації.

Таблиця 1. Показники розподілів частот глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів (c^{-1}), зареєстрованих у нейронах дорсального рогу на 16-ту добу *in vitro* ($M \pm m, n=6$)

Показники	Контроль	Семакс	
		10 мкмоль/л	100 мкмоль/л
Середнє значення	21,17±1,15	36,34±0,67*	41,04±1,29*,**
Мода, c^{-1}	14,09±1,12	24,45±2,43*	22,95±2,11*
Медіана, c^{-1}	15,18±0,73	31,74±0,71*	34,49±0,73*,**

* статистично вірогідна різниця у порівнянні зі значеннями у контролі;

** статистично вірогідна різниця при порівнянні показників між групами культивування з семаксом.

Представлені результати свідчать про посилення синаптичної активності в нейронних мережах ко-культур під впливом семаксу. Як відомо, підвищення частоти спонтанних постсинаптичних відповідей нейронів у процесі їх *in vitro* диференціювання тісно корелює зі збільшенням числа функціональних синапсів на постсинаптичних нейронах [9], тобто з підвищенням рівня синаптогенезу. Провідна роль у процесах формування, дозрівання та стабілізації синапсів у нейронах ЦНС належить нейротрофінам (NGF, BDNF тощо), транскрипція генів і рецепторів котрих посилюється під впливом семаксу [4,5]. Таким чином, можна припустити, що пептид надає опосередкований стимулювальний вплив на формування глутаматергічних синапсів на нейронах ДР у ко-культурі з нейронами СГ, імовірно через стимуляцію синтезу нейротрофінів.

Семакс підвищує амплітуду і квантовий вміст сВПСС у нейронах ДР. Амплітудні розподіли сВПСС у контролі та в нейронах, культивованих з семаксом, характеризувалися наявністю декількох рівновіддалених піків, які апроксимувалися сумою кривих Гауса (рис. 3).

Середня відстань між піками таких гістограм відповідала першій моді ($-20,6 \pm 0,8$ пА; $n = 36$) розподілів, що свідчить про чітко виражений багатоквантовий характер вивільнення глутамату в синапсах ко-культивованих нейронів. Крім того, моді амплітудних розподілів сВПСС були кратними моді унімодальних амплітудних гістограм мВПСС ($-20,5 \pm 0,7$ пА; $n = 7$), які інтерпретуються

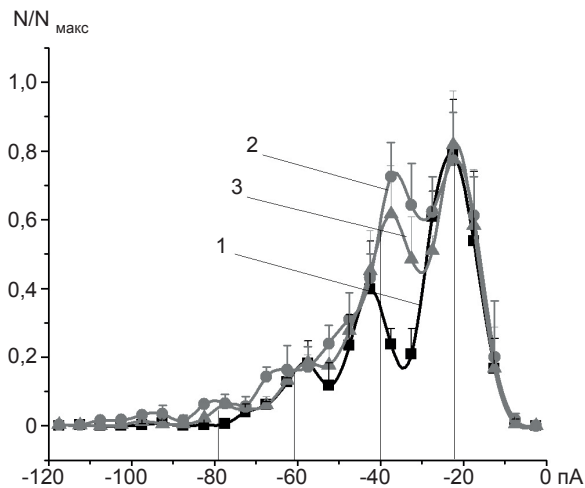


Рис.3. Вплив тривалого культивування (12 діб *in vitro*) з семаксом на амплітуду глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів (сВПСС) у нейронах дорсального рогу. Суперпозиція усереднених полімодальних амплітудних розподілів сВПСС (амплітуди нормовані на максимальні значення; N/N_{\max}) у контролі (1), на тлі культивування з пептидом у концентраціях 10 (2) та 100 (3) мкмоль/л. Вертикальні лінії вказують на середні значення мод амплітудних гістограм

як значення синаптичного струму внаслідок викиду одиничного кванту глутамату в синапсах культивованих нейронів [10]. Кінетика мВПСС відповідала такій сВПСС (час наростання $3,07 \pm 0,35$ мс, τ спаду $5,51 \pm 0,53$ мс; $n = 5$). На тлі культивування з семаксом амплітуди мВПСС істотно не змінювалися порівняно з контролем. Середня частота мВПСС також вірогідно не відрізнялася від контрольних значень: $0,36 \pm 0,07$ s^{-1} ($n = 5$) у контролі, $0,34 \pm 0,09$ s^{-1} ($n = 4$) та $0,40 \pm 0,06$ s^{-1} ($n = 4$) при культивуванні нейронів з 10 та 100 мкмоль/л семаксу, відповідно.

Розподіли амплітуд сВПСС у нейронах ДР, що культивувалися з пептидом, відріз-

нялися від контрольної групи ($P < 0,001$) більшим числом піків при відносно постійній середній відстані між ними. Також відзначалося деяке підвищення частоти спостереження 2- і 4-квантових подій, як це видно при порівнянні амплітудних гістограм (див. рис. 3). Відмінності у розподілах амплітуд сВПСС у групах культивування з пептидом при різних концентраціях не сягали статистично значущого рівня.

Середні значення амплітуд сВПСС, а також значення медіан амплітудних розподілів, зареєстрованих у нейронах ДР при культивуванні з семаксом, були несуттєво, але вірогідно вищими за контрольні (табл. 2).

Значення сВПСС у групах нейронів, інкубованих з пептидом, зростали не більше ніж на 13,5% відносно контролю. Підвищення амплітуди сВПСС при культивуванні з пептидом спостерігалось паралельно зі збільшенням квантового вмісту (див. табл. 2).

Відповідно до біноміальної моделі, прийнятної для опису ймовірності вивільнення глутамату в синапсах досліджуваних нейронів [11], квантовий вміст залежить від ймовірності викиду окремих квантів та числа зон викиду нейромедіатора. Для глутаматергічних ВПСС ймовірність викиду пресинаптичних везикул є прямопропорційною частоті мВПСС, тобто частоті викиду поодиноких квантів глутамату. У наших експериментах тривале культивування нейронів з семаксом не змінювало цей показник порівняно з контролем. Отже, підвищення ефективності багатовезикулярного викиду в нейронних мережах ко-культур на тлі інкубації з семаксом вочевидь реалізується внаслідок зростання кількості глутаматергічних синапсів на ней-

Таблиця 2. Показники амплітудних розподілів сВПСС, зареєстрованих у нейронах дорсального рогу на 16-ту добу *in vitro* ($M \pm m$, $n=6$)

Показники	Контроль	Семакс	
		10 мкмоль/л	100 мкмоль/л
Середнє значення, пА	$-33,50 \pm 2,58$	$-37,85 \pm 3,45^*$	$-35,32 \pm 3,20^*$
Медіана, пА	$-30,38 \pm 2,78$	$-34,48 \pm 3,36^*$	$-29,52 \pm 2,92^*$
Квантовий вміст	$1,54 \pm 0,08$	$1,97 \pm 0,11^*$	$1,91 \pm 0,09^*$

* статистично вірогідна різниця у порівнянні зі значеннями у контролі.

ронах ДР під впливом пептиду.

Семакс модулює короточасну пластичність у ноцицептивних сенсорних синапсах на нейронах ДР. Для оцінки впливу семаксу на короточасну пластичність у сенсорних синапсах досліджували одну з її найбільш поширених форм – пластичність при парній стимуляції (ППС). З використанням методу парної patch-clamp реєстрації стимулювали пресинаптичний нейрон СГ ноцицептивного фенотипу парами імпульсів з інтервалом 200 мс і відводили викликані глутаматергічні ВВПСС у нейроні ДР. Зареєстровані струми були опосередковані переважно активацією АМРА-рецепторів [12].

У нейронних парах після культивування з семаксом реєстрували ВВПСС значно більшої амплітуди, ніж у контролі (рис. 4).

Середні значення амплітуд струмів у контролі становили $-74,2 \pm 7,8$ пА ($n = 8$), при культивуванні з пептидом у концентрації 10 мкмоль/л $-155,5 \pm 7,2$ пА ($n = 6$; $P < 0,001$), у концентрації 100 мкмоль/л $-144,7 \pm 19,4$ пА ($n = 7$; $P < 0,01$). Таке підвищення цього показника ймовірно є результатом збільшення числа сенсорних синапсів на нейронах ДР у процесі культивування під впливом семаксу.

Тривале культивування нейронів СГ і ДР з семаксом суттєво впливало на параметри

ППС: КПС істотно підвищувався для нейронів, культивованих з пептидом (див. рис. 4). У контрольній групі відзначалася виражена депресія ВВПСС при парній стимуляції нейронів СГ ($\text{КПС} = 0,53 \pm 0,028$; $n = 8$). Після інкубації з семаксом (10 та 100 мкмоль/л) ступінь депресії значно знижувався: КПС в цих групах нейронних пар становив $0,91 \pm 0,072$ ($n = 6$; $P < 0,01$) та $0,95 \pm 0,026$ ($n = 7$; $P < 0,001$) відповідно.

При аналізі ППС порівнювали коефіцієнти варіації амплітуд 1-го та 2-го ВВПСС (CV1 та CV2). Для нейронних пар контрольної групи співвідношення $\text{CV2}/\text{CV1}$ становило $1,49 \pm 0,11$ ($n = 8$). Таке збільшення варіації 2-го ВВПСС в порівнянні з 1-м вказує на пресинаптичні механізми розвитку депресії при парній стимуляції [13], пов'язані зі зменшенням імовірності викиду медіатора при відповіді на 2-й стимул у парі. Після культивування нейронів СГ і ДР з пептидом у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л співвідношення $\text{CV2}/\text{CV1}$ були достовірно нижчими за контроль і становили $1,02 \pm 0,09$ ($n = 6$; $P < 0,05$) та $1,11 \pm 0,13$ ($n = 7$; $P < 0,01$) відповідно. Як видно, у цих групах нейронів підвищення варіації 2-го ВВПСС порівняно з 1-м є незначним, що вказує на стабілізацію ймовірності викиду глутамату під впливом семаксу. Пред-

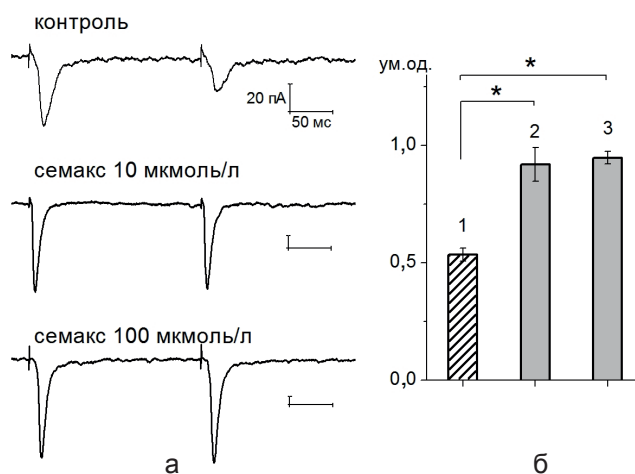


Рис.4. Ефекти тривалого культивування (12 днів *in vitro*) з семаксом на пластичність при парній стимуляції в ноцицептивних сенсорних синапсах: а – усереднені записи збуджувальних постсинаптичних струмів в ноцицептивних синапсах у контролі (1), на тлі культивування з пептидом у концентраціях 10 (2) та 100 (3) мкмоль/л; б – гістограма середніх значень коефіцієнтів парної стимуляції. * статистично вірогідна різниця порівняно з контролем

ставлені результати з одного боку вказують на те, що на тлі дії семаксу пластичність при парній стимуляції стає менш вираженою, а з іншого боку – свідчать про здатність пептиду підвищувати рівень надійності синаптичної передачі в сенсорних синапсах.

Отже, пептид семакс при тривалому впливі у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л сприяє підвищенню синаптичної активності в нейронних мережах спільно культивованих нейронів СГ і ДР. В умовах *in vitro* пептид стимулює функцію глутаматергічних синапсів на нейронах ДР, а також підвищує ймовірність багатовезикулярного викиду в нейронних мережах ко-культур. У ноцицептивних сенсорних синапсах семакс вочевидь діє на пресинаптичну терміналь, підвищуючи рівень надійності передачі соматосенсорної інформації в умовах фізіологічно детермінованої частоти імпульсної активності аферентних нейронів.

Ця робота є частиною проекту спільних українсько-російських наукових досліджень НАН України та Російського фонду фундаментальних досліджень «Вивчення клітинних механізмів нейропротекторної дії гліпролінів при системних пошкодженнях нейронів» (номер реєстрації 0114U005000).

**М.С.Шипшина, Н.С. Веселовский,
Н.Ф. Мясоедов, С.И. Шрам, С.А. Федулова**

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА СЕМАКС НА СИНАПТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И КРАТКОВРЕМЕННУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ СИНАПСОВ КО-КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ СПИНАЛЬНЫХ ГАНГЛИИВ ДОРСАЛЬНОГО РОГА СПИННОГО МОЗГА

Исследовано влияние длительного культивирования (12 суток *in vitro*) нейронов спинальных ганглиев (СГ) и нейронов дорсального рога (ДР) с пептидом семакс на уровень синаптической активности в ко-культурах, а также на кратковременную пластичность в сенсорных синапсах. Показано, что культивирование нейронов с пептидом в концентрациях 10 та 100 мкмоль/л способствовало повышению частоты глутаматергических спонтанных постсинаптических токов, регистрируемых в нейронах

ДР на $71,7 \pm 1,8$ и на $93,9 \pm 3,1$ % соответственно. Семакс существенно не влиял на амплитуду и частоту миниатюрных глутаматергических токов, но повышал амплитуду спонтанных постсинаптических токов, а также квантовое содержание. Результаты свидетельствуют о повышении эффективности многовезикулярного выброса глутамата в нейронных сетях ко-культур при инкубации с пептидом. Следует отметить также изменения основных параметров кратковременной пластичности в сенсорных синапсах под действием семакса: 1) повышение коэффициента парной стимуляции от $0,53 \pm 0,028$ до $0,91 \pm 0,072$ и $0,95 \pm 0,026$; 2) снижение соотношения коэффициентов вариации постсинаптических токов (CV2/CV1) от $1,49 \pm 0,11$ до $1,02 \pm 0,09$ и $1,11 \pm 0,13$ соответственно. Полученные результаты указывают на стимулирующее влияние семакса на активность глутаматергических синапсов в нейронных сетях ко-культур, а также на способность пептида эффективно модулировать кратковременную пластичность в сенсорных синапсах.

Ключевые слова: спинальные ганглии; дорсальный рог спинного мозга; глутамат; постсинаптические токи; синаптическая активность; кратковременная пластичность; пептид семакс.

**M.S. Shypshyna¹, N.S. Veselovsky¹,
N.F. Myasoedov², S.I. Shram², S.A. Fedulova¹**

EFFECT OF PEPTIDE SEMAX ON SYNAPTIC ACTIVITY AND SHORT-TERM PLASTICITY OF GLUTAMATERGIC SYNAPSES OF CO-CULTURED DORSAL ROOT GANGLION AND DORSAL HORN NEURONS

The influence of long-term culturing (12 days *in vitro*) of dorsal root ganglion (DRG) and dorsal horn (DH) neurons with peptide Semax on the level of synaptic activity at co-cultures, as well as short-term plasticity in sensory synapses were studied. It has been shown that neuronal culturing with peptide at concentrations of 10 and 100 μM led to increasing the frequency of spontaneous glutamatergic postsynaptic currents in DH neurons to $71.7 \pm 1.8\%$ and $93.9 \pm 3.1\%$ ($n=6$; $P<0.001$). Semax has a not significant effect on the amplitude and frequency of miniature glutamatergic currents, but causes an increase of the amplitudes of spontaneous postsynaptic currents, as well as elevates the quantum content. The data show the increase of multivesicular glutamate release efficiency in neural networks of co-cultures following incubation with the peptide. Also Semax (10 and 100 μM) induces changes of the basic parameters of short-term plasticity in sensory synapses: (1) increasing the paired-pulse ratio from 0.53 ± 0.028 ($n=8$) to 0.91 ± 0.072 ($n=6$, $P<0.01$) and 0.95 ± 0.026 ($n=7$; $P<0.001$); (2) reducing the ratio of the coefficients of variation (CV2/CV1) from 1.49 ± 0.11 ($n=8$) to 1.02 ± 0.09 ($n=6$; $P<0.05$) and 1.11 ± 0.13 ($n=7$; $P<0.01$) respectively. The results indicate a stimulating effect of Semax on the activity of glutamatergic

synapses in neural networks of co-cultures, as well as the ability of the peptide to effectively modulate the short-term plasticity in sensory synapses.

Key words: dorsal root ganglion; dorsal horn of the spinal cord; glutamate; postsynaptic currents; synaptic activity; short-term plasticity; peptide Semax.

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

²*Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia*

REFERENCES

1. Stavchansky VV, Yuzhakov VV, Botsina AY, Skvortsova VI, Bondurko LN, Tsyganova MG, Limborska SA, Myasoedov NF, Dergunova LV. The effect of Semax and its C-end peptide PGP on the morphology and proliferative activity of rat brain cells during experimental ischemia: a pilot study. *J Mol Neurosci.* 2011; 45(2):177-85.
2. Polunin GS, Makarov IA, Shirshikov IK, Makashova NV. The efficacy of the antioxidant preparation Histochrome in the treatment of hemophthalmos in hypertension and diabetes mellitus. *Vestn Oftalmol.* 2000; 116(2):19-20.
3. Kamkin AG, Kiseleva IS, Kositskiĭ GI. Role of ACTH fragments in regulating electrogenesis and electrotonic synaptic interaction of pond snail neurons. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova.* 1986; 72(7):908-20 [Russian].
4. Dmitrieva VG, Povarova OV, Skvortsova VI, Limborska SA, Myasoedov NF, Dergunova LV. Semax and Pro-Gly-Pro activate the transcription of neurotrophins and their receptor genes after cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol.* 2010; 30(1):71-9.
5. Shadrina M, Kolomin T, Agapova T, Shram S, Slominsky P, Lymborska S, Myasoedov N. Comparison of the temporary dynamics of NGF and BDNF gene expression in rat hippocampus, frontal cortex, and retina under Semax action. *J Mol Neurosci.* 2010; 41(1):30-5.
6. Ivanova DM, Levitskaya NG, Andreeva LA, Kamenskii AA, Myasoedov NF. Comparative study of analgesic potency of ACTH4-10 fragment and its analog semax. *Bull Exp Biol Med.* 2007; 143(1):5-8.
7. Manchenko DM, Glazova NI, Levitskaia NG, Andreeva LA, Kamenskii AA, Miasoedov NF. Nootropic and analgesic effects of Semax following different routes of administration. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2010; 96(10):1014-23 [Russian].
8. Shypshyna MS, Veselovsky MS. Characteristics of sensory neurotransmission in co-culture of neurons from the dorsal root ganglion and dorsal horn spinal cord in rats. *Fiziol Zh.* 2010; 56(4):26-36 [Ukrainian].
9. Gottmann K, Pfrieger FW, Lux HD. The formation of glutamatergic synapses in cultured central neurons: selective increase in miniature synaptic currents. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994; 81(1):77-88.
10. Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J. Physiol.* 1990; 430:213-249.
11. Shypshyna MS, Veselovsky MS. Properties of quantum release of glutamate and glycine in synapses between co-cultured primary afferent and spinal dorsal horn neurons. *Neurophysiology.* 2013; 45(2):103-108.
12. Shypshyna MS, Fedulova SA, Veselovsky NS. Induction of long-term depression of synaptic transmission in a co-culture of DRG and spinal dorsal horn neurons of rats. *Neurophysiology.* 2011; 43(4):261-270.
13. Wilcox KS, Dichter MA. Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA_B autoreceptor activation. *J Neurosci.* 1994; 14(3): 1775-88.

Матеріал надійшов до редакції 09.11.2014

Вплив ускладнень діабету на нервово-м'язову передачу в гладеньких м'язах сечового міхура щурів

І.В. Владімірова^{1,3}, І.Б. Філіппов^{1,3}, О.Н. Падурару^{2,3}, Є.Я. Шуба^{1,3}, Є.М. Кулієва^{1,3}, Я.М. Шуба^{1,2,3}

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

²Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ;

³Державна ключова лабораторія молекулярної і клітинної фізіології при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: yshuba@biph.kiev.ua

*У роботі було перевірено припущення, що такі ускладнення діабету, як цистит або стафілококова інфекція є синергічними з діабетом факторами, що посилюють порушення нервово-м'язової передачі в гладеньких м'язах детрузора (ГМД) сечового міхура. У контрольних щурів і щурів з стрептозотоциніндукованим цукровим діабетом інтерстиціальний цистит моделювали одноразовим інтраперитонеальним введенням циклофосфаміду (200 мг / кг), а системне запалення – пептидоглікану *Staphylococcus aureus* (300 мкг / кг). Циклофосфамідіндукований цистит незалежно від наявності або відсутності діабету призводив до незначного збільшення атропінчутливого холінергічного компонента скорочень смужок ГМД, активованих електричною стимуляцією, і до посилення в них індометацинчутливого прозапального компонента, пов'язаного з активацією циклооксигенази 1-2 і вивільненням простагландинів. Використання пептидоглікану також збільшувало внесок як атропін- так і індометацинчутливого компонентів у скороченнях, викликаних електричною стимуляцією, які, однак, були менш вираженими, ніж при циклофосфамідіндукованому циститі. Загалом, зміни у синаптично викликаних скороченнях при моделюванні циститу і системного запалення виявилися набагато менші порівняно з ГМД сечового міхура тварин з діабетом та ознаками супутнього циститу. Наші результати вказують на необхідність пошуку додаткових чинників і механізмів, крім циститу, що призводять до цих змін.*

Ключові слова: цукровий діабет; цистит; сечовий міхур; гладенькі м'язи; скорочення; нервово-м'язова передача.

ВСТУП

Відомо, що перебіг діабету супроводжується низкою урологічних розладів [1], які можуть ще більше посилюватися внаслідок таких його ускладнень, як інфекції та запальні процеси. Запалення є важливим індикатором ушкодження тканини, а хронічний інтерстиціальний цистит при діабеті – надзвичайно поширене явище [2]. При цьому причини запальних процесів не завжди очевидні. Одна з них у хворих на діабет – послаблення імунітету та пов'язана з цим схильність до інфекцій, зокрема, сечовивідних шляхів [2].

У нашій попередній роботі [3] ми показали, що у щурів з стрептозотоцин(СТЗ)-

© І.В. Владімірова, І.Б. Філіппов, О.Н. Падурару, Є.Я. Шуба, Є.М. Кулієва, Я.М. Шуба

індукованим експериментальним цукровим діабетом на 8–10-й тиждень, при рівні цукру у крові 25–30 ммоль/л помітні зміни у нервово-м'язовій синаптичній передачі в гладеньких м'язах детрузора (ГМД) сечового міхура порівняно з контролем спостерігалися тільки у приблизно 40 % усіх досліджених тварин, що, очевидно, пояснює суперечливі літературні дані щодо впливу діабету на цю передачу [4–10]. У цих тварин виявлені нами зміни полягали у суттєвому посиленні пуринергічного і, особливо, холінергічного компонентів скорочень, викликаних електричною стимуляцією смужок ГМД, а також у збільшенні їх скорочувальних реакцій на

прикладання екзогенних агоністів пурино- і m-холінорецепторів АТФ і карбахолу відповідно. Решта ж 60 % ГМД характеризувалися скорочувальними реакціями на вказані стимули, які мало відрізнялися від контролю. Ми помітили[3], що зміни у пуринергічній та холінергічній сигналізації спостерігалися тоді, коли у сечовому міхурі щурів з діабетом, з якого готувалися смужки ГМД, виявляли ознаки запалення (цистити), у зв'язку з чим було зроблено припущення, що їх основною причиною насамперед є не гіперглікемія, а її ускладнення, зокрема, інтерстиціальний цистит.

Мета роботи – визначення ролі інтерстиціального циститу в порушенні нервово-м'язової передачі в гладеньких м'язах сечового міхура при експериментальному діабеті.

МЕТОДИКА

При створенні моделі експериментального стрептозотоцин-(СТЗ)викликаного діабету враховані рекомендації Michigan Diabetes Research and Training Center at the University of Michigan [11]. Його викликали у дорослих щурів масою 200–250 г за допомогою одноразової внутрішньоочеревинної ін'єкції 42 ммоль/л стрептозоточину (СТЗ, “Сігма-Алдріх”, США), розведеному у 100 ммоль/л оцтовому буфері при рН 4,5. Контрольним тваринам вводили аналогічний об'єм чистого буфера.

Використовували тварин, концентрація глюкози в крові яких була у межах 30 ммоль/л. При менших її значеннях (в межах 16 – 25 ммоль/л) змін у нервово-м'язовій передачі гладеньких м'язів сечового міхура в більшості випадків не було. Тварин з діабетом досліджували після 8 тиж з дня введення СТЗ у зв'язку з тим, що пік розвитку гіперактивності та зростання ємності сечового міхура припадає на 6 – 9-й тижні [12].

Індукцію супутнього циститу здійснювали за допомогою одноразового внутрішньоочеревинного введення циклофосфаміду (“Сігма-Алдріх”, США) в концентрації 200 мг/кг, [13] або пептидоглікану *Staphylococcus*

aureus (“Сігма-Алдріх”, США) в концентрації 300 мкг/кг [14, 15], за 3 доби до проведення досліджень. У разі індукції хронічного циститу проводили триразове внутрішньоочеревинне введення циклофосфаміду в концентрації 75 мг/кг (на 1-, 3- та 5-ту добу), а тварин використовували в експерименті на 7-му добу [15]. Циклофосфамід – це відомий хемотерапевтичний препарат, поширеною побічною дією якого є індукція геморагічного циститу та дифузного запалення сечового міхура [16], тоді як пептидоглікан здатен викликати системну запальну реакцію, пов'язану з активацією імунної відповіді [17].

Щурів наркотизували ефіром та декапітували. Сечовий міхур швидко видаляли і поміщали в нагрітий (37° С), оксигенований (95% O₂ і 5% CO₂) розчин Кребса (ммоль/л): NaCl – 120,4, KCl – 5,9, CaCl₂ – 1,8, MgCl₂ – 1,2, NaH₂PO₄ – 1,2, NaHCO₃ – 15,5, глюкози – 11,5 (рН 7,4). Передню стінку міхура розрізали від основи до купола, очищали від сполучної тканини та уротелію, і нарізали поздовжні та кільцеві смужки довжиною 0,7–1,0 см і діаметром 0,2–0,3 см. Смужки поміщали в проточну камеру з одним кінцем зафіксованим нерухомо, а другим – прикріпленим до ємнісного датчика сили з базовим навантаженням 3 мН. Електричну стимуляцію проводили 2-х секундними серіями імпульсів (тривалість імпульсу 0,5 мс, амплітуда 100 В, частота 10 Гц) раз на 3 хв, що було достатньо для повного відновлення базального тону. Запис скоротливої активності здійснювали через аналогово-цифровий перетворювач на комп'ютер і паралельно на чорнильний самописець.

Атропін (“Сігма-Алдріх”, США) розчиняли у воді, а індометацин (“Сігма-Алдріх”, США) в спирті в концентрації 10 ммоль/л, і потрібний об'єм для досягнення кінцевої робочої концентрації додавали до розчину Кребса.

Кожен експеримент проводили на 8-10 смужках ГМД вимірюючи зміни базального тону, максимальну амплітуду скорочень,

викликаних електричною стимуляцією і їх тривалість на рівні 0,25 амплітуди у відповідь на прикладання різних сполук. Для кожного досліду амплітуду скорочень нормували на масу смужки і виражали в одиницях - міліньютон на 1 мг (мН/мг). Ми не помітили статистично значущих відмінностей у скоротливих реакціях кільцевих і поздовжніх смужок ГМД сечового міхура ні у відповідь на електричну стимуляцію, ні на прикладання атропіну або сумісного прикладання атропіну та індометацину, а тому при статистичній обробці результатів однотипні результати від обох видів смужок були об'єднані. Умовою для цього об'єднання було таке: 1) належність вибірок до генеральних сукупностей, розподілених за нормальним законом розподілу, показники ймовірностей яких за тестом Шапіро-Уїлка перевищували рівень $P=0,05$; 2) гомогенність дисперсій у вибірках, значимість яких для критеріїв Фішера та Левена перевищував $P=0,05$. Для кожного типу експерименту результати усереднювали і подавали у вигляді середнє \pm стандартна похибка середнього з позначенням числа смужок «n», на яких вони отримані. Статистичні порівняння двох незалежних вибірок були здійснені за допомогою парного або непарного критерію t Стьюдента, вважаючи значущими відмінності при $P<0,05$. Статистичне порівняння контрольних значень показників і значень під впливом діабету і сполук проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з поправкою Бонферроні, вважаючи відмінності з критичним рівнем $P<0,017$ значущими ($0,05/3=0,017$, де 3 число порівнянь).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив циклофосфамідіндукованого циститу на скорочення ГМД контрольних щурів і щурів з експериментальним діабетом. Ритмічна електрична стимуляція (20 імпульсів амплітудою 100 В і тривалістю 0,5 мс при частоті 10 Гц) смужок ГМД викликала монотонно на-

ростаюче скорочення, яке після припинення стимуляції також монотонно релаксувало до вихідного рівня базального тону. Вибрана нами кількість стимулювальних імпульсів була такою, щоб активувати переважно початковий пуринергічний компонент скорочення, тоді як фаза монотонної релаксації, внаслідок припинення стимуляції могла містити як пуринергічний, так і затриманий холінергічний компоненти.

Вже через 3 доби після разового інтраперитонеального введення циклофосфаміду як контрольним, так і щурам з діабетом їх сечовий міхур набував явних зовнішніх ознак геморагічного циститу. При цьому скорочувальні реакції смужок ГМД на електричне подразнення від обох груп тварин під впливом циклофосфамідіндукованого циститу також зазнавали деяких незначних змін. Останні переважно полягали у помірному подовженні постстимуляційної фази релаксації та порушенні монотонності її спаду (рис. 1). При цьому принципових відмінностей у характері змін скорочень нами відзначено не було. Більше того, індукція з модульованого циститу не призводила до тих змін у скороченні ГМД, які ми спостерігали тварин з діабетом, сечовий міхур у яких був з ознаками супутнього циститу [3].

У тварин з циклофосфамідіндукованим циститом прикладання антагоніста m-холінорецепторів атропіну (1 мкмоль/л), зменшувало амплітуду скорочень приблизно на 20 % (див. рис. 1) і суттєво пригнічувало фазу релаксації (див. рис. 1, а, в), вказуючи на те, що модифікація скорочувальних реакцій в результаті моделювання циститу значною мірою захоплює холінергічний компонент. Аплікація на тлі атропіну неселективного інгібітора циклооксигенази 1/2 індометацину (1 мкмоль/л) призводила до додаткового пригнічення амплітуди скорочень, яке в сумі з атропіновим сягало майже 60%, та повного усунення затримки фази релаксації (див. рис. 1). Оскільки циклооксигеназа каталізує синтез прозапальних медіаторів простагландинів з арахідонової кислоти, наслідком циклофос-

фамідіндукованого циститу є також посилення активації циклооксигенази 1/2 і поява у синаптично викликаному скороченні значного прозапального, простагландинзалежного компонента, який робить внесок як у його загальну амплітуду, так і у фазу релаксації.

Отже, моделювання циститу за допомогою циклофосфаміду хоч і спричинило незначне подовження холінергічного компонента у фазі релаксації синаптично викликаних скорочень, але воно було значно меншим, ніж ми спостерігали у нашому попередньому дослідженні [3] на деяких смужках ГМД сечового міхура з ознаками супутнього циститу від тварин з діабетом (див. рис. 1). Експерименти з індукцією хронічного циститу за допомогою циклофосфаміду не надали принципово відмінних результатів, вказуючи на те, що цистит, очевидно, є не єдиною причиною, що призводить до такого подовження.

Вплив пептидоглікану Staphylococcus aureus на скорочення ГМД контрольних щу-

рів і щурів з експериментальним діабетом. Пептидоглікан – це компонент клітинної стінки всіх бактеріальних клітин, що здатен викликати запальну реакцію. Пептидоглікан золотистого стафілокока при інтраперитонеальному введенні експериментальним тваринам стимулює напрацювання макрофагами і моноцитами прозапальних цитокінів та хемокінів (фактора некрозу пухлин α , інтерлейкінів 1, 6 та 8) [15], максимальний пік яких при грампозитивній інфекції спостерігають на 50–75-ту годину після зараження [2]. Для стимуляції клітинної відповіді *in vitro* потрібні великі його концентрації, що знаходяться в діапазоні від 0,001 до 0,005 мг/мл [14, 18].

Ознаки помірного геморагічного циститу у сечовому міхурі можна було помітити вже на 3-тю добу після разового внутрішньоочеревинного введення пептидоглікану контрольним щурам і щурам з діабетом. При цьому вплив індукованого пептидогліканом запалення на скорочувальні реакції смужок

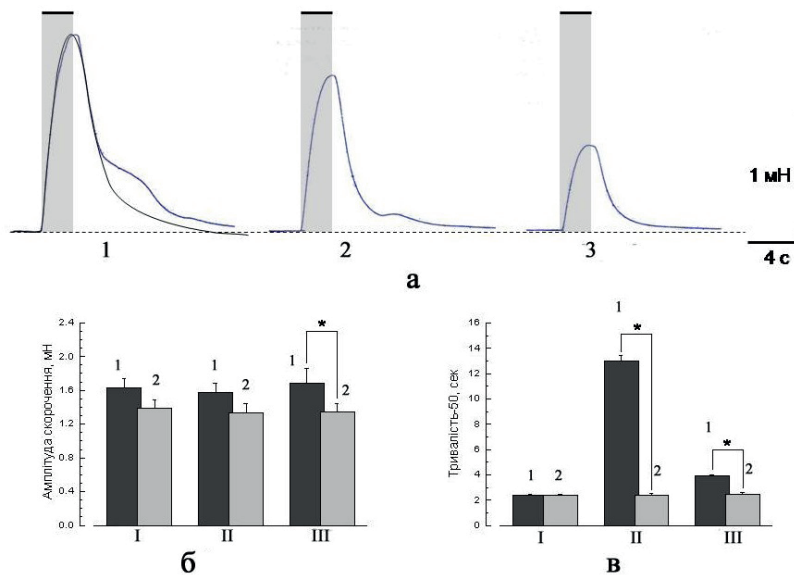


Рис. 1. Збільшення холінергічного компонента та поява простагландинзалежного компонента скорочень гладеньких м'язів детрузора (ГМД) сечового міхура, викликане циклофосфамідіндукованим циститом: а - типові реєстрації скорочень смужок ГМД сечового міхура контрольних щурів на 3-тю добу після введення циклофосфаміду; контрольне скорочення (1), скорочення після додавання атропіну (2) та скорочення після сумісної дії атропіну та індометацину (3); горизонтальні риси зверху показують час електричної стимуляції; б, в: порівняння амплітуд (б) та тривалостей на рівні 0,25 амплітуди (в) активованих електричною стимуляцією скорочення смужок ГМД сечового міхура щурів з діабетом (І), щурів з діабетом та ознаками супутнього інтерстиціального циститу (ІІ) та щурів з індукованим циститом у контролі (ІІІ); наведені середні значення \pm с.п.с., $n=5-7$ для кожного випадку; * $P<0,05$

ГМД, активованих електричною стимуляцією, у цих тварин дещо відрізнявся. Основна відмінність полягала у тому, що тільки у контрольних щурів спостерігали незначне подовження тривалості фази релаксації (рис. 2, 3) при тому, що ні у контрольних щурів, ні у щурів з діабетом сама форма синаптично викликаного скорочення очевидних модифікацій не зазнавала. Також не було виявлено суттєвих відмінностей і в дії атропіну (1 мкмоль/л), який приблизно однаковою мірою (у середньому на 20%) пригнічував амплітуду скорочень смужок ГМД від цих тварин, яких піддавали дії пептидоглікану. Подальша аплікація на тлі атропіну індометацину (1 мкмоль/л) додатково пригнічувала амплітуду скорочень у контрольних тварин в середньому 48 %, а у тварин з діабетом – 42 %. Треба зазначити, що у дослідах на ГМД від контрольних щурів, сумісна аплікація атропіну та індометацину пригнічувала амплітуду скорочень в середньому на 37 %.

Таким чином, індукція системного запалення за допомогою пептидоглікану *Staphylococcus aureus* не відтворювала зміни у фор-

мі та амплітудно-часових характеристиках скорочень смужок ГМД сечового міхура з ознаками природного циститу від тварин з діабетом. Також було виявлено, що при системному запаленні, пов'язаному з ефектами пептидоглікану, внесок простагландинзалежного компонента в загальну амплітуду синаптично викликаних скорочень значно менший порівняно з циклофосфамідіндукованим циститом.

Геморагічний цистит – це багатофакторний патологічний стан, причинами якого може бути дисфункція епітелію, активація тканинних базофілів (mast cells), нейрогенне запалення. У разі циклофосфамідіндукованого циститу основним патологічним чинником вважається його токсичний метаболіт акролеїн, який здатен активувати сенсорні нервові аференти приводячи до вивільнення з них прозапальних нейропептидів (субстанція Р, кальцитонін ген-споріднений пептид) та простаноїдів [4, 19, 20]. При цьому мішенню прямої дії акролеїну є катіонний, кальцій-проникний канал з родини TRP – TRPA1, який еспресується в закінченнях сенсорних

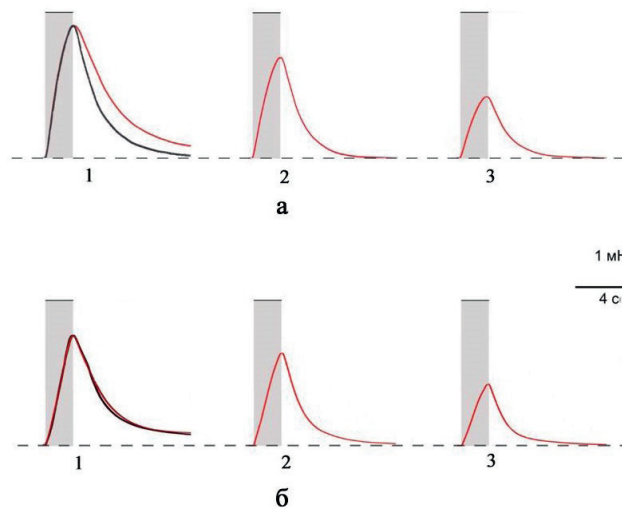


Рис. 2. Збільшення внеску пептидогліканом золотистого стафілокока холінергічного та простагландинзалежного компонентів у скорочення гладеньких м'язів детрузора (ГМД) сечового міхура щурів. Типові реєстрації скорочень смужок ГМД сечового міхура контрольних (а) і щурів з діабетом на (б) 3-тю добу після введення пептидоглікану; контрольне скорочення (1), скорочення після додавання атропіну (2) та сумісної дії атропіну з індометацином (3); для порівняння на контрольне скорочення накладено пронормоване з ним за амплітудою скорочення смужки ГМД контрольного щура (а1) і щура з діабетом (б1) без запалення, індукованого пептидогліканом; горизонтальні риси зверху – час електричної стимуляції

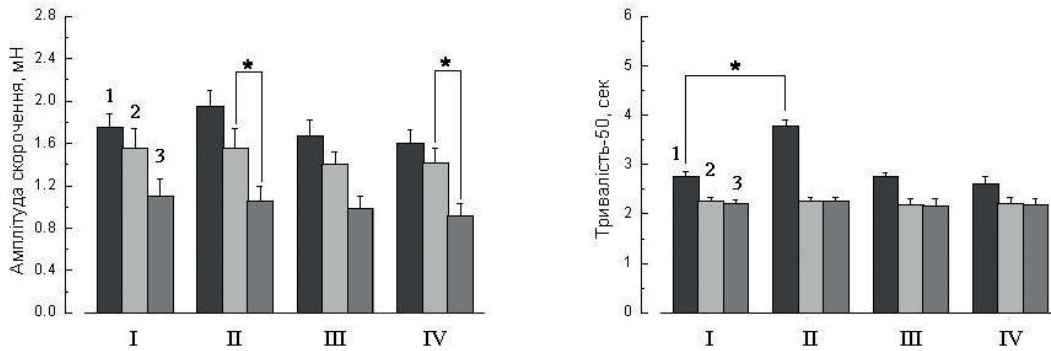


Рис. 3. Вплив пептидоглікану на компоненти скорочень гладеньких м'язів детрузора (ГДМ) сечового міхура контрольних щурів і щурів з діабетом. Порівняння амплітуд (а) і тривалостей на рівні 0,25 амплітуди (б) скорочення смужок ГДМ в контролі (1), після додавання атропіну (2) та суміші атропіну і індометацину (3); I – ГДМ контрольних тварин; II – ГДМ контрольних тварини, підданих дії пептидоглікану; III – ГДМ тварини з діабетом; IV – ГДМ тварин з діабетом, підданих дії пептидоглікану; наведені середні значення \pm с.п.с., $n=5-7$ для кожного випадку; * $P<0,017$

нейронів і є чутливим до низки екзогенних фізико-хімічних подразнювальних факторів (низькі температури, кулінарні спеції) та ендогенних сполук, що утворюються при запальних процесах (брадикінін, H_2S , реактивні форми кисню) [20, 21]. Більше того, агоністи TRPA1 здатні посилювати експресію циклооксигенази-2 [22].

У відповідності з таким механізмом дії наші експерименти показали, що введення циклофосфаміду як контрольним, так і щурам з діабетом збільшує внесок прозапального індометацинчутливого компонента синаптично викликаних скорочень смужок ГДМ. Зростання індометацинчутливого компонента, хоч і не таке значне, як у випадку з циклофосфамідом, спостерігалось нами і після виклику системної імуноопосередкованої запальної реакції у відповідь на введення пептидоглікану. Однак ні у разі з циклофосфамідом, ні з пептидогліканом збільшення простагландинзалежного компонента скорочень не супроводжувалося суттєвою модифікацією їх холінергічного компонента, вказуючи на те, що нейрогенне запалення переважно зачіпає аферентну гілку в регуляції скорочень, але тільки незначно впливає на вивільнення, стабільність та/або дію еферентних медіаторів, зокрема ацетилхоліну.

Таким чином, наші результати свідчать, що ускладнення діабету у вигляді циститу

саме по собі не є причиною істотних змін холінергічної нервово-м'язової передачі, які спостерігаються в сечовому міхурі тварин з діабетом з ознаками супутнього циститу, і спонукають до подальших пошуків механізмів цих змін.

Робота виконана за підтримки Національної академії наук України і Державного фонду фундаментальних досліджень грант F46.2/001.

**І.В. Владімірова^{1,3}, І.Б. Філіппов^{1,3},
А.Н. Падурару^{2,3}, Є.Я. Шуба^{1,3}, Е.М. Кулієва^{1,3},
Я.М. Шуба^{1,2,3}**

ВЛИЯНИЕ ОСЛОЖНЕНИЙ ДИАБЕТА НА НЕРВНО-МЫШЕЧНУЮ ПЕРЕДАЧУ В ГЛАДКИХ МЫШЦАХ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРЫС

В данной работе было проверено предположение, что осложнения диабета – цистит или стафилококковая инфекция являются синергическими с диабетом факторами, приводящими к усилению нарушенной нервно-мышечной передачи в гладких мышцах детрузора (ГДМ) мочевого пузыря. У нормальных крыс и крыс с стрептозотоцининдіцированным сахарным диабетом интерстициальный цистит моделировали путем однократного интраперитонеального введения циклофосфамида (200 мг/кг), а системное воспаление – пептидогліканом *Staphylococcus aureus* (300мкг/кг). Циклофосфамидиндуцированный цистит независимо от наличия или отсутствия диабета приводил к незначительному увеличению атропинчувствительного холінергіческого компонента сокращений полосок ГДМ, активированных электрической стимуля-

цией, и к усилению в них индометацинчувствительного провоспалительного компонента, связанного с активацией циклооксигеназы 1/2 и высвобождением простагландинов. Использование пептидогликана также увеличивало вклад как атропин- и индометацинчувствительного компонентов в сокращения, вызванных электрической стимуляцией, которые, однако, были менее выраженными, чем при циклофосфамидиндуцированном цистите. В общем, изменения синаптически вызванных сокращений при моделировании цистита и системного воспаления оказались намного меньше по сравнению с ГМД мочевого пузыря животных с диабетом и признаками сопутствующего цистита. Наши результаты указывают на необходимость поиска дополнительных факторов и механизмов, кроме цистита, приводящих к этим изменениям.
Ключевые слова: сахарный диабет; цистит; мочевой пузырь; гладкие мышцы; сокращение; нервно-мышечная передача.

REFERENCES

1. Andrade EL, Ferreira J, André E, Calixto B. Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder. *Biochem Pharmacol.* 2006 Jun 28;72(1):104-14.
2. Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med.* 1999 27(8):1608-16.
3. Vladimirova IA, Philypov IB, Paduraru ON, Shuba Éla, Kuliieva ÉM, Shuba IaM. Changes of neuromuscular transmission in smooth muscles of rats bladder with experimental diabetes. *Fiziol Zh.* 2014;60(2):31-7.
4. Andersson KE, Yoshida M. Antimuscarinics and the overactive detrusor-which is the main mechanism of action? *Eur Urol.* 2003 Jan;43(1):1-5.
5. de Groat WC, Yoshimura N. Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001 (41): 691-721.
6. Hegde SS, Eglén RM. Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci.* 1999 64 (6-7): 419-28.
7. Latifpour J, Gousse A, Kondo S, Morita T, Weiss RM. Effects of experimental diabetes on biochemical and functional characteristics of bladder muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989 248(1): 81-88.
8. Liu G1, Daneshgari F. Alterations in neurogenically mediated contractile responses of urinary bladder in rats with diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jun;288(6):F1220-6.
9. Luheshi GN, Zar MA. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cholinergic motor transmission in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 1991 Jul;103(3):1657-62.
10. Mumtaz FH, Lau D.H, Siddiqui EJ, Morgan RJ, Thompson CS, Mikhailidis D.P. Changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in the diabetic rabbit bladder. *In Vivo.* 2006 20 (1): 1-4.
11. Morrow TJ. Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model. *Curr Protoc Neurosci.* 2004 Nov; Chapter 9:Unit 9.18.
12. Firouz Daneshgari, Guiming Liu and Peter B. Imrey. Time Dependent Changes in Diabetic Cystopathy in Rats Include Compensated and Decompensated Bladder Function. *J. Urol.* 2006, July 176: 380-86.
13. Juszczak K, Gil K, Wyczolkowski M, Thor PJ. Functional, histological structure and mastocytes alterations in rat urinary bladders following acute and [corrected] chronic cyclophosphamide treatment. *J Physiol Pharmacol.* 2010 Aug;61(4):477-82.
14. Filippov I. B., Shuba M. F., T. L. Davydovskaya, L. S. Kholodnaya, Pozur B.B. Effects of active substances from *Staphylococcus aureus* (protein A and peptidoglycan) on neurotransmitter-induced contractions of smooth muscles. *Neurophysiology.* 1996; January - November 28(4): 23239.
15. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Jul;18(3):521-40.
16. Korkmaz A, Topal T, Oter S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol. Toxicol.* 2007 23(5):303-12.
17. McDonald C1, Inohara N, Nuñez G. Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J Biol Chem.* 2005 May 27;280(21):20177-80.
18. Kusunoki T, Hailman E, Juan TS, Lichenstein HS, Wright SD. Molecules from *Staphylococcus aureus* that bind CD14 and stimulate innate immune responses. *J Exp Med.* 1995 182(6):1673-82.
19. Geppetti P, Nassini R, Materazzi S, Benemei S. The concept of neurogenic inflammation. *BJU Int.* 2008 Mar;101 Suppl 3:2-6.
20. Skryma R, Prevarskaya N, Gkika D, Shuba Y. From urgency to frequency: facts and controversies of TRPs in the lower urinary tract. *Nat Rev Urol.* 2011 8(11): 617-30.
21. Lapointe TK, Altier C. The role of TRPA1 in visceral inflammation and pain. *Channels (Austin).* 2011 5 (6): 525-29.
22. Moilanen LJ, Laavola M, Kukkonen M, Korhonen R, Leppänen T, Högestätt ED, Zygmunt PM, Nieminen RM, Moilanen E. TRPA1 contributes to the acute inflammatory response and mediates carrageenan-induced paw edema in the mouse. *Sci Rep.* 2012 2: 380.

Матеріал надійшов
до редакції 19.08.2013

Вплив супернатанта прогеніторних нейроклітин на цитотоксичну функцію лімфоцитів у щурів з гліомою

Л.Д. Любич, М.І. Лісяний

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»;
E-mail: lyubichld@gmail.com

Вивчали дію супернатанта прогеніторних нейроклітин (СНК) на цитотоксичну функцію лімфоцитів у щурів за умов фізіологічної норми та експериментально змодельованого пухлинного процесу (гліома головного мозку, штамп 101.8). Дослідження проведені у тварин з первитою пухлиною без введення СНК, а також з різними режимами його введення (трикратно з 5-ї по 10-ту добу після перевивання гліоми, а також попередньо за тиждень та за місяць до перевивання). До груп порівняння ввійшли щури без гліоми, яким трикратно вводили СНК, та інтактні тварини (контроль). СНК отримували з суспензії нейрогенних прогеніторних клітин (НПК) мозку щура на 14-ту добу гестації та вводили внутрішньоочеревинно (0,12 мг білка на тварину). Цитотоксичну функцію лімфоцитів щурів експериментальних груп вивчали за допомогою МТТ-колориметричного тесту з аlogenними клітинами гліоми. Введення СНК підвищувало цитотоксичну активність лімфоцитів in vitro стосовно аlogenних пухлинних клітин як у інтактних тварин (на 37–38%), так і у щурів з гліомою (на 11–22%). За умов впливу СНК збільшувалася середня тривалість життя і медіана виживаності тварин-носіїв пухлини (у середньому на 3–4 доби). Режими введення СНК трикратно з 5-ї по 10-ту добу після перевивання гліоми та за тиждень до перевивання були найбільш ефективними. Таким чином, встановлено опосередкований пухлинопригнічувальний ефект при внутрішньоочеревинному введенні СНК щурам з гліомою, що, очевидно, зумовлено підвищенням ефективності цитотоксичної функції імункомпетентних клітин тварин з первитою пухлиною під впливом продукованих НПК факторів.

Ключові слова: цитотоксична функція лімфоцитів; гліома 101.8; супернатант прогеніторних нейроклітин.

ВСТУП

Важливою проблемою імунології злоякісних пухлин і, зокрема, гліом головного мозку є визначення механізмів їх «вислизання» з-під нагляду імунної системи та її пригнічення. Відомо, що при гліомах – найбільш загальних первинних пухлинах мозку, які характеризуються інфільтративним ростом, резистентністю до лікування і мають несприятливий прогноз для життя пацієнтів, виявляються зміни у всіх ланках імунітету [1]. Гліома формує імуносупресивне оточення секрецією різних молекул (простагландину E2, інтерлейкіну-10 – IL-10, трансформую-

чого ростового фактора β – TGF- β , гангліозидів) для послаблення імунної відповіді [2]. Поряд зі зниженням кількості та функції імункомпетентних клітин (відносна та абсолютна лімфопенія, знижений вміст лімфоцитів CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, HLA-DR⁺-клітин, гальмування проліферативної здатності лімфоцитів, зниження секреції ефекторних цитокінів), підвищується кількість Т-регуляторних клітин CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, що продукують імуноінгібувальні медіатори [3]. При гліомах, особливо злоякісних, відбувається часткова або повна втрата клітинами пухлин експресії антигенів I та/або II класу головно-

© Л.Д.Любич, М.І.Лісяний

го комплексу гістосумісності (МНС) [4,5], зниження експресії компонентів механізму їх процесингу (транспортних молекул LMP2, TAP1 та β 2-мікроглобуліну) [6], поява неklasичних молекул HLA-G та HLA-E з імуномодулювальною дією клітинами гліобластом і мікроглією/макрофагами, які інфільтрують пухлину [7,8], що сприяє уникненню гліомами контролю з боку імунної системи.

Актуальним підходом у лікуванні гліом мозку є використання нейрогенних стовбурових і прогеніторних клітин (НСК, НПК відповідно), а також їх компонентів і продуктів, що демонструють протипухлинні властивості [9–11]. Це пов'язано зі здатністю НСК до міграції та вбудовування у місця патології в ЦНС [10,12,13]. У зв'язку з цим їх розглядають як вектори для генно-клітинної терапії пухлин мозку [10–12]. Одним із можливих механізмів реалізації протипухлинних властивостей НСК є індукція ефективної імунної відповіді проти внутрішньомозкових пухлин, у якій провідне місце належить $CD8^+T^-$, $CD4^+T^-$ і НК-клітинам.

Недостатньо вивчено питання щодо імуномодулювального потенціалу НСК/НПК, особливо їх гуморальних чинників. Оскільки існують перспективи використання НСК/НПК для терапії злоякісних пухлин мозку, дослідження у цьому напрямку є актуальними.

Метою нашої роботи було визначення впливу супернатанта прогеніторних нейроклітин (СНК) на цитотоксичну функцію лімфоцитів у щурів за умов фізіологічної норми та експериментально змодельованого пухлинного процесу (гліома головного мозку, штам 101.8).

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на білих щурах-самцях масою 120 ± 10 г (віварій ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»). Усі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриман-

ням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою», з урахуванням принципів біоетики та норм біологічної безпеки та були погоджені Комітетом з біоетики ДУ «ІНХ НАМН».

Тварини були введені в експеримент одномоментно та розподілені на 6 груп по 12 тварин у кожній. До першої групи ввійшли щури з перевитою гліомою без введення СНК; до другої - з трикратним введенням СНК з 5-ї по 10-ту добу після перевивання пухлини; до третьої і четвертої - щури, яким трикратно вводили СНК попередньо за тиждень і за місяць відповідно до перевивання гліоми; до п'ятої – тварини без пухлини, яким трикратно вводили СНК; до шостої - інтактні щури (контроль).

Модель гліоми відтворювали внутрішньомозковим введенням 0,02 мл ($3,5 \cdot 10^5$) суспензії клітин гліоми штаму 101.8 (Всеросійська колекція клітинних культур, Інститут морфології людини РАН, Москва) у ліву півкулю мозку щура на глибину 1,5–2,0 мм. Цей штам являє собою анапластичну гліому, в якій одночасної малігнізації зазнали астроцитарна глія, олігодендроглія та епендима, і за своїми гістобіологічними властивостями наближається до злоякісних гліом людини [14].

СНК отримували при культивуванні нейрогенних клітин мозку щура, вилучених на 14-ту добу гестації. Нативну тканину мозку щура, звільняли від оболонок у фізіологічному розчині, переносили в середовище DMEM («Sigma», Німеччина) і суспендували багаторазовим піпетуванням. Клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відмивали у середовищі DMEM, до осаду клітин додавали свіже середовище та ресуспендували. Життєздатність клітин у суспензії визначали у стандартному цитотоксичному тесті з 0,2%-м трипановим синім («Merch», Німеччина). Концентрацію клітин доводили до $6,0 \cdot 10^6$ /мл, до отриманої

клітинної суспензії додавали конканавалін А (0,10 мг/мл) та інкубували 2 год в CO₂-інкубаторі при 37,0±0,5°C, постійній вологості 95% та 5% CO₂. Після цього клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відмивали у середовищі DMEM, до осаду клітин додавали свіже середовище, ресуспендували та інкубували протягом 24 год. Потім їх повторно осаджували центрифугуванням упродовж 5 хв при 1500 хв⁻¹, відбирали супернатант, визначали у ньому концентрацію білка за методом Лоурі, стандартизували до концентрації 1,0 мг/мл, аліквотизували і зберігали при -20±0,5°C. СНК експериментальним тваринам вводили внутрішньоочеревинно, сумарна доза становила 0,12 мг на тварину (за концентрацією білка).

Джерелом імунокомпетентних клітин (зрілих лімфоцитів) була селезінка тварин, яких досліджували на 17-ту добу від перевищення пухлини (на піку клінічних проявів). Інтактних тварин, яким трикратно вводили СНК, досліджували, відповідно, через тиждень після останньої ін'єкції. Тварин наркотизували, видаляли селезінки, готували суспензію спленоцитів механічною гомогенізацією у середовищі RPMI та фільтрували через капроновий фільтр. Лімфоцити отримували центрифугуванням суспензії спленоцитів у градієнті фіколу-верографіну (d=1,077) при 1500 об/хв протягом 30 хв, двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином з рН 7,2–7,4. Кількість і життєздатність отриманих клітин визначали у цитотоксичному тесті з 0,2%-м розчином трипанового синього ("Merck", Німеччина).

Отримані лімфоцити досліджували у цитотоксичному тесті з 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромідом (МТТ-тест), який проводили за протоколом [15]. Лімфоцити тварин експериментальних груп використовували як клітини-ефектори (5·10⁷/мл); клітини гліоми 101.8 (1·10⁷/мл) - як клітини-мішені. Оптимальне співвідношення ефектор-мішень було виявлено у попередніх

експериментах і становило 5:1. Тест проводили у триплетах. Цитотоксичну активність лімфоцитів виражали цитотоксичним індексом (ЦІ) у відсотках:

$$\text{ЦІ} = 100 - \left(\frac{\text{ОГ}_{e+m} - \text{ОГ}_e}{\text{ОГ}_m} \cdot 100 \right) \%,$$

де ОГ – оптична густина: ОГ_{e+m} – в лунках з ефекторами і мішенями; ОГ_e – в лунках з ефекторами; ОГ_m – в лунках з мішенями.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакету програм Statistica 6.0. Застосовували параметричні та непараметричні методи варіаційної статистики. Нормальність розподілу результатів визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності при P<0,05, статистично високозначущими – при P<0,01.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Порівняння цитотоксичної активності тварин дослідних груп за допомогою тесту ANOVA Краскела-Уолліса виявило статистично високозначущі відмінності між ними (P=0,0009). Попарне порівняння показників груп за допомогою U-критерію Манна-Уїтні дало змогу виявити наступні особливості. Цитотоксична активність лімфоцитів інтактних щурів (шоста група, контроль) у МТТ-тесті з клітинами гліоми (у алогенній системі) становила 33,23±1,13 %. Внутрішньоочеревинне введення СНК здоровим тваринам без гліоми (п'ята група) підвищувало ЦІ імунокомпетентних клітин до статистично значущого рівня (U-критерій, P=0,016; рис.1); в середньому цитотоксична активність лімфоцитів збільшувалася на 37-38 %.

У щурів з перевитою гліомою (перша група) показник цитотоксичності лімфоцитів становив 63,07±11,05 %, перевищуючи такий у інтактних тварин (U-критерій, P=0,003; див. рис.1). У тварин другої групи цитотоксична активність імунокомпетентних клітин зростала, порівняно з показником тварин першої

групи, але не до статистично значущого рівня (U-критерій, $P=0,24$; див. рис.1); в середньому вона підвищувалася на 11–12 %.

Цікавим виявилось збільшення ЦІ у тесті з клітинами пухлини імунокомпетентних клітин щурів третьої групи (статистично значуще, порівняно з аналогічним показником тварин першої групи, U-критерій, $P=0,009$; див. рис.1); в середньому цитотоксична активність лімфоцитів підвищувалася на 21–22 %. На відміну від показників тварин третьої групи, ЦІ імунокомпетентних клітин щурів четвертої групи виявився нижчим, ніж у інших дослідних групах (U-критерій, $P=0,02–0,09$; див. рис.1).

Ефективність режимів введення СНК тваринам з гліомою визначали за допомогою аналізу виживаності. Застосування методу множинних оцінок Каплана-Майєра з використанням критерію Вілкоксона-Гехана виявило, що показники виживаності тварин з гліомою та різними режимами введення СНК мали статистично високочислу від-

мінності (критерій χ^2 , $P=0,00043$). Попарне порівняння показників груп за допомогою двовибіркового критерія Вілкоксона-Гехана дало змогу виявити такі особливості.

У щурів другої групи статистично високочислу збільшувалася середня тривалість життя (СТЖ) і медіана виживаності порівняно з тваринами першої групи (таблиця, рис. 2). У щурів третьої та четвертої груп також рис.2). При цьому максимальна тривалість життя тварин першої групи становила 22 доби, другої групи – 40, третьої – 32, четвертої – 25 діб (рис.2). Отже, найбільш значуще на виживаність щурів з гліомою впливали режими введення СНК трикратно з 5-ї по 10-ту добу після перевивання пухлини та за тиждень до її перевивання. Вказані режими виявились ефективними у підвищенні здатності імунокомпетентних клітин тварин-носіїв пухлини чинити цитотоксичну дію на алогенні клітини гліоми у тесті *in vitro*.

Як наведено вище, у щурів-носіїв гліоми цитотоксична функція лімфоцитів не

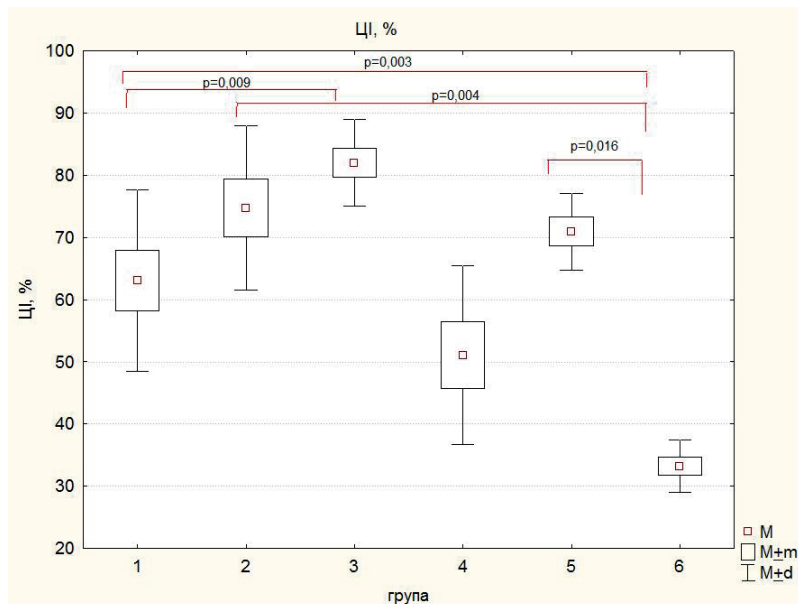


Рис. 1. Цитотоксична активність лімфоцитів тварин дослідних груп відносно клітин гліоми 101.8 *in vitro* (МТТ-тест, цитотоксичний індекс – ЦІ): 1 – щури з перевитою гліомою без введення супернатанта нейроклітин (СНК); 2 – введення СНК з 5-ї по 10-ту добу після перевивання гліоми; 3 і 4 – введення СНК за тиждень і місяць відповідно до перевивання гліоми; 5 – введення СНК щурам без гліоми; 6 – контроль. М – середнє значення; m – стандартна похибка середнього значення; d – стандартне відхилення від середнього значення.

Середня тривалість життя (СТЖ) та медіани виживаності тварин дослідних груп з гліомою штаму 101.8

Схема досліджу	СТЖ, доби ($M \pm m$)	50' процентиль (медіана), доби	25' процентиль (нижній квар- тиль), доби	75' процентиль (верхній квар- тиль), доби	P (критерій Вілкоксона-Ге- хана)
Гліома	14,6 ± 2,8	14,0	12,0	17,3	-
Гліома та наступне трикрат- не введення супернатанта прогеніторних нейроклітин (СНК)	18,9 ± 3,7	18,0	15,0	18,7	0,00023
Гліома з попереднім за ти- ждень до перевивання пух- лини трикратним введенням СНК	18,4 ± 3,1	18,0	15,0	20,7	0,01443
Гліома з попереднім за місяць до перевивання пухлини три- кратним введенням СНК	17,7 ± 2,2	17,0	15,0	20,5	0,00429

Примітка: M – середнє значення; m – стандартне відхилення від середнього значення.

є зниженою, навпаки, ЦІ був вищим, ніж у інтактних щурів. Але оскільки тварини-пухлиносії загинули до 23-ї доби, очевидно, що протипухлинний імунітет у цих тварин є неефективним. Це може бути зумовлене різними механізмами, за допомогою яких гліома уникає контролю імунної системи. До них відносять створення імуносупресивного оточення секретованими гліомою імуноінгібувальними молекулами [2]; часткову або повну втрату клітинами гліоми антигенів МНС [4,5] та компонентів механізму їх процесингу [6], появу експресії неklasичних молекул комплексу гістосумісності клітинами гліобластом і мікроглією/макрофагами, що інфільтрують пухлину [7,8].

Слід вказати, що застосована нами модифікація МТТ-тесту дає можливість визначити сумарну цитотоксичну активність ефекторних імунокомпетентних клітин – як цитотоксичних лімфоцитів, так і природних кілерів. Імовірно, за умов впливу СНК у ефекторних клітинах імунної системи запускаються сигнальні каскади, які призводять до підвищення експресії антигенів МНС I класу та компонентів механізму їх процесингу, що сприяє кращому розпізнаванню алогенних

пухлинних клітин і, відповідно, призводить до підвищення цитотоксичної активності імунокомпетентних клітин. Оскільки зазначені клітини імунної системи (цитотоксичні лімфоцити та природні кілери) відіграють провідну роль у забезпеченні протипухлинного імунітету, можна припустити, що внутрішньоочеревинне введення СНК щура індукує більш ефективну імунну відповідь проти клітин гліоми, забезпечуючи реалізацію протипухлинних властивостей НПК, і даючи змогу подовжити тривалість життя тварин-пухлиносіїв.

Слід зазначити, що такий ефект СНК має певні обмеження у тривалості. Його введення за місяць до перевивання пухлини подовжувало тривалість життя тварин на 3 доби, за тиждень – на 4 доби (максимальна тривалість життя 25 і 32 доби відповідно). Введення СНК з 5-ї по 10-ту добу після перевивання гліоми подовжувало тривалість життя тварин на 4,2 доби (максимальна тривалість життя – 40 діб). Оскільки цитотоксична активність лімфоцитів селезінки на 17-ту добу після перевивання пухлини у тварин, яким вводили СНК за тиждень до її індукції та з 5-ї по 10-ту добу після цього, була вірогідно підвищеною,

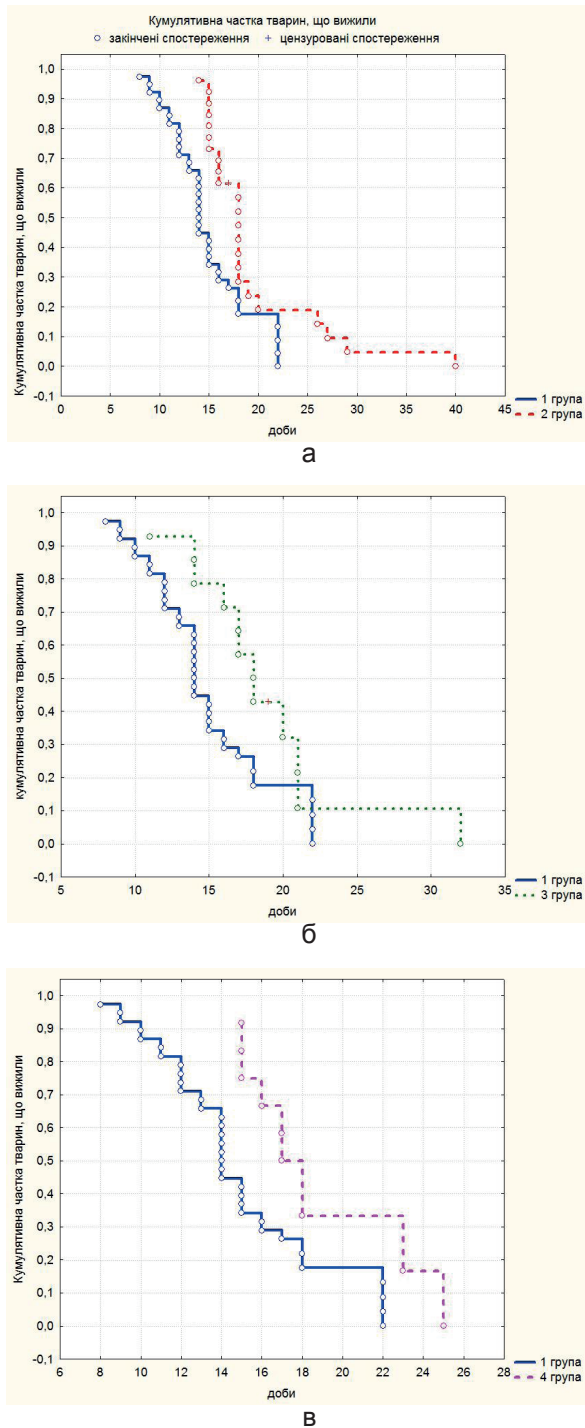


Рис.2. Криві виживаності тварин дослідних груп з гліомою: 1 – щури з перевитою гліомою без введення супернатанта нейроклітин (СНК); 2 – введення СНК з 5-ї по 10-ту добу після перевивання гліоми; 3 і 4 – введення СНК за тиждень і за місяць відповідно до перевивання гліоми

на відміну від тварин, яким вводили СНК за місяць до моделювання пухлинного процесу, можна припустити, що максимальний активуючий ефект СНК на імунокомпетентні клітини селезінки триває протягом 7–20 діб.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників. Відомо, що НПК можуть мігрувати до гліобластом та індукувати загибель клітин пухлини у мишей та щурів [11]; пролонгувати виживання тварин або майже повністю інгібувати ріст гліоми [13]. Мультипотентні НПК людини, щура і миші експресують і продукують досить широкий набір цитокінів [16–18]. Генетична модифікація НСК терапевтичними цитокінами посилювала протипухлинний ефект і подовжувала термін виживання тварин-пухлиноносіїв. Зокрема, НСК з трансфікованим геном IL-12, а також НПК, генетично сконструйовані до продукції IL-23, мали виражений протипухлинний ефект: збільшували термін виживання тварин-носіїв внутрішньомозкової та дисемінованої гліоми, порівняно з несекретуючими НСК, а також активно індукували протипухлинний імунітет [19–21].

У наших дослідженнях показано опосередковану пухлинопригнічувальну дію при внутрішньоочеревинному введенні супернатанта НПК, що, очевидно, зумовлено підвищенням ефективності цитотоксичної функції імунокомпетентних клітин тварин з індукованою гліомою під впливом продуктованих НПК факторів (цитокінів). Відомо, що НПК щура можуть експресувати та продукувати як прозапальні, так і супресорні цитокіни (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, фактор некрозу пухлин- α (TNF- α) [17,18], лейкеміє-інгібувальний фактор [16]). За нашими даними, СНК містив дві основні переважаючі фракції білків: 67 кДа – 55%; 46 кДа – 44% (результат електрофорезу у 1,5% ПААГ); до складу мінорної фракції білків (~1%), за даними імуноферментного аналізу, входили мозковий нейротрофічний фактор – BDNF (115 пг/мл), TGF- β 1 (12 пг/мл), а також IL-1 β та IL-4 у дуже низьких кількостях

(неопубліковані дані). Оскільки цей перелік включає цитокіни з різноспрямованою дією, можна припустити, що саме відповідний баланс вказаних біологічно активних речовин у складі СНК сприяє подовженню терміну виживаності тварин із гліомою. Зокрема, за посилення протипухлинної цитотоксичності лімфоцитів може відповідати ІЛ-1 β (активує проліферацію лімфоцитів). Крім того, не можна виключати також безпосередній проапоптотичний вплив на клітини пухлини TGF- β 1. Ще однією молекулою, що спричиняє ефект СНК, може бути канцеростатичний фактор неонатального мозку (neonatal brain-derived carcinostatic factor – NBCF), описаний у 90-х роках [22], молекулярна маса якого (62 кДа) наближається до однієї з переважаючих фракцій білків СНК (67 кДа). Відомо, що NBCF інгібував ріст і синтез ДНК в злоякісних клітинах [22]. Механізм стимуляції цитотоксичної активності імункомпетентних клітин за умов впливу СНК потребує подальших досліджень.

Таким чином, внутрішньоочеревинне введення СНК підвищувало цитотоксичну функцію імункомпетентних клітин у щурів з гліомою та збільшувало їх середню тривалість життя і медіану виживаності порівняно з тваринами-пухлиноносцями без введення СНК. Режими введення СНК трикратно з 5-ї по 10-ту добу після перевивання пухлини та за тиждень до її перевивання були найбільш ефективними.

Л.Д. Любич, Н.І. Лісяний

ВЛИЯНИЕ СУПЕРНАТАНТА ПРОГЕНИТОРНЫХ НЕЙРОКЛЕТОК НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ У КРЫС С ГЛИОМОЙ

Изучали действие супернатанта прогениторных нейроклеток (СНК) на цитотоксическую функцию лимфоцитов у крыс в условиях физиологической нормы и экспериментально смоделированного опухолевого процесса (глиома головного мозга, штамм 101.8). Исследования проведены у животных с перевитой глиомой без введения СНК и различными режимами его введения (трикратно с 5-х по 10-е сутки после перевивки глиомы, а также предварительно

за неделю и за месяц до перевивки). В группы сравнения вошли крысы без глиомы, которым трикратно вводили СНК, и интактные животные (контроль). СНК получали из суспензии нейрогенных прогениторных клеток (НПК) мозга крысы на 14-е сутки гестации и вводили внутривентриально (0,12 мг белка на животное). Цитотоксическую функцию лимфоцитов крыс экспериментальных групп изучали с помощью МТТ-колориметрического теста с аллогенными клетками глиомы. Введение СНК повышало цитотоксическую активность лимфоцитов *in vitro* по отношению к аллогенным опухолевым клеткам как у интактных животных (на 37–38%), так и у крыс с глиомой (на 11–22%). Под влиянием СНК увеличивалась средняя продолжительность жизни и медиана выживаемости животных-носителей опухоли (в среднем на 3–4 дня). Режимы введения СНК трикратно с 5-х по 10-е сут после перевивки глиомы и за неделю до перевивки были наиболее эффективны. Таким образом, установлен опосредованный опухолеингибирующий эффект при внутривентриальном введении СНК крысам с глиомой, что, очевидно, обусловлено повышением эффективности цитотоксической функции иммунокомпетентных клеток животных с перевитой опухолью под влиянием продуцированных НПК факторов.

Ключевые слова: цитотоксическая функция лимфоцитов; глиома 101.8; супернатант прогениторных нейроклеток.

ГУ «Институт нейрохирургии им.акад.А.П.Ромоданова НАМН Украины»

L.D. Liubich, N.I. Lisyany

THE INFLUENCE OF PROGENITOR NEUROCELLS SUPERNATANT ON THE LYMPHOCYTES CYTOTOXIC FUNCTION IN RATS WITH GLIOMA

The impact of rat neurogenic progenitor cells supernatant (RPNS) on the cytotoxic function of lymphocytes in rats under conditions of physiological norm and experimentally modeled tumor (brain glioma strain 101.8) was studied. The research was carried out in animals with inoculated tumor without RPNS injection and with different regimes of RPNS injection (thrice repeated from 5th to 10th day after glioma inoculation as well as 1 week and 1 month before tumor inoculation). Comparison groups included rats without glioma who triple injected with RPNS; and intact animals (control). RPNS was received from suspension of neurogenic progenitor cells (NPC) of rat brain on 14th day of gestation and injected intraperitoneally (0,12 mg per animal). Cytotoxic function of lymphocytes of experimental rats was evaluated in MTT-colorimetric test with allogeneic glioma cells. RPNS administration increased the cytotoxic activity of lymphocytes *in vitro* tests with allogeneic tumor cells in intact animals (to 37-38%) as well as in rats with glioma (to 11-22%). Under the RPNS influence the life expectancy and median survival of tumor-bearing animals increased (an average of 3-4 days). RPNS input modes such

as triple injection from 5th to 10th day after glioma inoculation and 1 week before inoculation were the most effective. Thus, indirect tumor-inhibiting effect under intraperitoneal RPNS administration in rats with glioma is demonstrated, which is obviously due to increased efficiency of cytotoxic function of immune cells of animals with inoculated tumor under the influence of the factors produced by NPC.

Key words: lymphocytes cytotoxic function; glioma 101.8; progenitor neurocells supernatant.

SI «A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery NAMS of Ukraine», Kyiv

REFERENCES

- Lisyany NI. Immunology and immunotherapy of malignant brain gliomas. Kiev: Interservice; 2011. [Russian].
- Ghosh A, Bhattacharya M, Sarkar P, Acharya S, Chaudhury S. T11 target structure exerts effector function by activating immune cells in CNS against glioma where cytokine modulation provide favorable microenvironment. *Indian J Exp Biol.* 2010; 48(9): 879-88.
- Learn CA, Fecci PE, Schmittling RJ, Xie W, Karikari I, Mitchell DA, Archer GE, Wei Z, Dressman H, Sampson JH. Profiling of CD4+, CD8+, and CD4+CD25+CD45RO+FoxP3+ T cells in patients with malignant glioma reveals differential expression of the immunologic transcriptome compared with T cells from healthy volunteers. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(24): 7306-15.
- Huang H, Hara A, Homma T, Yonekawa Y, Ohgaki H. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005; 64 (10): 891-901.
- Nano R, Capelli E, Facoetti A, Benericetti E. Immunobiological and experimental aspects of malignant astrocytoma. *Anticancer Res.* 2009; 29: 2461-6.
- Mehling M, Simon P, Mittelbronn M, Meyermann R, Ferrone S, Weller M, Wiendl H. WHO grade associated downregulation of MHC class I antigen-processing machinery components in human astrocytomas: does it reflect a potential immune escape mechanism? *Acta Neuropathol.* 2007; 114 (2): 111-9.
- Kren L, Muckova K, Lzicarova E, Sova M, Vybihal V, Svoboda T. Production of immune-modulatory nonclassical molecules HLA-G and HLA-E by tumor infiltrating ameboid microglia/macrophages in glioblastomas: a role in innate immunity? *J Neuroimmunol.* 2010; 220 (1-2): 131-5.
- Kren L, Slaby O, Muckova K, Lzicarova E, Sova M, Vybihal V, Svoboda T, Fadrus P, Lakomy R, Vanhara P. Expression of immune-modulatory molecules HLA-G and HLA-E by tumor cells in glioblastomas: an unexpected prognostic significance. *Neuropathology.* 2011; (2): 129-34.
- Achanta P, Sedora Roman NI, Quiñones-Hinojosa A. Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010; 10 (2): 121-30.
- Bovenberg MS, Degeling MH, Tannous BA. Advances in stem cell therapy against gliomas. *Trends Mol Med.* 2013; 19 (5): 281-91.
- Kim SU. Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors. *Stem Cell Rev.* 2011; 7(1): 130-40.
- Ahmed AU, Ulasov IV, Mercer RW, Lesniak MS. Maintaining and loading neural stem cells for delivery of oncolytic adenovirus to brain tumors. *Methods Mol Biol.* 2012; 797: 97-109.
- Stafin K, Lindvall M, Zuchner T, Lundberg C. Instructive cross-talk between neural progenitor cells and gliomas. *J Neurosci Res.* 2007; 85(10): 2147-59.
- Halanskij AS, Kondakova LI, Avcyn AP. New transplantable rat brain gliomas. *Voprosy neyrohirurgii.* 1995; (2): 23-5. [Russian].
- Liubich LD, Lisyany NI, inventor; SI "Institute of neurosurgery n.acad.A.Romodanov NAMS of Ukraine", assignee. Method of study of allocytotoxic activity of immune cells. Ukraine patent UA 75059. 2012 Nov 11. [Ukrainian].
- Chen HC, Ma HI, Sytwu HK, Wang HW, Chen CC, Liu SC, Chen CH, Chen HK, Wang CH. Neural stem cells secrete factors that promote auditory cell proliferation via a leukemia inhibitory factor signaling pathway. *J Neurosci Res.* 2010; 88(15): 3308-18.
- Klassen HJ, Imfeld KL, Kirov II, Tai L, Gage FH, Young MJ, Berman MA. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. *Cytokine.* 2003; 22(3-4): 101-6.
- Liu J, Götherström C, Forsberg M, Samuelsson EB, Wu J, Calzarossa C, Hovatta O, Sundström E, Åkesson E. Human neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells and fetal nervous system present differences in immunogenicity and immunomodulatory potentials in vitro. *Stem Cell Res.* 2013; 10(3): 325-37.
- Ehtesham M, Kabos P, Kabosova A, Neuman T, Black KL, Yu JS. The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Res.* 2002; 62(20): 5657-63.
- Yang SY, Liu H, Zhang JN. Gene therapy of rat malignant gliomas using neural stem cells expressing IL-12. *DNA Cell Biol.* 2004; 23(6): 381-9.
- Yuan X, Hu J, Belladonna ML, Black KL, Yu JS. Interleukin-23-expressing bone-marrow-derived neural stem-like cells exhibit antitumor activity against intracranial glioma. *Cancer Res.* 2006; 66(5): 2630-8.
- Miwa N., Mizuno S., Suitani Y. Tumor growth-inhibitory glycoprotein secreted from the mouse brain at terminal stage of the ontogeny: molecular homogeneity and requirement of the retained protein conformation for exhibition of the cytotoxic action. *Biochim.Biophys. Acta.* 1990; 1034(3): 309-17.

Матеріал надійшов до редакції 10.12.2014

Морфофункціональна характеристика клітин крові за хронічного впливу похідного малеїміду – інгібітора протеїнкіназ

І.В. Белінська, О.В. Линчак, С.М. Цивінська, В.К. Рибальченко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка; E-mail: byelinska@univ.kiev.ua

Досліджено вплив похідного малеїміду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон), інгібітора VEGF-R1,2,3, FGF-R1, EGF-R(h), PDK1, Src(h), Syk(h), YES, ZAP70 тощо протеїнкіназ з антинеопластичною активністю, на морфофункціональний стан клітин крові. Показано, що MI-1 в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг (які пригнічують канцерогенез товстої кишки) після хронічного впливу (20 і 26 тиж) не змінює морфофункціональний стан еритроцитів у здорових щурів. Це підтверджується відсутністю різниці у концентрації гемоглобіну в крові, кількості еритроцитів, вмісту і концентрації гемоглобіну в еритроциті, гематокриту та середнього об'єму еритроцита і кількості ретикулоцитів в крові як після 20, так і 26 тиж впливу. У зазначених дозах MI-1 не впливає на загальний вміст і склад лейкоцитів в крові (еозинофільних і нейтрофільних гранулоцитів, лімфоцитів, моноцитів) і не пригнічує тромбоцитопоез (кількість тромбоцитів залишається без змін). Відсутність негативного впливу MI-1 на гемопоєз не обмежує (з боку кровотворної системи) його застосування як сполуки з протипухлинною активністю

Ключові слова: похідне малеїміду; інгібітор протеїнкіназ; еритроцити; лейкоцити; тромбоцити.

ВСТУП

Похідне малеїміду (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон) створено *in silico* і синтезовано хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка як конкурентний інгібітор АТФ-зв'язувального сайту протеїнкіназ. MI-1 *in vitro* інгібує VEGF-R1,2,3, PDK1, FGF-R1, YES, EGF-R(h), Src (h), ZAP70, Syk(h) тощо кінази і пригнічує проліферацію ракових клітин ліній: HCT-116 і SW-620 (колоректального раку), MALME-3M й UACC (меланоми), A549/ATCC та NCI-H226 (недрібноклітинного раку легень) тощо [1]. У дослідженнях *in vivo* доведено, що MI-1 зменшує кількість пухлин та площу ураження товстої кишки за умов 1,2-диметилгідразин(ДМГ)-індукованого колоректального раку, що свідчить про протипухлинну активність [2]. Крім того, цій сполуці притаманні антиоксидантні власти-

вості [3] і низька токсичність щодо органів шлунково-кишкового тракту і печінки [2], нирок і підшлункової залози [4].

Зазначені протеїнкінази беруть участь у передачі сигналу в клітину у відповідь на дію цитокінів, які ініціюють проліферацію і виживання та диференціювання різноманітних клітин різних тканин, в тому числі і гемопоетичних [5-7]. Введення протягом місяця здоровим щурам MI-1 в дозах, які виявляють протипухлинний ефект, істотно не змінює кількість еритроцитів у крові, але впливає на середній об'єм еритроцитів, зменшує кількість лейкоцитів внаслідок зниження вмісту еозинофільних і нейтрофільних гранулоцитів та моноцитів. Кількість тромбоцитів не зазнає змін [8]. Дослідження впливу MI-1 на клітини крові за умов ДМГ-індукованого раку товстої кишки показало, що ця сполука запобігає гемолізу еритроцитів індукованого ДМГ і канцерогенезом та повертає до норми

© І.В. Белінська, О.В. Линчак, С.М. Цивінська, В.К. Рибальченко

збільшену кількість моноцитів і тромбоцитів у крові [9]. Оскільки МІ-1 є інгібітором протеїнкіназ залучених до гемопоезу, і змінює морфофункціональний стан клітин крові після введення протягом місяця та за умов хемоіндукованого раку товстої кишки, метою нашої роботи було проаналізувати ефекти МІ-1 на клітини крові здорових щурів за умов його хронічного введення.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих щурах-самцях (нащадках лінії Вістар розводки віварію Київського національного університету імені Тараса Шевченка) з початковою масою 180–200 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Дослідження проведені відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм та вимог, згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Досліджували вплив МІ-1 на показники клітин крові щурів після 20 та 26 тиж дії. МІ-1 розчиняли у 0,1 мл соняшникової олії в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг (що відповідає концентрації сполуки у крові 10^{-6} і 10^{-4} моль/л) і вводили *per os* щоденно протягом 20 і 26 тиж. Вибрані дози пригнічували проліферацію пухлинних клітин *in vitro* на 50 та 90 % [1]. Контрольні групи щурів одержували 0,1 мл соняшникової олії та/або 0,1 мл фізіологічного розчину. За результатами статистичного аналізу показники контрольних груп не відрізнялися ($p > 0,05$). Тому їх об'єднали в дві контрольні групи (20 тиж – група I, 26 тиж – група IV) для збільшення ймовірності виявлення різниці між показниками дослідних груп порівнянно з контрольною. Виходячи з цього, щури були поділені на 6 груп.

I серія досліду (20 тиж): I – контрольна група ($n=15$), II – введення 0,027 мг/кг МІ-1

($n=6$), III – введення 2,7 мг/кг МІ-1 ($n=5$).

II серія досліду (26 тиж): IV – контрольна група ($n=16$), V – введення 0,027 мг/кг МІ-1 ($n=8$), VI – введення 2,7 мг/кг МІ-1 ($n=9$).

Кров для аналізу у щурів I – III груп під ефірним наркозом забирали з пахової вени на 21-му, у щурів IV – VI груп – на 27-му тижні. Показники крові (кількість еритроцитів, концентрація гемоглобіну в крові, гематокрит, середній об'єм еритроцита – MCV, середній вміст гемоглобіну в еритроциті – MCH, середня концентрація гемоглобіну в еритроциті – MCHC, кількість лейкоцитів і тромбоцитів) визначали загальноприйнятими методами. Диференціальний аналіз лейкограм здійснювали на мазках крові, забарвлених за Паппенгеймом, підраховуючи 200 лейкоцитів (еозинофільні і нейтрофільні гранулоцити, лімфоцити, моноцити).

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою SPSS 16,0 для Windows. За результатами тесту Шапіро-Уїлка встановлено, що показники крові щурів мають ненормальний розподіл в одній із груп порівняння, тому для оцінки різниці між їх значеннями використовували критерій Крускала-Уолліса для множинних порівнянь з подальшим застосуванням непараметричного критерію Манна-Уїтні [10]. Обчислювали медіану, 25-й і 75-й процентилі, найбільше і найменше значення у групах. Порівнювали показники груп після впливу МІ-1 з контролем (2 попарних порівнянь). Різницю вважали вірогідною при $P < 0,025$. Кількість тромбоцитів у групах має нормальний розподіл і однакові дисперсії (за тестом Levene), тому різницю оцінювали за результатами однофакторного дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) з подальшим використанням тесту Даннета. Різницю вважали вірогідною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано (рис. 1), що концентрація гемоглобіну в крові, кількість еритроцитів, вміст і концентрація гемоглобіну в еритроциті, гема-

токрит та середній об'єм еритроцита не зазнають істотних змін ($P>0,05$) після впливу МІ-1 в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг протягом 20 і 26 тиж. Не змінюється також кількість ретикулоцитів в крові (рис. 2). Тобто МІ-1 у досліджених

дозах не пригнічує еритропоез. Відомо, що PDK1-кіназа потрібна для проліферації гемопоетичних клітин і їх диференціювання у еритроїдному і міелоїдному напрямках [11], а її інгібування зменшує кількість цих клітин.

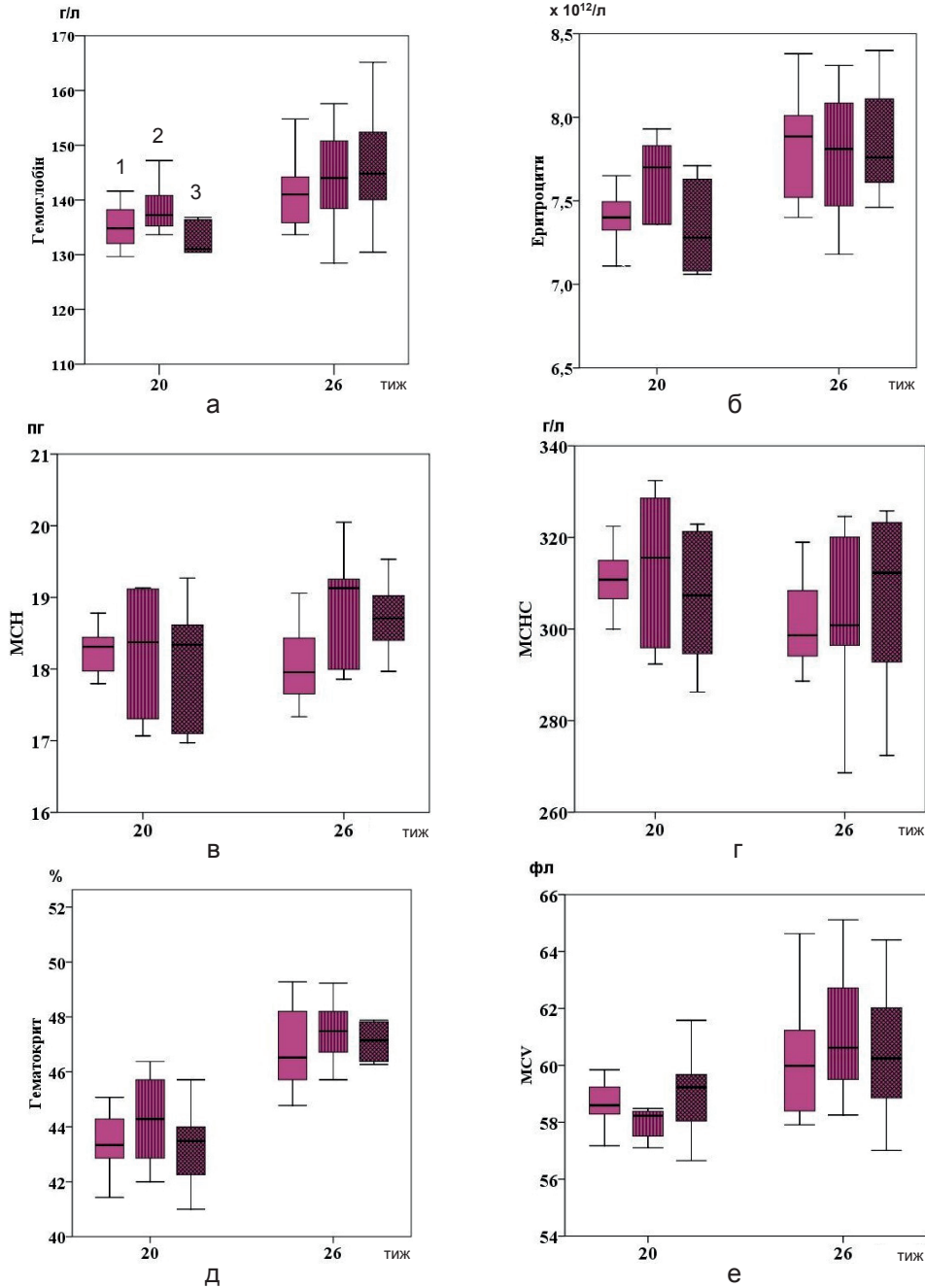


Рис. 1. Морфофункціональна характеристика еритроцитів крові щурів у нормі (1) та за умов впливу похідного малеїміду (МІ-1) в дозах 0,027 (2) і 2,7 (3) мг/кг протягом 20 та 26 тиж: а – гемоглобін, б – еритроцити, в – середній вміст гемоглобіну в еритроциті МСН; г – середня концентрація гемоглобіну в еритроциті МСНС; д – гематокрит; е – середній об'єм еритроцита МСV

У активацію PDK1-кінази залучена Src-кіназа [12]. Гіперактивація однієї із Src-кіназ Lyn призводить до експансії еритропоезу в кістковому мозку і селезінці, гемолізу еритроцитів та розвитку анемії. Зниження експресії цієї кінази пригнічує диференціювання і затримує дозрівання гемопоетичних клітин в еритроїдному напрямку наслідком чого також є виникнення анемії [13].

Введення MI-1 протягом місяця в дозах, які пригнічують проліферацію пухлинних клітин, призводить до тенденції збільшення середнього об'єму еритроцитів [8], але такі зміни не є клінічно значимими. Після хронічного впливу цієї сполуки змін кількості та морфофункціонального стану еритроцитів не виявлено, що свідчить про відсутність її впливу на еритропоез. MI-1 не викликає гемолізу еритроцитів, що підтверджується нормальною кількістю ретикулоцитів у крові та результатами біохімічних досліджень [14] – концентрація непрямого білірубину не збільшується.

MI-1 не впливає на загальний вміст і склад лейкоцитів в крові (таблиця) ($P > 0,05$ порівняно з контролем), тобто у зазначених дозах після тривалого впливу не пригнічує лейкопоез. У наших попередніх дослідженнях [8] показано, що після введення протягом місяця MI-1 грануло- і моноцитопоез пригнічуються,

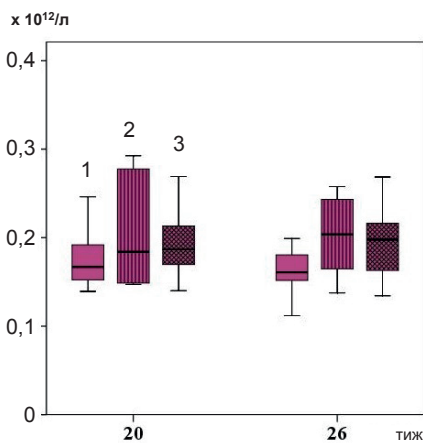


Рис. 2. Кількість ретикулоцитів у крові щурів у нормі (1) та за умов впливу похідного малеїміду (MI-1) в дозах 0,027 (2) і 2,7 (3) мг/кг протягом 20 та 26 тиж

що є свідченням негативного ефекту цієї сполуки для організму. Оскільки після хронічного впливу MI-1 таких змін немає, що підтверджується результатами досліджень після 20 та 26 тиж дії (див. таблицю), то це свідчить про „транзиторний” пригнічувальний ефект після впливу цієї речовини протягом місяця і адаптацію лейкопоезу за умов тривалої дії.

Протеїнкінази PDK1, YES, Src (h), ZAP70, Syk(h), VEGF-R1,2,3, FGF-R1 (які інгібує MI-1) задіяні у проліферації гемопоетичних стовбурових клітин і потрібні не тільки для кінцевого диференціювання у лейкоцити [5-7, 11], а й для їх функціонування [15, 16].

„Базальна” активність мієлопоезу у здорових щурів не реагує на вплив цього інгібітора у зазначених дозах (див. рис. 1, табл). Але за умови його активації (наприклад, внаслідок канцерогенезу) вищезгадані протеїнкінази є гіперактивовані [7, 15]. Ймовірно, що за цих умов і проявляється нормалізувальна антипроліферативна дія MI-1. Останнє підтверджується результатами наших досліджень за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу кишечника у щурів, при якому збільшується кількість моноцитів у крові і нормалізується після дії MI-1 [9]. Ще одним доказом антипроліферативного впливу MI-1 на неопластичні клітини моноцитарного напрямку диференціювання U937 є пригнічення мітотичної активності за допомогою переключення із проліферативного пулу G₂/M+S до пулу проліферативного спокою G₀/G₁ і активація апоптозу [17].

Результати наших досліджень збігаються з даними інших дослідницьких груп. Так, синтетичний інгібітор PDK1/АКТ кінази КР372-1 також пригнічує проліферацію клітин гострої мієлоїдної і мієло-моноцитарної лейкемії, при цьому такий ефект на CD34⁺ гемопоетичних клітинах відсутній [18]. Інгібування Syk-кінази дає обнадійливі результати для лікування гострої мієлоїдної (особливо моноцитарного напрямку диференціювання) та лімфоїдної лейкемії [19].

MI-1 не змінює кількість тромбоцитів

Загальний вміст і склад лейкоцитів (медіана, [25-й і 75-й процентилі]) у нормі та за умов впливу похідного малеїміду (MI-1)

Схема та серії дослідів	Загальна кількість лейкоцитів		Еозинофільні гранулоцити		Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити,		Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити		Лімфоцити		Моноцити	
	×10 ⁹ /л	%	×10 ⁹ /л	%	×10 ⁹ /л	%	×10 ⁹ /л	%	×10 ⁹ /л	%	×10 ⁹ /л	%
I серія (20 тиж)												
Контроль	18,90 [14,50;24,0]	3,00 [2,00;4,00]	0,52 [0,31;0,93]	1,50 [0,50;2,00]	0,22 [0,11;0,40]	18,50 [18,50;24,00]	3,84 [3,12;5,25]	66,00 [64,50;73,00]	13,99 [9,72;15,80]	6,50 [4,50;8,00]	1,03 [0,85;1,65]	
MI-1 в дозі 0,027 мг/кг	26,0 [19,30;28,35]	2,50 [1,75;6,00]	0,52 [0,35;1,72]	1,50 [0,75;2,00]	0,41 [0,16;0,55]	18,50 [14,50;34,75]	4,73 [2,90;9,0]	70,50 [51,50;71,00]	16,32 [9,71;20,06]	8,50 [6,75;10,25]	2,52 [1,29;2,65]	
2,7 мг/кг	18,30 [17,50;26,75]	3,50 [2,88;4,88]	0,70 [0,59;1,07]	1,00 [0,38;1,63]	0,18 [0,65;0,33]	16,25 [13,13;21,88]	3,22 [2,30;5,27]	73,50 [65,38;77,63]	14,04 [12,74;17,70]	6,25 [3,75;7,50]	1,13 [0,69;1,97]	
II серія (26 тиж)												
Контроль	16,70 [14,45;20,93]	3,25 [2,13;4,5]	0,70 [0,42;0,79]	1,00 [0,50;1,88]	0,20 [0,07;0,33]	18,50 [13,50;25,88]	3,44 [2,82;4,10]	71,50 [60,50;73,88]	11,11 [9,10;16,19]	7,00 [5,25;8,75]	1,23 [0,94;1,68]	
MI-1 в дозі 0,027 мг/кг	17,90 [16,18;26,10]	3,75 [3,13;4,50]	0,76 [0,62;0,94]	1,25 [0,50;2,38]	0,20 [0,11;0,44]	21,25 [17,88;26,50]	3,61 [3,37;6,41]	66,50 [62,00;71,75]	12,13 [10,76;17,34]	6,5 [6,00;6,88]	1,17 [0,99;1,59]	
2,7 мг/кг	17,20 [13,65;21,95]	3,50 [2,00;6,00]	0,70 [0,33;0,99]	1,00 [0,00;2,00]	0,24 [0,00;0,39]	23,00 [17,25;26,75]	3,18 [2,64;5,69]	63,00 [56,50;71,50]	10,93 [9,03;14,04]	8,50 [7,00;10,25]	1,50 [1,15;1,97]	

P>0,05 порівняно з контролем

у крові після хронічного впливу протягом 20 та 26 тиж, що підтверджується відсутністю різниці між значеннями дослідних і контрольної груп як за результатами тесту Манна-Уїтні, так і тесту Даннета ($P > 0.05$, рис. 3). Не було зареєстровано змін морфофункціонального стану тромбоцитів після впливу МІ-1 протягом місяця [8]. Водночас, проліферація і диференціювання тромбоцитарної ланки кровотворення [20], так само як і еритроцитарної і лейкоцитарної, залежать від активності протеїнкіназ, які інгібує МІ-1. Досліджені дози препарату не впливають на тромбоцитопоез здорових щурів, хоча нормалізують кількість тромбоцитів за умов його активації канцерогенезом [9].

Таким чином, МІ-1 в дозах 0,027 і 2,7 мг/кг (які пригнічують канцерогенез товстої кишки) після хронічного впливу (20 і 26 тиж) на здорових щурів не викликає змін морфофункціонального стану еритроцитів і кількості ретикулоцитів в крові; не впливає на загальний вміст і склад лейкоцитів в крові (еозинофільних і нейтрофільних гранулоцитів, лімфоцитів, моноцитів); не пригнічує тромбоцитопоез (кількість тромбоцитів залишається без змін).

Отже, відсутність негативного впливу МІ-1 на гемопоез не обмежує (з боку кровотворної системи) його застосування як сполуки з протипухлинною активністю.

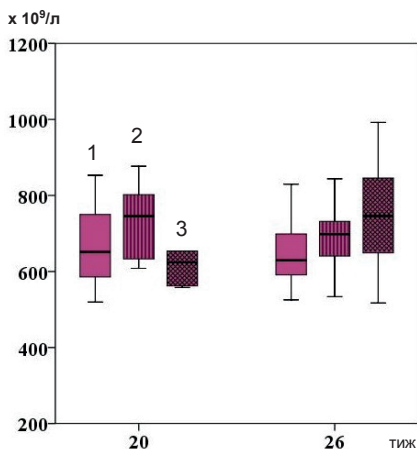


Рис. 3. Кількість тромбоцитів у крові щурів у нормі (1) та за умов впливу похідного малеїміду (МІ-1) в дозах 0,027 (2) і 2,7 (3) мг/кг протягом 20 та 26 тиж

И.В. Белинская, О.В. Линчак, С.Н. Цивинская, В.К. Рыбальченко

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА - ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНКИНАЗ

Исследовано влияние производного малеимида (MI-1, 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-фениламино)-1H-пиррол-2,5-дион), ингибитора VEGF-R1,2,3, FGF-R1, EGF-R(h), PDK1, Src(h), Syk(h), YES, ZAP70 и др. протеинкиназ с антинеопластической активностью на клетки крови. Показано, что MI-1 в дозах 0,027 и 2,7 мг/кг (которые супрессируют канцерогенез толстого кишечника) после хронического воздействия (20 и 26 нед) не вызывает изменений морфофункционального состояния эритроцитов у здоровых крыс. Это подтверждается отсутствием разницы в концентрации гемоглобина в крови, количестве эритроцитов, содержании и концентрации гемоглобина в эритроците, гематокрите и среднего объема эритроцита, а также количестве ретикулоцитов в крови как после 20, так и 26 нед воздействия по сравнению с контрольной группой. В указанных дозах MI-1 не влияет на общее содержание и состав лейкоцитов в крови (эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов, моноцитов) и не угнетает тромбоцитопоез (количество тромбоцитов не изменяется). Отсутствие негативного влияния этого соединения на гемопоез не ограничивает (со стороны кровотворной системы) его применения как соединения с противоопухолевой активностью.

Ключевые слова: производное малеимида; ингибитор протеинкиназ; эритроциты; лейкоциты; тромбоциты.

I.V. Byelinska, O.V. Lynchak, S.M. Tsyvinska, V.K. Rybalchenko

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF BLOOD CELLS AFTER CHRONIC EXPOSURE OF THE PROTEIN KINASES INHIBITOR MALEIMIDE DERIVATIVE

The effect of the protein kinases inhibitor maleimide derivative (MI-1, 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione), inhibitor of VEGF-R1,2,3, FGF-R1, EGF-R(h), PDK1, Src(h), Syk(h), YES, ZAP70 et al. with antineoplastic activity, on blood cells parameters of rats after chronic exposure has been studied. Administration of MI-1 at doses 0.027 and 2.7 mg/kg (suppress colon carcinogenesis) for 20 and 26 weeks does not affect the morphofunctional state of red blood cells in healthy rats. This is confirmed by the lack of differences in the concentration of hemoglobin in blood, red blood cells count, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration, hematocrit and mean corpuscular volume, and the number of reticulocytes

in blood after 20 and 26 weeks of exposure compared with the control group. MI-1 at indicated doses does not influence total leukocytes count and content (eosinophilic and neutrophilic granulocytes, lymphocytes, monocytes) and does not inhibit thrombocytopoiesis (platelet count remains unchanged).

No negative effect of MI-1 on hematopoiesis is not limited (by the hemopoietic system) use of this compound as a potential antitumor drug

Key words: maleimide derivative; protein kinases inhibitor; erythrocytes; leukocytes; platelets.

Taras Shevchenko National University of Kyiv

REFERENCES

- Dubinina GG, Volovenko YuM. Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity. *Pat. 22204 (UA)*. 21.02.2006. Appl. U200601855. 25.04.2007.
- Garmanchuk LV, Linchak OV, Niculina VV, Dzhus OI, Chranovskaya NN, Nicolaenko TV, Babuta EN, Rybalchenko VK. Potential cytostatic effect of the Maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. *Ekspерim Klin Farmakol*. 2013;76(8):39–42.
- Filinska OM, Yablonska SV, Mandryk SY, Kharchuk IV, Ostrovska GV, Rybalchenko VK. State of the liver antioxidant system and content of matrix metalloproteinase-2 of large intestine under the effect of maleimide derivative in experimental colon carcinogenesis in rats. *Ukr Biochem J*. 2010;82(4):69–77.
- Kharchuk IV, Filinska OM, Yablonska SV, Rybalchenko TV. The structure functional status of rat kidney and pancreas after the long-term influence of novel targeted-action compound — maleimide derivative. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. 2010; 7:150–4.
- Kent D, Copley M, Benz C, Dykstra B, Bowie M, Eaves C. Regulation of Hematopoietic Stem Cells by the Steel Factor/KIT Signaling Pathway. *Clin Cancer Res*. 2008;14(7):1926–30.
- Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*. 2002;21:3334–58.
- Pearn L, Fisher J, Burnett AK, Darley RL. The role of PKC and PDK1 in monocyte lineage specification by Ras. *Blood*. 2007;109(10):4461–9.
- Byelinska IV, Rybalchenko VK, Ostrovska GV, Dyagil IS. Hematological effects of protein kinases inhibitor maleimide derivative (1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione). *J Pre-Clin and Clin Res*. 2010;4(1):32–5.
- Byelinska IV, Lynchak OV, Rybalchenko TV, Gurnyak OM. Hematological effects of the protein kinases inhibitor maleimide derivative of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis of rats. *Fiziol Zh*. 2014;60(4):40–9. [Ukrainian].
- Grzhibovskiy AM. Analysis of three or more independent groups of quantitative data. *Ecology of human*. 2008;(3):50–8. [Russian]
- Bone HK, Welham MJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling regulates early development and developmental haemopoiesis. *J Cell Science*. 2007;120:1752–62.
- Yang KJ, Shin S, Piao L, Shin E, Li Y, Ah Park K, Byun HS, Won M, Hong J, Kweon GR, Hur GM, Seok JH, Chun T, Brazil DP, Hemmings BA, Park J. Regulation of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) by Src involves tyrosine phosphorylation of PDK1 and Src SH2 domain binding. *J Biol Chem*. 2008;283:1480–91.
- Slavova-Azmanova NS, Kucera N, Satiaputra J, Stone L, Magno A, Maxwell MJ, Quilici C, Erber W, Klinken SP, Hibbs ML, Ingley E. Gain-of-function Lyn induces anemia: appropriate Lyn activity is essential for normal erythropoiesis and Epo receptor signaling. *Blood*. 2013;122(2):262–71.
- Filinska OM, Yablonska SV, Mandryk SY, Kharchuk IV, Ostrovska GV, Rybalchenko VK. Changes in biochemical parameters of rat serum under the influence of maleimide derivative in colorectal cancerogenesis. *Probl Ekologich and Med Genet and Clin Imunol*. 2009;8(95):75–83. [Ukraine].
- Czepluch FS, Olieslagers S, van Hulten R, Vöö SA, Waltenberger J. VEGF-A-induced chemotaxis of CD16+ monocytes is decreased secondary to lower VEGFR-1 expression. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):331–8.
- Vallières F, Girard D. IL-21 enhances phagocytosis in mononuclear phagocyte cells: identification of spleen tyrosine kinase as a novel molecular target of IL-21. *Immunol*. 2013;190(6):P.2904–12.
- Byelinska I, Garmanchuk L, Andrushchenko O, Kalmykova O, Rybalchenko V. Morpho-functional state of cells line U-937 after the influence of protein kinase inhibitor - maleimide derivative. *International Symposium on Cell Biology jointly with 4rd Ukrainian Congress of Cell Biology 17-20 September 2014. Uzhgorod, Ukraine*. Abstract book. 2014; P.113.
- Zeng Z, Samudio IS, Zhang W, Estrov Z, Pelicano H, Harris D, Frolova O, Hail N, Chen W, Kornblau SM, Huang P, Lu Y, Mills GM, Andreeff M, Konopleva M. Simultaneous Inhibition of PDK1/AKT and Fms-Like tyrosine kinase 3 signaling by a small-molecule KP372-1 induces mitochondrial dysfunction and Apoptosis in Acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2006; 66:3737–46.
- Carnevale J, Ross L, Puissant A, Banerji V, Stone RM, DeAngelo DJ, Ross KN, Stegmaier K. SYK Regulates mTOR Signaling in AML. *Leukemia*. 2013;27(11):2118–28.
- Nakao T, Geddis AE, Fox NE, Kaushansky K. PI3K/Akt/FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27Kip1. *Cell Cycle*. 2008;7(2):257–66.

Матеріал надійшов до редакції 01.11.2014

Активация протеїну С в процесі тромболізу *in vitro*

І.І. Паталах, С.А. Таланов, О.В. Ревка, Т.Ф. Дроботько

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ; E-mail: ipatalakh@ukr.net

У дослідях in vitro були відтворені фізіологічні умови формування та наступного лізису кров'яного тромбу. Тромбоутворення ініціювали тромбіном або контактом крові з аніонною поверхнею, що стимулює спонтанне згортання. У зразок крові попередньо додавали тканинний активатор плазміногену або/та протеїн С. Контролювали час початку та повної деградації сформованих тромбів, а також зміни вмісту протеїну С у лізатах. Встановлено, що лише додавання протеїну С, як окремо, так і в поєднанні з тканинним активатором плазміногену призводило до найбільш ефективного лізису тромбів: їх остаточної маса становила 18 та 5 % відповідно відносно контролю. Препарат тканинного активатора плазміногену за окремого внесення та у поєднанні з препаратом протеїну С призводив до зниження вмісту протеїну С в лізатах згустків крові, утворених спонтанно, на 83 та 74 %, відповідно. В лізатах згустків, утворених тромбіном, це зниження було 72 і 56 % відповідно. Без додавання тканинного активатора плазміногену лізати згустків, утворених тромбіном, містили протеїну С на 54 % менше, ніж ті, що були сформовані спонтанно. Отже, зміни вмісту протеїну С в ізольованому об'ємі тромбу мають контролюватися тромбіном на стадії тромбоутворення та системою фібринолізу на стадії тромболізу. Вміст протеїну С в лізатах згустків, утворених екзогенним тромбіном, поступово знижувався протягом наступних 10 год тромболізу, що додатково має свідчити про взаємодію систем фібринолізу та активації протеїну С. Сформульовано гіпотезу про існування в плазмі крові за участі клітин крові ендотеліальної незалежного механізму активації протеїну С, ефективність якого підвищується в процесі тромболізу.

Ключові слова: протеїн С; активація; тромбін; тканинний активатор плазміногену; тромбоутворення; тромболізис.

ВСТУП

Згортання плазми крові – це процес гідролітичного розщеплення розчинного фібриногену за участі тромбіну та наступного спонтанного утворення нерозчинної полімерної фібринової сітки. Дуалістична природа тромбіну зумовлює його можливість регулювати як прокоагулянтні шляхи, спрямовані на утворення фібринових згустків, так і антикоагулянтні, які стримують надмірну продукцію фібрину [1]. Коли тромбін функціонує як антикоагулянт, його головною мішенню є неактивний профермент протеїн С (ПС), попередник активованого протеїну С (АПС). Тромбін забезпечує конверсію ПС до АПС, здійснюючи його обмежений протеоліз. Окрім тромбіну, ПС може бути активований фактором згортання Ха, позитивним

регулятором цієї реакції є кофактор Va. Для активації ПС важливе значення мають також мембранні фосфоліпіди та інші від'ємно заряджені сполуки [2]. За певних умов конвертація ПС в АПС може здійснюватися плазміном чи безпосередньо самим АПС за механізмом автоактивації [3, 4].

У судинному руслі утворення АПС тромбіном відбувається переважно на поверхні ендотеліальних клітин, де локалізовані інші ключові кофактори системи активації ПС, а саме тромбомодулін та ендотеліальний рецептор протеїну С (ЕРПС). Проте тромбомодулін було виявлено й на поверхні клітин крові, зокрема моноцитів та тромбоцитів [5, 6]. Ці клітини затримуються у сітці фібрину при формуванні повноцінного тромбу та контактують з тромбіном і ПС, інкорпорованими

в об'ємі фібринового згустку. Отже, тромбоутворення створює передумови для запуску механізму активації ПС *in situ*. Однак нині існування та ефективність цього механізму абсолютно не досліджені.

Фібрин, що утворюється тромбіном під час формування кров'яного згустку, ініціює роботу системи фібринолізу, виступаючи кофактором так званого тричленного активаторного комплексу. Подібне комплексоутворення забезпечує високоспецифічну активацію проензиму плазміногену тканинним активатором плазміногену на поверхні фібрину. При цьому утворюється протеолітичний ензим плазмін, фізіологічним субстратом якого є саме фібрин. Розщеплюючи його, плазмін забезпечує протеолітичну деградацію фібринових згустків і кров'яних тромбів, зокрема. У дослідках з розчинами очищених білків було показано здатність плазміну активувати ПС через обмежений протеоліз [3]. Проте, чи має ця властивість плазміну певне значення для активації ПС в об'ємі тромбу, наразі невідомо.

Мета роботи – вивчити можливість активації ПС в ізолюваному об'ємі тромбу за ендотелійнезалежним механізмом, а саме в процесі тромбоутворення та наступного тромболізу згустків, отриманих *in vitro* з цільної крові.

МЕТОДИКА

Тромбоутворення та тромболізис кров'яного згустку досліджували таким чином. Безпосередньо перед проведенням досліду в пробірку або лунку планшета вносили 20 мкл тканинного активатора плазміногену (кінцева концентрація – 1,68 од/мл) та 20 мкл ПС (кінцева концентрація – 0,268 мкг/мл), а також 10 мкл тромбіну (кінцева концентрація 1 НІН од/мл). Венозну кров людини (без антикоагулянтів) якомога швидше після забору додавали по 0,452 мл в кожен лунку планшета (або пробірку) та струшували декілька разів до утворення згустку. Контролем щодо дії тромбіну були згустки, утворені з аналогічно

підготовлених зразків крові після її спонтанного зсідання на аніонній поверхні скляної пробірки, тобто без додавання тромбіну.

В усіх варіантах дослідів візуально фіксували час утворення повноцінного згустку в момент максимального ущільнення зразка крові, а також час початку лізису за появою рідкої фази (лізату). За лізисом спостерігали протягом доби, після чого переносили згустки, які залишилися, на 5 хв на фільтрувальний папір для зневоднення, а потім зважували.

Під час лізису в момент накопичення 100 мкл рідини відбирали проби, піддавали їх центрифугуванню та зберігали супернатанти протягом кількох діб при -20°C для наступного визначення концентрації вільного ПС. Його проводили після п'ятихвилинної інкубації зразка з нефізіологічним активатором з отрути змії *A. contortrix contortrix*, що дає можливість в подальшому реєструвати кількість ПС, переведеного в активований стан. Для цього застосовували загальноприйнятий метод оцінки амідолітичної активності АПС за його здатністю специфічно гідролізувати хромогенний субстрат S2366 (pGlu-Pro-Arg-pNA) [7]. Деякі інші протеази плазми крові також можуть розщеплювати S2366, забезпечуючи так звану фонову амідолітичну активність зразків. Крім того, зростання цієї активності може бути індикатором накопичення АПС у результаті фізіологічної активації проензиму ПС. Тому кожний зразок досліджували, паралельно оцінюючи його фонову та ПС-залежну амідолітичну активність, індуковану нефізіологічним активатором. Згідно з методикою, реєстрували зміни оптичної густини D (в одиницях оптичної густини) на довжині хвилі 405 нм для розчину пара-нітроаніліну, який утворювався протягом 5 хв в об'ємі реакційного середовища 130 мкл. Отже, кількість вільного ПС визначали за різницею швидкостей гідролізу хромогенного субстрату за наявності активатора в зразку та без нього.

Результати обробляли загальноприйнятими статистичними методами за допомогою

прикладних пакетів програм Excel 97 та Origin. Відмінності між окремими варіантами вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як відомо, тромбін здійснює пряму ініціацію коагуляційного каскаду із залученням загальної ланки внутрішнього та зовнішнього шляхів згортання [8]. У наших досліджах екзогенний тромбін з активністю 1 НН од/мл забезпечував швидке (протягом 1-ї хвилини) згортання цільної крові та утворення міцних згустків. Зразки крові без додавання тромбіну також утворювали згусток, але протягом 5–10 хв. Як відомо, спонтанне згортання крові здійснюється завдяки уповільненому фібриноутворенню, що регулюється поступовим накопиченням ендogenous тромбіну. За його продукцію відповідає каскадна система білків внутрішнього шляху згортання, початкові стадії якої чутливі до контактної активації аніонною поверхнею. В цій системі є дві мішені, на які спрямована антикоагулянтна активність АПС. Це теназний і протромбіназний комплекси. Натомість тромбоутворення, спричинене екзогенним тромбіном, не підпадає під антикоагулянтну дію АПС.

Під час дослідів було виявлено здатність

всіх штучно утворених згустків крові до лізису, як спонтанного (рис. 1, варіанти 1, 3, 5 і 7), так і стимульованого екзогенним тканинним активатором плазміногену (див. рис. 1, варіанти 2, 4, 6 і 8). Треба відзначити, що тканинний активатор плазміногену більш ефективно прискорював лізис згустків, утворених тромбіном, ніж сформованих контактною активацією: маса згустків у варіанті 6 зменшувалася на 24-ту годину лізису відносно варіанта 5 на 54 %, а у варіанті 2 відносно варіанта 1 – лише на 24 % (див. рис. 1).

Візуальні спостереження за динамікою тромболізу та кінцева маса згустків на 24-ту годину лізису (див. рис. 1) свідчили про значне прискорення деградації згустків екзогенним ПС. Його додавання як окремо, так і в поєднанні з тканинним активатором плазміногену призводило до значної деградації згустків, утворених тромбіном: остаточна маса згустку у варіанті 7 становила лише 18 % відносно варіанту 5, де ПС не додавали. Поєднання ПС і тканинного активатора плазміногену зумовило майже повний лізис, в результаті маса деградованих згустків у варіанті 8 зменшувалася приблизно до 5 % відносно варіанту 5. Ще суттєвішим був стимулювальний вплив ПС на швидкість лізису згустків, сформованих спонтанно, що призводило до повної їх деградації (варіанти 3 і 4).

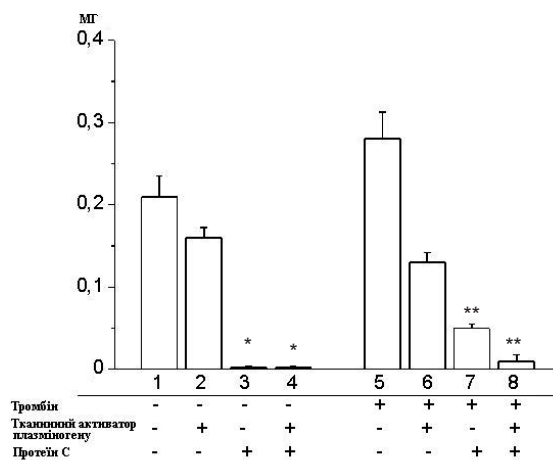


Рис.1. Маса деградованих згустків крові (n=5) через 24 год від ініціації зсідання. Варіанти 1-4 – спонтанно утворені згустки, 5-8 – згустки, утворені екзогенним тромбіном. * $P < 0,05$ – відносно варіанту 1; ** $P < 0,05$ – відносно варіанту 5

Слід зазначити, що ПС не проявляє будь-якої самостійної протеолітичної активності, оскільки є неактивним попередником ферменту АПС. Перевірка спонтанної амідолітичної чи клотингової активності препарату протеїну С, який було використано у дослідах, показала повну відсутність слідів АПС. Отже, виявлене нами прискорення тромболізу, спричинене додаванням ПС, може бути функціональним тестом, який опосередковано вказує на його залучення до реакції активації в процесі тромбоутворення чи тромболізу. Новоутворений АПС здатен стимулювати тромболізис як антикоагулянт, змінюючи структуру фібринового згустку в процесі тромбоутворення [9] або як профібринолітик, знижуючи активність інгібіторів фібринолізу, що прискорює тромболізис [10, 11]. Ймовірно, тромболітичний ефект ПС відносно згустків, утворених спонтанно, зумовлений поєднанням його профібринолітичної та антикоагулянтної дії. Натомість застосування екзогенного тромбіну для згортання крові значно обмежує антикоагулянтну функцію ПС внаслідок швидкого утворення згустків та сприяє його профібринолітичній дії.

Виявлення функціональної активності, притаманної для АПС, у зразках з екзогенним ПС є непрямим доказом його активації в про-

цесі тромбоутворення та тромболізу. Прямим доказом конверсії ПС в АПС, вочевидь, має бути зменшення кількості проензиму в об'ємі зразка з одночасним наростанням кількості його ензимної форми, про що свідчать зміни амідолітичної активності лізатів (рис. 2).

Представлені на рис. 2 результати визначення індукованої та фонові амідолітичної активності лізатів свідчать, що на початку лізису в усіх контрольних і дослідних варіантах фонові активності були несуттєвою (навіть у варіантах із додаванням тромбіну). Індукована активність, яка відображує кількість вільного ПС, знижувалася відносно відповідних контрольних значень (варіанти 1 та 3) в усіх варіантах з додаванням тканинного активатора плазміногену і тромбіну. А саме інкорпорування екзогенного тканинного активатора плазміногену до згустків, утворених спонтанно, призводило до зникнення 83 % індукованої активності ендogenous ПС у варіанті 2 відносно варіанту 1 та 74 % сумарного ПС (ендогенний та екзогенний) у варіанті 4 відносно варіанту 3. Якщо до плазми додавали лише тромбін і не вносили інших білків (варіант 5), також спостерігали зниження кількості ендogenous ПС: вона зменшувалася на 53 % відносно контрольного варіанту 1. Екзогенний тканинний актива-

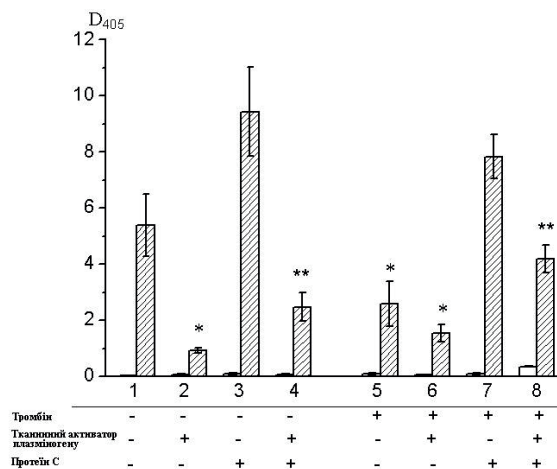


Рис.2. Фонова (білі стовпці) та індукована (смугасті стовпці) амідолітична активність лізатів на початку лізису. Варіанти 1-4 – спонтанно утворені згустки, 5-8 – згустки, утворені екзогенним тромбіном. * P<0,05 – відносно варіанту 1, ** P<0,05 – відносно варіанту 3

тор плазміногену у варіанті 6 підсилював ефект зниження кількості ендогенного ПС тромбіном ще на 19 %, а загальне зниження становило 72 %.

Слід зазначити, що внесення екзогенного ПС у варіанті 3 в кількості, що дорівнювала 6,5 % від його концентрації в плазмі, призвело до додаткового збільшення індукованої амідолітичної активності у лізатах на 75 % відносно варіанта 1. У лізатах згустків, утворених тромбіном, у варіанті 7 кількість сумарного ПС знижувалась лише на 17 % порівняно з варіантом 3, в якому тромбін не додавався; втім після інкорпорування в згусток тканинного активатора плазміногену (варіант 8) в лізатах залишалось всього 44 % ПС від його кількості у варіанті 3.

Як уже відмічалось, зростання фонові амідолітичної активності (як індикатора накопичення АПС) наразі було незначним порівняно з індукованою активністю. Ймовірно, новоутворений АПС швидко інактивується потужним інгібіторним потенціалом крові. Зокрема, АПС можуть нейтралізувати такі інгібітори тромбоцитарного походження, як РАІ-1 та нексин 1 [10]. У нативній плазмі крові АПС зв'язується також з α_2 -макроглобуліном та α_2 -антиплазміном [11]. Як відомо, саме здатність АПС незворотно

зв'язувати інгібітори фібринолізу зумовлює його профібринолітичну дію.

Виявлені в процесі тромболізу зміни кількості ПС у лізатах свідчать про більш суттєве витрачання проферменту за умов стимуляції системи фібринолізу екзогенним тканинним активатором плазміногену, що зумовлює більш потужну продукцію плазміну. За даними літератури, тромбін, внесений у плазму чи незмінену кров повністю інактивується інгібіторами плазми протягом 20–30 хв [12, 13]. Тому максимальна здатність екзогенного тромбіну до активації ПС має обмежуватися часом утворення і стабілізації тромбу. В нашому експерименті лізис утворених тромбіном згустків крові починався не раніше ніж через 2 год від моменту згортання. Отже, активаторна дія тромбіну під час тромбоутворення мала знижувати вміст ПС у лізатах лише на початковій стадії лізису, надалі не впливаючи на його кількість. Втім, як видно з рис. 3, протягом наступних 10 год руйнації згустків вміст ПС у лізатах поступово знижувався, що вказує на певний зв'язок між системами плазміноген/плазміну та активації ПС.

Отже, зміни вмісту ПС в об'ємі ізольованого згустку мають контролюватись тромбіном на стадії тромбоутворення та системою фібринолізу на стадії тромболізу.

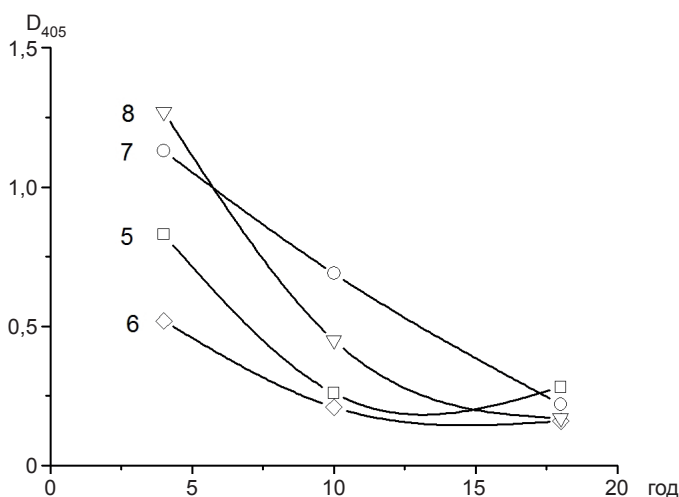


Рис.3. Зміни індукованої амідолітичної активності в процесі деградації згустків, утворених тромбіном з крові: 5 – без внесення інших білків; 6 – внесення тканинного активатора плазміногену; 7 – внесення протеїну С; 8 – внесення тканинного активатора плазміногену разом із протеїном С

Аналізуючи можливі причини змін вмісту ПС у розчинній фазі в процесі тромболізу, не можна відкидати можливість його фізичного утримування в об'ємі недеградованої частини згустку. При цьому в рідкому оточенні менш деградованих згустків мала виявлятися менша кількість ПС. Щоб перевірити зв'язок між масою деградованого згустку та кількістю вивільненого ПС, згустки переносили в 0,5 мл робочого буфера через годину після ініціації тромболізу та продовжували відслідковувати кількісні зміни вільного ПС в процесі деградації згустків. З'ясувалося, що дійсно існує зворотний зв'язок між масою згустків та вмісту в них індукційного ПС під час активного лізису (рис.4).

Однак ця залежність має квазілінійний характер лише для варіантів, де не вносили тканинний активатор плазміногену (див. рис. 4, 1). Поряд з цим тканинний активатор плазміногену, інкорпорований в об'єм згустку, сприяв більш ефективному його розчиненню та суттєво зменшував вміст ПС в лізаті (див. рис. 4, 2). Про це свідчить зміщення кривої 2 вниз та вліво відносно кривої 1. Напевне, це зниження вмісту ПС зумовлене не лише його фізичною затримкою в об'ємі згустків, а й незворотним перетворенням у певних

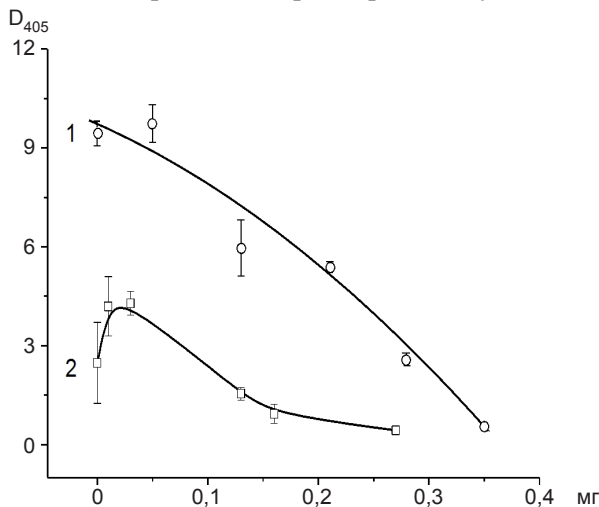


Рис.4. Залежність між індукційною амідолітичною активністю ПСа та розміром згустків: 1 – спонтанний лізис, 2 – лізис, індукований тканинним активатором плазміногену (n=3)

біохімічних взаємодіях. Ці результати дають змогу припустити, що тканинний активатор плазміногену регулює механізм залучення проферменту ПС до процесу тромболізу. Проте, тромбін в умовах нашого експерименту не відіграє ключової ролі в метаболічних перетвореннях ПС, а виконує лише функцію ущільнення та зміцнення згустку, що сприяє концентруванню та утриманню неактивного проферменту в його об'ємі. Можливо, залучення ПС у біохімічні взаємодії з тромбіном маскується більш вираженим ефектом фізичного утримання, залежного від стабільності згустку.

На підставі отриманих результатів нами сформульовано гіпотезу про існування ендотелійнезалежного шляху активації протеїну С у плазмі крові за участі клітин крові, ефективність якого підвищується в процесі тромболізу. Біохімічний механізм подібного способу активації ПС залишається нез'ясованим, що спонукає на продовження наукового пошуку.

**І.І. Паталах, С.А. Таланов, О.В. Ревка,
Т.Ф. Дроботько**

АКТИВАЦИЯ ПРОТЕИНА С В ПРОЦЕССЕ ТРОМБОЛИЗИСА *IN VITRO*

В опытах *in vitro* были воспроизведены физиологические условия формирования и последующего лизиса кровяного тромба. Тромбообразование инициировали тромбином либо контактом крови с анионной поверхностью, стимулирующей спонтанное свертывание. В образец крови предварительно добавляли тканевой активатор плазминогена или/и протеин С. Контролировали время начала и полной деградации сформированных тромбов, а также изменение содержания протеина С в лизатах. Установлено, что только добавление протеина С, как отдельно, так и в сочетании с тканевым активатором плазминогена приводило к наиболее эффективному лизису тромбов: их остаточная масса составляла соответственно 18 % и 5 % относительно контроля. Препарат тканевого активатора плазминогена при отдельном внесении либо в сочетании с протеином С приводил к снижению содержания протеина С в лизатах сгустков крови, образованных спонтанно, на 83 % и 74 %, соответственно. В лизатах сгустков, образованных тромбином, это снижение составляло, соответственно, 72 % и 56 %. Без добавления тканевого активатора плазминогена лизаты сгустков, образованных тромбином, содержали протеина С на 54 % меньше, чем те, что были сформированы спонтанно. Таким образом, изменение содержания протеина С в изолированном объе-

ме тромба должно контролироваться тромбином на стадии тромбообразования и системой фибринолиза – на стадии тромболізу. Содержание протеина С в лизатах сгустков, образованных экзогенным тромбином, постепенно снижалось в течение последующих 10 час тромболізу, что дополнительно свидетельствует о взаимодействии систем фибринолиза и активации протеина С. Сформулирована гипотеза о существовании в плазме с участием клеток крови эндотелийнезависимого механизма активации протеина С, эффективность которого повышается в процессе тромболізу.

Ключевые слова: протеин С; активация; тромбин; тканевой активатор плазминогена; тромбообразование; тромболізу; моделирование.

I.I. Patalakh, S.A.Talanov, O.V. Revka, T.F. Drobotko

ACTIVATION OF PROTEIN C IN THE IN VITRO THROMBOLYSIS

Physiological conditions of formation and subsequent lysis of thrombus were reconstituted *in vitro* in our research. Thrombus formation was initiated either by addition of exogenous thrombin or by contact of blood with anionic surface, which stimulates spontaneous coagulation of blood. Tissue plasminogen activator and/or protein C were previously added in the blood sample. The time of the beginning and total degradation of formed thrombi as well as the level of PC in lysates was controlled then. Only an addition of protein C alone or in combination with tissue plasminogen activator led to the most effective lysis of thrombi: their residual weight was 18% and 5% comparing to control. Addition of exogenous tissue plasminogen activator alone or in combination with protein C caused a 83% and 74% decrease of PC level in lysates of spontaneously formed thrombi, and 72% and 56% decrease for thrombi formed by thrombin, respectively. Without an addition of tissue plasminogen activator protein C level in lysates of thrombi formed by thrombin was 54% down on spontaneously formed thrombi. Thus, changes of PC concentration in isolated volume of clot seem to be controlled by thrombin at the stage of thrombus formation and by fibrinolytic system at the stage of fibrinolysis. Concentration of PC in lysates from clots formed by exogenous thrombin was decreasing over the next 10 hours of thrombolysis, which can also be the evidence of the interaction between the fibrinolytic and PC activation systems. A hypothesis is formulated about an existence of endothelium-independent mechanism of PC activation in blood plasma with blood cells participation, which effectiveness increases in the process of thrombolysis.

Key words: protein C; activation; thrombin; tissue plasminogen activator; thrombus formation; thrombolysis; modeling.

Palladin Institute of biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Di Cera E. Thrombin as procoagulant and anticoagulant. *J Thromb Haemost* 2007;5(Suppl. 1):196-202.
2. Rezaie A.R. Rapid Activation of Protein C by Factor Xa and Thrombin in the Presence of Polyanionic Compounds. *Blood*. 1998;91(12):4572-80.
3. Varadi K., Philapitsch A., Santa T., Schwarz H.P. Activation and inactivation of human protein C by plasmin. *Thromb Haemost* 1994;71(5):615-21.
4. Hassouna H., Quinn C. Proteolysis of protein C in pooled normal plasma and purified protein C by activated protein C (APC). *Biophys Chem*. 2002;95(2):109-24.
5. McCachren S.S., Diggs J., Weinberg J.B., Dittman W.A. Thrombomodulin expression by human blood monocytes and by human synovial tissue lining macrophages. *Blood*. 1991;78:3128-32.
6. Suzuki K., Nishioka J., Hayashi T., Kosaka Y. Functionally active thrombomodulin is present in human platelets. *J Biochem*. 1988;104:628-63.
7. Takahashi H., Hanano M., Tatewaki W., Shibata A. Fast functional assay of protein C in whole plasma using a snake venom activator: evaluation in patients with congenital and acquired protein C deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1988;175(3):217-25.
8. Anand M., Rajagopal K., Rajagopal K.R. A model for the formation, growth, and lysis of clots in quiescent plasma. A comparison between the effects of antithrombin III deficiency and protein C deficiency. *J Theor Biol*. 2008;253:725-38.
9. Gruber A., Mori E., del Zoppo G.J., Waxman L., Griffin J.H. Alteration of fibrin network by activated protein C. *Blood*. 1994;83(9):2541-48.
10. Wohner N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008;6(3):224-28.
11. Heeb M.J., Gruber A., Griffin J.H. Identification of divalent metal ion-dependent inhibition of activated protein C by alpha 2-macroglobulin and alpha 2-antiplasmin in blood and comparisons to inhibition of factor Xa, thrombin, and plasmin. *J Bio. Chem*. 1991;266(26):17606-12.
12. Varin R., Mirshahi S., Mirshahi P., Klein C., Jamshedov J., Chidiac J., Perzborn E., Mirshahi M., Soria C., Soria J. Whole blood clots are more resistant to lysis than plasma clots - greater efficacy of rivaroxaban. *Thromb Res*. 2013;131:e100-e109.
13. Hemker H. C., Giesen P. L. A., Ramjee M., Wagenvoort R., Beguin S. The Thrombogram: Monitoring Thrombin Generation in Platelet Rich Plasma. *Thromb Haemost*. 2000;83:589-91.

Матеріал надійшов до редакції 30.09.2015

Дослідження субмікроскопічної архітектоніки клітин Сертолі й Лейдига після впливу гідрохлориду серотоніну та можливості корекції метаболічними засобами

Н.М. Бречка, В.П. Невзоров *, В.А. Бондаренко, Н.Г. Малова, Н.Ю. Селюкова

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», Харків;

*ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМН України», Харків;

E-mail: natalia_iper@mail.ru

Представлено результати дослідження ультраструктурних змін органел клітин Сертолі і Лейдига, після дії гідрохлориду серотоніну та введення біоглобін-У. Показано, що гідрохлорид серотоніну викликає на внутрішньоклітинному рівні мітохондріальну дисфункцію і активує катаболічні внутрішньоклітинні процеси, а препарат біоглобін-У на його тлі підвищує активність репаративних і синтетичних реакцій, знижує ступінь мітохондріальної дисфункції і катаболічних процесів, а також активує метаболізм клітин Лейдига, і значно знижує кількість вогнищ деструкції мембран ендоплазматичного ретикулула, мембран ядра і мітохондрії.

Ключові слова: ультраструктура клітин Сертолі і Лейдига; серотоніну гідрохлорид; мітохондріальна дисфункція; біоглобін-У

ВСТУП

Проблема чоловічого безпліддя, що розвивається внаслідок захворювань або всіх сумарних патологічних впливів на репродуктивну систему чоловіків, досить актуальна нині усьому світі. Його патогенез, структура, діагностика - це предмет багатьох дискусій [1–4]. Статистика ВООЗ надає інформацію про те, що в 45 % випадків безплідних пар «винуватцем» є чоловік, а в 40 % - жінка [5]. Різноманіття факторів, що призводять до чоловічого безпліддя та можливість їх поєднання ускладнюють вибір необхідних методів діагностики і особливо лікування. Відомо, що серед багатьох причин чоловічої неплідності провідною є варикоцеле простатити різного генезу, травми статевих органів, тощо. При цьому відновлення репродуктивної функції розтягується за часом і негативно позначається на ефективності лікування [6–8]. У зв'язку з цим розуміння механізмів ефекту тих чи інших факторів

залежить від правильного вибору лікарської терапії. Спермії розвиваються в звивистих каналцях, що встелені клітинами Сертолі і герміногенними клітинами. Головною функцією клітин Сертолі є забезпечення розвитку сперматозоїдів, формування гематотестикулярного бар'єра за рахунок щільних з'єднань між собою [9, 10]. Таким чином, для нормального сперматогенезу необхідна комплексна взаємодія клітин Сертолі і Лейдига [10]. Порушення функціонального стану всіх цих клітин може негативно позначитися на перебіг сперматогенезу. Важливим є дослідження негативного впливу різних факторів на функцію сім'яників [11]. Для відтворення патології гонад нами була використана модель серотонінового ураження яєчок. У механізмі розвитку цієї патології провідну роль відіграє судиннозвужувальна дія гідрохлориду серотоніну, з подальшим порушенням трофіки та виникненням патологічних змін у органі, що часто зустрічається в практиці лікарів (варикоцеле, травми, процеси, які

© Н.М. Бречка, В.П. Невзоров, В.А. Бондаренко, Н.Г. Малова, Н.Ю. Селюкова

викликані гіподинамією, тощо) [11]. Гідрохлорид серотоніну в дозі 5 мг/кг порушує метаболізм підтримуючих епітеліоцитів і інтерстиціальних ендокриноцитів сім'яників щурів. Різко знижувалася синтетична і репаративна активність, структурним підтвердженням чого є фрагментація мембран ендоплазматичного ретикулула, зменшення числа рибосом, полісом і секреторних гранул, збільшення кількості вторинних лізосом, а також редукція пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі [11].

Нині ведеться пошук препаратів, що поліпшують стан репродуктивної системи після деструктивного впливу [12]. В останні роки досить актуальним є застосування препаратів біогенних стимуляторів (муміє, прополіс, екстракт алое). Основна їх особливість полягає в тому, що вони активують різні захисні системи організму, головним чином, ферментні, імунобіологічну реактивність, нормалізують гормональні функції і т.д. Завдяки індукції, репресії, інгібуванню та підвищенню каталітичної активності різних ферментів вони стимулюють загальний метаболізм організму, чим і пояснюється широта діапазону їх дії [13, 14]. Таким препаратом є біоглобін-У – протеїнізований водно-сольовий екстракт плаценти людини, до складу якого входять поліпептиди (3,5-7 %), амінокислоти (50-60 %), аміноцукри (4-5 %), гексуронові кислоти (8-9 %) [15]. Відомо, що його застосування при гострому та хронічному простатиті перешкоджає дегрануляції тканинних базофілів [16].

Метою нашої роботи було дослідження субмікроскопічної архітекtonіки клітин Сертолі і Лейдіга, які зазнали деструктивного впливу гідрохлориду серотоніну та можливості корекції цього стану препаратом біоглобін-У.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на білих статевозрілих самцях щурів популяції Вістар з масою

тіла 280-350 г. Тварини були розподілені на три групи: 1-ша – негативний контроль (інтактні щури), 2-га – позитивний контроль (контрольна патологія – тварини з модельованим серотоніновим ураженням ячок [9]), 3-тя – тварини, яким за 3 доби до початку введення гідрохлориду серотоніну, на тлі його введення та протягом 3 діб після ін'єкцій гідрохлориду серотоніну вводили препарат біоглобін-У (виробництва компанії ЗАТ «Біолік», м. Харків) у дозі 200 мкл/кг. Гідрохлорид серотоніну (Alfa Aesar®, США) вводили протягом 14 діб підшкірно у дозі 5 мг/кг [17].

Тварин декапітували на 21-шу добу відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [18].

Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки тканини сім'яника піддавали попередній фіксації в 2,5%-му забуференому розчині глутарового альдегіду протягом 5-6 год при 4°C. Після цього промивали в буферному розчині, остаточну фіксацію проводили в 1%-му забуференому розчині чотириокису осмію. Зневоднення тканини проводили в спиртах зростаючої концентрації й ацетоні. Потім тканину просочували в суміші епоксидних смол (епон-аралдит) за стандартними методиками [19, 20]. Блоки полімеризували в термостаті при 60°C протягом 48 год. З них на ультрамікротомі УМП-3М виготовляли ультратонкі зрізи, монтували їх на електролітичні сіточки і, після контрастування цитратом свинцю, вивчали під електронним мікроскопом ЕМВ-100БР при прискорювальній напрузі 75 кВ.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні субмікроскопічної архітекtonіки контрольної групи тварин (1-ша

група) в препаратах спостерігалися клітини Сертолі й Лейдіга, а також сперматогонії і сперматоцити, що знаходилися на різних стадіях сперматогенезу. Ультраструктурна організація цих клітин відповідала сучасним уявленням [19]. Порушення внутрішньоклітинних мембранних структур були відсутні, що свідчило про адекватну гістологічну обробку матеріалу.

Електронно-мікроскопічне дослідження препаратів в групі щурів, яким вводили гідрохлорид серотоніну в дозі 5 мг/кг (2-га група), виявило описані раніше дистрофічні та деструктивні порушення субмікроскопічної організації органел клітин Сертолі та Лейдіга, а також сперматогенних клітин різної стадії диференціювання. Найбільш чутливими до негативного впливу гідрохлориду серотоніну були мітохондрії. Їх зовнішні мембрани набували розпушеного вигляду, найчастіше виявлявся вогнищевий лізис як зовнішніх мембран, так і крист, що свідчило про розвиток мітохондріальної дисфункції. Порушення біоенергетичного забезпечення синтетичних процесів структурно підтверджується редукцією пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі, зменшенням кількості рибосом і полісом у цитоплазмі,

а також осередкової деструкцією мембран ендоплазматичного ретикулула. На розвиток катаболічних процесів вказує і поява в цитоплазмі клітин Сертолі та Лейдіга вторинних лізосом і включень ліпідів. Детальний опис субмікроскопічної організації цих клітин був описаний нами в раніше опублікованій праці [11].

Після введення біоглобін-У на тлі гідрохлориду серотоніну (3-тя група) було виявлено поліморфні зміни органел. Значна частина клітин Сертолі набувала типової будови з наявністю слабо виражених дистрофічних порушень. Ядра цих епітеліоцитів мали переважно деконденсований хроматин, гранули якого були дифузно розсіяні по каріоплазмі. Ядерна мембрана утворювала інвагінації різної глибини і не містила вогнищ лізису. У цитоплазмі розташовувалися численні мітохондрії, які мали електронно-щільний матрикс і досить велику кількість крист. Деякі мітохондрії приймали «гантелеподібну форму», що вказувало на активацію процесу ділення цих органел (рис. 1,а). Гладкий ендоплазматичний ретикулум був добре розвинений, його цистерни електроннопрозорі. Пластинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі був помірно гіпер-

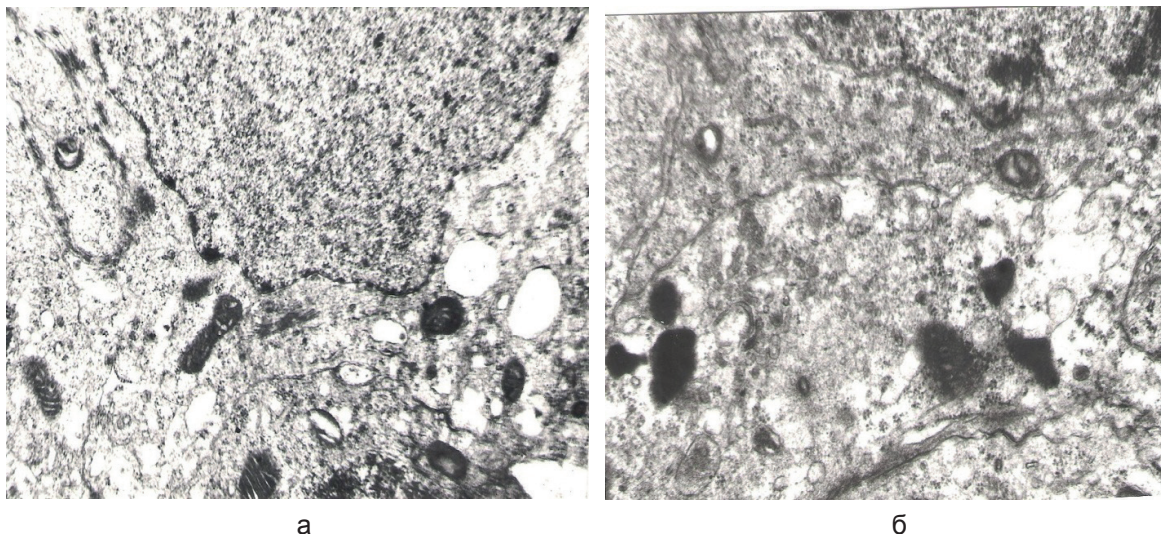


Рис. 1. Ультраструктура підтримуючих епітеліоцитів сім'яників щурів, які отримували біоглобін-У на тлі гідрохлориду серотоніну: а – мітохондрії, що діляться, збільшення 31000; б - включення ліпідів у цитоплазмі, збільшення 36000

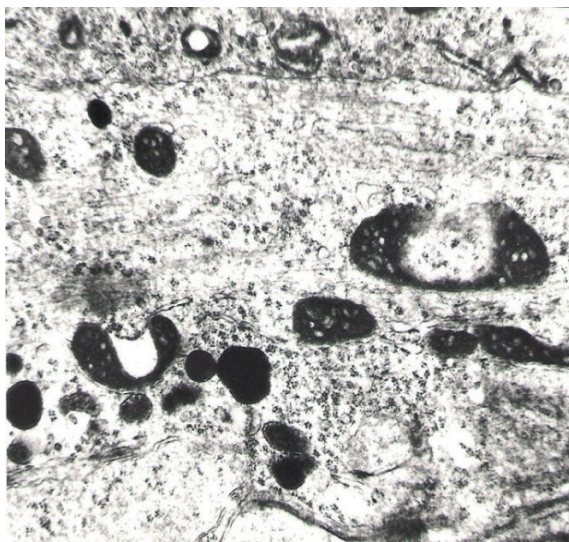
трофований. В зоні його локалізації виявлено включення ліпідів і фагоцитованого матеріалу. Цитоплазматична мембрана мала структуру, притаманну елементарній мембрані.

У препаратах зустрічалася невелика кількість підтримуючих епітеліоцитів, ультраструктура яких дистрофічна, а іноді і деструктивно порушена. Їх ядра містили переважно конденсований хроматин, брилки якого локалізувалися по периферії матриксу. Ядерна мембрана була сильно розпушена, а іноді вогнищево зруйнована. Агранулярний ендоплазматичний ретикулум був вакуолізованим, його мембрани розпушені. У цитоплазмі спостерігалася невелика кількість рибосом і полісом.

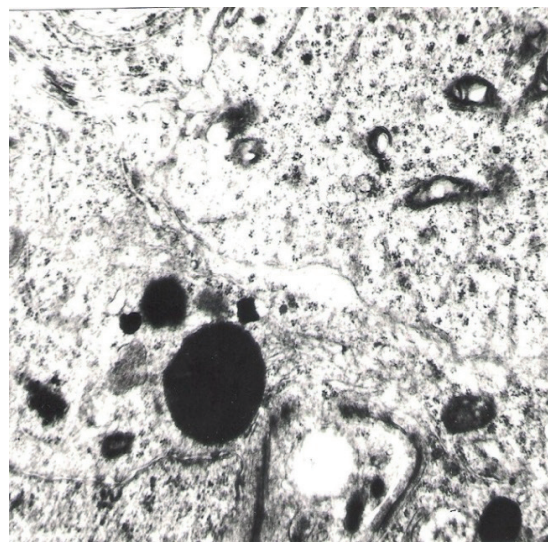
Мітохондрії розташовувалися в цитоплазмі у вигляді скупчень. Матрикс мітохондрій мав високу електронну щільність і гомогенну структуру. Кристи були сильно вкорочені. Спостерігалася осередкове розпушення і лізис зовнішніх мембран мітохондрій. У базальному відділі цитоплазми клітин Сертолі розташовувалися включення ліпідів. Цитоплазматична мембрана осміофільна і потовщена (див. рис. 1,б). Гладкий ендо-

плазматичний ретикулум представлений у вигляді дуже великих електронно-прозорих вакуолей. Найчастіше спостерігалася фрагментація його мембран. У цитоплазмі практично були відсутні рибосоми і полісоми. Пластинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі був редукованим, а його гладкі мембрани дезорганізованими. Гіалоплазма клітин Сертолі мала дуже низьку електронну щільність.

Ядра інтерстиціальних ендокриноцитів після введення біоглобіну-У на тлі гідрохлориду серотоніну містили хроматин як в конденсованій, так і в деконденсованій формах. Ядерна мембрана вогнищево розпушена, мала дрібні і глибокі інвагінації. Перинуклеарні простори дещо розширені. Вогнища деструкції ядерної мембрани практично були відсутні. Мітохондрії в клітинах Лейдіга надзвичайно відрізнялися за розмірами і формою, часто виявлялися на різних стадіях поділу. Матрикс мітохондрій мав високу електронну щільність і містив численні трубчасті кристи. Дуже рідко зустрічалися мітохондрії з вогнищами лізису зовнішньої мембрани (рис. 2,а). Плас-



а



б

Рис. 2. Ультраструктура інтерстиціальних ендокриноцитів сім'яників шурів, які отримували біоглобін-У на тлі гідрохлориду серотоніну: а - лізис зовнішніх мембран мітохондрій, збільшення 32000; б - включення ліпідів і секреторні гранули в цитоплазмі, збільшення 34000

тинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі був гіпертрофованим, його гладкі мембрани паралельно орієнтовані і зібрані в стопки. Навколо них локалізувалися скупчення дрібних електронно-прозорих везикул. Цитоплазма містила численні рибосоми, зібрані в полісоми, а також включення ліпідів і секреторні гранули (див. рис. 2,б).

Таким чином, проведене дослідження ультраструктурної організації підтримуючих епітеліоцитів і інтерстиціальних ендокриноцитів сім'яників щурів після введення гідрохлориду серотоніну показало наявність дистрофічних і деструктивних порушень, оскільки у механізмі розвитку цієї патології провідну роль відіграє вазоконстрикторна дія гідрохлориду серотоніну, що викликає подальший розвиток порушення трофіки та виникнення патологічних змін у органі.

Найбільш чутливими до негативного впливу гідрохлориду серотоніну були мітохондрії. Їх зовнішні мембрани набували розпушеного вигляду, найчастіше виявлявся вогнищевий лізис як зовнішніх мембран, так і крист, що свідчило про розвиток мітохондріальної дисфункції. Порушення біоенергетичного забезпечення синтетичних процесів структурно підтверджується редукцією пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі, зменшенням кількості рибосом і полісом у цитоплазмі, а також осередкової деструкцією мембран ендоплазматичного ретикулума. На розвиток катаболічних процесів вказує і поява в цитоплазмі клітин Сертолі і Лейдіга вторинних лізосом і включень ліпідів. Слід зазначити, що за глибиною і ступенем вираженості виявлені порушення органел лежать у межах фізіологічної компенсації і є зворотними після зняття негативного впливу гідрохлориду серотоніну.

Особливість застосування препаратів, які стимулюють метаболічні процеси, а саме біоглобіну-У, полягає в тому, що вони активують різні захисні системи організму, головним чином ферментні, імунобіологічної

реактивності, нормалізацію гормональних функцій, тощо. Завдяки індукції, репресії, інгібіції, підвищенню енергетичного рівня різних ферментів впливають на метаболізм організму, чим і пояснюється широта діапазона їхньої дії. Також біоглобін-У виявляє аналгетичну та протизапальну дію. Після його введення на тлі гідрохлориду серотоніну прослідковується незначно виражена активність репаративних і синтетичних процесів у клітинах Сертолі. Зберігалися дистрофічно змінені мітохондрії, мембрани ендоплазматичного ретикулума мали вогнища лізису, а також залишався низьким вміст рибосом у цитоплазмі, що свідчить про наявність мітохондріальної дисфункції. Спостерігався помірно редукований пластинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі, поблизу якого іноді зустрічаються включення ліпідів, що вказує на досить високий рівень активності катаболічних процесів.

Отже, у групі експериментальних тварин, які отримували біоглобін-У, істотно зростає активність метаболічних процесів у клітинах Лейдіга, що структурно підтверджується збільшенням числа рибосом, гіпертрофією пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі і збільшенням кількості секреторних гранул у цитоплазмі. Істотно зменшувалася кількість вогнищ деструкції мембран ендоплазматичного ретикулума і мембран як ядра, так і мітохондрій.

Таким чином, при введенні біоглобіну-У на тлі ураження яєчок гідрохлоридом серотоніну активність репаративних і синтетичних процесів у клітинах сім'яників зростає. Також зберігалася помірна мітохондріальна дисфункція, низький вміст рибосом у цитоплазмі і редукція пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі у щурів, які на тлі гідрохлориду серотоніну отримували препарат біоглобін-У у дозі 200 мкл/кг. Останній істотно активує метаболізм клітин Лейдіга, що структурно підтверджується збільшенням числа рибосом, секреторних

гранул, гіпертрофією пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі. Введення біоглобін-У значно знижує кількість вогнищ деструкції мембран ендоплазматичного ретикулума, ядра і мітохондрій в клітинах Сертолі та Лейдіга.

**Н. М. Бречка, В. П. Невзоров, В. А. Бондаренко,
Н. Г. Малова, Н. Ю. Селюкова**

**ИССЛЕДОВАНИЯ
СУБМИКРОСКОПИЧЕСКОЙ
АРХИТЕКТониКИ КЛЕТок СЕРТОЛИ
И ЛЕЙДИГА ПОСЛЕ ДЕСтРУКТИВНОГО
ВЛИЯНИЯ ГИДРОХЛОРИДА СЕРОТОНИНА
И ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ
МЕТАБОТРОПНЫМИ СРЕДСТВАМИ**

Представлены результаты исследования ультраструктурных изменений органелл клеток Сертоли и Лейди-га, подверженных воздействию гидрохлорида серотонина и введения биоглобина-У. Показано, что гидрохлорид серотонина вызывает на внутриклеточном уровне митохондриальную дисфункцию и активирует катаболические внутриклеточные процессы, а препарат биоглобин-У на его фоне повышает активность репаративных и синтетических реакций, снижает степень митохондриальной дисфункции и катаболических процессов, а также активирует метаболизм клеток Лейдига, и значительно снижает количество очагов деструкции мембран ендоплазматического ретикулума, мембран ядра и митохондрий.

Ключевые слова: ультраструктура клеток Сертоли и Лейдига; гидрохлорид серотонина; митохондриальная дисфункция; биоглобин-У.

**N. Brechka, V. Nevzorov, V. Bondarenko,
N. Malova, N. Selyukova**

**INVESTIGATIONS OF SUBMICROSCOPIC
ARCHITECTONICS SERTOLI AND LEYDIG
CELLS AFTER HYDROCHLORIDE
SEROTONIN DESTRUCTIVE IMPACT AND
THE POSSIBILITY OF CORRECTION BY
STIMULANTS OF METABOLIC PROCESSES**

The results of study of ultrastructural changes in the Sertoli cells and Leydig's cells organelles after destructive influence of the serotonin hydrochloride and under influence bioglobin-U have been presented. It was shown that serotonin hydrochloride causes mitochondrial dysfunction and activates intracellular catabolic processes on the intracellular level. Bioglobin-U increases the activity and reparative synthetic reactions, reduced the degree of mitochondrial dysfunction and

catabolic processes and activate the Leydig cell metabolism, and significantly reduces the number of foci destruction membranes of the endoplasmic reticulum, mitochondrial, and membranes of nucleus on the background of serotonin hydrochloride.

Key words: ultrastructure of Sertoli cells and Leydig cells; serotonin hydrochloride; mitochondrial dysfunction; bioglobin-U

*SI "V Danilevsky Institute of Endocrine Pathology
Problems of the NAMS of Ukraine", Kharkiv.*

REFERENSES

1. Bykov VL. Spermatogenesis males in the late twentieth century. Problems of reproduction. 2000; 1:6-13.
2. Gasparov A. Reproductive health. Infertility as a medical and social problem. Practical Guide. 2000; p.56.
3. Ter-Avanesov GV. Male fertility in the XXI century. Andrology and genital surgery. 2000, p.32.
4. Al-Rayess MM, Al-Rikabi AC. Morphologic patterns of male infertility in Saudi patients University Hospital experience. Saudi Med J. 2000 Jul;21(7):625-8.
5. Altay B. The effects of female age on the outcome of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with azoospermia. Int Urol Nephrol. 2002;33(1):95-9.
6. Gogolevskiy PA. Using spermatids in IVF / ICSI. Problems of reproduction. 1998; 2:5-11.
7. Korjakin MV. Analysis of the causes of male infertility. Problems of reproduction. 2000; 5:48-53.
8. Loran OB, Segal A, Pushkar D. Assisted reproductive technology in urology. Urology. 2001; 4:39-42.
9. Pshenichnikova T. Infertility Married. Medical, 1991, p. 318.
10. Raitsina SS. Modern problems of spermatogenesis. Medicine, 1982, pp.73-107.
11. Brechka NM, Nevzorov VP, Bondarenko VA, Koreneva EM, Malova NG. Violation ultrastructure of Sertoli cells and Leydig cells under the influence of serotonin hydrochloride. Problems of endocrine pathology. 2012; 2:73-9.
12. Gorpichenko I, Gurzhenko AYu. Research Tribestan efficacy in the treatment of patients with erectile dysfunction. Men's Health. 2008; 8:89-94.
13. Rossikhin VV, Kozin YI. Opportunities biocorrection in urology and andrology. Scientific and practical significance in medicine bioglobina as bionormalizatorom: scientific-practical materials. conf. with int. participation. Kharkiv, 2001, p.5-8.
14. Rossikhin VV, Kozin YI. Bioglobina evaluation of patients with chronic pyelonephritis. Scientific and practical significance in medicine as bioglobina bionormalizatorom: scientific-practical materials. conf. with int. participation. Kharkiv, 2001, pp. 9-15.
15. Gavrilouk AM, Chopyak VV, Nakonechniy AI, Kurpish MA. Male factor in the pathogenesis of female infertility.

- Medical aspects of men's health. 2012; 3(1):42-8.
16. Kulikovskii VF, Oleinik NV, Osipov PG, Stepchenko OI. Phytotherapy patients with lower urinary tract syndrome. Modern high technologies. 2009; 6:41-2.
 17. Butenko IG, Lar'yanovska YB. Correction drugs Yohimbe-genesis and Yohimbe-harmony disorders of spermatogenesis in rats caused by serotonin. Experimental and Clinical Medicine. – 2000; 3:18-21.
 18. General ethical principles of animal experimentation. Endocrinology. 2003; 8(1):142-5.
 19. Danilova L. Ultrastructural studies of spermatogenesis. Moscow: Nauka; 1978.
 20. Dedov VI. Ultrastructure of Sertoli cells and Leydig cells in rats under normal conditions and under conditions of prolonged internal exposure. Cytology. 1980; 10(22):1153-7.

Матеріал надійшов до редакції 14.03.2014

Шляхи активації перекисного окиснення ліпідів і білків при хронічній хворобі нирок

Л.В. Король

Державна установа «Інститут нефрології НАМН України», Київ; E-mail: lesyakorol@meta.ua

Досліджували спонтанне та металіндуковане окиснення ліпідів та протеїнів при моделюванні in vitro шляхів перекисного окиснення за утворенням малонового діальдегіду (МДА) та карбонільних груп протеїнів (КГП) у пацієнтів з хронічними пієлонефритом (хПН) та гломерулонофритом (хГН) без порушення екскреторної функції нирок. Встановлено, що у хворих на хПН і хГН порівняно з групою практичноздорових осіб вміст МДА в сироватці крові збільшувався у 2 та 2,3 рази відповідно, в еритроцитах – на 14 та 29%, вміст КГП – в 1,5 та 2 рази. Відмічено більш виразне зростання продукції МДА та КГП в крові у пацієнтів з хГН. Стимуляція in vitro процесів пероксидації сприяла суттєвому зростанню цих показників порівняно з базовим рівнем до стимуляції. При моделюванні аскорбат- та НАДФН-залежного шляхів пероксидації ліпідів та протеїнів констатовано збільшення продукції МДА та КГП в обох групах пацієнтів, особливо при другому шляху, що необхідно враховувати при корекції окислативних порушень та призначенні антиоксидантної терапії.
Ключові слова: окислативний стрес; перекисне окиснення ліпідів; окисна модифікація протеїнів; хронічні захворювання нирок.

ВСТУП

Останнім часом все більше досліджень присвячено вивченню механізмів розвитку окислативного стресу, що виникає як результат дисбалансу між окислативними та антиоксидантними процесами при запаленні в нирках [1–5]. Несвочасне блокування окислативних реакцій посилює негативну дію активних метаболітів кисню (АМК) на клітини нирок та призводить до переходу патологічного процесу в хронічний [3,5]. Відомо, що нормальний перебіг окиснення в організмі здійснюється двома шляхами: оксидазним та оксигеназним. Оксидазний шлях окиснення реалізується за допомогою ензимів з утворенням малоактивних продуктів та сприяє модифікації мембранних фосfolіпідів, виконуючи функції синтезу біологічно активних речовин, детоксикації, метаболізму ендогенних субстратів [6,7]. Оксигеназний шлях окиснення супроводжується утворенням вільних радикалів і

найчастіше ініціюється Fe^{2+} [8,9], має руйнівний характер, призводить до структурних порушень клітинних елементів і загибелі самих клітин [6,8]. У нормі ці процеси регулюються антиоксидантною системою. При розвитку запалення відбувається інтенсивне утворення Fe^{2+} , і внаслідок чого активується здебільшого неензимний шлях окиснення ліпідів та протеїнів [8,9].

Мета нашої роботи – дослідити шляхи активації перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та протеїнів крові у пацієнтів при хронічній хворобі нирок без порушення їх екскреторної функції.

МЕТОДИКА

Обстежено 57 хворих на хронічний пієлонефрит (хПН, I група), 42 – на гломерулонофрит (хГН, II група). До контрольної групи увійшли 30 практично здорових осіб. Після 12-годинного голодування в крові визначали активність процесів ПОЛ за накопиченням

малонового діальдегіду (МДА) при моделюванні *in vitro* Fe²⁺-індукованого неензимного (аскорбатзалежного) та ензимного (НАДФН₂-залежного) шляхів окиснення. Для ініціації використовували: середовище 1 – 25ммоль/л тріс-НСІ-буфер (рН7,4) та 20мкмоль/л FeSO₄; середовище 2 – 0,85 мл 0,1моль/л тріс-НСІ-буфера (рН7,4), по 0,05мл 1ммоль/л ЕДТА і FeSO₄ та 0,3 ммоль/л Н₂О₂; середовище 3 – 25ммоль/л тріс-НСІ-буфер (рН7,4), 20мкмоль/л FeSO₄ та 0,35мг аскорбінової кислоти (для моделювання неензимного окиснення) та середовище 4 – 25ммоль/л тріс-НСІ-буфер (рН7,4), 0,5мкмоль/л НАДФН, 2 мкмоль/л нікотинаміду, 4 мкмоль/л АДФ, 20мкмоль/л FeSO₄ (для моделювання шляху ензимного окиснення). Проби інкубували годину при 37°C, денатурували 20%-м розчином трихлороцтової кислоти та центрифугували при 3000g 20 хв. У супернатанті за реакцією з тіобарбітуровою кислотою визначали

вміст МДА на спектрофотометрі СФ-26 (λ=532нм), використовуючи коефіцієнт молярного поглинання 156000М⁻¹. До денатурованих протеїнових осадів доливали 1,0мл 0,1моль/л розчину 2,4-динітрофенілгідразину для визначення вмісту карбонільних груп протеїнів (КГП) та інкубували 1 годину, потім центрифугували при 3000g 20 хв. Отриманий осад для екстракції ліпідів і 2,4-динітрофенілгідразину, що не прореагував з КГП, промивали сумішшю етанол:етилацетат (1:1) та надалі розчиняли в 8 моль/л сечовині. В супернатанті визначали вміст КГП на спектрофотометрі СФ-26 (λ=363нм) [2,10]. В роботі було використано реактиви: 2,4-динітрофенілгідразин, ЕДТА, НАДФН, АДФ, нікотинамід фірми “Sigma-Aldrich” (США), сечовина, тріс, трихлороцтова та тіобарбітурова кислоти фірми “Merck” (Німеччина), інші були вітчизняного виробництва. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за

Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків при моделюванні шляхів окиснення в крові у пацієнтів з хронічними запальними захворюваннями нирок (M±m)

Середовище	Малоновий діальдегід, мкмоль/л				Карбонільні групи протеїнів, ум.од./мл	
	сироватка крові		еритроцити		протеїнів, ум.од./мл	
	I група	II група	I група	II група	I група	II група
До стимуляції (базовий рівень)	269±11	291±13	626±24	709±21	1,76±0,23	2,31±0,19
Інкубаційні середовища	P _н <0,01	P _н <0,01		P _н <0,01	P _н <0,01	P _н <0,01
1	361±28	392±24	760±35	883±21	1,98±0,18	3,12±0,24
	P ₆ <0,01	P ₆ <0,001	P ₆ <0,01	P ₆ <0,001 P _{I-II} <0,01		P ₆ <0,02 P _{I-II} <0,01
2	481±26	528± 21	”-----“	”-----“	3,66±0,21	6,1±0,23
	P ₆ <0,001	P ₆ <0,001			P ₆ <0,001	P ₆ <0,001 P _{I-II} <0,01
3	370±11	469±18	699±41	888±35	2,31±0,15	3,24±0,21
	P ₆ <0,001	P ₆ <0,001 P _{I-II} <0,01		P ₆ <0,01 P _{I-II} <0,01	P ₆ <0,02	P ₆ <0,01 P _{I-II} <0,01
4	427±22	498±17	757±38	919±37	2,32±0,21	3,52±0,19
	P ₆ <0,001	P ₆ <0,001 P _{I-II} <0,02	P _н <0,01	P ₆ <0,01 P _{I-II} <0,01		P ₆ <0,02 P _{I-II} <0,01

P_н<0,01 – вірогідність при порівнянні з показниками у здорових осіб

P₆<0,01 – вірогідність при порівнянні з показниками базового рівня у групі

P_{I-II}<0,01 – вірогідність при порівнянні з показниками між групами I-II

допомогою програми “Excel-7” Вірогідність різниці оцінювали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Встановлено, що у пацієнтів при хронічних хворобах нирок зростає вміст МДА в сироватці крові в 2,17 раза (в контролі 119 ± 35 , $P < 0,001$) та в еритроцитах – на 20% (в контролі 549 ± 31 , $P < 0,01$) і збільшувалася спонтанна продукція КГП у сироватці крові у 1,76 раза (в контролі $1,13 \pm 0,12$, $P < 0,02$). При аналізі показників залежно від типу запального процесу та нозології первинного ураження нирок встановлено, що для I групи порівняно з показниками у здорових людей характерно зростання спонтанної продукції МДА в сироватці крові у 2 рази ($P < 0,02$) та еритроцитах – на 14% ($P > 0,05$); а для пацієнтів II групи – збільшення вмісту МДА в сироватці крові у 2,3 раза та еритроцитах – на 29% (таблиця).

Стимуляція іонами заліза процесів ПОЛ (середовище 1) сприяла суттєвому зростанню вмісту МДА в дослідних зразках порівняно з базовим рівнем (до стимуляції): в сироватці крові в обох групах на 34%, а в еритроцитах – на 21% та 24% відповідно (див. таблицю). При інкубації з компонентами середовища 2 встановлено більш суттєве зростання вмісту МДА в сироватці крові – до 80% в обох групах пацієнтів порівняно з показниками до стимуляції. У разі ініціації аскорбатзалежного ПОЛ (середовище 3) констатовано збільшення продукції МДА (порівняно з базовим рівнем) в сироватці крові у I групі – на 37% та у II групі – на 61%; а в еритроцитах вірогідно лише у II групі – на 25%. При аналізі результатів моделювання НАДФН-залежного ПОЛ (середовище 4) у I групі спостерігали зростання вмісту МДА в сироватці крові на 58% та еритроцитах – на 20% порівняно зі значеннями до стимуляції; у II групі цей показник у сироватці крові зростає на 71%, а в еритроцитах – на 31%. Отже, для обох груп пацієнтів характерна активація процесів

окиснення за аскорбат- та НАДФН-залежними шляхами, що підтверджується збільшенням вмісту МДА та окиснення ліпідів за умов моделювання цих процесів. Проте для пацієнтів II групи характерна найвиразніша активація обох шляхів окиснення.

При оцінці ступеня окиснення протеїнів встановлено зростання в 1,5 раза спонтанної продукції КГП у сироватці крові у I групі та вдвічі у II групі порівняно з показниками групи практично-здорових осіб. В умовах стимуляції окиснення протеїнів (інкубації зразків сироватки крові з компонентами середовища 2) вміст КГП зростає двічі у I групі та в 2,6 раза – у II групі порівняно зі спонтанним рівнем окиснення протеїнів в групах (див. таблицю). Оцінюючи ступінь окисної модифікації протеїнів в зразках крові, що були денатуровані після моделювання шляхів окиснення з компонентами середовищ 3 та 4, відмічено збільшення вмісту КГП у I групі – на 31% та II групі – на 40% (при моделюванні неензимного окиснення) і на 50% (при стимуляції ензимного окиснення). Отже, отримані результати свідчать про помірну активацію процесів окисної модифікації протеїнів при ініціації обох шляхів окиснення і характеризуються збільшенням вмісту КГП на тлі активації ПОЛ в обох групах пацієнтів. Слід відмітити, що найбільше накопичення МДА та КГП спостерігалось саме при моделюванні НАДФН-залежного окиснення та при наявності імунно-запального процесу в нирках (група II).

Отже, при розвитку запальних захворювань нирок в крові пацієнтів процеси ПОЛ активуються двома шляхами: аскорбатзалежним (аскорбінова кислота регенерує іони за рахунок зворотного відновлення Fe^{3+} до Fe^{2+}) і НАДФН-залежним (де донорами електронів є молекули НАДФН₂). Особливість неензимного окиснення полягає в тому, що воно практично не відбувається за відсутності металів зі змінною валентністю, зокрема Fe^{2+} , які ініціюють ланцюгові вільнорадикальні реакції [9]. Відомо, що оксидази здатні генерувати АМК, котрі в свою чергу

або утилізуються антиоксидантною системою, або зумовлюють неензимне окиснення ліпідів. Також показано, що деякі оксигенази, для яких субстратами є жирні кислоти, здатні активувати одночасно обидва шляхи окиснення [2,8]. Доведено, що НАДФН-залежний шлях ПОЛ пов'язаний з участю ліпоксигеназ і циклооксигеназ, що каталізують окиснення арахідонової, лінолевої та ліноленової кислот з утворенням циклічних та аліфатичних пероксидів [7]. Циклооксигенази запускають реакції утворення вільних радикалів (неензимним шляхом) і також впливають на синтез простагландинів і тромбоксанів. Простагландини в свою чергу впливають на проникність клітинних мембран і на процеси реабсорбції в нирках, а тромбоксани регулюють функції тромбоцитів, стимулюючи їх агрегацію, особливо при розвитку запальних реакцій [4,6]. Ліпоксигенази окиснюють жирні кислоти, перетворюючи їх на лейкотрієни, що продукуються лейкоцитами, регулюють хемотаксис гранулоцитів і стимулюють фагоцитоз. Фагоцитуючі клітини, маючи низьку активність НАДФН-оксидази, проявляють слабку бактеріцидну здатність [7]. До того ж, активація утворення АМК лежить в основі апоптозної і некрозної загибелі клітин, захисної функції нейтрофілів при запальних реакціях [4,6].

Зазвичай, реакції неензимного окиснення блокуються аскорбатом, а окиснені форми аскорбінової кислоти відновлюються глутатіоном за рахунок атомів водню від НАДФН₂, який утворюється при ензимному окисненні, а каталізують ці реакції – глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза та каталаза, підтримуючи таким чином ПОЛ на надзвичайно низькому рівні [8,10]. Водночас тривала інтенсифікація процесів окиснення призводить до виснаження антиоксидантного резерву (дефіциту вітамінів Е, С, В-каротину, глутатіону, селену, зниження активності каталази, глутатіонпероксидази), що й було описано при хГН та хПН раніше [2,3]. У сироватці крові вільні радикали нейтралізуються церулоплазміном, який зменшує пул

Fe²⁺ і блокує ланцюгові реакції неензимного окиснення [6]. Зниження активності церулоплазміну сприяє ініціації реакцій неензимного окиснення ліпідів, що й доведено нашими результатами (накопичення МДА і активізація неензимного шляху ПОЛ) та узгоджено з даними попередніх досліджень щодо змін (зниження активності і вмісту) цього ензиму на фоні гіперактивації процесів ПОЛ у хворих з хГН та рецидивуючим хПН [3,10].

Активізація ензимного окиснення окрім циклогеназно-ліпоксигеназного комплексу також пов'язана і з імунологічними реакціями, що розвиваються при запальному процесі в нирках, та супроводжуються звільненням медіаторів запалення; активацією протеаз крові та активацією комплементу. Показано, що при хГН спостерігається відкладення в мембранах ниркового епітелію похідних компонента С3, а у плазмі крові хворих виявляється фактор, що його активує [5]. Збільшення вмісту медіаторів запалення, підвищене утворення АМК нейтрофілами і макрофагами активує каспази, що стимулюють апоптоз. Формування запальної реакції у відповідь на проникнення в тканини патогенів відбувається за участі прозапальних цитокінів-інтерлейкінів (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-23), що активно синтезуються при запаленні і посилюють спрямовану міграцію лейкоцитів у вогнище запалення, фагоцитоз і продукцію АМК (це є активним захисним механізмом та основою неспецифічного імунітету) [4,6]. Також АМК стимулюють рецептори клітин, що індукують продукцію прозапальних цитокінів та експресію адгезивних молекул. Однак надмірне їх утворення призводить до швидкого руйнування клітин нирки та є основою патогенезу хГН та хПН [1,4,5,9]

Отже, з одного боку, переокиснене окиснення є нормальним фізіологічним процесом, а його роль полягає у відновленні біологічних мембран, іонного транспорту, регуляції активності ензимів; з іншого – підвищення рівня ПОЛ чи окиснення протеїнів спостерігається при багатьох патологіях, а їх про-

дукти є відповідальними за пошкодження клітин і тканин. До того ж, пошкоджені тканини схильні до перекисного окиснення більшою мірою, ніж здорові, а причиною цього є інактивація деяких антиоксидантів, витік їх з пошкоджених клітин і виділення іонів металів (особливо заліза і міді) з місць їх накопичення в клітинах [6,9]. Утворені продукти ПОЛ також здатні впливати на процеси окиснення протеїнів, при цьому ліпідні радикали та АМК, атакуючи протеїнові компоненти, забезпечують фізіологічну відповідь на активацію ПОЛ. За фізіологічних умов може відбуватися металіндуковане окиснення протеїнів за допомогою впливу металів перемінної валентності, зокрема Fe^{2+} , на пероксид водню, що призводить до утворення більш агресивного $\cdot OH$, який надалі реагує з функціональними групами амінокислотних залишків та модифікує їх, утворюючи карбонільні похідні. Окисненням протеїнам притаманна підвищена чутливість до протеолізу. Модифіковані протеїни частіше атакуються протеазами [4,6]

Таким чином, при розвитку запальних захворювань нирок у крові пацієнтів активація ПОЛ відбувається неензимним та ензимним шляхами, при цьому більше ушкоджуються ліпідні компоненти та утворюються ліпідні пероксиди, що слід враховувати при корекції оксидативних порушень у пацієнтів з хПН та хГН при призначенні відповідних антиоксидантних препаратів, що здатні блокувати їх розвиток. Встановлено, що наявність запального процесу в нирках призводить до активації ПОЛ та окисної модифікації протеїнів крові з виникненням помірного синдрому ендогенної інтоксикації їх продуктами.

Л.В. Король

ПУТИ АКТИВАЦІЇ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ І БЕЛКІВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПОЧЕК

Исследовали спонтанное и металлиндуцированное окисление липидов и белков при моделировании *in vitro* путей перекисного окисления по образованию малонового

диальдегида (МДА) и карбонильных групп протеинов (КГП) у пациентов с хроническим пиелонефритом (хПН) и гломерулонефритом (хГН) без нарушения экскреторной функции почек. Установлено, что в крови пациентов при хПН и хГН по сравнению с практически здоровыми особами возрастало содержание МДА в сыворотке крови в 2 и 2,3 раза, в эритроцитах – на 14 и 29%, уровень КГП – в 1,5 и 2 раза соответственно. Более значительное повышение содержания МДА и КГП отмечено у пациентов с хГН. Стимуляция *in vitro* процессов перекисной окисления способствовала существенному росту продукции МДА по сравнению с базовым уровнем до стимуляции. При моделировании *in vitro* аскорбатзависимого и НАДФН-зависимого путей перекисного окисления липидов и белков констатировано увеличение продукции МДА и КГП у обеих групп пациентов, особенно при инициации НАДФН-зависимого пути, что необходимо учитывать при коррекции оксидативных процессов и назначении антиоксидантной терапии.

Ключевые слова: оксидативный стресс; перекисное окисление липидов; окислительная модификация белков; хронические заболевания почек

L.V. Korol

MODELING IN VITRO PATHWAYS OF ACTIVATION OF LIPID PEROXIDATION AND PROTEIN IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

We studied the spontaneous and metal induced oxidation of lipids and proteins in *in vitro* modeling ways of lipid peroxidation and blood proteins in the formation of malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl groups (PCG) in 86 patients with chronic pyelonephritis (cPN) and 64 patients chronic glomerulonephritis (cGN) without prejudice excretory function of the kidneys. Installed the increase in the blood of patients with cPN MDAs 2 times, MDAe –14%, PCG 1.5 times; and cGN – MDAs 2.3 times, MDAe –29%, PCG – 2 times. Found increased MDA content and PCG in the blood of patients with cPN and more expressive when cGN. Stimulation of *in vitro* peroxidation processes contributed significantly increased of production of MDA compared with baseline. In the modeling *in vitro* ascorbate-dependent and NADPH-dependent lipid peroxidation ways and the increase in protein production of MDA and PCG in both groups of patients, especially in the NADPH-dependent way, which must be considered in the correction of oxidative processes and antioxidant therapy appointment.

Key words: oxidative stress; lipid peroxidation; oxidative modification of proteins; chronic kidney disease

SI «Institute of Nephrology of NAMS of Ukraine», Kyiv

REFERENCES

1. Driyanska VE, Stepanova NM, Haysenyuk FS, Rudenko MU. The impact on performance Nucleinat immunity

- and lysosomal enzymuriy in patients with pyelonephritis. Immunol and Allergol: Science and Practice. 2013; 4 : 4-9. [Ukrainian].
2. Romadanova AI. Features of cellular metabolic mechanisms of oxidative homeostasis in the progression of CKD stages. Vist Probl Biol and Med. 2011; 89(3):107-13. [Ukrainian].
 3. Stepanova NM, Korol LV, Kundin VY, Myhal LA, Romanenko OA Oxidative processes in patients with recurrent pyelonephritis and how their relationship with areas of sclerosis of the renal parenchyma. Ukr J Nephrol. and Dial. 2012; 3: 12-7. [Ukrainian].
 4. Cachofeiro V, Goicochea M, Garcia de Vinuesa, Oubina P, Lahera V Luno J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic renal disease and cardiovascular disease. Kidney Int.2008;74:4-9.
 5. Kao MP, Ang DS, Pall AD. Struthers Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. J Hum Hypertens. 2010; 24(1): 1–8.
 6. Klenowa NA Biochemistry of pathological conditions. Samara: Publishing house «Samara University»; 2006. [Russian].
 7. Roberts C.K. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. Metabolism. 2006; 55: 928-34.
 8. Vladimirov YA, Archakov AI. Lipid peroxidation in biomembranes, Moscow : Nauka, 2003.[Russian].
 9. Halliwell B. Oxygen toxiciti, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemistry. 2004; 215: 1-14.
 10. Korol LV, Myhal LY, Nikulina GG, Kolesnik MO Biochemical methods for assessing oxidative status in patients with chronic kidney disease: Guidelines. Kyiv; 2013. [Ukrainian].
 11. Jones Dean P. Radical-free biology of oxidative stress Am J Physiol Cell Physiol. 2008; 295: 849-68.

*Матеріал надійшов
до редакції 10.02.2015*

Спектральні показники варіабельності ритму серця у студентів з різним ступенем навчального навантаження

О.В. Гулька

Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка;
E-mail: olga_gulka@mail.ru

У статті проаналізовано зміну спектральних показників варіабельності ритму серця студентів різних спеціальностей (I група – «Іноземні мови», II – «Фізика і математика», III – «Хімія і біологія», IV – Фізичне виховання) під впливом умов навчальної та практично-прикладної діяльності. Встановлено, що під час навчання у жінок усіх груп досліджувані показники знижувались, а у студенток IV групи низькочастотні коливання (LF) зросли майже в 2 рази ($P \leq 0,05$) паралельно із зменшенням низькочастотних (VLF) (з 902 [497; 1417] до 516 [401; 723] мс^2 , $P \leq 0,05$). Під час проходження практики у студенток I групи вірогідно зростав показник вегетативного балансу низько- та високочастотного спектра (LF/HF) (з 1,47 [0,88; 1,80] до 1,63 [1,18; 3,15] ум. од.) та усі досліджувані показники мали тенденції до збільшення ($P \geq 0,05$). Ріст загальної потужності спектра (з 1969 [1298; 2398] до 3273 [1874; 4568] мс^2 , $P \leq 0,05$) у жінок III групи свідчив про посилення активності автономного контура регуляції. У студенток II та IV груп тенденції до зменшення мали показники HF, VLF, TP та до збільшення – LF й LF/HF ($P \geq 0,05$). Зміни спектральних показників вказують на посилення симпатикотонічних впливів та зниження адаптивних можливостей в організмі жінок IV групи під впливом психоемоційного напруження у поєднанні із розумовим та фізичними навантаженнями.

Ключові слова: варіабельність ритму серця; спектральні показники; вегетативна нервова система; симпатична та парасимпатична ланки регуляції; студенти педагогічного вищого навчального закладу.

ВСТУП

Дослідження адаптації людини до стресогенних факторів природного та соціального (включно виробничого) походження є актуальним, оскільки має не лише теоретичне значення, але й прикладне (медицина, педагогіка, ергономіка) [1, 2]. Функціональний стан організму сучасної людини формується на тлі реалізації певного виду діяльності [3, 4]. Становлення молодого фахівця – це довготривалий процес набуття не лише фахових компетенцій, але й формування адаптації до комплексу вимог та умов майбутньої професії.

Стресогенність професійної діяльності розглядається дослідниками крізь призму оцінки змін варіабельності ритму серця

© О.В. Гулька

(BPC) [1, 5]. Зміна в BPC вказує на зрушення гемодинамічних, метаболічних та енергетичних показників функціонування організму – прогностична ознака у виявленні передпатологічних та патологічних станів та виступає критерієм виділення груп ризику за станом здоров'я [6–8].

Інтерпретація показників BPC базується на уявленнях про регуляторні впливи на серце відділів вегетативної нервової системи (ВНС), підкіркового серцево-судинного центру та вищих рівнів управління фізіологічними функціями [8–10]. Хвильова природа серцевого ритму визначається періодичністю тривалості кардіоінтервалів, які формуються пейсмекерними клітинами синусного вузла. З ритмограми низки кардіоінтервалів (R-R-

інтервалів) у результаті перетворень Фур'є отримують частотний спектр періодичних коливань, в якому прийнято виділяти три діапазони: дуже низькочастотний спектр (VLF), низькочастотний (LF) та високочастотний (HF) [11, 18].

Хвильова структура кардіоритму (високо- та низькочастотні компоненти) дає змогу оцінити стан вегетативної нервової системи та баланс між її відділами [6, 8]. HF-коливання пов'язані з дихальною періодикою і відображають переважаючий вплив парасимпатичного відділу на серцевий м'яз. LF-коливання пов'язані з активністю постгангліонарних симпатичних волокон [9]. VLF-коливання пов'язують з активністю гіпоталамічних центрів, які генерують повільні ритми через симпатичну ланку регуляції [7, 8, 11].

Кількісна оцінка методу ВРС дає змогу неінвазивно вивчати вегетативний статус учнів і студентів у процесі навчання, контролювати розвиток пристосувальних реакцій до умов діяльності та прогнозувати розвиток адаптаційних змін при психоемоційному навантаженні [10, 12, 13].

Середовище, в якому перебуває студент, є лише зовнішнім стресовим фактором, що запускає саморегульовальні механізми, які змінюють функціональні системи організму на метаболічному та гомеостатичному рівнях [2, 14, 15].

Мета роботи – дослідити динаміку спектральних показників студентів різних спеціальностей, що дають можливість виявити відмінності розвитку пристосувальних змін в організмі та оцінити вплив регуляторних механізмів на формування серцевого ритму в умовах навчального середовища та практичної діяльності (специфічних для кожної спеціальності).

МЕТОДИКА

Обстежено 57 студенток, яких відповідно до спеціальностей було поділено на групи: «Іноземні мови» (I група, n=21), «Фізика і ма-

тематика» (II група, n=13), «Хімія і біологія» (III група, n=15), «Фізичне виховання» (IV група, n=8). Студенти різних спеціальностей обрані з огляду на різну складність змісту та відмінність спеціалізованої навчальної діяльності, неоднакову інтенсивність фізичного і розумового навантаження. Студентки I групи повинні володіти: навичками спілкування і взаємодії з людьми (установлення контакту); вербальними здібностями (уміння зв'язано і чітко викладати свої думки, добре поставлена мова, багатий словниковий запас); високим рівнем розвитку пам'яті (здатність запам'ятовувати факти, викладені співрозмовником). Опрацьовуючи значний обсяг навчального матеріалу, студентки дотримуються малорухомого способу життя. Для жінок II групи характерною є діяльність, яка вимагає тривалого статичного напруження при роботі за комп'ютером, володіння гарною пам'яттю на числа і символи, здатності зосереджуватися і тривалий час зберігати увагу на визначеному об'єкті або виді діяльності, високого рівня концентрації, розподілу і переключення уваги. Під час навчання особи III групи повинні: володіти здатністю тривалий час зосереджуватися на одному об'єкті, предметі, не відволікаючись на інші; здатністю до екстраполяції; високою точністю дрібної моторики; уміти аналізувати і систематизувати велику кількість інформації. Студентки IV групи повинні бути добре фізично підготовленими (їх навчальна діяльність проходить в умовах високого рухового режиму), здатними до вольового саморегулювання, володіти високим рівнем розвитку моторної (рухової) пам'яті та мати глибокі медико-біологічні знання [16].

Для аналізу розвитку пристосувальних змін в організмі обстежуваних використовували показники ВРС, що були отримані за допомогою комп'ютерного діагностичного комплексу «Омега-М» (Санкт-Петербург, Росія). Проводили короткі 5-хвилинні записи у II стандартному відведенні (реєструвалось 300 кардіоінтервалів) з 8 до 13 год із дотриманням стандартних вимог [11, 17].

Студенток обстежували під час навчання на I курсі (жовтень 2006 р), потім на IV курсі в період навчання (жовтень 2009 р) та проходження педагогічної практики (грудень 2009 р). На момент обстеження яскраво виражених хронічних соматичних захворювань та інвалідностей не зафіксовано.

Аналізували такі спектральні показники: HF (0,15-0,40 Гц) – пов'язаний з дихальною аритмією і відображає вагусний контроль серцевого ритму (квадратні мілісекунди); LF (0,04-0,15 Гц) – характеризує симпатичну модуляцію серцевого ритму і вказує на стан активності вазомоторного центру довгастого мозку (квадратні мілісекунди); VLF (0,003-0,04 Гц) – індикатор керування метаболічними процесами, що відображає вплив надсегментарного рівня регуляції, психоемоційного стану та функціонального стану кори головного мозку (квадратні мілісекунди); TP – відображає сумарну активність нейрогуморальних впливів на серцевий ритм, (квадратні мілісекунди); LF/HF – вказує на баланс між симпатичною і парасимпатичною ланками ВНС (умовні одиниці, ум.од.) [7, 11, 18].

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою пакета програми Statistica 6.0 та Microsoft Excel for Windows XP. Оскільки показники мали ненормальний розподіл, то результати описували медіаною та інтерквартильним розмахом (25-й і 75-й перцентилі). Відомо, що медіана описує типове значення для вибірки з ненормальним розподілом [19], тому середнє сумарне значення показника загальної потужності спектра не завжди збігається із значенням медіани. Достовірність відмінностей між групами визначали за непараметричними критеріями: для порівняння незв'язаних вибірок критерій Краскела–Уоліса, зв'язаних – Вілкоксона [19].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При оцінці незв'язаних вибірок за критерієм Краскела–Уоліса відмінності по групах були

виявлені за показниками VLF та LF ($P \leq 0,05$). Отже, студентки різних спеціальностей відрізняються за характером активності симпатикотонічних впливів і включення вищих надсегментарних рівнів регуляції.

Стресогенними факторами, які викликають вегетативні зміни функціонування організму студентів від курсу до курсу, є умови навчання (рівень інтелектуального та фізичного навантаження, кількість аудиторних занять, санітарно-гігієнічні умови, розпорядок дня, тривалість розумово-інтелектуальної діяльності тощо) [5, 13] та специфіка дисциплін (обсяг інформації, характер практичних і лабораторних занять, руховий режим) [4, 13], а під час педагогічної практики – специфічний практичний характер діяльності.

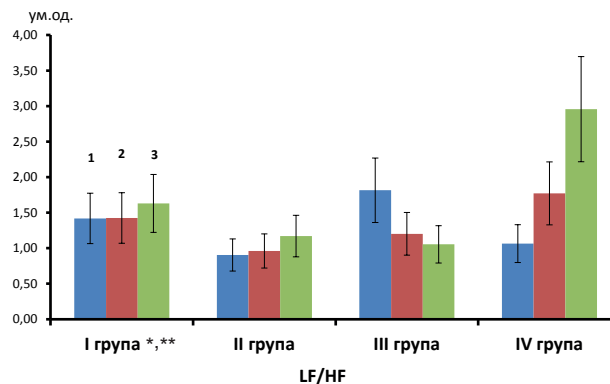
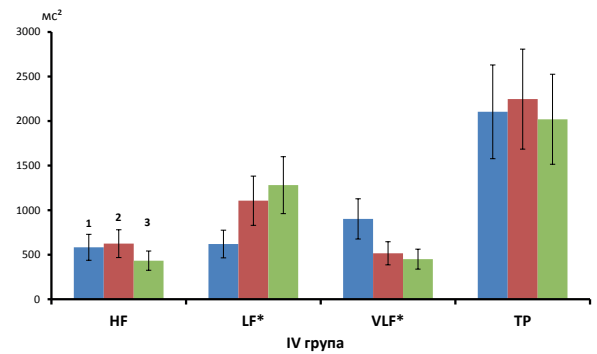
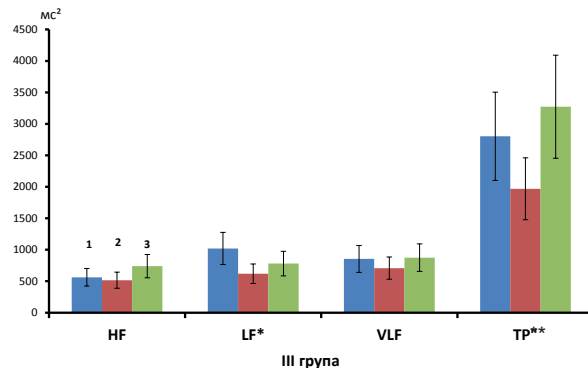
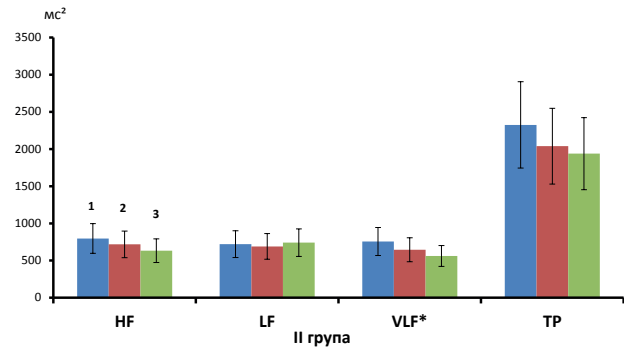
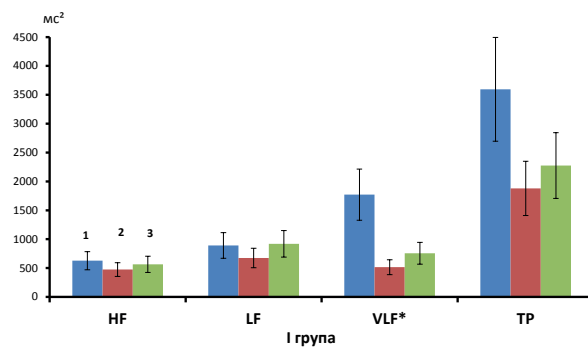
Усвідомлення власних можливостей у навчальній діяльності та правильності обраного фаху накладає відбиток на формування адаптивних змін в організмі студентів [12–14].

Згідно з результатами, представленими на рисунку 1, значення HF у студенток усіх груп вірогідно не змінювалось. У жінок I групи під час навчання (з I по IV курс) спостерігали достовірне зниження показника VLF з 1771 [1131; 2267] до 515 [329; 1045] мс^2 та збільшення показника вегетативного балансу LF/HF з 1,42 [1,09; 3,64] до 1,47 [0,88; 1,80] ум.од. ($P \leq 0,05$). Тенденцію до зниження мали показники HF, LF та загальної потужності спектра TP ($P \geq 0,05$). В умовах практично-прикладної діяльності значення усіх досліджуваних показників мали тенденції до збільшення ($P \geq 0,05$). Значення LF/HF зросло з 1,47 [0,88; 1,80] до 1,63 [1,18; 3,15] ум.од. ($P \leq 0,05$)

У жінок II групи під час навчання VLF знижувався з 756 [581; 1232] до 645 [421; 1137] мс^2 ($P \leq 0,05$). Тенденції до зниження мали HF, LF, TP ($P \geq 0,05$). За час проходження практики спектральні показники продовжували знижуватись ($P \geq 0,05$), крім LF, який мав тенденції до збільшення ($P \geq 0,05$). Показник вегетативного балансу також мав тенденції до збільшення ($P \geq 0,05$).

У старшокурсниць III групи, порівняно з 1-м роком навчання, майже вдвічі зменшився LF – з 1020 [592; 1402] до 620 [375; 822] мс², (P<0,05). Інші показники мали тенденції до зниження (P≥0,05). Під час практики достовірно зріс показник TP з 1969 [1298; 2398] до 3273 [1874; 4568] мс² (P<0,05); інші показники мали тенденцію до зростання (P≥0,05). Значення LF/HF зменшувалось (P≥0,05), як в умовах навчальної діяльності, так і педагогічної практики.

У період навчання у жінок IV групи спостерігали збільшення LF з 620 [456; 2026] до 1106 [613; 1368] мс² (P<0,05) та зниження VLF з 902 [497; 1417] до 516 [401; 723] мс² (P<0,05). Інші досліджувані показники (HF, TP, LF/HF) мали тенденції до зростання (P≥0,05). Під час практики показники HF, VLF, TP мали тенденції до зменшення (P≥0,05), а LF та LF/HF – до зростання (P≥0,05).



Динаміка спектральних показників студентів різних груп. 1 – 1-й курс, 2 – 4-й курс, до практики, 3 – 4-й курс після практики. *P<0,05 щодо показників 1-го і 4-го курсів до практики; ** P<0,05 щодо показників 4-го курсу до і після практики

Варто зауважити, що адаптація до умов навчання відбувається паралельно із завершенням формування зрілості фізіологічних систем та структур організму [20]. Про це свідчать зміни VLF, який пов'язують із активністю нейрогуморальних впливів [9, 8]. У студенток усіх груп він знижується.

Зниження TP протягом навчання з I по IV курсу у жінок I, II та III груп спостерігалось внаслідок зменшення значень високо-, низько- та дуже низькочастотного показників. У студенток IV групи TP зростав за рахунок збільшення показників HF ($P \geq 0,05$) та LF ($P \leq 0,05$), що свідчить про несуттєвий вплив дихальної періодики на серцевий ритм, активізацію вазомоторного центру й посилення симпатикотонічної ланки регуляції при зниженні активності церебрально-ерготропних впливів.

Зменшення TP і VLF можна пояснити розвитком втоми і поступового вичерпання функціональних резервів на тлі психоемоційного напруження, яке виникає в умовах навчальної діяльності [3, 4, 13].

Педагогічна практика дає змогу студентам зрозуміти й усвідомити власну професійну спроможність, що проявляється в інтелектуальному та фізичному напруженні під час здійснення фахової діяльності. Це сприяє формуванню в організмі адаптивних змін, що забезпечують функціонування систем для підтримки вегетативного гомеостазу в стресових умовах [12, 21].

У жінок I та III груп значення TP в умовах практики зростало унаслідок збільшення значень усіх складових спектра. В останніх збільшення показника TP з 1969 [1298; 2398] до 3273 [1874; 4568] мс² ($P \leq 0,05$) може свідчити про посилення активності автономного контура регуляції та розвиток адаптивних змін із мінімальним залученням функціональних резервів організму. На це вказує і поступове зміщення вегетативного балансу в бік зменшення симпатoadреналової активності – показник LF/HF знижується ($P \geq 0,05$). У студенток I групи зростання LF/HF ($P \leq 0,05$) вказує на посилення симпатикотонічних впливів.

У обстежених II та IV груп тенденції до зниження TP були результатом зменшення внеску HF та VLF на тлі активізації симпатичних впливів – зростання LF ($P \geq 0,05$). В умовах практично-прикладної діяльності регуляція серцевого ритму відбувалася під впливом неспецифічних механізмів, коли зростає потужність не HF-хвиль, а активність вазомоторного центра (LF), що свідчить про посилення симпатикотонічної модуляції у формуванні серцевого ритму [7, 8]. Про це вказує і зростання показника вегетативного балансу LF/HF ($P \geq 0,05$).

Студентки на I та IV курсах належать до однієї вікової групи (період юнацького віку 16–20 років) [20], тому можна вважати, що ВСР змінюється під впливом стресових умов навчального середовища. Адаптація під час навчання протікала зі зниженням активності церебральних ерготропних впливів, на що вказувало зменшення показника VLF ($P \leq 0,05$) у студенток усіх груп. Відповідно до отриманих результатів провідну роль у формуванні пристосувальних реакцій відігравала симпатoadреналова ланка регуляції. Напруження регуляторних систем організму спостерігали у студенток I, II та IV груп, що проявилось у зміщенні вегетативного балансу в бік переважання симпатичної модуляції ритму серця.

Під час педагогічної практики навчальна діяльність змінюється на практично-прикладну, що зумовлює високе психоемоційне напруження. Жінки I, II та IV груп мали показники, які можуть вказувати на розвиток енергодефіцитного стану при посиленні симпатoadреналової активності: HF, VLF, TP мали тенденції до зменшення у студенток III і IV груп та до збільшення – I групи ($P \geq 0,05$); LF мав тенденції до збільшення в усіх групах ($P \geq 0,05$). Вірогідне зростання показника вегетативного балансу (LF/HF) з 1,47 [0,88; 1,80] до 1,63 [1,18; 3,15] ум.од. ($P \leq 0,05$) у жінок I групи вказувало на активізацію симпатичної ланки регуляції. Проте найбільшим значення LF/HF було у студенток IV групи – 2,96 [0,82; 3,92] ум.од.

Стресогенність навчальної та практичної діяльності найменше відчували студентки III групи, що проявилось у зниженні активності симпатикотонічних впливів на серцевий ритм: LF – зменшувався в умовах навчання з 1020 [592; 1402] до 620 [375; 822] ms^2 ($P \leq 0,05$) та несуттєво зростав за час практики; поступово знижувався показник LF/HF ($P \geq 0,05$). Отримані результати можна пояснити впливом специфіки фахової підготовки майбутніх вчителів хімії та біології, яка передбачає використання різних видів діяльності під час польових практик.

Посилення активності симпатичної ланки регуляції при тривалому психоемоційному навантаженні може призвести до напруження регуляторних систем організму та нерационального використання функціональних резервів і, як наслідок, до низького рівня адаптаційних можливостей і розвитку дезадаптації [8, 9]. Оцінюючи зміни спектральних показників ВРС, студентів досліджуваних груп можна розташувати в порядку зниження адаптивних можливостей організму: III група («Хімія і біологія») > II група («Фізика і математика») > I група («Іноземні мови») > IV група («Фізичне виховання»). Отже, інтенсивні розумові та фізичні навантаження в період професійного становлення сприяють формуванню психоемоційного напруження і можуть бути передумовами розвитку дезадаптивних змін в організмі майбутніх педагогів.

О.В. Гулька

ДИНАМИКА СПЕКТРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВАРИАбельНОСТИ РИТМА СЕРДЦА СТУДЕНТОВ С РАЗНЫМ ХАРАКТЕРОМ УЧЕБНОЙ НАГРУЗКИ

В статье проанализированы изменения спектральных показателей variability ритма сердца студентов в условиях учебной деятельности и педагогической практики. Установлено, что во время обучения у женщин всех исследованных групп показатели снижались, а у студенток «Физического воспитания» значение LF увеличилось почти вдвое ($P \leq 0,05$) параллельно с уменьшением VLF (с 902 [497; 1417] до 516 [401; 723] ms^2 , $P \leq 0,05$). Во время прохождения практики, у студенток «Иностранные языки» вы-

рос показатель вегетативного баланса LF/HF (с 1,47 [0,88; 1,80] до 1,63 [1,18; 3,15] усл. ед., $P \leq 0,05$) и все исследуемые показатели имели тенденции к увеличению ($P \geq 0,05$). Рост общей мощности спектра (с 1969 [1298; 2398] до 3273 [1874; 4568] ms^2 , $P \leq 0,05$) у женщин специальности «Химия и биология» свидетельствовал об усилении активности автономного контура регуляции. У студенток специальности «Физики и математики» и «Физического воспитания» тенденции к уменьшению имели показатели HF, VLF, TP и к увеличению – LF и LF/HF ($P \geq 0,05$). Изменения спектральных показателей указывают на усиление симпатикотонических влияний и снижение адаптационных возможностей в организме женщин «Физического воспитания» под влиянием психоэмоционального напряжения от учебных и физических нагрузок.

Ключевые слова: вариабельность ритма сердца; спектральные показатели; вегетативная нервная система; симпатический и парасимпатический отделы регуляции; студенты педагогического вуза.

O.V. Hulka

DYNAMICS OF SPECTRAL INDEXES OF HEART VARIABILITY RATE OF THE STUDENTS WITH DIFFERENT CHARACTER OF THE EDUCATIONAL LOADING

It has been analyzed in the article the change of spectral parameters of heart rate variability of the students of various disciplines influenced by conditions of educational and practical activities. It has been established that during training for women of all groups the studied parameters were reduced, and the students of «Physical culture» value LF increased almost in 2 times ($P \leq 0,05$) in parallel with a decrease of VLF (of 902 [497; 1417] to 516 [401; 723] square milliseconds $P \leq 0,05$). During the internship in students of «Foreign Languages» significantly increased rate of vegetative balance LF/HF (from 1,47 [0,88; 1,80] to 1,63 [1,18; 3,15] standard units, $P \leq 0,05$) and all the studied parameters tended to increase ($P \geq 0,05$). The growth of total power of spectrum (1969 [1298, 2398] to 3273 [1874; 4568] square milliseconds $P \leq 0,05$) in women specialty «Chemistry and Biology» testified to the increased activity of independent regulation circuit. In the students' «Physics and Mathematics» and «Physical Education» downward trend indicators had HF, VLF, TP and to increase – LF and LF / HF ($P \geq 0,05$). Changes of spectral indices point to strengthen sympathyktonic impacts and reduction of adaptive capacity in women «Physical Education» experiencing psycho-emotional tension combined with mental and physical load.

Keywords: heart variability rate, spectral indexes, vegetative nervous system, sympathetic and parasympathetic links of regulation, students of pedagogical higher educational establishment.

Ternopil V. Hnatyuk National Pedagogical University.

REFERENCES

1. Guazzi M, Faggiano P, Mureddu GF, 2014. Worksite health and wellness in the European union. *Prog Cardiovasc Dis.* Mar-Apr. 56(5): 508–514.
2. Sorokin AV, 2007. Dr Med Sci. Abstract dis. Chelyabinsk, 46 p. [Russian].
3. Shook NJ, Fazio RH, Vasey MW, 2007. Negativity bias in attitude learning: a possible indicator of vulnerability to emotional disorders? *J Behav Ther Exp Psychiatry.* 38: 144-55.
4. Bernada VV, 2008. Kand. biol. sci. abstrat dis. Kyiv, 20 p. [Ukrainian].
5. Bulateckij SV. Prognostic significance of heart variability rate at the psychoemotional trial in groups with different success of vocational training. In: *Actual issues of Clinical and Experimental Pathology.* Ryazan: RyazGMU, 2005, P. 20-7. [Russian].
6. Suls J, 2013. Anger and the heart: perspectives on cardiac risk, mechanisms and interventions. *Prog Cardiovasc Dis.* May-Jun, 55(6):538-47.
7. Weber CS, Thayer JF, Rudat M, Wirtz PH, 2010. Low vagal tone is associated with impaired post stress recovery of cardiovascular, endocrine, and immune markers. *Eur J Appl Physiol.* 109: 201-11.
8. Baevskij PM, Ivanov GG. Heart variability rate: theoretical aspects and clinical applications (Eds SV Grachev, GG Ivanov, AL Syrkin). Moscow: Tehnosfera, 2007, P. 473-496. [Russian].
9. Thayer JF, Ahs F, Fredrikson M, Sollers JJ, Wager TD, 2012. A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: Implications for heart rate variability as a marker of stress and health. *Neurosci and Biobehavioral Rev.* 36: 747-56.
10. Val'kova NJu, 2007. Dr. biol. sci. abstract dis. Arkhangelsk, 40 p. [Russian].
11. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart Rate Variability. Standards of measurements, Physiological Interpretation, and Clinical Use. *Circulation,* 1996. 93: 1043-65.
12. Quintana DS, Guastella AJ, Outhred T, Hickie IB, Kemp AH, 2012. Heart rate variability predicts emotion recognition: Direct evidence for a relationship between the autonomic nervous system and social cognition. *International J Psychophysiol.* 86(2): 168-72.
13. Osadchaja EA, 2004. Kand Biol Sci. Dis. Orel, 173 p. [Russian]
14. Peacock J, Whang W, 2013. Psychological distress and arrhythmia: risk prediction and potential modifiers. *Prog Cardiovasc Dis.* May-Jun, 55(6): 582-89.
15. Glushko AN, 2006. Dr. psychol sci abstract dis. Moscow, 44 p. [Russian].
16. Romanova ES, 2004. 99 popular professions. Psychological analysis and professionogram. SPb.: Piter, 464 p. [Russian].
17. The system of the complex by computer studies of the functional state of the human body «Omega-M», 2001. SPb: Scientific research. Laboratory «Dynamics», 67 p. [Russian].
18. Buccelletti F. Maria GB, Gilardi E, Viore F, Calcinaro S, 2012. Computational and Mathematical Methods in Medicine [Internet]. <http://www.hindawi.com/journals/cmmm/2012/219080/>.
19. Rebrova OJu, 2002. Statistic analysis of medical data. Application software package STATISTICA. Moscow: Mediasfera, 312 p. [Russian].
20. Bezrukih MM, Son'kin VD, Farber DA. Physiology of age. Moscow: Publishing Center Academy, 2005, 446 p. [Russian].
21. Buchheit M, Gindre C, 2006. Cardiac parasympathetic regulation: respective associations with cardiorespiratory fitness and training load. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291: H451-H458.

Матеріал надійшов до редакції 27.01.2014

Стан автономної нервової системи студентів і його зв'язки з фізичною та інтелектуальною працею

Л.Д. Коровіна, Т.М. Запорожець

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія»;
E-mail: lidijaz@mail.ru

Досліджено стан автономної нервової системи студентів молодших курсів і його зв'язку з фізичною активністю, загальною і добовою тривалістю роботи з комп'ютерами. Вихідний вегетативний тонус переважно був ваготонічний й ейтонічний (93,2%), вегетативна реактивність переважно асимпатикотонічна й симпатикотонічна (77,0%). Збудливість симпатичного відділу автономної нервової системи за результатами ортостатичної проби у 61,1% нормальна, а реактивність парасимпатичного відділу за результатами проби Даньїні–Ашнера переважно нормальна або знижена (72,8%). Заняття за комп'ютером тривалістю 3 год за добу та більше підсилюють симпатичні впливи на серцеву діяльність, тоді як збільшення загальної тривалості занять сприяє відносному зниженню симпатичного тону. Вегетативна реактивність посилюється як зі збільшенням часу роботи з комп'ютером, так і з ростом тривалості занять спортом.

Ключові слова: студенти; автономна нервова система; робота з комп'ютером; фізична активність.

ВСТУП

Функціональний стан автономної нервової системи (АНС) залежить від особливостей професійної діяльності та фізичної активності людини [1–4]. Адаптація студентів до умов навчання у вищому навчальному закладі позначається на стані їхнього здоров'я [5, 6]. Найбільше впливають такі чинники, як нервове та психо-емоційне напруження, значне навантаження на зорову систему, гіпокінезія у вимушеній робочій позі, монотонність дій [2, 6]. Часто порушується режим харчування, праці та відпочинку [7]. Деякі дослідники показали вплив фізичної активності студентів на стан вегетативної регуляції серцевого ритму [8, 9]. В останнє десятиліття спостерігаються зміни в способі життя студентів. На заняття із комп'ютерами та іншими гаджетами, що вимагає напруження уваги та зору, витрачається багато часу. Це призводить до збільшення психо-емоційної та зменшення загальної фізичної активності. Проте даних про зв'язок цього виду занять зі

станом АНС і рівнем здоров'я студентів мало. Обсяг навчальних навантажень у медичних вищих навчальних закладах і загальна тривалість занять вищі, ніж у студентів інших спеціальностей. Також більшими є витрати часу на підготовку до занять, яка здійснюється з високою інтелектуальною напруженістю. Це ускладнює адаптацію, висуває жорсткіші вимоги до організму студентів-медиків.

Метою нашої роботи було виявлення взаємозв'язків стану АНС з фізичною активністю й тривалістю роботи з комп'ютерами у студентів молодших курсів.

МЕТОДИКА

У 185 студентів (94 юнака й 91 дівчина) 1-х і 2-х курсів медичної академії проводили анамнестичне анкетування для аналізу способу життя, рівня фізичної активності та захворюваності, визначали артеріальний тиск (АТ), частоту серцевих скорочень (ЧСС) і похідні показники. У 40 юнаків і 37 дівчат з числа опитаних також досліджували стан вегета-

тивної регуляції системи кровообігу за допомогою проб Руф'є, Даньїні–Ашнера, активної ортостатичної проби, кардіоінтервалографії та здійснювали реоенцефалографію [10, 11]. Обстеження проводили в першій половині робочого дня і не після занять з фізичного виховання. Учасники дослідження дали згоду на участь і обробку даних відповідно до вимог Токійської декларації Всесвітньої медичної асоціації, Міжнародних рекомендацій з проведення медико-біологічних досліджень та законів України.

За АТ та ЧСС розраховували вегетативний індекс (ВІ) Кердо, на підставі результатів кардіоінтервалографії розраховували моду (Мо), амплітуду моди (АМо), варіаційний розмах (Dx), індекс напруження (ІН), вегетативний показник ритму (ВІР), індекс вегетативної рівноваги (ІВР), вихідний вегетативний тонус (ВВТ) і вегетативну реактивність (ВР) [10–12]. Результати реоенцефалографії аналізували за Виноградовою [11]. Порівняння показників проводили методом Манна-Уїтні або за критерієм χ^2 (для показників, що не мали нормального розподілу) і критерієм t Стьюдента (для нормально розподілених), також проводили кореляційний аналіз [13, 14].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Добова тривалість занять сидячи становила $8,4 \pm 0,1$ год, статевих відмінностей не було. Праця з комп'ютером займала $3,2 \pm 0,2$ год за добу у юнаків та $2,4 \pm 0,2$ год у дівчат ($P < 0,001$). Юнаки мали загальну тривалість праці з комп'ютером $6,5 \pm 0,4$ роки, а дівчата – $4,7 \pm 0,3$ роки ($P < 0,001$). Ранкову зарядку робили 29,8% студентів та 37,4% студенток, частота становила $3,4 \pm 0,3$ разів за тиждень ($4,0 \pm 0,4$ разів – у юнаків, $2,9 \pm 0,3$ разів за тиждень – у дівчат, $P > 0,05$), середня тижнева тривалість була $1,7 \pm 0,2$ год ($2,2 \pm 0,4$ год – у юнаків, $1,2 \pm 0,2$ год – у дівчат, $P > 0,05$). Додаткові (окрім навчального плану) спортивні заняття відзначали 79,8% студентів та 75,8% студенток. У групі тих, що практикували

спортивні заняття (144 особи), юнаки приділяли спорту більше уваги: частота занять була $3,2 \pm 0,2$ разів за тиждень щодо $2,6 \pm 0,2$ разів у дівчат ($P < 0,05$), тривалість – $5,6 \pm 0,4$ год щодо $3,6 \pm 0,3$ год у дівчат ($P < 0,001$).

Показники вегетативного забезпечення студентів (показник серцевої діяльності за пробою Руф'є, коефіцієнт витривалості, ортостатичний індекс, уповільнення пульсу в пробі Даньїні–Ашнера та коефіцієнт узгодженості Хільдебранта Q) не мали статистично значимої різниці у юнаків та дівчат. Збудливість симпатичного відділу АНС, яка визначалася за результатами активної ортостатичної проби, у 61,1% була нормальною. Вегетативна реактивність парасимпатичного відділу АНС за результатами проби Даньїні–Ашнера переважно була нормальна (37,7%) або знижена (35,1%).

Рівень функціонування АНС обстежених оцінювали за аналізом кардіоінтервалограм. Розподіл юнаків та дівчат за ВВТ та ВР не мав статистично значимих статевих відмінностей. Ваготонічний ВВТ визначався у 40,54% обстежених, ейтонічний – у 52,70%, симпатикотонічний – у 4,05%, а гіперсимпатикотонічний – у 2,70%. Вегетативна реактивність була асимпатикотонічною у 33,78% обстежених, симпатикотонічною у 43,24%, а гіперсимпатикотонічною у 22,97%.

Аналіз залежності стану АНС від тривалості роботи за комп'ютером і фізичної активності обстежених студентів показав, що не всі показники мали виражені зв'язки з дослідженими чинниками. Показники, визначені за кардіоінтервалограмою, мали зв'язки і з добовою тривалістю часу роботи за комп'ютером, і з фізичною активністю студентів. А вегетативний тонус серцево-судинної системи, визначений за ВІ Кердо, мав статистично значимі зв'язки лише з рівнем фізичної активності.

Медіана розподілу добової тривалості роботи за комп'ютером становила 3 год. Тому для аналізу стану АНС залежно від тривалості занять з комп'ютером виділили дві групи

студентів: тих, що регулярно працювали з комп'ютером, але менше, ніж 3 год за добу, та тих, що працювали 3 год і більше (табл. 1). Між ними спостерігалися статистично значимі розходження за багатьма показниками ритму серця.

У студентів, які проводили тривалий час за комп'ютером, порівняно з тими, які працювали менше 3 год за добу, знижувалася Мо, збільшувалися АМо, ІН, ВІР та ІВР (табл.1). Все це свідчило про зростання симпатичних впливів, посилення централізації регуляції ритму серця. Частка ваготоніків зменшувалася, переважаючим вихідним вегетативним тонусом ставав ейтонічний (табл.2). Різниця вегетативної реактивності у студентів з різним добовим часом занять за комп'ютером не спостерігали (табл.2).

Інтенсивність занять з комп'ютером мала кореляційні зв'язки із станом АНС. Спостерігалася кореляція ІН з добовою тривалістю занять з комп'ютером ($r = 0,26, P < 0,05$). Індекс ВР, що характеризує баланс симпатичних і парасимпатичних впливів на серце, позитив-

но корелював з добовою тривалістю роботи з комп'ютером ($r = 0,23, P < 0,05$), так само, як і показник ВВТ ($\tau = 0,21, P < 0,05$). Показник ВР зростав із підвищенням загальної тривалості роботи з комп'ютером ($r = 0,36, P < 0,002$).

Рівень фізичної активності мав ще більше зв'язків з показниками стану АНС. У осіб з ваготонічним ВВТ спостерігалася більша тривалість додаткових спортивних занять на тиждень ($4,8 \pm 0,9$ год), ніж у осіб з ейтонічним ВВТ ($2,5 \pm 0,4$ год, $P > 0,05$). Симпатико- і гіперсимпатикотонічний ВВТ рідко спостерігалися у обстежених студентів. У осіб з гіперсимпатикотонічною ВР частіше спостерігалася висока фізична активність, ніж у студентів з симпатикотонічною та асимпатикотонічною ВР; між останніми групами відмінностей не спостерігалася. Середня тривалість спортивних занять за тиждень у осіб з гіперсимпатикотонічною ВР становила $5,5 \pm 1,3$ год, тоді як у осіб із симпатикотонічною ВР – $2,6 \pm 0,4$ год ($P < 0,05$), а у осіб із асимпатикотонічною ВР – $3,2 \pm 0,8$ год ($P > 0,05$). Середня частота спортивних

Таблиця 1. Показники кардіоінтервалографії студентів з різним часом добової роботи за комп'ютером (М \pm т)

Показник	Час роботи за комп'ютером			
	Менше ніж 3 год за добу (n=34)		3 год за добу і більше (n=43)	
	Горизонтальне положення	Вертикальне положення	Горизонтальне положення	Вертикальне положення
Мода, с	0,93 \pm 0,03	0,76 \pm 0,03	0,81 \pm 0,02 P<0,001	0,68 \pm 0,02 P<0,01
Амплітуда моди, %	15,00 \pm 1,00	18,00 \pm 1,00	19,00 \pm 1,00 P<0,001	20,00 \pm 1,00 P>0,05
Варіаційний розмах, с	0,30 \pm 0,00	0,35 \pm 0,02	0,30 \pm 0,00 P>0,05	0,28 \pm 0,02 P<0,05
Індекс напруження, ум.од.	26,63 \pm 3,01	49,13 \pm 8,68	55,87 \pm 6,70 P<0,001	82,83 \pm 12,93 P<0,05
Вегетативний показник ритму, ум.од.	3,50 \pm 0,27	4,80 \pm 0,53	5,42 \pm 0,46 P<0,005	7,14 \pm 0,73 P<0,05
Індекс вегетативної рівноваги, ум.од.	48,04 \pm 5,16	66,87 \pm 9,53	85,52 \pm 9,20 P<0,005	101,24 \pm 12,66 P>0,05 P<0,05
Вегетативна реактивність, ум.од.		1,95 \pm 0,28		2,44 \pm 0,74 P>0,05

Примітка: P – показник значимості статистичної різниці між групами студентів, що проводили за комп'ютером менше ніж 3 год за добу, або 3 год і більше, визначений за методом Манна-Уїтні.

занять за тиждень у осіб з гіперсимпатикотонічною ВР була $3,0 \pm 0,5$ разів, у осіб із симпатикотонічною ВР – $1,9 \pm 0,2$ разів ($P < 0,05$), у осіб із асимпатикотонічною ВР – $1,8 \pm 0,3$ разів ($P < 0,05$). Загальна тривалість занять спортом у осіб з гіперсимпатикотонічною ВР була $5,3 \pm 1,1$ року, тоді як у осіб із симпатикотонічною ВР – $2,0 \pm 0,6$ року ($P < 0,01$), а у осіб із асимпатикотонічною ВР – $2,2 \pm 0,6$ року ($P < 0,02$).

Визначали кореляційні зв'язки між деякими показниками стану АНС та інтенсивністю занять спортом. Були виявлені негативні зв'язки індексу вегетативної рівноваги із частотою занять спортом ($\tau = -0,17$, $P < 0,05$). Показник вихідного вегетативного тону також мав зв'язки із частотою ($\tau = -0,26$, $P < 0,02$) і тижневою тривалістю ($\tau = -0,20$, $P < 0,05$) занять спортом.

Аналіз розподілу студентів за вегетативним тонутом серцево-судинної системи, визначеним за ВІ Кердо, залежно від частоти занять спортом не виявив значимих розходжень. Але сумарна тижнева тривалість фізичних тренувань, які включали й ранкову зарядку, і спортивні заняття, була максимальною у студентів з вегетативною рівновагою й парасимпатичним переважанням в межах норми, мінімальна тривалість – у осіб із симпатичним пере-

важанням. Студенти з ВР в 2 рази частіше, ніж із симпатичним або парасимпатичним переважанням, робили ранкову зарядку ($P < 0,05$). Найвища тривалість ранкової зарядки спостерігалася у осіб з парасимпатичним переважанням у межах норми – в 2,9 рази більше, ніж у студентів із симпатичним або парасимпатичним переважанням ($P < 0,05$).

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами характеристики зв'язків вегетативного тону та вегетативної реактивності із поведінковими чинниками підтверджуються дослідженнями інших авторів. У студентів з рівновагою вегетативного тону за Кердо та з парасимпатичним переважанням в межах норми спостерігалися вища частота та тривалість ранкової зарядки та фізичних тренувань, ніж у осіб з симпатичним чи парасимпатичним переважанням. Симпатикотонічний ВВТ, що визначався за результатами кардіоінтервалографії, також частіше спостерігався у осіб з низьким рівнем фізичної активності. Механізми зниження симпатичного тону внаслідок фізичних тренувань залишаються не повністю вивченими [13, 23]. Можливою є реалізація взаємозв'язків м'язової, інтелектуальної

Таблиця 2. Розподіл студентів з різним часом добової роботи за комп'ютером за рівнями вихідного вегетативного тону та вегетативної реактивності

Показник	Добовий час за комп'ютером		P
	Менше 3 год за добу (n=34)	3 год за добу і більше (n=43)	
Вихідний вегетативний тонус			
ваготонічний	20	11	<0,005
ейтонічний	12	27	<0,05
симпатикотонічний	2	3	>0,05
гіперсимпатикотонічний	0	2	>0,05
Вегетативна реактивність			
асимпатикотонічна	8	16	>0,05
симпатикотонічна	19	15	>0,05
гіперсимпатикотонічна	7	12	>0,05

Примітка: P – показник значимості статистичної різниці між групами студентів, що проводили за комп'ютером менше, ніж 3 год за добу, або 3 год і більше, визначений за критерієм χ^2 .

активності та тону АНС з включенням системи глюкоза крові – інсулін – адренергічні рецептори. Зв'язки симпатичної ланки АНС з регуляцією вмісту глюкози крові та наявність адренергічних ефектів інсуліну показані деякими дослідниками [3, 8, 13].

У нашому дослідженні також виявлена множинна кореляційна залежність ВВТ ($R = 0,39$, $P < 0,005$) від часу, проведеного за комп'ютером за добу ($\beta_1 = 0,40$, $P < 0,002$), і загальної тривалості роботи з комп'ютером у роках ($\beta_2 = -0,32$, $P < 0,02$). Це вказує на небажаність тривалих занять за комп'ютером при позитивному впливі на стан АНС відносно короточасних занять. Визначені залежності можна пояснити тим, що інтелектуальні навантаження супроводжуються збільшенням обміну речовин, споживання глюкози і кровообігу в задіяних ділянках мозку, що показали дослідження, проведені за допомогою позитронно-емісійної та магніто-резонансної томографії Тао Джін і співавт. [11]. За даними деяких авторів, заняття за комп'ютером – пошукова, навчальна, навіть ігрова діяльність – також стимулюють мозкову діяльність, споживання глюкози і тим самим сприяють посиленню мозкового кровообігу [5, 18]. Проте під час тривалої роботи за комп'ютером спостерігається низька загальна фізична активність, що призводить до змін, характерних для гіподинамії.

Вірогідно, що подібність локальних змін обміну речовин, які відбуваються в м'язах під час фізичних навантажень і в мозку від час роботи за комп'ютером, призводить до подібних змін регуляції. Таким чином здійснюється тренувальний процес, що призводить до пристосувальних змін симпатичної ланки нервової системи, що при помірних навантаженнях сприяє рівновазі тону двох ланок АНС.

Отже, у обстежених нами студентів-першокурсників спостерігалось зрушення ВВТ у бік парасимпатичних впливів зі збільшенням спортивних навантажень і у бік симпатичних впливів – з подовженням добового часу

роботи за комп'ютером. ВР посилювалася при підвищенні обох цих факторів. Вплив занять за комп'ютером залежав від тривалості занять – відносно посилення симпатичних впливів спостерігалось при їхній великій добовій тривалості, тоді як з ростом загальної тривалості занять відзначено посилення парасимпатичних впливів.

Л.Д. Коровина, Т.Н. Запорожець

СОСТОЯНИЕ АВТОНОМНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА И ЕГО СВЯЗИ С ФИЗИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ И РАБОТОЙ С КОМПЬЮТЕРОМ

Исследовано состояние автономной нервной системы студентов младших курсов и его связи с их физической активностью, суточной и общей длительностью работы с компьютерами. Наблюдавшийся исходный вегетативный тонус в основном был ваготоническим и эйтоническим (93,2%), вегетативная реактивность преимущественно асимпатическая и симпатическая (77,0%). Возбудимость симпатического отдела автономной нервной системы в ортостатической пробе была у 61,1% студентов нормальной, а реактивность парасимпатического отдела в пробе Данини–Ашнера в основном нормальная или сниженная (72,8% студентов). Занятия за компьютером длительностью 3 ч и больше в сутки усиливают симпатические влияния на сердечную деятельность, тогда как увеличение общего времени занятий способствует относительному снижению симпатического тонуса. Вегетативная реактивность повышается как с увеличением времени работы с компьютером, так и с ростом длительности занятий спортом.
Ключевые слова: студенты; вегетативная нервная система; работа с компьютером; физическая активность.

L.D.Korovina, T.M. Zaporozhets

STATE OF AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM OF MEDICAL HIGHER SCHOOL STUDENTS AND ITS RELATIONS WITH THEIR PHYSICAL ACTIVITY AND OPERATION WITH THE COMPUTER

The state of autonomic nervous system of the first-second years students and its relations with their physical activity, the experience and operation duration with computers have been explored. The observed base vegetative tonus was vagotonia and eytonia mainly (93,2%), vegetative reactivity was asympathetic and sympathetic (77,0%) mainly. Autonomic nervous system sympathetic part excitability in orthostatic test in 61,1% of the students was norm, while parasympathetic part reactivity

in oculocardiac test was norm or reduced (72,8% of students) mainly. Work with the computer during 3 hours and more a day enhances sympathetic influences on heart activity, but increase of total work time promotes to relative decrease of sympathetic tonus. Vegetative reactivity grows both with increase of the operating time with the computer and with increase of the sport exercises duration.

Key words: students; autonomic nervous system; work with computer; physical activity.

REFERENCES

1. Apanasenko GL, Popova LA. Medical valueology. Kyiv: 1998. [Russian].
2. Gevorkyan ES, Minasjan SM, Ksadzhikeyan NN, Dajan AV. The functional state of students at a mental load. *Gigiena sanitaria*. 2005; (3): 55. [Russian].
3. Sudakov KV, Umrjuhina PE. System bases of emotional stress. Moscow: GEOTAR-MEDIA; 2009. [Russian].
4. Vyazova AV. An estimation of adaptive possibilities of an organism. Mechanisms of functioning visceral systems functioning]. - VII All-Russia conference with the international participation; September, 29th - October, 02th, 2009, St.-Petersburg, Russia. Theses of reports. St.-Petersburg: 2009; 45. [Russian].
5. Shcherbatykh YuV. Communication of features of the medical students person with activity of vegetative nervous system. *Psikhologicheskii Zh.* 2002; (1): 118-22. [Russian].
6. Shpangenberg S, Boeva B. Influence of factors of educational medium and training on a state of pupils health. *Gigiena Sanitaria*. 2003; (5): 50-3. [Russian].
7. Shwerina TA, Shcheplikova TA. A mode of life and a nutrition of students. Physical training and a healthy mode of life of studying youth. Tver: 2000; 98. [Russian].
8. Davletyarova KV, Kapilevich LV, Soltanova VL, Baranova EV, Andreyev VI. Adaptive possibilities of a student organism who are engaged in medical physical training. *Bull of Siberian Med.* 2011; (3): 116-20. [Russian].
9. Yefimova IV, Yenikolopova EV. Feature of heart rhythm regulation at students with various level of a motor performance. *Hum Physiol.* 1987; 13 (5): 859. [Russian].
10. Berseneva VA, Guba GP, Pyatak OA, editors. The manual on clinical neurovegetology. Kiev: Zdorov'ya; 1990. [Russian].
11. Veyn AM, editor. Vegetative disorders: clinic, treatment, diagnostics. Moscow: Medicine; 1998. [Russian].
12. Vinogradova TS., editor. Instrumental research techniques of cardiovascular system research. The manual. Moscow: Medicine; 1986. [Russian].
13. Glantz SA. Primer of biostatistics. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1994.
14. Lakin GF. [A biometry]. Moscow: Higher school; 1990. Russian
15. Mueller PJ Activity-Dependent Plasticity in Central Homeostatic Systems. Exercise training and sympathetic nervous system activity: evidence for physical activity dependent neural plasticity. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2007; (34): 377-384.
16. Vanhees L, Fagard R, Lijnen P, Moerman E, De Geest H, Amery A. Influence of physical training on blood pressure, plasma renin, angiotensin and catecholamines in patients with ischaemic heart disease. *Europ J Applied Physiol and Occupational Physiol.* 1984; 53 (3): 219-224.
17. Ng AV, Callister R, Johnson DG, Seals DR. Age and gender influence muscle sympathetic nerve activity at rest in healthy humans. *Hypertension.* 1993; (21): 498-503.
18. Grover A, Padginton C, Wilson MF, Bong Hee Sung, Izzo JLL, Dandona P. Insulin Attenuates Norepinephrine-Induced Venoconstriction An Ultrasonographic Study *Hypertension.* 1995; (25): 779-784.
19. Skup M, Dwornik A, Macias M, Sulejczak D, Wiater M, Czarkowska-Bauch J. Long-term locomotor training up-regulates TrkB(FL) receptor-like proteins, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord. *Exp Neurol.* 2002;176(2): 289-3.
20. Silhol M, Arancibia S, Maurice T, Tapia-Arancibia L. Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neuroscience.* 2007; (146): 962-973.
21. Jin Tao, Mehrens H, Hendrich KS, Kim SG. Mapping brain glucose uptake with chemical exchange-sensitive spin-lock magnetic resonance imaging. *J Cerebral Blood Flow & Metabolism* advance online publication 28 May 2014; doi: 10.1038/jcbfm.2014.97.
22. Erickson KI, Boot WR, Basak C, Neider MB, Prakash RS, Voss MW, Graybiel AM, Simons DJ, Fabiani M, Gratton G, Kramer AF. Striatal Volume Predicts Level of Video Game Skill Acquisition. *Cereb. Cortex.* 2010; 20 (11):2522-2530.
23. Small GW, Moody TD, Siddarth P, Bookheimer SY. Your brain on Google: patterns of cerebral activation during internet searching. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2009;17(2):116-26.

Матеріал надійшов до редакції 17.03.2014

ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ

Олег Олександрович Кришталь: до 70-річчя з дня народження

Олег Олександрович народився в Києві в сім'ї ентомолога Олександра Пилиповича Кришталя. Після закінчення 1968 р. фізичного факультету Київського університету за спеціальністю «молекулярна фізика» розпочав свою наукову діяльність. З 1967 р. працює в Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України на посадах механіка, з 1968 р. – стажера-дослідника, а з 1970 р. – молодшого, потім старшого наукового співробітника (1975). З 1982 р. і понині завідує відділом фізико-хімічної біології клітинних мембран, з 2003 р. – заступник директора, з 2010 р. – директор Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця та Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України.

У різні роки Олега Олександровича Кришталя запрошували працювати професором в університеті Кюсю (Японія), Гарвардському і Пенсільванському університетах (США), Мадридському університеті Комплутенсе (Іспанія). О.О. Кришталь входить до складу редакційних колегій кількох міжнародних журналів, у тому числі таких провідних світових видань, як «Neuroscience», «Autonomic Neuroscience», «Neurology, Psychiatry and Brain», «Purinergic Signalling», «Neuroscience Bulletin», «Neurophysiology», «WIREs Membrane Transport and Signaling». Він є президентом Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка та Українського товариства нейронаук, керівником кафедри ЮНЕСКО в Україні, входить до правління Всесвітньої організації з вивчення мозку (IBRO) та Федерації європейських товариств нейронаук (FENS).

Провідну роль у формуванні О.О. Кришталя як ученого зіграв видатний український нейрофізіолог П.Г. Костюк. Під його

керівництвом Олег Олександрович показав можливість перенесення вхідних струмів іонами кальцію. Ця знахідка лягла в основу його кандидатської дисертації (1970). Під час досліджень іонної проникності мембрани нейронів за допомогою мікроелектродної техніки виникла нагальна потреба контролювати внутрішній іонний вміст цих клітин, а мікроелектродна техніка такої можливості не давала. Тому було створено новий метод внутрішньоклітинної перфузії. Він дав змогу здійснити першу в світі заміну цитоплазми нейрона штучним середовищем. Перші результати, отримані за допомогою інноваційного методу, були опубліковані в 1975 р. у найпрестижнішому міжнародному журналі «Природа» (Nature). Авторами були розробники методу П.Г. Костюк, О.О. Кришталь та В.І. Підоплічко [1]. Ученим вдалося розділити іонні струми, в тому числі натрієвий і кальцієвий. У цьому самому році, за допомогою нового унікального методу вони вперше зареєстрували в державному реєстрі відкриттів СРСР (№ 276, 1975 р.) «Явище вибіркової саморегульованої кальцієвої провідності мембрани соматичних нервових клітин». Таким чином, уперше були відкриті системи спеціалізованих дискретних потенціалзалежних іонопровідних структур – кальцієвих каналів у соматичних нейронів. Отримані результати про властивості струмів, їх розділення, кальційзалежність, а також оцінка провідності поодиноких кальцієвих каналів методом флукуаційного аналізу лягли в основу докторської дисертації Олега Олександровича, присвяченої механізмам електричної збудливості нервової клітини (1978).

У 1980 р., використовуючи метод внутрішньоклітинної перфузії, О.О. Кришталем

разом із В.І. Підоплічко було знайдено новий рецептор протонів мембран нервових клітин [2], у 1981 р. його пов'язали з рецепцією болю [3–5]. Таке припущення було в ті часи досить провокативним і викликало дискусію серед учених, які спростовували його і вважали артефактом. Але, як показав час, наявність цілої родини водневих рецепторів нині визнана у світі, ці рецептори назвали ASIC-каналами (від англ. Acid-sensing ion channels). Доведена їх присутність у всіх нейронах ссавців.

З 1982 р. Олег Олександрович очолює відділ фізико-хімічної біології клітинних мембран, в якому досліджуються механізми іонної проникності каналів і рецепторів, локалізованих на мембрані нервових клітин. Під його керівництвом вивчаються їх фізико-хімічні і фармакологічні властивості із застосуванням низки нових методів. У 1983 р. О.О. Кришталею і його співробітниками було виявлено інший фундаментально новий рецептор у нервових клітинах – рецептор АТФ [6]. Майже одночасно таке саме відкриття було опубліковане в журналі «Nature» двома американськими вченими. Однак пріоритет зафіксований за українськими фізіологами. Таким чином, два з трьох найбільш важливих первинних механізмів сприйняття болю, зумовлених активністю рецепторів протонів і рецепторів АТФ, були встановлені О.О. Кришталею та співробітниками в Інституті ім. О. О. Богомольця НАН України.

Зараз Олег Олександрович та його колеги займаються дослідженнями, які дадуть змогу зрозуміти, яким чином можна впливати на механізми формування больового сигналу, пошуком хімічних молекул, котрі здатні селективно діяти на вказані рецептори. Адже це дасть можливість отримувати лікарські препарати нового покоління, які допоможуть боротися з хронічним або гострим болем (післяопераційним, болем при онкологічних захворюваннях або при СНІДі тощо).

Результати наукової діяльності О.О. Кришталея узагальнені в 2 монографіях і понад 300 публікаціях у міжнародних та

українських журналах. Наразі Олег Олександрович Кришталь входить у вісімку найбільш цитованих учених України. Під його керівництвом підготовлено 4 доктори та понад 20 кандидатів наук. Він також займається науково-педагогічною діяльністю – завідує кафедрою молекулярної фізіології та біофізики Фізико-технічного навчально-наукового центру НАН України.

Свою наукову діяльність О.О. Кришталь вміло поєднує з науково-організаційною на громадській діяльності. Так, він є президентом Українського наукового клубу, основні завдання якого – сприяння реформі наукової сфери. Ця організація проводить незалежні аналітичні дослідження та моніторинг освіти, розвитку науки і технології в Україні та в усьому світі.

Олег Олександрович був ініціатором створення в нашій країні низки так званих ключових лабораторій. Ідея полягає в створенні умов для провідних учених країни, які проводять дослідження світового рівня. Щоб продовжувати працювати в Україні, їм потрібно забезпечити гідне фінансування. Таким чином, держава може підтримувати перспективні дослідження практично в усіх основних галузях науки. Важливо відзначити, що ключова лабораторія також може виступати як науково-навчальний центр, оскільки в такому проекті задіяна молодь. У нашій країні перша і поки що остання ключова лабораторія була створена на базі Інституту ім. О. О. Богомольця та Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. До її складу увійшли близько 90% українських учених-біологів, які за своїми публікаціями мають високий міжнародний рейтинг. Фінансування лабораторії проводилося з коштів Фонду фундаментальних досліджень при Державному агентстві з питань науки, інновацій та інформатизації.

Олег Олександрович захоплюється літературною творчістю, і є автором низки художніх романів: «Гомункулус» (опублікований у журналі «Нева», 1995 р., який отримав золоту медаль журналу за кращий роман року, в

2000 р. виданий у Франції під назвою «Moi et Mon Double»), а також роман-есе «До співу птахів». Свою літературну діяльність Олег Олександрович присвячує темі взаємозв'язку свідомого і підсвідомого. Він вважає, що ця проблема не є ні суто літературною, ні художньою, а, скоріше, науковою.

О.О. Кришталь – кавалер ордена «За заслуги» II, III ступеня, нагороджений медаллю «За працю і звитягу», є заслуженим діячем науки і техніки України, Лауреатом Державної премії СРСР, Державної премії України у галузі науки і техніки, премії НАН України ім. О. О. Богомольця, премії НАН України ім. П. Г. Костюка.

Співробітники Інституту фізіології та його колеги поздоровляють шановного ювіляра та бажають йому здоров'я, щастя, успіхів і творчої наснаги.

REFERENCES

1. Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells. *Nature* 1975 Oct 23;257(5528):691-3.
2. Krishtal OA, Pidoplichko VI. A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience* 1980;5(12):2325-7.
3. Krishtal OA, Pidoplichko VI. A "receptor" for protons in small neurons of trigeminal ganglia: possible role in nociception. *Neurosci Lett* 1981 Jul 17;24(3):243-6.
4. Krishtal OA, Pidoplichko VI. Receptor for protons in the membrane of sensory neurons. *Brain Res* 1981 Jun 9;214(1):150-4.
5. Krishtal OA, Pidoplichko VI. A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience* 1981;6(12):2599-601.
6. Krishtal OA, Marchenko SM, Pidoplichko VI. Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. *Neurosci Lett* 1983 Jan 31;35(1):41-5.

О.О. Лук'янець, І.І. Ченцова



ВАЛЕРІЙ МАКСИМОВИЧ КИЄНКО (ДО 75-РІЧЧЯ З ДНЯ НАРОДЖЕННЯ)

Талановитий організатор академічної науки, учений секретар, заступник директора з науково-організаційної роботи Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, кандидат біологічних наук, заслужений діяч науки і техніки України Валерій Максимович Києнко зустрічає своє 75-річчя.

Народився Валерій Максимович 5 липня 1940 р. у Таганрозі Ростовської області Росії. У 1963 р. закінчив лікувальний факультет Київського медичного інституту. Наукову діяльність розпочав аспірантом, продовжив – молодшим, згодом – старшим науковим співробітником, а з 1976 р. – ученим секретарем Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР. Одночасно у 1968-1973 рр. працював у апараті Президії АН УРСР науковим співробітником-консультантом, заступником Головного ученого секретаря Президії АН УРСР. З 2004 р. на нього покладені обов'язки заступника директора

Інституту з науково-організаційної роботи.

В.М. Києнко зробив значний вклад у підвищення ефективності наукових досліджень Інституту, покращення взаємодії його підрозділів, координації наукової співпраці із іншими установами України медико-біологічного профілю, підпорядкованих різним міністерствам та відомствам, залучення до бюджету Інституту додаткового фінансування, а саме – міжнародних грантів, тем за програмами МОН України, національними програмами та програмами Київської міської державної адміністрації. Він бере активну участь у підвищенні наукової кваліфікації наукових співробітників, проведенні їх атестацій, підборі кадрів до аспірантури і докторантури.

Разом з великою науково-організаційною роботою В.М. Києнко плідно займається дослідницькою діяльністю. Він є кваліфікованим спеціалістом у галузі фізіології вищої нервової діяльності. Результати його досліджень мають важливе значення для професійного відбору та реабілітації працівників різних галузей народного господарства. Особливо хочеться відзначити роль Валерія Максимовича у створенні у 1998р. Трускавецької науково-виробничої групи клінічної бальнеології та фітотерапії при відділі експериментальної бальнеології.

За результатами проведених досліджень видано інформаційно-методичний лист «Статистичні методи інтегральної оцінки імунного статусу» (2002) та низку монографій, зокрема: Реабілітація захисно-приспосувальних систем на курорті Трускавець (2004); Бальнеокардіоангіологія. Вплив бальнеотерапії на курорті Трускавець на серцево-судинну систему та фізичну працездатність (2005); Чорнобиль, пристосувально-захисні системи, реабілітація. Адаптаційні, метаболічні, гемостазіо- і імунологічні аспекти діагностики та бальнео- і фітореабілітації на курорті Трускавець осіб, підданих дії чинників аварії на ЧАЕС (2006); Фізіологічна активність оздоровлювального напою „Трускавецька

кришталева з алое” (2007); Експериментальна бальнеофітотерапія (2008), співавтором яких є В.М. Києнко.

У творчому доробку В.М. Києнка - 84 наукові публікації, в тому числі 7 монографій, 2 методичні рекомендації, 4 буклети.

Велика організаторська та дослідницька діяльність В.М. Києнка відзначена високими державними нагородами: орденами «Знак Пошани» (1986), «За заслуги» III ст. (2004), Грамотою Президії Верховної ради УРСР

(1984), Грамотою Верховної Ради України (2003), Почесною грамотою Верховної Ради України (2010), Почесною Грамотою Кабінету Міністрів України (2013), Київської міської адміністрації (2007) та відзнакою НАН України (2008). Валерій Максимович є Заслуженим діячем науки і техніки України (2009).

Щиро вітаємо Валерія Максимовича з 75-річчям, бажаємо міцного здоров'я, особистого щастя, удачі, невичерпної енергії, терпіння, оптимізму.

CONTENTS

O.O. Lunko, D. S. Isaev, O. O. Krishtal, E. V. Isaeva. Thrombin modulates persistent sodium current in CA1 pyramidal neurons of young and adult rat hippocampus	5
N.A. Dorofeyeva, A.V. Kotsuruba, B.S. Kopjak, V.F. Sagach. Physical exercise training cancels constitutive NOS uncoupling and induced violations of cardiac hemodynamics in hypertension (Part III)	11
V.B.Kulyk, I.V.Chizhnikov, T.M. Volkova, O.P. Maximyuk, O.A.Krishtal. Role phosphoinositid signaling pathway in opioids control of P2X3 receptors in the primary sensory neurons	22
S.A. Rykov, Y. Y. Byts, S. V. Goncharov, V. E. Dosenko. Allelic variant frequency of promoter ($G^{-47} \rightarrow A$) Γ -crystallin gene affects the level of its expression in platelets	30
A. G. Reznikov, N.D. Nosenko, L.V. Tarasenko, A.A. Limareva. Changes in the brain testosterone metabolism and sexual behavior in male rats prenatally exposed to methyl dopa and stress	41
M.S. Shypshyna, N.S.Veselovsky, N.F. Myasoedov, S.I. Shram, S.A. Fedulova. Effect of peptide semax on synaptic activity and short-term plasticity of glutamatergic synapses of co-cultured dorsal root ganglion and dorsal horn neurons	48
I.A. Vladimirova, I.B. Philypov, E.M. Kulieva, O.N. Paduraru, Y.Y. Shuba, Y.M. Shuba. Impact of diabetic complications on neuromuscular transmission in the smooth muscle of the bladder of rats with experimental diabetes	56
L.D. Liubich, N.I. Lisiany. The influence of progenitor neurocells supernatant on the lymphocytes cytotoxic function in rats with glioma	63
I.V. Byelinska, O.V. Lynchak, S.M.Tsyvinska, V.K. Rybalchenko. Morphofunctional state of blood cells after chronic exposure of the protein kinases inhibitor maleimide derivative	71
I.I. Patalakh, S.A.Talanov, O.V. Revka, T.F. Drobotko. Activation of protein C in the <i>in vitro</i> thrombolysis	78
N. Brechka, V. Nevzorov, V. Bondarenko, N. Malova, N. Selyukova. Investigations of submicroscopic architectonics sertoli and leydig cells after hydrochloride serotonin destructive impact and the possibility of correction by stimulants of metabolic processes	85
L.V. Korol. Modeling in vitro pathways of activation of lipid peroxidation and protein in chronic kidney disease	92
O.V. Hulka. Dynamics of spectral indexes of heart variability rate of the students with different character of the educational loading	98
L.D. Korovina, T.M. Zaporozhets. State of autonomic nervous system of medical higher school students and its relations with their physical activity and operation with the computer	105

JUBILEE DATES