

Фізіологічний журнал

ТОМ 62 № 1 2016

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Tsybal D.O., Minchenko D.O., Kryvdiuk I.V., Riabovol O.O., Halkin O.V., Ratushna O.O., Minchenko O.H.</i> Expression of proliferation related transcription factor genes in U87 glioma cells with IRE1 knockdown: upon glucose and glutamine deprivation	3
<i>Драган А.В., Петрушенко О.А., Бурлак О.П., Лук'янець О.О.</i> Вплив агоніста TRPA1-рецепторів на десенситизацію TRPV1-каналів у нейронах дорсальних гангліїв щура	16
<i>Насібян Л.С., Філіптов І.Б.</i> Вплив пептидоглікану клітинної стінки золотистого стафілокока на механізми регуляції аденілатциклазною сигнальною системою скоротливої активності міометрія щурів	25
<i>Коркушко О.В., Шатило В.Б., Чижова В.П., Наскалова С.С., Осмак Є.Д., Грем'яков А.В., Антонюк-Щеглова І.А., Гавалко Г.В., Наумчук Н.С.</i> Реакція організму на гостру гіпоксичну пробу у здорових людей і осіб з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну	34
<i>Пранік Н.Б., Гончаров С.В., Гур'янова В.Л., Майданник В.Г., Хайтович М.В., Мойбенко О.О., Досенко В.Є.</i> Аналіз асоціації між 11 одонуклеотидними поліморфізмами та рівнем ендотеліязалежної вазодилатації у дітей, хворих на цукровий діабет 1-го типу	43
<i>Драницина А.С., Моргаєнко О.О., Гребіник Д.М., Остапченко Л.І.</i> Експресія генів REG1A, GAST та TGFB1 за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уразень слизової оболонки шлунка щурів	53
<i>Гаркавенко В.В., Колосова О.В., Максимова В.Д.</i> Стабілографічні показники у людини в позиціях нахилів тіла вперед і назад	62
<i>Sergey V. Ziablitsev, Ruslan N. Boris, Svetlana V. Pishchulina, Svetlana V. Kolesnikova</i> Systemic effects of unspecific inflammatory reaction at traumatic brain injury	68

<i>Головченко І.В., Гайдай М.І.</i> Кореляційні зв'язки показників церебральної гемодинаміки та електричної активності головного мозку у дітей з порушенням рухової активності	74
<i>Павлович С.І., Макогон Н.В., Грушка Н.Г., Бризгіна Т.М., Янчій Р.І.</i> Морфологічні зміни у печінці мишей за умов конканавалін А-індукованого гепатиту	83
<i>Березнякова А.І., Жемела О.Д., Черемісіна В.Ф.</i> Вміст загального імуноглобуліну Е у крові щурів різного віку при алергічному дерматиті	92
<i>Довбинчук Т.В., Червінська Т.М., Закордонець Л.В., Толстанова Г.М.</i> Роль гістаміну в механізмах антибіотиквикликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки	95
<i>Могильницька Л.А., Могильницька О.С.</i> Вміст ендотеліального моноцитарного пептиду-II в сироватці крові при цукровому діабеті 1-го типу	102
ОГЛЯДИ	
<i>Шепель О.А., Вознесенська Т.Ю., Блашків Т.В., Янчій Р.І.</i> Гени кумулюсних клітин як потенційні біомаркери для діагностики розвитку ооцитів та ембріонів	107
РЕЦЕНЗІЇ	
Рецензія на учебник «патофізіологія» под редакцией Н.Н. Зайко, Ю.В. Быця, Н.В. Крышталя, Киев: ВСИ медицина, 2015.– 744 с.	114

Expression of proliferation related transcription factor genes in U87 glioma cells with IRE1 knockdown: upon glucose and glutamine deprivation

D.O. Tsymbal¹, D.O. Minchenko^{1,2}, I.V. Kryvdiuk¹, O.O. Riabovol¹, O.V. Halkin¹,
O.O. Ratushna¹, O.H. Minchenko¹

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

²O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv; e-mail: ominchenko@yahoo.com

Glycolysis and glutaminolysis as well as endoplasmic reticulum stress are required for tumor progression suggests through regulation of the cell cycle. Inhibition of ERN1/IRE1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1/inositol requiring enzyme 1), a central mediator of endoplasmic reticulum stress, significantly suppresses glioma cell proliferation and tumor growth as well as modifies sensitivity gene expressions to glucose and glutamine deprivation. We have studied the expression of genes encoded transcription factors such as E2F8 (E2F transcription factor 8), EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1), HOXC6 (homeobox C6), TBX3 (T-box 3), TBX2 (T-box 2), GTF2F2 (general transcription factor IIF), GTF2B (general transcription factor IIB), MAZ (MYC-associated zinc finger protein, purine-binding transcription factor), SNAI2 (snail family zinc finger 2), TCF3 (transcription factor 3), and TCF8/ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) in U87 glioma cells upon glucose and glutamine deprivation in relation to inhibition of IRE1. We demonstrated that glutamine deprivation leads to up-regulation of the expression of EPAS1, TBX3, GTF2B, and MAZ genes and down-regulation of E2F8, GTF2F2, TCF8, and TBX2 genes in control glioma cells. At the same time, glucose deprivation enhances the expression of EPAS1 and GTF2B genes and decreases of E2F8, HOXC6, TCF3, and TBX2 genes in these glioma cells. Inhibition of IRE1 by dnIRE1 significantly modifies the expression most of studied genes with different magnitude. Present study demonstrates that fine-tuning of the expression of proliferation related transcription factor genes depends upon glucose and glutamine deprivation in IRE1-dependent manner and possibly contributes to slower tumor growth after inhibition of IRE1.

Key words: mRNA expression; transcription factors; endoplasmic reticulum stress; IRE1 inhibition; glucose deprivation; glutamine deprivation; glioma cells.

INTRODUCTION

Multiple studies have clarified the link between endoplasmic reticulum stress and cancer [1-4]. Malignant tumors use endoplasmic reticulum stress response and its signaling pathways to adapt and to enhance tumor cells proliferation under stressful environmental conditions [5-7]. It is well known that activation of ERN1/IRE1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1/inositol requiring enzyme 1) branch of the endoplasmic reticulum stress response is tightly linked to apoptosis and to cell death, and suppression of its function has been demonstrated

to result in significant anti-proliferative effect in glioma growth [8-11]. Glucose and glutamine are substrates for glycolysis and glutaminolysis, which are important for tumor progression through regulation of the cell cycle at distinct stages [12, 13]. The activation of glycolysis and glutaminolysis in cancer cells is tightly regulated by the action of two ubiquitin ligases, which control the transient appearance and metabolic activity of the glycolysis-promoting enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) and glutaminase 1 (GLS1), the first enzyme in glutaminolysis [12].

© D.O. Tsymbal, D.O. Minchenko, I.V. Kryvdiuk, O.O. Riabovol, O.V. Halkin, O.O. Ratushna, O.H. Minchenko

Malignant gliomas are highly aggressive tumors and to date there is no effective treatment available. As solid tumors expand, oxygen and nutrients become limiting owing to inadequate vascularization. Glucose shortage associated with malignant progression triggers apoptosis through the endoplasmic reticulum unfolded protein response [14]. Moreover, endoplasmic reticulum stress is in part caused by reduced glucose flux [14]. Thus, a better understanding of tumor responses to glucose and glutamine deprivations as well as to endoplasmic reticulum stress is required to elaborate therapeutical strategies of cell sensibilization, based on the blockade of survival mechanisms [4, 14-18].

The endoplasmic reticulum is a key subcellular structure in the response to different factors, which activate a complex set of signaling pathways, named the unfolded protein response and plays an important role in metabolic integration [5, 6, 19]. This adaptive response is mediated by three interconnected endoplasmic reticulum-resident sensors, but IRE1 is the most evolutionary conserved and an important sensor of the unfolded protein response to the accumulation of misfolded proteins and represents a key regulator of the life and death processes [1, 6, 7, 11]. The IRE1 enzyme contains protein kinase and endoribonuclease activities. The protein kinase of IRE1 responsible for autophosphorylation and controls some gene expressions [7, 20]. The IRE1 endoribonuclease activity is involved in the degradation of a specific subset of mRNA and also initiates the cytosolic splicing of the pre-XBP1 (X-box binding protein 1) mRNA whose mature transcript encodes a transcription factor that stimulates the expression of numerous unfolded protein response specific genes [11, 21-24].

Transcription factors are responded to diverse cellular stresses to regulate expression of its target genes, thereby inducing cell cycle control, proliferation, apoptosis, and senescence, especially in cancer [25-30]. E2F family of transcription factors regulates various cellular functions related to cell cycle and apoptosis and

is strongly up-regulated in human hepatocellular carcinoma, thus possibly contributing to hepatocarcinogenesis [25, 26]. Moreover, there is data that transcription factors E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1 [27]. The T-box transcription factors TBX3 and TBX2 play multiple roles in normal development and disease by either repressing or activating transcription of target genes in a context-dependent manner and control the rate of cell proliferation as well as mediate cellular signaling pathways [28]. It was shown that TBX3 is a transcriptional repressor and its overexpression is associated with several cancers, but this transcription factor may mediate the antiproliferative and promigratory role of TGF- β 1 in breast epithelial and skin keratinocytes [29].

Transcription factor HOXC6 is a member of a highly conserved homeobox family of transcription factors that play an important role in proliferation as well as in morphogenesis and metastasis and regulates genes with both oncogenic and tumor suppressor activities and may contribute to the progression of gastric carcinogenesis [30]. Recently was shown that knockdown of endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), which also known as hypoxia-inducible transcription factor-2 α (HIF-2 α), as well as HIF-1 α decreased cell proliferation under normoxic as well as hypoxic conditions in pulmonary vascular endothelial cells and that EPAS1/HIF-2 α and SOX9 regulate *TUBB3* gene expression and affect ovarian cancer aggressiveness [31]. Moreover, the expression of *EPAS1* gene was significantly correlated with tumor size, invasion, and necrosis as well as with *VEGF* gene expression, which supported the correlation of EPAS1 up-regulation with tumor angiogenesis [32].

Recently was shown that genes encoded transcription factors E2F8, HOXC6, EPAS1, and TBX3 are strongly depended from the endoplasmic reticulum stress particularly its IRE1 signaling pathway, because inhibition of IRE1, especially its endoribonuclease activity,

significantly affects all these gene expressions and this deregulation of proliferation related genes (suppression of pro-proliferative genes *E2F8*, *HOXC6*, and *EPAS1* and up-regulation of transcription repressor gene *TBX3*) correlates to slower tumor growth [33].

The general transcription factor IIB (GTF2B) is also overexpression in human hepatocellular carcinoma and has a potential link to cell proliferation [34]. There is data that the MYC-associated zinc-finger protein MAZ is a purine-binding transcription factor, which modulates cell proliferation and metastasis through reciprocal regulation of androgen receptor [35]. The transcriptional repressor SNAI2 (snail family zinc finger 2), also known as SLUG, is controlled invasion of colorectal cancer cells [36]. Recently was shown that CUL4A induces epithelial-mesenchymal transition and promotes cancer metastasis by regulating the expression of transcriptional repressor TCF8/ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) [37].

The aim of this study was to investigate the effects of glucose and glutamine deprivation on the expression of genes encoded transcription factors *E2F8*, *EPAS1/HIF2A*, *HOXC6*, *TBX3*, *TBX2*, *GTF2B*, *GTF2F2*, *MAZ*, *SNAI2*, *TCF3*, and *TCF8/ZEB1*, which participate in the regulation of cell proliferation and invasion in U87 glioma cell line and its subline with IRE1 loss of function for evaluation of possible significance these genes in the control of tumor growth through IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress signaling.

METHODS

The glioma cell line U87 (HTB-14) was obtained from ATCC (USA) and grown in high glucose (4.5 g/l) Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM; Gibco, Invitrogen, USA) supplemented with glutamine (2 mM), 10% fetal bovine serum (Equitech-Bio, Inc., USA), penicillin (100 units/ml; Gibco, USA) and streptomycin (0.1 mg/ml; Gibco) at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Glucose and glutamine

deprivation conditions were created by changing the complete DMEM medium into culture plates on DMEM medium without glucose or glutamine and plates were exposed to these conditions for 16 h.

In this work we used two sublines of U87 glioma cells. One subline was obtained by selection of stable transfected clones with overexpression of vector (pcDNA3.1), which was used for creation of dominant-negative construct (dnIRE1). This untreated subline of glioma cells was used as control (control glioma cells) in the study of the effects of glutamine and glucose deprivations on the expression level of transcription factor *E2F8*, *EPAS1*, *HOXC6*, *TBX3*, *TBX2*, *GTF2F2*, *GTF2B*, *MAZ*, *SNAI2*, *TCF3*, and *TCF8/ZEB1* genes. Second subline was obtained by selection of stable transfected clones with overexpression of dnIRE1 and has suppressed both protein kinase and endoribonuclease activities of this bifunctional signaling enzyme of endoplasmic reticulum stress. This cell subline is a gift from prof. M. Moenner (France) [4]. Previously was shown that these cells have low proliferation rate and does not express XBP1 alternative splice variant, a key transcription factor in IRE1 signaling, after induction endoplasmic reticulum stress by tunicamycin [6]. The expression level of the studied genes in these cells upon glutamine and glucose deprivations was compared with cells, transfected by vector (control glioma cells).

Total RNA was extracted from glioma cells using Trizol reagent according to manufacturer protocols (Invitrogen, USA). The RNA pellets were washed with 75 % ethanol and dissolved in nuclease-free water. For additional purification RNA samples were re-precipitated with 95 % ethanol and re-dissolved again in nuclease-free water.

QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Germany) was used for cDNA synthesis according to manufacturer protocol. The expression level of *E2F8*, *EPAS1*, *HOXC6*, *TBX3*, *TBX2*, *GTF2F2*, *GTF2B*, *MAZ*,

SNAI2, *TCF3*, *TCF8*, and *ACTB* mRNA were measured in U87 glioma cells by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using Mx 3000P QPCR (Stratagene, USA) and Absolute qPCR SYBRGreen Mix (Thermo Fisher Scientific, ABgene House, UK) or semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using “MasterCycler Personal” (“Eppendorf”, Germany). Polymerase chain reaction was performed in triplicate using specific primers, which were received from Sigma-Aldrich (USA).

For amplification of HOXC6 (homeobox C6 transcription factor) cDNA we used next forward and reverse primers: 5'-AAAAGAGGAAAAGCGGGAAG-3' and (5'-GGTCCACGTTTGACTCCCTA-3', correspondingly. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 772 – 791 and 963 – 944 of human HOXC6 cDNA (GenBank accession number NM_004503). The size of amplified fragment is 192 bp. The amplification of EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1), also known as hypoxia-inducible factor 2alpha (HIF-2 α), cDNA for real time RCR analysis was performed using two oligonucleotides primers: forward – 5'-AAGCCTTGGAGGGTTTCATT-3' and reverse – 5'-TCATGAAGAAGTCCCGCTCT-3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 788 – 807 and 1021 – 1002 of human EPAS1 cDNA (GenBank accession number NM_001430). The size of amplified fragment is 234 bp. For amplification of E2F8 (E2F transcription factor 8)cDNA we used next forward and reverse primers: 5'-CCACCACAGCAAATATCGTF-3' and 5'-CTTTGGCCTCAGGTAATCCA-3', correspondingly. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 596 – 615 and 805 – 786 of human E2F8 cDNA (GenBank accession number NM_024680). The size of amplified fragment is 210 bp. For amplification of TBX3 (T-box 3 transcriptional repressor) cDNA we used forward (5'-ACTGGGGAACAGTFGATGTC-3' and reverse (5'-TTCGGGGAACA AGTATGTCC-3') pri-

mers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 1551 – 1570 and 1729 – 1710 of human TBX3 cDNA (GenBank accession number NM_005996). The size of amplified fragment is 179 bp. For amplification of TBX2 (T-box 2 transcriptional factor) cDNA we used forward (5'-GGGAC CAGTTCCACAAGCTA-3' and reverse (5'-AAGCCGTFCTTGTCAGAGAT-3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 625 – 644 and 943 – 924 of human TBX2 cDNA (GenBank accession number NM_005994). The size of amplified fragment is 319 bp. The amplification of GTF2F2 (general transcription factor IIF, polypeptide 2), also known as ATP-dependent helicase GTF2F2 and transcription initiation factor RAP30, cDNA for real time RCR analysis was performed using two oligonucleotides primers: forward – 5'-GGAGTFTGGCTAGTCAAGGT-3' and reverse – 5'-GCACTGACTGAAGCTG GTTT-3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 209 – 228 and 390 – 371 of human GTF2F2 cDNA (GenBank accession number NM_004128). The size of amplified fragment is 182 bp. For amplification of GTF2B (general transcription factor IIB), also known as RNA polymerase II transcription factor IIB, cDNA we used forward (5'-TCTGTTG TFTCTTGTTGCGG-3' and reverse (5'-GTTTCGCCATTCAGATCCCAC-3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 80 – 99 and 280 – 261 of human GTF2B cDNA (GenBank accession number NM_001514). The size of amplified fragment is 201 bp. The amplification of MAZ (MYC-associated zinc finger protein, purine-binding transcription factor), also known as serum amyloid A activating factor 1 (SAF-1), cDNA for real time RCR analysis was performed using two oligonucleotides primers: forward – 5'-TCTACCACCTGAACCGAC AC-3' and reverse – 5'-TTTGAAGGGC CGTTCTGTTG-3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 1037 – 1056 and 1266 – 1247 of human

MAZ cDNA (GenBank accession number NM_002383). The size of amplified fragment is 230 bp. For amplification of transcription factor SNAI2 (snail family zinc finger 2), also known as neural crest transcription factor SLUG, cDNA we used forward (5'- CCT GGTTGCTTCAAGGACAC-3' and reverse (5'-AGCAGCCAGATTCCTCATGT-3') primers. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 765 – 784 and 968 – 949 of human SNAI2 cDNA (GenBank accession number NM_003068). The size of amplified fragment is 204 bp. The amplification of transcriptional regulator TCF3 (transcription factor 3), also known as E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12E47, cDNA was performed using forward primer (5'-ACAAGGAGCTCAGTFACCTC-3') and reverse primer (5'-CTGTFCGACTCAGTFAAGTF-3'). These oligonucleotides correspond to sequences 107 – 126 and 326 – 307 of human TCF3 cDNA (GenBank accession number NM_003200). The size of amplified fragment is 220 bp. The amplification of transcription repressor TCF8 (factor 8), also known as ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1), cDNA for real time RCR analysis was performed using two oligonucleotides primers: forward – 5'-CAGGGAGGAGCAGTFAAAGA –3' and reverse – 5'-CTCTTCAGGTCCTCAGGAA –3'. The nucleotide sequences of these primers correspond to sequences 209 – 228 and 438 – 419 of human TCF8/ZEB1 cDNA (GenBank accession number NM_030751). The size of amplified fragment is 230 bp. The amplification of beta-actin (ACTB) cDNA was performed using forward - 5'- GGA CTTC GAGCAAGAGATGG –3' and reverse - 5'-AGCACTGTFTTGGCGTACAG –3' primers. These primer nucleotide sequences correspond to 747 – 766 and 980 – 961 of human *ACTB* cDNA (GenBank accession number NM_001101). The size of amplified fragment is 234 bp. The expression of beta-actin mRNA was used as control of analyzed RNA quantity.

An analysis of quantitative PCR was perfor-

med using special computer program Differential Expression Calculator. The values of the expression of transcription factors *E2F8*, *EPAS1*, *HOXC6*, *TBX3*, *TBX2*, *GTF2F2*, *GTF2B*, *MAZ*, *SNAI2*, *TCF3*, and *TCF8* mRNA were normalized to beta-actin mRNA expressions and represent as percent of control (100 %). Statistical analysis was performed according to Student's test using Excel program and OriginPro 7.5 software. All values are expressed as mean \pm SEM from triplicate measurements performed in 4 independent experiments.

RESULTS

To test the effect of glutamine and glucose deprivations on expression levels of different transcription factor genes, strongly related to both positive and negative control of cell proliferation in relation to IRE1 signaling enzyme function, we used the U87 glioma cell sublines, which constitutively expresses vector pcDNA3.1 (control cells) or dnIRE1 [10, 21]. Figure 1 demonstrates that glutamine deprivation affects the expression of studied genes at mRNA level: up-regulates the expression of *EPAS1* (+28 %), *TBX3* (+26 %), *MAZ* (+22 %), and *GTF2B* (+51 %) genes and down-regulates of *E2F8* (-50 %), *TBX2* (-47 %), *TCF8/ZEB1* (-16 %), and *GTF2F2* (-27 %) gene expressions as compared to control glioma cells growing with glutamine. It is interesting to note that more significant changes in the expression level were shown for *E2F8*, *TBX2*, and *GTF2B* genes as compared to other studied genes. At the same time, the expression of *HOXC6*, *SNAI2*, and *TCF3* genes at mRNA level was resistant to glutamine deprivation in control glioma cells.

We also analyzed the expression level of genes encoded different transcription factors in glioma cells upon glucose deprivation condition. As shown in Figure 2, glucose deprivation up-regulates the expression level of *EPAS1* (+45%) and *GTF2B* (+16 %) genes only and down-regulates of *E2F8* (2.9 fold), *TBX2* (-34 %), *TCF3* (-22 %), and *HOXC6* (-15 %) gene expressions in control

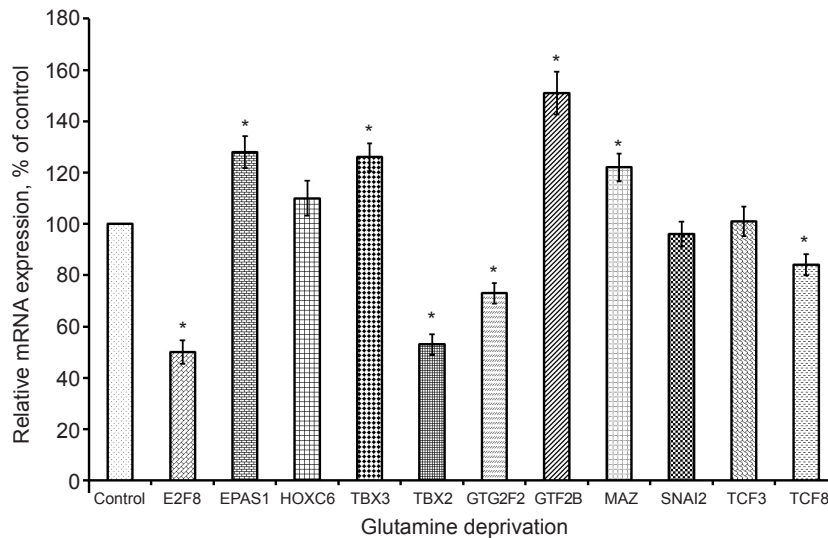
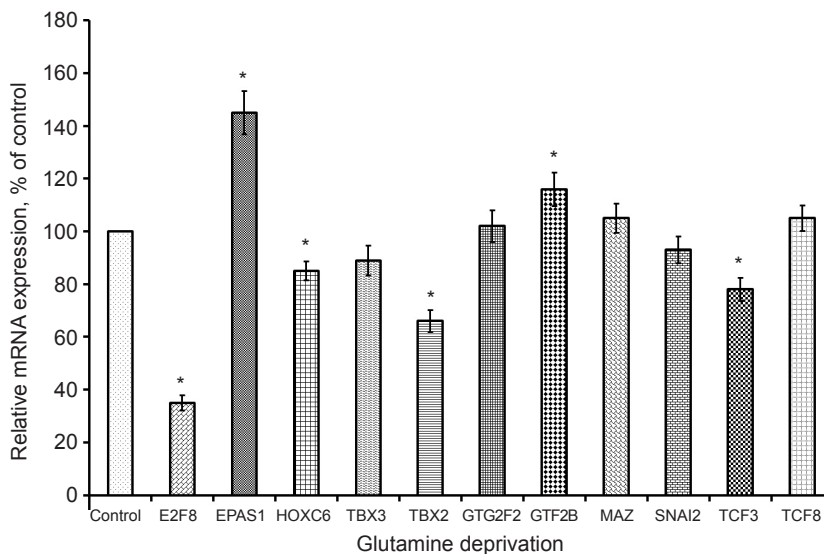


Figure 1. Effect of glutamine deprivation on the expression of transcription factor genes *E2F8* (E2F transcription factor 8), *EPAS1* (endothelial PAS domain protein 1), *HOXC6* (homeobox C6), *TBX3* (T-box 3), *TBX2* (T-box 2), *GTF2F2* (general transcription factor IIF), *GTF2B* (general transcription factor IIB), *MAZ* (MYC-associated zinc finger protein, purine-binding transcription factor), *SNAI2* (snail family zinc finger 2), *TCF3* (transcription factor 3), and *TCF8* in glioma cell line U87 measured by quantitative PCR. Values of these gene expressions were normalized to beta-actin expression and represent as percent of control (vector, 100 %); mean \pm SEM; $n = 4$; * – $P < 0.05$ as compared to control

glioma cells as compared to cells growing with glucose. It is interesting to note that more significant changes in the expression level were shown for *E2F8* and *EPAS1* genes as compared to other studied genes. At the same time, the

expression of *GTF2F2*, *TBX3*, *MAZ*, *SNAI2*, and *TCF8* genes at mRNA level was resistant to glucose deprivation in control glioma cells.

We next studied how inhibition of IRE1 modulates the effect of glutamine and glucose



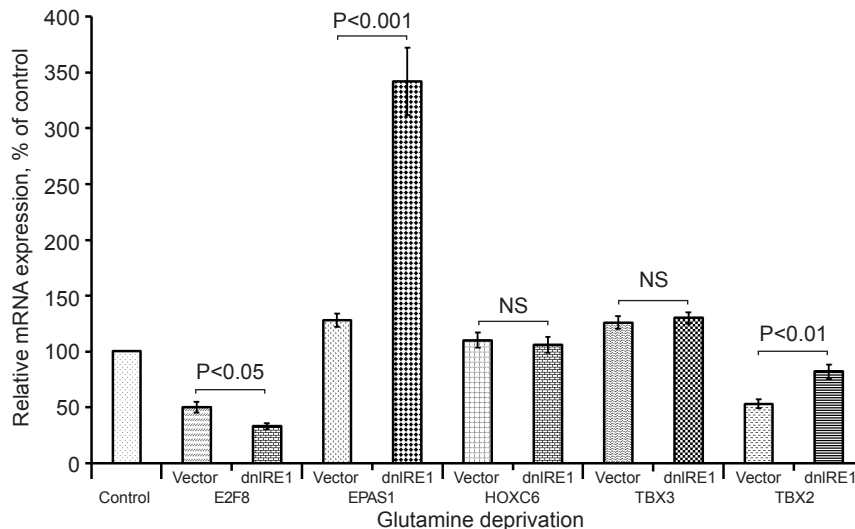
Figures 2. Effect of glucose deprivation on the expression of transcription factor genes *E2F8*, *EPAS1*, *HOXC6*, *TBX3*, *TBX2*, *GTF2F2*, *GTF2B*, *MAZ*, *SNAI2*, *TCF3*, and *TCF8* in glioma cell line U87 measured by quantitative PCR. Values of these gene expressions were normalized to beta-actin expression and represent as percent of control (vector, 100 %); mean \pm SEM; $n = 4$; * – $P < 0.05$ as compared to control

deprivation on the expression of these genes on mRNA level. As shown in Figure 3, the expression of *HOXC6* gene is resistant to glutamine deprivation condition in both control glioma cells and cells with knockdown IRE1. However, the changes in the expression of genes encoded transcription factor *EPAS1*, *E2F8*, and *TBX2* upon glutamine deprivation condition is significantly different in control glioma and cells with knockdown IRE1: for *EPAS1* in 8.6 fold, for *E2F8* in 1.3 fold, and for *TBX2* in 2.6 fold. Moreover, inhibition of IRE1 completely abolishes the effect of glutamine deprivation on the expression *TBX2* gene.

The results of comparative investigation of the expression of *GTF2F2*, *GTF2B*, *MAZ*, *SNAI2*, *TCF3*, and *TCF8/ZEB1* genes upon glutamine deprivation in two types of glioma cells are shown in Figure 4. Thus, the expression of *TCF3* gene is resistant to glutamine deprivation condition in both control glioma cells and cells with knockdown IRE1. At the same time, glutamine deprivation down-regulates the expression level of *GTF2F2* gene in both control glioma cells and in cells without IRE1 enzyme function, but these changes are similar

(Figure 4). Moreover, inhibition of IRE1 creates sensitivity of *SNAI2* gene to glutamine deprivation and abolishes the effect of this deprivation on the expression of *MAZ* gene as well as enhances the effect of glutamine deprivation on the expression of *GTF2B* (1.5 fold) and *TCF8/ZEB1* (1.9 fold) genes.

We also studied the effect of inhibition of IRE1 signaling enzyme on sensitivity of the expression of transcription factor genes at mRNA level to glucose deprivation in glioma cells. As shown in Figure 5, the expression of *TBX3* gene is resistant to glucose deprivation condition in both control glioma cells and cells with knockdown IRE1. At the same time, glucose deprivation down-regulates the expression level of *TBX2* gene only in control glioma cells and inhibition of IRE1 enzyme function abolishes the sensitivity of this gene expression to glucose deprivation (Figure 5). Moreover, the changes in the expression level of genes encoded transcription factor *E2F8*, *EPAS1*, and *HOXC6* upon glucose deprivation condition is significantly different in control glioma and cells with knockdown IRE1: for *E2F8* in 2.1 fold, for *EPAS1* in 5.9 fold, and for *HOXC6* in 2.5 fold.



Figures 3. Comparative effect of glutamine deprivation on the expression of transcription factor genes *E2F8*, *EPAS1*, *HOXC6*, *TBX3*, and *TBX2* in two types of glioma cells: control cells transfected by vector (Vector) and cells with a deficiency of the signaling enzyme IRE1 (dnIRE1) measured by quantitative PCR. Values of these gene expressions were normalized to beta-actin expression and represent as percent of corresponding control (both controls is accepted as 100 %); NS – no significant changes; mean \pm SEM; $n = 4$

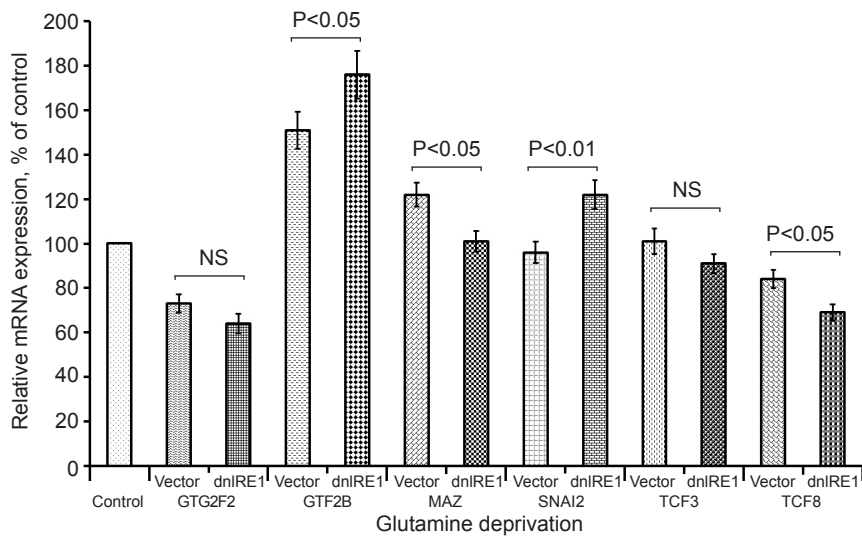
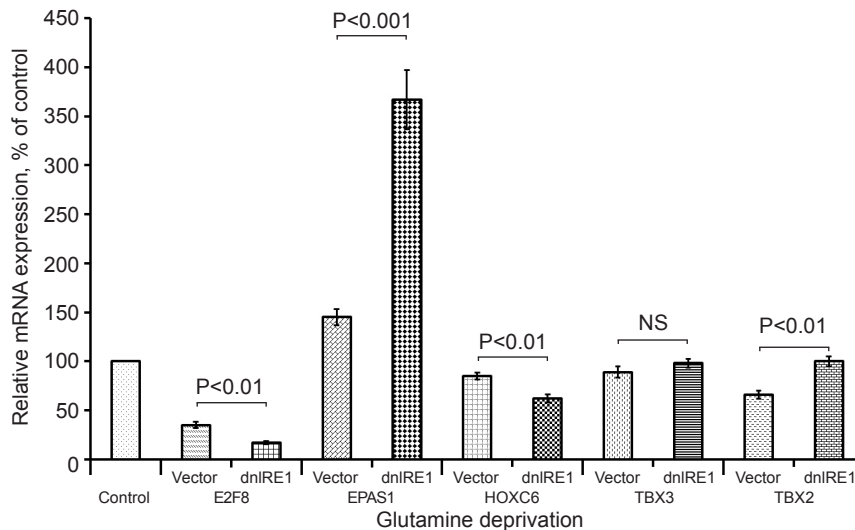


Figure 4. Comparative effect of glutamine deprivation on the expression of transcription factor genes *GTF2F2*, *GTF2B*, *MAZ*, *SNAI2*, *TCF3*, and *TCF8* in two types of glioma cells: control cells transfected by vector (Vector) and cells with a deficiency of the signaling enzyme IRE1 (dnIRE1) measured by quantitative PCR. Values of these gene expressions were normalized to beta-actin expression and represent as percent of corresponding control (both controls is accepted as 100%); NS – no significant changes; mean \pm SEM; $n = 4$

Figure 6 contains the results of comparative study the sensitivity of *GTF2F2*, *GTF2B*, *MAZ*, *SNAI2*, *TCF3*, and *TCF8/ZEB1* gene expressions to glucose deprivation in control glioma cells and cells without IRE1 signaling enzyme function. We have shown that the expression of

TCF8 gene is resistant to glucose deprivation condition in both control glioma cells and cells with IRE1 knockdown. At the same time, the expression of *MAZ* gene is also resistant to glucose deprivation in both types of cells; however, between these two groups there is



Figures 5. Comparative effect of glucose deprivation on the expression of transcription factor genes *E2F8*, *EPAS1*, *HOXC6*, *TBX3*, and *TBX2* in two types of glioma cells: control cells transfected by vector (Vector) and cells with a deficiency of the signaling enzyme IRE1 (dnIRE1) measured by quantitative PCR. Values of these gene expressions were normalized to beta-actin expression and represent as percent of corresponding control (both controls is accepted as 100%); NS – no significant changes; mean \pm SEM; $n = 4$

small but statistically significant differences (Figure 6). We have also shown that inhibition of IRE1 creates sensitivity of *GTF2F2* and *SNAI2* genes to glucose deprivation and enhances the effect of this deprivation on the expression of *GTF2B* gene (4.4 fold). Furthermore, inhibition of IRE1 signaling enzyme does not change the effect of glucose deprivation on the expression *TCF3* gene: -22 % in control glioma cells and -20 % in IRE1 knockdown cells (Figure 6).

Thus, the expression almost all studied genes encoded proliferation-related transcription factors is affected by glutamine and glucose deprivations and inhibition of IRE1 preferentially modified sensitivity of these gene expressions to glutamine and glucose deprivations.

DISCUSSION

Results of this study clearly demonstrated that the expression levels of almost all tested genes (*E2F8*, *EPAS1*, *HOXC6*, *TBX3*, *TBX2*, *GTF2F2*, *GTF2B*, *MAZ*, *SNAI2*, *TCF3*, and *TCF8/ZEB1*) encoding key proliferation-related transcription factors, which are stress responsible and participate in malignant tumor

growth, are affected by glucose and glutamine deprivations through IRE1 signaling branch of endoplasmic reticulum stress. Our results are confirmed to data that glycolysis and glutaminolysis are related to the control of cell proliferation through regulation of cell cycle and tumor suppressor genes [12, 38-40]. Recently we have shown that genes encoded transcription factors *E2F8*, *HOXC6*, *EPAS1*, and *TBX3* are strongly depended from the endoplasmic reticulum stress particularly its IRE1 signaling pathway, because inhibition of IRE1, especially its endoribonuclease activity, significantly affects all these gene expressions. Furthermore, this deregulation of proliferation related transcription factors (suppression of pro-proliferative genes *E2F8*, *HOXC6*, and *EPAS1* and up-regulation of transcription repressor gene *TBX3*) strongly correlates to down-regulation of glioma cell proliferation and slower tumor growth [33].

In this study we have shown that both glucose and glutamine deprivation down-regulates the expression level of *E2F8* gene and that inhibition of IRE1 signaling enzyme function in U87 glioma cells more strongly decreases

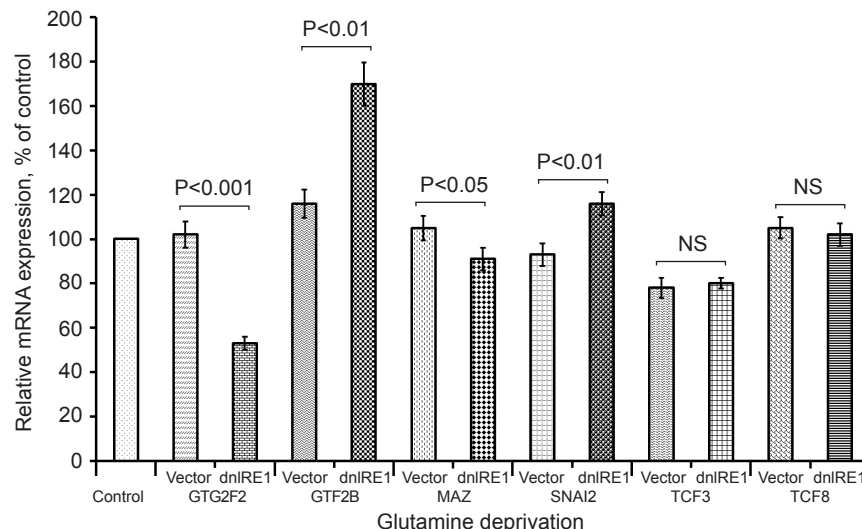


Figure 6. Comparative effect of glucose deprivation on the expression of transcription factor genes *GTF2F2*, *GTF2B*, *MAZ*, *SNAI2*, *TCF3*, and *TCF8* in two types of glioma cells: control cells transfected by vector (Vector) and cells with a deficiency of the signaling enzyme IRE1 (dnIRE1) measured by quantitative PCR. Values of these gene expressions were normalized to beta-actin expression and represent as percent of corresponding control (both controls is accepted as 100 %); NS – no significant changes; mean \pm SEM; $n = 4$

E2F8 gene expression and observed down-regulation correlate with suppression of this gene expression and cell proliferation by IRE1 inhibition [33]. Thus, our results completely argue to data Colombo et al. [12], which shown that glucose and glutamine are required for tumor progression through cell cycle control and that deprivation of these substrates of glycolysis and glutaminolysis have opposite effect. There is also data that *E2F8* creates complexes with other members of E2F family of transcription factors and coordinates various cellular functions through the regulation of the expression of target genes, thereby regulating cell cycle, apoptosis, and angiogenesis, including transcriptional activation of *VEGFA* in cooperation with *HIF1* [25-27].

At the same time, both glutamine and glucose deprivations lead to up-regulation of the expression level of transcription factor *EPAS1/HIF-2 α* and inhibition of IRE1 enhances effect of glutamine and glucose deprivation conditions on this gene expression. The expression of *EPAS1* gene mediates numerous hypoxia-induced processes including proliferation in cell-specific manner is significantly correlated with tumor size, invasion, and necrosis as well as with *VEGF* gene expression, which supported the correlation of *EPAS1* up-regulation with tumor angiogenesis [31, 32]. Moreover, *EPAS1* gene expression level is strongly down-regulated in glioma cells harboring dnIRE1 [33]. Thus, biological significance of increased expression of *EPAS1* gene upon glutamine and glucose deprivation is not clear yet and warrants further study.

We have also demonstrated that the expression of T-box transcription factor *TBX3* is elevated in glioma cells exposure to glutamine deprivation condition, but is resistant to glucose deprivation. Moreover, up-regulation of *TBX3* gene expression was observed in glioma cells growing in regular medium (with glucose and glutamine) when IRE1 function is inhibited [33]. This increase of *TBX3* gene expression by IRE1 inhibition as well as by glutamine deprivation

may contribute to the suppression of cell proliferation and glioma growth of these cells, because *TBX3* is a transcriptional repressor, which controls the rate of cell proliferation as well as mediate cellular signaling pathways and high expression level of this gene was found in normal human astrocytes [28, 30, 33]. At the same time, transcription factor *TBX3* plays multiple roles in normal development and disease by either repressing or activating transcription of target genes in a context-dependent manner and it may mediate the antiproliferative and pro-migratory role of TGF- β 1 in breast epithelial and skin keratinocytes, but its overexpression is associated with several cancers [29]. Thus, increased expression of *TBX3* can mediate inhibition of cell growth and could also contribute to the suppression of glioma cells proliferation, since it has pleiotropic functions. Transcription factor *TBX2* has preferentially opposite functions to *TBX3* and its expression is down-regulated upon both glutamine and glucose deprivation possibly through IRE1 signaling pathway, because inhibition of IRE1 abolishes sensitivity of this gene expression to glutamine as well as glucose deprivation condition. Thus, decreased expression of transcription factor *TBX2* can mediate inhibition of cell growth upon glutamine and glucose deprivation.

CONCLUSIONS

Results of this study demonstrated that the expression of almost all studied genes encoded key proliferation-related transcription factors is affected by glutamine and glucose deprivation conditions in gene-specific manner and that inhibition of IRE1, a central mediator of endoplasmic reticulum stress response, preferentially modified sensitivity of these gene expressions to glutamine and glucose deprivations and possibly contributes to slower glioma growth. However, molecular mechanisms of the regulation of proliferation-related transcription factor genes by glutamine and glucose deprivation through the endoplas-

mic reticulum stress response pathways warrant further investigation for clarification the role of glycolysis and glutaminolysis in cancer progression as well as development new strategies of anti-tumor therapy.

Д.О. Цимбал, Д.О. Мінченко, І.В. Кривдюк, О.О. Рябовол, О.В. Галкін, О.О. Ратушна, О.Г. Мінченко

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ, ЩО МАЮТЬ ВІДНОШЕННЯ ДО ПРОЛІФЕРАЦІЇ, У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87 З ПРИГНІЧЕННЯМ IRE1 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ ТА ГЛУТАМІНУ

Глюкоза та глутамін, як і стрес ендоплазматичного ретикулула, є необхідними для росту пухлин, оскільки причетні до регуляції клітинного циклу. Пригнічення ERN1/IRE1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулула до ядра 1/залежний від інозитола ензим 1), що є центральним медіатором стресу ендоплазматичного ретикулула, істотно пригнічує проліферацію клітин гліоми і ріст пухлин, а також модифікує чутливість експресії генів до дефіциту глюкози та глутаміну. Ми вивчали експресію генів, що кодують такі транскрипційні фактори, як E2F8 (E2F transcription factor 8), EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1), HOXC6 (homeobox C6), TBX3 (T-box 3), TBX2 (T-box 2), GTF2F2 (general transcription factor IIF), GTF2B (general transcription factor IIB), MAZ (MYC-associated zinc finger protein, purine-binding transcription factor), SNAI2 (snail family zinc finger 2), TCF3 (transcription factor 3) та TCF8/ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) у клітинах гліоми лінії U87 за умов дефіциту глюкози та глутаміну залежно від пригнічення IRE1. Нами встановлено, що за умов дефіциту глутаміну спостерігається посилення експресії генів *EPAS1*, *TBX3*, *GTF2B* та *MAZ* і зниження експресії генів *E2F8*, *GTF2F2*, *TCF8* та *TBX2* у контрольних клітинах гліоми. Водночас за умов дефіциту глюкози збільшується рівень експресії генів *EPAS1* та *GTF2B* і зменшується - *E2F8*, *HOXC6*, *TCF3* та *TBX2* у цих клітинах гліоми. Пригнічення IRE1 за допомогою dnIRE1 суттєво змінює експресію більшості досліджених генів, але по-різному. Ця робота продемонструвала, що експресія генів транскрипційних факторів, що мають відношення до проліферації, змінюються за умов дефіциту глюкози та глутаміну залежно від функції IRE1 і можливо задіяні у зниженні інтенсивності росту пухлин після пригнічення IRE1.

Ключові слова: експресія мРНК; транскрипційні фактори; стрес ендоплазматичного ретикулула; пригнічення IRE1; дефіцит глюкози; дефіцит глутаміну; клітини гліоми.

Д.О. Цимбал, Д.О. Мінченко, І.В. Кривдюк, О.О. Рябовол, О.В. Галкін, О.О. Ратушна, О.Г. Мінченко

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ, КОТОРЫЕ ИМЕЮТ ОТНОШЕНИЕ К ПРОЛИФЕРАЦИИ, В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ ЛИНИИ U87 С УГНЕТЕННЫМ IRE1 ПРИ ДЕФИЦИТЕ ГЛЮКОЗЫ И ГЛУТАМИНА

Глюкоза и глутамин, как и стресс эндоплазматического ретикулула – необходимые факторы роста опухолей, поскольку они причастны к регуляции клеточного цикла. Угнетение ERN1/IRE1 (сигналинг от эндоплазматического ретикулула к ядру 1/зависимый от инозитола энзим 1), что является центральным медиатором стресса эндоплазматического ретикулула, существенно угнетает пролиферацию клеток глиомы и рост опухоли, а также модифицирует чувствительность экспрессии генов к дефициту глюкозы и глутамина. Мы изучали экспрессию генов, что кодируют транскрипционные факторы E2F8 (E2F transcription factor 8), EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1), HOXC6 (homeobox C6), TBX3 (T-box 3), TBX2 (T-box 2), GTF2F2 (general transcription factor IIF), GTF2B (general transcription factor IIB), MAZ (MYC-associated zinc finger protein, purine-binding transcription factor), SNAI2 (snail family zinc finger 2), TCF3 (transcription factor 3) и TCF8/ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) в клетках глиомы линии U87 при дефиците глюкозы и глутамина в зависимости от угнетения IRE1. Нами установлено, что при дефиците глутамина отмечается усиление экспрессии генов *EPAS1*, *TBX3*, *GTF2B* и *MAZ* и снижение – *E2F8*, *GTF2F2*, *TCF8* и *TBX2* в контрольных клетках глиомы. В то же время, при дефиците глюкозы отмечается увеличение уровня экспрессии генов *EPAS1* и *GTF2B* и снижение – *E2F8*, *HOXC6*, *TCF3* и *TBX2* в этих клетках глиомы. Угнетение IRE1 с помощью dnIRE1 существенно изменяет экспрессию большинства исследованных генов, но по-разному. Эта работа продемонстрировала, что экспрессия генов транскрипционных факторов, что имеют отношение к пролиферации, изменяется при дефиците глюкозы и глутамина в зависимости от функции IRE1 и возможно задействованы в снижении интенсивности роста опухолей после угнетения IRE1.

Ключевые слова: экспрессия мРНК; транскрипционные факторы; стресс эндоплазматического ретикулула; угнетение IRE1; дефицит глюкозы; дефицит глутамина; клетки глиомы.

REFERENCES

1. Clarke HJ, Chambers JE, Liniker E, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer Cell*. 2014; 25(5): 563-73.
2. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol*. 2012; 197: 857-67.

3. Yadav RK, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and cancer. *J Cancer Prev.* 2014; 19(2): 75-88.
4. Cao SS, Kaufman RJ. Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2013; 17(4): 437-48.
5. Bravo R1, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AF, Lavandero S. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013; 301: 215-90.
6. Manié SN, Lebeau J, Chevet E. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014; 307(10): C901-7.
7. Minchenko OH, Kharkova AP, Bakalets TV, Kryvdiuk IV. Endoplasmic reticulum stress, its sensor and signaling systems and the role in the regulation of gene expressions in malignant tumor growth and hypoxia. *Ukr Biochem J.* 2013; 85(5): 5–16.
8. Moenner M, Pluquet O, Bouche-careilh M, Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(22):10631–4.
9. Drogat B, Auguste P, Nguyen DT, Bouche-careilh M, Pineau R, Nalbantoglu J, Kaufman RJ, Chevet E, Bikfalvi A, Moenner M. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2007; 67(14): 6700–7.
10. Auf G, Jabouille A, Guérit S, Pineau R, North S, Platonova N, Maitre M, Favereaux A, Vajkoczy P, Seno M, Bikfalvi A, Minchenko D, Minchenko O, Moenner M. Inositol-requiring enzyme 1 alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(35): 15553–8.
11. Minchenko OH, Kubaichuk KI, Minchenko DO, Kovalevska OV, Kulinich AO, Lypova NM. Molecular mechanisms of IRE-1-mediated angiogenesis. *Int J Physiol Pathophysiol.* 2014; 5(1): 1-22.
12. Colombo SL, Palacios-Callender M, Frakich N, Carcamo S, Kovacs I, Tudzarova S, Moncada S. Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(52): 21069-74.
13. Yalcin A, Clem BF, Imbert-Fernandez Y, Ozcan SC, Peker S, O'Neal J, Klarer AC, Clem AL, Telang S, Chesney J. 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death and Disease* 2014; 5: e1337.
14. Huber AL, Lebeau J, Guillaumot P, Pétrilli V, Malek M, Chilloux J, Fauvet F, Payen L, Kfoury A, Renno T, Chevet E, Manié SN. p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol Cell.* 2013; 49(6): 1049-59.
15. Lenihan CR, Taylor CT. The impact of hypoxia on cell death pathways. *Biochem Soc Trans.* 2013; 41: 657–63.
16. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol.* 2013; 15(5): 481-90.
17. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci.* 2014; 39(5): 245-54.
18. Malhotra JD, Kaufman RJ. ER stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3: a004424.
19. Pluquet O, Dejeans N, Chevet E. Watching the clock: endoplasmic reticulum-mediated control of circadian rhythms in cancer. *Ann Med.* 2014;46(4):233-43.
20. Minchenko DO, Kubaichuk KI, Hubenia OV, Kryvdiuk IV, Kharkova AP, Herasymenko RM, Sulik RV, Karbovskiy LL, Minchenko OH. Endoplasmic reticulum stress and angiogenesis in cancer. *Int J Physiol Pathophysiol.* 2014; 5(3): 261-81.
21. Auf G, Jabouille A, Delugin M, Guérit S, Pineau R, North S, Platonova N, Maitre M, Favereaux A, Vajkoczy P, Seno M, Bikfalvi A, Minchenko D, Minchenko O, Moenner M. High epi-regulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1alpha and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer.* 2013; 13: 597.
22. Pluquet O, Dejeans N, Bouche-careilh M, Lhomond S, Pineau R, Higa A, Delugin M, Combe C, Lorient S, Cubel G, Dugot-Senant N, Vital A, Loiseau H, Gosline SJ, Taouji S, Hallett M, Sarkaria JN, Anderson K, Wu W, Rodriguez FJ, Rosenbaum J, Saltel F, Fernandez-Zapico ME, Chevet E. Posttranscriptional regulation of PER1 underlies the oncogenic function of IREα. *Cancer Res.* 2013; 73(15): 4732–43.
23. Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon CJ, Kluger Y, Dynlacht DD. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Molecular Cell.* 2007; 27: 53–66.
24. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2009; 186(3):323–31.
25. Aragón T, van Anken E, Pincus D., Serafimova IM, Korennykh AV, Rubio CA, Walter P. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature.* 2009; 457(7230): 736–40.
26. Deng Q, Wang Q, Zong WY, Zheng DL, Wen YX, Wang KS, Teng XM, Zhang X, Huang J, Han ZG. E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation. *Cancer Res.* 2010; 70: 782-91.
27. Christensen J, Cloos P, Toftgaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E, Heeran M, Di Stefano L, Helin K. Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33 (17): 5458-70.
28. Weijts BG, Bakker WJ, Cornelissen PW, Liang KH,

- Schaftenaar FH, Westendorp B, de Wolf CA, Paciejewska M, Scheele CL, Kent L, Leone G, Schulte-Merker S, deBruin A. E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1. *EMBO J.* 2012; 31(19): 3871-84.
29. Washkowitz AJ, Gavrilov S, Begum S, Papaioannou VE. Diverse functional networks of Tbx3 in development and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2012; 4: 273-83.
30. Li J, Weinberg MS, Zerbini L, Prince S. The oncogenic TBX3 is a downstream target and mediator of the TGF- β 1 signaling pathway. *Mol Biol Cell.* 2013; 24(22): 3569-76.
31. Zhang Q, Jin XS, Yang ZY, Wei M, Liu BY, Gu QL. Upregulated Hoxc6 expression is associated with poor survival in gastric cancer patients. *Neoplasma.* 2013; 60(4): 439-445.
32. Raspaglio G, Petrillo M, Martinelli E, Li Puma DD, Mariani M, De Donato M, Filippetti F, Mozzetti S, Prislei S, Zannoni GF, Scambia G, Ferlini C. Sox9 and Hif-2 α regulate TUBB3 gene expression and affect ovarian cancer aggressiveness. *Gene.* 2014; 542: 173-81.
33. Bangoura G, Yang LY, Huang GW, Wang W. Expression of HIF-2 α /EPAS1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 525-30.
34. Li L, Zhang A, Cao X, Chen J, Xia Y, Zhao H, Shen A. General transcription factor IIb overexpression and a potential link to proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2013; 19 (2): 195-203.
35. Jiao L, Li Y, Shen D, Xu C, Wang L, Huang G, Chen L, Yang Y, Yang C, Yu Y, Sun Y. The prostate cancer-up-regulated Myc-associated zinc-finger protein (MAZ) modulates proliferation and metastasis through reciprocal regulation of androgen receptor. *Med Oncol.* 2013; 30 (2): 570.
36. Qian J, Liu H, Chen W, Wen K, Lu W, Huang C, Fu Z. Knockdown of Slug by RNAi inhibits the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells. *Mol Med Rep.* 2013; 8(4): 1055-9.
37. Wang Y, Wen M, Kwon Y, Xu Y, Liu Y, Zhang P, He X, Wang Q, Huang Y, Jen KY, LaBarge MA, You L, Kogan SC, Gray JW, Mao JH, Wei G. CUL4A induces epithelial-mesenchymal transition and promotes cancer metastasis by regulating ZEB1 expression. *Cancer Res.* 2014; 74 (2): 520-31.
38. Minchenko DO, Karbovskiy LL, Danilovskiy SV, Moenner M, Minchenko OH. Effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation on the expression of retinoblastoma and retinoblastoma-related genes in ERN1 knockdown glioma U87 cell line. *Am J Mol Biol.* 2012; 2(1): 21-31.
39. Minchenko DO, Danilovskiy SV, Kryvdiuk IV, Bakalets TV, Yavorskiy VV, Sulik RV, Hubenia OV, Minchenko OH. Effect of glutamine and glucose deprivation on the expression of TP53, MDM2, USP7 and PERP genes in glioma U87 cells with IRE-1 knockdown. *Int J Adv Med Sci.* 2014; 2(2): 13-8.
40. Minchenko DO, Danilovskiy SV, Kryvdiuk IV, Hlushchak NA, Kovalevska OV, Karbovskiy LL, Minchenko OH. Acute L-glutamine deprivation affects the expression of TP53-related protein genes in U87 glioma cells. *Fiziol Zh.* 2014; 60(4): 11-21.

Received 18.11.2015

Вплив активації TRPA1-рецепторів на десенситизацію TRPV1-каналів у нейронах дорсальних гангліїв щура

А.В. Драган¹, О.А. Петрушенко¹, О.П. Бурлак^{1,2}, О.О. Лук'янець^{1,2}

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

²Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ; e-mail: elena@biph.kiev.ua

Досліджували активність TRPA1- та TRPV1-каналів, їх чутливість до селективних активаторів – алілізотіоціанату (АІТС) і капсаїцину, особливості взаємодії цих каналів. Використовували метод мікрофлуоресцентної мікроскопії та кальційчутливий барвник fura-2AM. Експерименти проводили на культивованих нейронах дорсальних гангліїв щура. Встановлено, що аплікація АІТС і капсаїцину на сому DRG-нейронів викликала значне зростання вмісту внутрішньоклітинного Ca²⁺. Кількаразові повторні аплікації капсаїцину призводили до суттєвого зниження амплітуди кальцієвих транзєнтів (десенситизація TRPV1-каналів), що становило 20,7% від початкового значення. Подальша аплікація АІТС відновлювала чутливість TRPV1-каналів до капсаїцину (ресенситизація TRPV1-каналів). Таким чином, наші дослідження вказують на наявність регуляції активності TRPV1-каналів з боку TRPA1- каналів.

Ключові слова: TRPV1-канали; TRPA1-рецептори; кальцій; DRG-нейрони; кальцієва сигналізація; капсаїцин; алілізотіоціанат.

ВСТУП

Два представники родини каналів транзєнтного рецепторного потенціалу (TRP) – TRPA1- (анкіринові рецептори) та TRPV1- (ванілоїдні рецептори), що можуть коекспресуватися в периферичних сенсорних нейронах, відіграють важливу роль у формуванні ноцицептивної чутливості нервової системи [1–3]. Також ці рецептори суттєво задіяні в термочутливості та в процесах, що не пов'язані із нейрональною активністю [4].

TRPV1- канали відносяться до полімодальних рецепторів, чутливих до пошкоджувальних високих температур (понад 43°C), зміни рН (ацидоз і алкалоз), «ендованілоїдів» (анандамід, метаболіти арахідонової кислоти тощо). З іншого боку, TRPV1-канали чутливі до дії таких різних «пекучих» рослинних продуктів, як капсаїцин (з гострого перцю), резиніфератоксин (з рослини евкаліпт), піперин

(їдкий інгредієнт чорного перцю), гінгерол і зінгерон (з імбиру), камфора, а також євгенол (з гвоздичної олії) [5]. TRPV1-канали можуть активуватися низкою хімічних агентів – етанолом, отрутами з медуз і павуків та деякими іншими сполуками [5]. TRPA1-канали також відносяться до полімодальних ноцицепторних рецепторів різних пошкоджувальних стимулів, включаючи такі «пекучі» хімічні сполуки, як алілізотіоціанат, наявний в гірчичній олії, тіосульфінати, які є в часнику, коричний альдегід і слъзозгінні гази [6, 7].

Відомо, що обидва ці канали відносяться до неселективних кальційпроникних катіонних каналів, які беруть участь у регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію [8–11], відіграючи важливу сигнальну роль у нервових клітинах [12, 13]. Показано, що TRPA1- та TRPV1-канали здатні взаєморегулювати свою активність, і активація одного з них може підсилювати або пригнічувати чут-

© А.В. Драган, О.А. Петрушенко, О.П. Бурлак, О.О. Лук'янець

ливість іншого до відповідних селективних агоністів [9, 14].

Метою нашої роботи було вивчення взаємодії TRPA1- та TRPV1-каналів у кальцієвій сигналізації DRG-нейронів, зокрема можливого впливу активації TRPA1-каналів на функціонування TRPV1-каналів у тому самому нейроні.

МЕТОДИКА

Культивування нейронів дорсальних гангліїв щура. В експерименти брали однодобову культуру нейронів дорсальних гангліїв, виділених із шурів лінії Вістар віком 9 діб. Декапітацію щура проводили відповідно до вимог НАН України з використання експериментальних тварин. Виділені спинномозкові ганглії переносили у розчин Тіроде, що містив ферменти: колагеназу (тип IA, «Sigma-Aldrich», США) в концентрації 1 мг/мл та протеазу (тип XIV, «Sigma-Aldrich», США) в концентрації 2 мг/мл, в якому утримувалися протягом 30 хв. при 37°C. Для усунення залишків ферментів та запобігання їх подальшій дії ганглії інкубували в розчині DMEM («Sigma-Aldrich», США) із 10%-ю телячою ембріональною сироваткою (FBS) протягом 10 хв за цієї самої температури із кількаразовою заміною розчину для повної інактивації ферментів білками сироватки. Далі ганглії піпетували за допомогою Пастерівських піпеток різного діаметра у 0,5 мл культурального середовища (DMEM із FBS та антибіотиками) для одержання суспензії клітин. Отриману суспензію осаджували на попередньо знежирених скельцях у стерильних чашках Петрі та розміщували в CO₂-інкубаторі. В дослідах використовували клітини наступної доби після їх культивування.

Визначення експресії генів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). РНК виділяли з нейрональної культури DRG-нейронів, вирощеної на скельцях, покритих полілізином. З дослідних чашок Петрі, де знаходилися скельця, виливали культуральне середовище і вносили по 1 мл тризолу (TRIzol® Reagent, Ambion®) у чашку. Далі

РНК виділяли як описано виробником. Отриману тотальну РНК переводили у к-ДНК за допомогою набору реактивів “Revert Aid H Minus First Strand cDNA synthesis Kit” (Thermo Scientific) за протоколом виробника. З цією к-ДНК проводили полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), додаючи реагенти для проходження реакції “2’PCR Master Mix” («Fermentas (Thermo Fisher Scientific)», Литва) як описано виробником. В реакційну суміш додавали праймери з кінцевою концентрацією 0,25 мкмоль/л. Для виявлення експресії генів, що кодують білки TRPV1-каналів, використали праймери з послідовністю F 5’-AGC GAG TTC AAA GAC CCA GA-3’ та R 5’-TTC TCC ACC AAG AGG GTC AC-3’ з розміром продукту 300 пар основ. Для TRPA1-каналів брали праймери з послідовністю F 5’-CCC CAC TAC ATT GGG CTG CA-3’ та R 5’-CCG CTG TCC AGG CAC ATC TT-3’ з розміром продукту 500 пар основ. ПЛР проводили в термоциклері PeqSTAR 96 Universal Gradient («PeqLAB Biotechnologie GmbH»). Пробірки з реакційною сумішшю зберігали при 8 °C. Режим ампліфікації був однаковий для всіх реакцій. Отримані ПЛР-продукти розганяли протягом 30 хв у горизонтальному електрофорезі (Cleaver Scientific Ltd) з режимом 100 В, 80 мА та 8 Вт за допомогою блоку живлення Electrophoresis Power Supply Consort EV243 («Consort bvba», Бельгія). Використовували агарозний гель («Fermentas»), розчинений в однократному трисацетатному буфері 50’TAE («Fermentas», Литва) до кінцевої концентрації 1,5% та з додаванням бромистого етидію (MoBio Laboratories, Inc.) до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл. Всі амплікони були внесені в агарозний гель разом з барвником 6’DNA Loading Dye («Fermentas», Литва) та відповідність розміру продукту визначали за маркером Gene Ruler 100 bp («Fermentas», Литва). Всі продукти після електрофорезу були сфотографовані в ультрафіолетовому світлі за однакових умов.

Вимірювання змін концентрації Ca²⁺ за допомогою мікрофлуоресцентного методу.

Для дослідження змін $[Ca^{2+}]_i$ в сенсорних нейронах дорсальних гангліїв щура використовували кальцієвий індикатор fura-2AM [15]. Клітини інкубували протягом 30 хв при $37^\circ C$ з барвником у зовнішньоклітинному розчині. Після цього їх відмивали чистим розчином і залишали в ньому на 20 хв для завершальної деестерифікації fura-2AM без світла. Далі скельця переносили в чашку з лункою та закріплювали на інвертованому мікроскопі Olympus IX 71 (Японія). Протягом експерименту скельце постійно промивалося розчином Tyrode такого складу (ммоль/л): NaCl – 125, KCl 2,5, $-CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ – 1, Hepes – 20, глюкоза – 10 (pH 7,4 доводилось TrisOH).

Збудження флуоресцентного барвника та реєстрацію результатів здійснювали за допомогою системи та програмного забезпечення Cell M (Olympus, Німеччина) на довжинах хвилі 340 (F1) та 380 (F2) нм з використанням ксенонової лампи та відповідних фільтрів. Емісію барвника реєстрували в діапазоні 480–570 нм з піком 510 нм. Зміни концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} встановлювали співвідношенням інтенсивності свічення зонда при двох довжинах хвиль $R=F1/F2$. Перед початком замірів фонову флуоресценцію визначали за допомогою програмного забезпечення (Cell M, Olympus, Німеччина) та враховували у подальших вимірюваннях.

Аплікацію та зміну розчинів здійснювали електронною системою крапельної подачі або їх заміною у вимірювальній камері із швидкістю 1 мл за 30 с. Всі реактиви для експериментів були отримані від фірми («Sigma-Aldrich», США).

Статистичний аналіз результатів виконували із програмним забезпеченням OriginPro (OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТИ

ПЛР-аналіз показав, що мРНК TRPV1- та TRPA1- каналів експресуються в DRG- нейронах. Рис. 1 демонструє отримані фореграми агарозного гель-електрофорезу з

ПЛР-продуктами TRPV1- та TRPA1- генів. Експресія мРНК TRPA1-каналів була удвічі вищою, ніж мРНК TRPV1-каналів. Наші результати збігаються з експериментами на DRG-нейронах мишей, у яких експресію цих генів оцінювали під час постнатального розвитку [16]. Рівень експресії мРНК TRPV1-каналів зменшувався, а мРНК TRPA1-каналів суттєво збільшувався у мишей 21-ї доби постнатального онтогенезу (P21) порівняно з новонародженими (P0).

Відомо, що TRPV1- та TRPA1-рецептори є неселективними іонними каналами, які здатні пропускати іони натрію та кальцію. Тому ми використовували метод внутрішньоклітинної кальциметрії, описаний нами раніше [17–19]. Він дає змогу вивчати активність указаних TRP-каналів реєстрацією змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію за допомогою кальцієвого барвника та мікрофлуоресцентної техніки.

Для активації TRPV1-каналів застосовували їх селективний агоніст — капсаїцин у концентрації 0,2 мкмоль/л, а TRPA1-каналів їх селективний агоніст алілізотіоціанат (AITC) у концентрації 1 мкмоль/л. На початку кожного експерименту використовували аплікацію гіперкалієвого розчину (50 ммоль/л) щоб перевірити функціональний стан нейронів. Обирались DRG-нейрони малого діаметра (менше ніж 30 мкм), які відносяться до но-

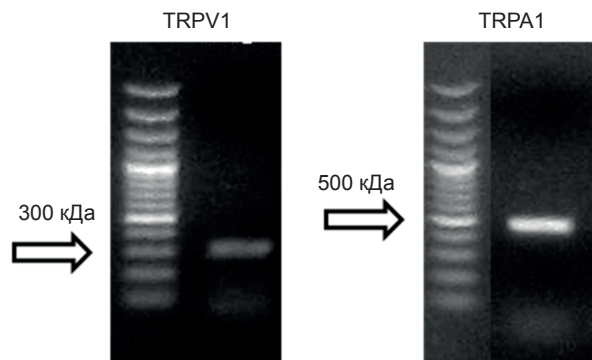


Рис.1. Експресія TRPV1- та TRPA1-каналів у нейронах дорсальних гангліїв щура. Агарозний гель-електрофорез продуктів полімеразної ланцюгової реакції підтвердив експресію TRPV1- та TRPA1- мРНК цих нейронів

цицептивних, капсаїцин-чутливих нейронів. Більші за розміром клітини (понад 40 мкм) у дослід не брали.

Показано, що тестовані DRG- нейрони неоднорідні щодо експресії TRPV1- та TRPA1- каналів, оскільки зустрічалися різні комбінації відносно їх активності у певному нейроні. В цих дослідах обирались для вимірювань тільки ті нейрони, які відповідали на аплікацію як капсаїцину, так і АІТС, тобто експресували одночасно TRPA1- та TRPV1- канали. На рис.2, а представлені кальцієві транзєнти, викликані аплікацією агоністів TRPA1- та TRPV1- каналів на одній і тій самій клітині.

Для підтвердження факту, що дія АІТС не пов'язана із неспецифічністю його впливу, а його активність направлена дійсно на TRPA1-рецептори, в наступних експериментах використовували селективний блокатор TRPA1-каналів – речовину НС-030031. Як було показано раніше, селективність до TRPA1 була визначена тестуванням блокатора до 48 різних ферментів, рецепторів та транспортерів (MDS Pharma Service, Taipei, Taiwan) [20, 21]. Використовували НС-030031 в концентрації 100 мкмоль/л, який додавали

разом з АІТС. Як видно з рис. 2,б, блокатор TRPA1-рецепторів суттєво пригнічував амплітуду кальцієвих транзєнтів, викликаних АІТС. У цьому разі амплітуда транзєнтів становила $15,64 \pm 0,03\%$ (n=3) від її значень у контрольних умовах. Таким чином, застосування селективного блокатора TRPA1-каналів підтверджує, що АІТС-індуковані кальцієві транзєнти відображають активність саме TRPA1- каналів.

Слід зазначити, що значення амплітуд кальцієвих транзєнтів, викликаних капсаїцином та АІТС, дещо відрізнялися у досліджуваних нейронів і в середньому їх співвідношення було $0,892 \pm 0,03$ (n=10). При повторних аплікаціях капсаїцину амплітуда кальцієвих транзєнтів поступово зменшувалася, що відповідало десенситизації TRPV1-рецепторів. Цей процес зберігався більше ніж 10 хв (рис. 3, а). При подальших повторних аплікаціях капсаїцину, відновлення або збільшення амплітуди кальцієвих транзєнтів не відбувалося, або було дуже незначним.

Вплив TRPA1-рецепторів на десенситизацію TRPV1-каналів вивчали за іншим протоколом. Клітини підлягали повторюваним послідовним аплікаціям капсаїцину три-

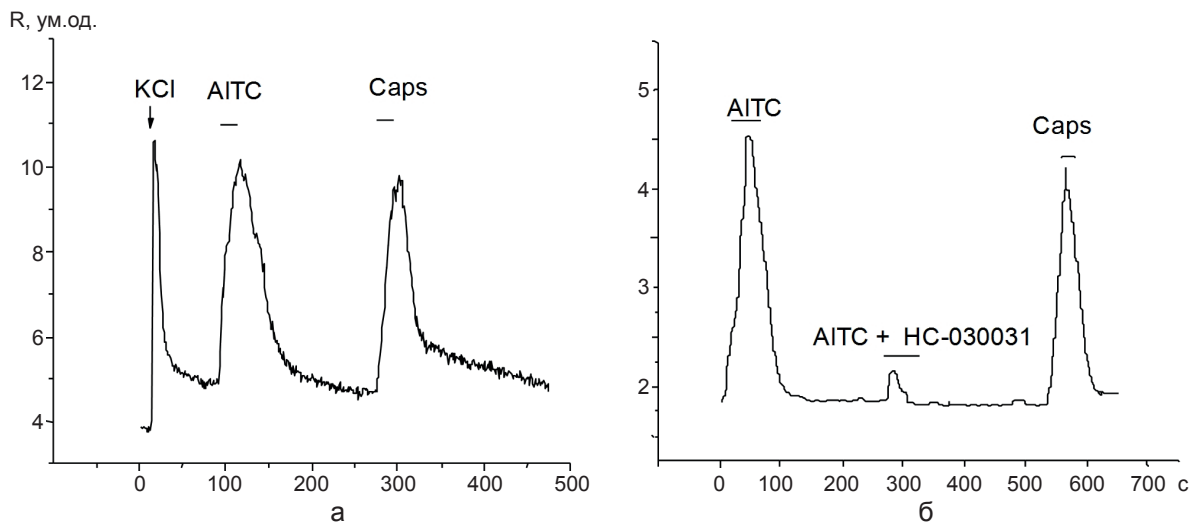


Рис.2. Кальцієві транзєнти, викликані агоністами TRP-каналів: а – кальцієві транзєнти, викликані деполяризацією мембрани (KCl) та аплікацією агоністів TRPV1- (капсаїцин, Caps) та TRPA1- (алілізотіоціанат, АІТС) каналів; б – вплив блокатора TRPA1-каналів (НС-030031) на кальцієві транзєнти, викликані дією агоніста TRPA1-каналів. Моменти аплікації показані стрілкою та лініями

валістю по 20 с для активації TRPV1-каналів та подальшої їх десенситизації. Після цього аплікували АІТС протягом 120 с. У всіх випадках також значно зменшувалася амплітуда кальцієвих транзєнтів, індукованих додаванням АІТС (див. рис. 3, б). Далі на клітину знову подавали капсаїцин, агоніст TRPV1-каналів. Як видно із рисунка, амплітуда кальцієвого транзєнта, викликаного активацією TRPV1-каналів, відновлювалася (або навіть перевищувала початкове значення). Після активації TRPA1-каналів спостєригалася ресенситизація TRPV1-рецепторів. Усереднені значення приведені на рис. 3, в у вигляді відношення значення амплітуди кальцієвих транзєнта, викликаного активацією TRPV1-каналів у процесі десенситизації (стовпчик 2) та ресенситизації (стовпчик 3) до величини, що вимірювалася на початку експерименту

(стовпчик 1). Амплітуда кальцієвих транзєнтів, викликаних капсаїцином, зменшувалася під час десенситизації до $20,66 \pm 7,42\%$ ($n=10$) від початкового, а після ресенситизації поверталася до значень, близьких до початкових.

Далі перевірили чи дійсно активація TRPA1-рецепторів потрібна для ресенситизації TRPV1-рецепторів, використавши протокол експериментів, представлений на рис. 3, б, але в цьому разі аплікацію агоністів проводили за наявності блокатора TRPA1-каналів HC-030031 (100 мкмоль/л). Як видно із рис. 4, послїдовні аплікації 0,2 мкмоль/л капсаїцину тривалістю 10 с призводили до десенситизації TRPV1-рецепторів протягом декількох хвилин. Потім у розчин додавали активатор TRPA1-каналів (1 мкмоль/л АІТС) протягом 30 с за наявності їх селективного

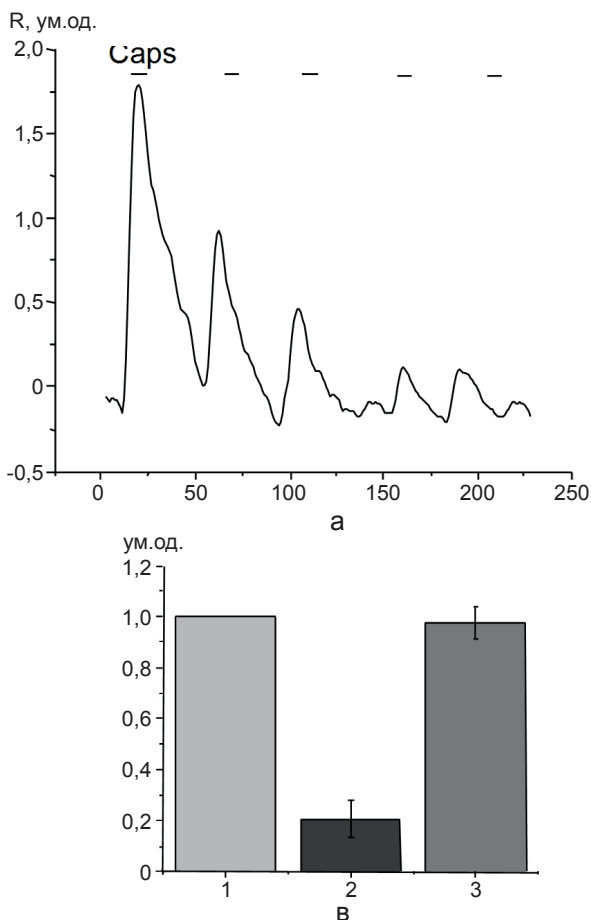


Рис.3. Десенситизація та ресенситизація TRPV1-каналів: а – показані кальцієві транзєнти, викликані повторними аплікаціями капсаїцину (Caps); б – ресенситизація TRPV1-каналів, викликана активацією TRPA1-каналів. Кальцієві транзєнти, викликані повторними аплікаціями капсаїцину та АІТС; в – середні значення амплітуди кальцієвих транзєнтів під час десенситизації та ресенситизації TRPV1-каналів: на початку експерименту (1), під час десенситизації (2) та після ресенситизації після прикладання алїзітїоціанату АІТС (3), $n=10$. $**P<0,05$ порівняно з амплітудою кальцієвого транзєнта, викликаного капсаїцином на початку експерименту. Моменти аплікації показані лініями

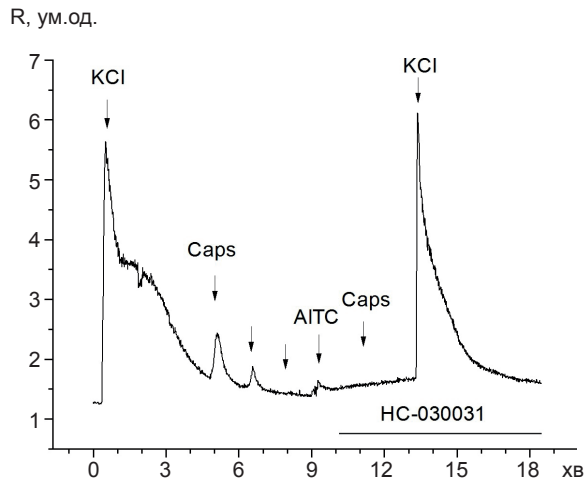


Рис.4. Вплив антагоніста TRPA1-каналів на процес ресенситизації TRPV1-каналів. Кальцієві транзйенти викликані повторними аплікаціями капсаїцину (Caps). Спостерігається десенситизація TRPV1-рецепторів. Аплікація активатора TRPA1-каналів АІТС у продовженій присутності їх блокатора HC-030031 (показано лінією) із наступною аплікацією капсаїцину та KCl. Моменти аплікації показані стрілками

антагоніста. Наступна аплікація агоніста TRPV1-каналів капсаїцину демонструвала, що у цьому разі, ресенситизації TRPV1-каналів не відбувалося (див. рис. 4). Хоча деполаризація мембрани гіперкальєвим розчином (50 ммоль/л) викликала кальцієві транзйенти з амплітудою, близькою до початкової в контрольних умовах.

Слід зазначити, що відповіді DRG-нейронів, які реагували виключно на аплікацію капсаїцину і не реагували на АІТС, також підлягали десенситизації, однак пролонгована аплікація АІТС не відновлювала чутливість таких нейронів до капсаїцину. Це свідчить про те, що саме активація TRPA1-рецепторів викликає ресенситизацію TRPV1-каналів, а не можлива неспецифічна дія АІТС на TRPV1-канали.

ОБГОВОРЕННЯ

TRPA1- та TRPV1- канали є неселективними кальцієвими каналами і можуть впливати на внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз [13]. Як відомо, його порушення може приз-

водити до патологій нервової системи, включно з невропатіями та больовими синдромами [12]. Нещодавні дослідження свідчать про можливу наявність взаємних зв'язків TRPA1- та TRPV1-каналів, які можуть впливати на їх активність та модулювати дію їх агоністів [3, 9, 14]. Так, було показано, що короткотривала активація TRPA1-каналів десенситизує TRPV1-канали, і навпаки — короткотривала активація TRPV1-каналів десенситизує TRPA1-канали [10, 22]. Однак, як показують наші дослідження та літературні дані [23], при пролонгованій активації TRPA1-каналів ефект дещо інший. При вже десенситизованих TRPV1-каналах така активація TRPA1-каналів призводить до ресенситизації TRPV1-каналів.

Іншим важливим фактом, який ми спостерігали, було те, що пролонгована аплікація АІТС після десенситизації TRPV1-каналів капсаїцином не викликала кальцієвих транзйентів або їх амплітуда була дуже незначною. Це могло б свідчити про відсутність TRPA1-каналів на досліджуваній клітині. Однак DRG-нейрони, що були відібрані для дослідів, давали виражену відповідь на разову коротку аплікацію АІТС на початку експериментів, що говорить про наявність на їх поверхні функціонально активних TRPA1-каналів. Таким чином, те, що аплікація АІТС не спричинила появи кальцієвого транзйента у клітинах із попередньо десенситизованими TRPV1-каналами, є ще одним доказом взаємодії цих каналів. Як показали наші експерименти, на клітинах, що відповідали тільки на специфічний агоніст TRPV1-каналів – капсаїцин, і не відповідали на АІТС, аплікація останнього не призводила до ресенситизації TRPV1-каналів. Також виявилось, що за наявності HC-030031, здатність АІТС викликати ресенситизацію TRPV1-каналів втрачалась, що підтверджує взаємодію TRPV1- та TRPA1-каналів і що саме активація TRPA1-каналів відновлює активність (ресенситизацію) TRPV1-каналів.

Згідно з літературними даними, взаємодія TRPV1- та TRPA1-каналів може відбуватися або безпосередньою взаємодією цих каналів, або через залучення вторинних посередників. Так, електрофізіологічними дослідженнями на рівні функціонування поодиноких каналів показано, що існує безпосередня взаємодія молекул TRPV1- та TRPA1- каналів [14]. Отже, ці результати вказують, що TRPA1- та TRPV1-канали можуть безпосередньо взаємодіяти та утворювати гетеродимери [14, 24].

Серед вторинних посередників, які впливають на активність TRPV1-каналів, було показано залучення їх фосфорилування протеїнкіназою C, що активується діацилгліцеролом (DAG). Відомо, що родина TRPV-каналів потенціюється фосфорилуванням у спосіб, що не залежить від типу активатора [25–27]. Показано, що активність поодиноких TRPV1-каналів збільшується внаслідок їх фосфорилування протеїнкіназою C [27], причому вона фосфорилує безпосередньо молекулу каналу [25]. Так само фосфорилування впливає і на активність мембранних потенціалзалежних кальцієвих каналів [28–31].

Іншим вторинним посередником, який впливає на активність TRPV1-каналів, є іони кальцію. Так, було показано, що вони відіграють суттєву роль у десенситизації TRPV1-каналів [10]. Вважається, що механізм десенситизації забезпечує кальційзалежна фосфатаза кальцинейрин [8]. Цікаво, що такий самий механізм кальційзалежного пригнічення спостерігався і у потенціалзалежних кальцієвих каналів, який також забезпечується їх дефосфорилуванням кальцинейрином [32, 33]. Таким чином, можна припустити, що існує спільний механізм потенціації та пригнічення різних родин кальцієвих каналів через їх фосфорилування/дефосфорилування.

Слід зазначити, що існують літературні дані, котрі вказують на залучення кальцій- та фосфорилування незалежних механізмів, здатних модулювати активність TRPV1-каналів. Наприклад, що TRPV1-канали мо-

жуть безпосередньо активуватися DAG без участі протеїнкінази C [34].

Враховуючи полімодальність TRPV1-каналів, припускається, що залежно від типу стимулу (температура, рН, агоністи) можуть бути залучені різні механізми взаємодії TRPV1- та TRPA1-рецепторів. Таким чином, результати наших досліджень разом із працями інших авторів [9, 14], вказують на наявність взаємодії активностей TRPA1- та TRPV1-каналів, що експресуються в ноцицептивних нейронах. Отримані результати вказують на здатність TRPA1-рецепторів ресенситизувати TRPV1-рецептори. Подальші дослідження взаємодії згаданих каналів дають змогу виявити механізми розвитку таких патологічних станів, як діабетична нейропатія та больові синдроми при патологічних процесах.

A.V. Dragan¹, O.A. Petrushenko¹, O.P. Burlak^{1,2}, E.A. Lukyanetz^{1,2}

EFFECT OF TRPA1 RECEPTOR ACTIVATION ON TRPV1 CHANNEL DESENSITIZATION IN RAT DORSAL GANGLION NEURONS

The activity of TRPA1 and TRPV1 channels, their sensitivity to selective activators - allyl isothiocyanate (AITC) and capsaicin (Caps), especially their interaction were studied. The method of microfluorescent microscopy and Ca^{2+} sensitive dye fura-2AM. Registration of changes in the concentration of intracellular Ca^{2+} was performed by using the ratio of fluorescence signals measured at two wavelengths ($R = F1/F2$). Researches were conducted on cultured neurons of rat dorsal ganglia (DRG neurons). Application of AITC and Caps on soma of DRG neurons resulted in an increase in intracellular Ca^{2+} . Consistent repeated Caps applications resulted in a significant reduction in the amplitude of Ca^{2+} transients (desensitization of TRPV1 channels), which accounted 20,7% of initial value. Further application of selective TRPA1 channel agonist (AITC) resulted in restoration of sensitivity to capsaicin TRPV1 channels (resensitization TRPV1 channels). Thus, we have established the presence of regulation of TRPV1 channel activity by TRPA1 channels.

Key words: TRPV1-channels; TRPA1-receptors; calcium; DRG-neurons; calcium signaling; capsaicin; allyl isothiocyanate.

¹*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv;*

²*International Center for Molecular Physiology NASU, Kyiv, Ukraine*

**А.В. Драган, Е.А. Петрушенко, О.П. Бурлак,
Е.А. Лукьянец**

**ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ TRPA1-РЕЦЕПТО-
РОВ НА ДЕСЕНСИТИЗАЦИЮ
TRPV1-КАНАЛОВ В НЕЙРОНАХ
ДОРСАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ КРЫСЫ**

Исследовали активность TRPA1- и TRPV1-каналов, их чувствительность к селективным активаторам – аллилизотиоцианата (АИТС) и капсаицина, особенности их взаимодействия. Использовали метод микрофлуоресцентной микроскопии и кальцийчувствительный краситель fura-2AM. Изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} регистрировали с помощью соотношения измеряемых сигналов флуоресценции на двух длинах волн ($R = F1/F2$). Исследования проводили на культуре нейронов дорсальных ганглиев крысы (DRG-нейроны). Показано, что аппликация АИТС и капсаицина на сом DRG-нейронов значительно повышала содержание внутриклеточного Ca^{2+} . Последовательная повторная аппликация капсаицина существенно снижала интенсивность кальциевых транзиев (десенситизация TRPV1-каналов). Дальнейшая аппликация АИТС, селективного агониста TRPA1-каналов восстанавливала чувствительность TRPV1-каналов к капсаицину (ресенситизация TRPV1-каналов), которая составляла 20,7% от начального значения. Таким образом, мы установили наличие регуляции активности TRPV1-каналов со стороны TRPA1-каналов.

Ключевые слова: TRPV1-каналы; TRPA1-рецепторы; кальций; DRG-нейроны; кальциевая сигнализация; капсаицин; аллилизотиоцианат.

REFERENCES

1. Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A. et al. The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr Biol*. 2011 Feb 22;21(4):316-21.
2. Bevan S, Andersson DA. TRP channel antagonists for pain--opportunities beyond TRPV1. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009 Jul;10(7):655-63.
3. Fernandes ES, Russell FA, Spina D, McDougall JJ, Graepel R, Gentry C, et al. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor alpha-induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monarthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Mar;63(3):819-29.
4. Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol*. 2012 May;166(2):510-21.
5. Brederson JD, Kym PR, Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol*. 2013 Sep 15;716(1-3):61-76.
6. Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification.

7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 19;103(51):19564-8.
7. Gijssen HJ, Berthelot D, De Cleyn MA, Geuens I, Brone B, Mercken M. Tricyclic 3,4-dihydropyrimidine-2-thione derivatives as potent TRPA1 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Jan 15;22(2):797-800.
8. Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*. 1997 May 15;17(10):3525-37.
9. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol*. 2007 Aug 15;583(Pt 1):175-93.
10. Vyklicky L, Novakova-Tousova K, Benedikt J, Samad A, Touska F, Vlachova V. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 3:S59-S68.
11. Dragan A, Rosada V, Lukyanetz EA. Investigation of calcium signaling of TRPA1 membrane channels in the sensory neurons by fluorescent method. *Proceedings of the XIIIth International Young Scientist's conference on applied physics*. 2013: 142-3.
12. Kostyk PG, Kostyuk E, Lukyanetz EA. Calcium ions in brain function - from physiology to pathology. Kyiv: Naukova Dumka; 2005.[Ukrainian]
13. Kostyk PG, Kostyuk EP, Lukyanetz EA. Intracellular calcium signalling: structure and function. Kyiv: Naukova Dumka; 2009.
14. Staruschenko A, Jeske NA, Akopian AN. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J Biol Chem*. 2010 May 14;285(20):15167-77.
15. Lukyanetz EA, Stanika RI, Koval LM, Kostyuk PG. Intracellular mechanisms of hypoxia-induced calcium increase in rat sensory neurons. *Arch Biochem Biophys*. 2003;410(2):212-21.
16. Jankowski MP, Ross JL, Weber JD, Lee FB, Shank AT, Hudgins RC. Age-dependent sensitization of cutaneous nociceptors during developmental inflammation. *Mol Pain*. 2014;10:34.
17. Lukyanetz IA, Kostyk PG, Lukyanetz EA. Calcium Signaling in Carassius Cerebellar Neurons: Role of the Mitochondria. *Neurophysiology*. 2009 Dec;41(6):375-9.
18. Lukyanetz IA, Kostyk PG, Lukyanetz EA. The involvement of calcium transport systems of the plasma membrane in calcium exchange in neurons of the Carassius gibelio cerebellum. *Neurophysiology*. 2009 Aug;41(4):231-7.
19. Lukyanets IA, Lukyanetz EA. Modulation of calcium signalling by the endoplasmic reticulum in Carassius neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Apr 19;433(4):591-4.
20. Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, et al. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced

- mechanical hypersensitivity. *Mol Pain*. 2008;4:48.
21. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 14;104(33):13525-30.
 22. Akopian AN, Ruparel NB, Patwardhan A, Hargreaves KM. Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation. *J Neurosci*. 2008 Jan 30;28(5):1064-75.
 23. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 24;105(25):8784-9.
 24. Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci*. 2009 Apr;29(8):1568-78.
 25. Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol*. 2001 Aug 1;534(Pt 3):813-25.
 26. Fan HC, Zhang X, McNaughton PA. Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2009 Oct 9;284(41):27884-91.
 27. Studer M, McNaughton PA. Modulation of single-channel properties of TRPV1 by phosphorylation. *J Physiol*. 2010 Oct 1;588(Pt 19):3743-56.
 28. Kostyuk PG, Lukyanetz EA, Ter-Markosyan AS. Parathyroid hormone enhances calcium current in snail neurones - Simulation of the effect by phorbol esters. *Pflug Arch*. 1992;420(2):146-52.
 29. Kostyuk PG, Lukyanetz EA, Doroshenko PA. Effects of serotonin and cAMP on calcium currents in different neurones of *Helix pomatia*. *Pflug Arch /Eur J Physiol*. 1992;420(1):9-15.
 30. Lukyanetz EA, Kostyuk PG. Two distinct receptors operate the cAMP cascade to up-regulate L-type Ca channels. *Pflug Arch*. 1996;432(2):174-81.
 31. Lukyanetz EA, Sotkis AV. Serotonin-induced changes in the activity of single Ca²⁺ channels in *Helix pomatia* neurons. *Neurophysiology*. 1996;28(2-3):103-10.
 32. Kostyuk PG, Lukyanetz EA. Mechanisms of antagonistic action of internal Ca²⁺ on serotonin-induced potentiation of Ca²⁺ currents in *Helix* neurones. *Pflug Arch*. 1993 Jun;424(1):73-83.
 33. Lukyanetz EA. Evidence for colocalization of calcineurin and calcium channels in dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*. 1997;78(3):625-8.
 34. Woo DH, Jung SJ, Zhu MH, Park CK, Kim YH, Oh SB, et al. Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Mol Pain*. 2008;4:42.

*Матеріал надійшов
до редакції 24.10.2013*

Вплив пептидоглікану клітинної стінки золотистого стафілокока на механізми регуляції аденілатциклазною сигнальною системою скоротливої активності міометрія щурів

Л.С. Насібян, І.Б. Філіппов

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

Досліджено вплив пептидоглікану клітинної стінки золотистого стафілокока на окремі ланки аденілатциклазної сигнальної системи, що беруть участь у регуляції скоротливої активності міометрія щурів. Спонтанні та викликані простагландином F_{2a} скорочення міометрія були пригнічені прикладанням неселективного агоніста адренорецепторів норадrenalіну та селективного агоніста β₂-адренорецепторів сальбутамолу, після чого аплікація на їх тлі пептидоглікану повністю відновлювала скоротливу активність. Те саме відбувалось при активації аденілатциклази форсколіном. Коли ж за допомогою прикладання 8-бром-цАМФ або неселективного блокатора цАМФ-залежних фосфодіестераз папаверину внутрішньоклітинний вміст циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) був підвищений, а скоротливість міометрія пригнічена, пептидоглікан не проявляв моделювальних властивостей. За умов активації G_s-білка холерним токсином пептидоглікан відновлював спонтанну активність та посилював простагландинвикликані скорочення. За умов деактивації коклюшим токсином G_{i/o}-білків він втрачав здатність поновлювати спонтанну і викликану скоротливу активність міометрія, що були пригнічені прикладанням агоністів β-адренорецепторів або форсколіну. Отже, вплив пептидоглікану на скоротливість міометрія щурів пов'язаний з його здатністю призводити до швидкої десенситизації аденілатциклази внаслідок збільшення функціональної активності G_i-білка.

Ключові слова: пептидоглікан; золотистий стафілокок; міометрій; скоротливість; аденілатциклазна сигнальна система; G-білки.

ВСТУП

Особливості скоротливої діяльності міометрія зумовлюють репродуктивну здатність матки, нормальний матково-плацентарний кровообіг, трофіку самого міометрія під час вагітності та поза неї, зміщення та розтягнення м'язових шарів матки при розвитку вагітності, а також адекватні зміни усіх її шарів при підготовці до пологів [1]. Один з важливих механізмів регуляції скоротливості міометрія контролюється аденілатциклазною системою (АЦС), яка завдяки кальційчутливим аденілатциклазам (АЦ) функціонально пов'язана з обміном Ca²⁺.

АЦС локалізована в плазматичній мембрані клітини та складається з функціональних блоків трьох типів: мембранних рецепторів (рецепторний компонент), гуанозинтрифосфатз'язувальних білків (G-білків) і власне АЦ (каталітичний компонент), кожен з яких представлений у клітині різними підтипами або ізоформами. G_s-, G_o- та G_i-підродина G-білків відіграють роль ланки, яка є сполучником між активованим рецептором і АЦ, відповідальною за зміну концентрації циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) у клітині. У міометрії активність АЦ індукується ендogenousними агоністами (катехоламіни, простагландини тощо) при

активації β 2-адренорецепторів і рецепторів до простагландину E2, які спряжені з Gs-білком. [2].

Популяції різних підтипів адренорецепторів, які являють собою перший функціональний блок АЦС, неоднаково представлені в різних шарах міометрія. У циркулярному шарі переважають α -адренорецептори, стимуляція яких спричинює скорочення міометрія, тоді як у повздовжньому - β -адренорецептори (85% – β 2-тип), активація яких його розслаблює [3 – 5].

Згідно з даними мікробіологічних досліджень, 25–40 % передчасних пологів зумовлені внутрішньоматковою інфекцією [6]. Вважається, що саме вона запускає цей процес через активацію вродженого (неспецифічного) імунітету. Розпізнавання мікроорганізмів може відбуватися за участю Toll-подібних рецепторів (TLR), які у свою чергу сприяють напрацюванню таких прозапальних хемокинів і цитокінів як інтерлейкин-8 (ІЛ-8), інтерлейкін-1 β (ІЛ-1 β) і фактор некрозу пухлин- α (ФНПа) [7].

Функції клітини-хазяїна часто порушують бактерії зміною внутрішньоклітинної концентрації цАМФ. Ферменти, що беруть участь у кожному етапі метаболізму цАМФ, у тому числі Gs-, Gi/o-білки, аденілатциклаза та фосфодіестерази є мішенями для різних патогенів [8, 9].

У плаценті людини виявлені TLR 1-10, а в клітинах епітелію амніону і міометрія - TLR 2. Показано, що експресія останніх помітно зростає під час пологів, у тому числі передчасних [10]. Відомо, що TLR 2 можуть бути залучені у патогенез репродуктивних розладів і хронічних запальних процесів, оскільки здатні розпізнавати широкий спектр бактеріальних продуктів, включаючи компоненти клітинної стінки грампозитивних бактерій: пептидоглікан, тейхоєві кислоти та ліпопротеїни. Нами було показано, що вплив пептидоглікану як агоніста TLR 2 на скоротливу активність міометрія залежить від гормонального фону [12].

Метою нашої роботи було з'ясувати механізм впливу пептидоглікану золотистого стафілокока на регуляцію аденілатциклазною сигнальною системою скоротливої активності міометрія щурів.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на смужках міометрія статевозрілих самиць-щурів лінії Вістар масою 200-250 г при дотримуванні положень Конвенції з біоетики Ради Європи [Страсбург, 1986]. Для моделювання псевдовагітності тварини отримували препарат естрогену за допомогою одноразового перорального введення 17- β -естрадіолу в дозі 1 мкг на тварину протягом 2 діб («Schering», Німеччина), після чого їм щоденно вводили підшкірно медроксипрогестерон у дозі 0,2 мг на тварину («Пфайзер», Бельгія). Загальна тривалість введення препарату естрогену становила 22 доби, що відповідає середній тривалості вагітності у щурів. Використана послідовність введення спочатку 17- β -естрадіолу сприяє збільшенню щільності рецепторів прогестерону, а подальші зміни морфології матки зумовлюються тільки послідовною дією прогестерону. Такий підхід дає можливість відтворити повну морфологічну картину вагітної матки з характерною для неї функціональною проліферацією ендометрія, гіпертрофією міометрія та утворенням щілинних контактів між гладеньком'язовими клітинами (ГМК) [11].

Самиць щурів було розділено на три групи по 15 тварин у кожній: до I (контрольної) групи увійшли тварини, що отримували лише препарат естрогену, до II – псевдовагітні на 14-ту добу та до III – на 22-гу добу гестації. Усіх тварин наркотизували ефіром та декапітували. Роги матки швидко видаляли і поміщали в нагрітий (37° C), 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, глюкоза – 11,5 (рН 7,4). Після того, як їх розрізали

уздовж, очищали від сполучної тканини та ендометрію, нарізали смужки довжиною 0,7 – 1,0 см і шириною 0,2 – 0,3 см та поміщали в проточну камеру, в якій один кінець препарату був зафіксований нерухомо, а другий – прикріплений до емісійного датчика сили з базовим навантаженням 3 мН. Скоротливу активність записували через аналогово-цифровий перетворювач на комп'ютер і паралельно на чорнильний самописець. Про характер скорочень гладеньких м'язів (ГМ) матки й впливу на них пептидоглікану судили за їхньою середньою частотою та амплітудою протягом 10 хв. Скоротливу активність матки оцінювали в одиницях Монтевідео (МУ) [12]. Для ідентифікації участі G-білків у ефектах пептидоглікану використовували коклюшний та холерний токсини. Коклюшний екзотоксин, ізольований з культури *Bordetella pertussis*, використовується для інактивації Gi/o-білків. Субодиниця А холерного токсину, ізольована з *Vibrio cholerae*, викликає АДФ-рибозилування залишку аргініну в α -субодиниці Gs-білка, пригнічуючи ГТФазу й зберігаючи цю субодиницю в безупинно активованому стані. Останнє збільшує каталітичну активність аденілатциклази, що призводить до значного зростання внутрішньоклітинного вмісту цАМФ, а також зниження її реакції на дію гормонів. Смужки міометрія щурів до експериментів витримували в нормальному розчині Кребса зі знизеним вмістом Ca^{2+} (1,25 ммоль/л) та Mg^{2+} (0,6 ммоль/л) з додаванням 6 мкг/мл коклюшного або холерного токсинів при 36°C протягом 15 – 18 год. Також для активації аденілатциклази використовували форсколін (1, 10 мкмоль/л). Всі досліджувані речовини були від фірми “Sigma-Aldrich” (США). Пептидоглікан розводили в 0,9%-му розчині NaCl у концентрації 2 мг/мл та додавали до розчину Кребса із розрахунку 0,003 мг/мл. Простагландин F2 α , попередньо розчинений в етанолі в базовій концентрації 20 ммоль/л, додавали до розчину Кребса в концентрації 10 мкмоль/л. Для активації β -адренорецепторів повздовжніх м'язів

матки використовували неселективний агоніст норадреналін (10 мкмоль/л) та селективний агоніст до β_2 -адренорецепторів сальбутамол (1 мкмоль/л), які вводили в розчин Кребса перед аплікацією. Також використовували мембранопрониклий аналог цАМФ 8-бром-цАМФ (10 мкмоль/л) та блокатор цАМФ-залежних фосфодіестераз папаверин (1 мкмоль/л).

Для кожного типу експерименту результати усереднювали і наводили у вигляді середнє \pm стандартна похибка середнього з позначенням числа смужок «n», на яких вони отримані. Статистичне порівняння значень під впливом пептидоглікану, простагландину F2 α та контрольних проводили за допомогою парного критерію t Стьюдента, а між групами за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з поправкою Бонферроні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що в усіх трьох групах норадреналін зменшував амплітуду і тривалість спонтанних скорочень міометрія та не змінював їхню частоту (рис. 1). Амплітуда спонтанних скорочень у невагітних тварин зменшувалася на $83,03 \pm 0,29$ %, у псевдовагітних на 14-ту добу – на $84,43 \pm 0,93$ %, а наприкінці гестації – на $63,49 \pm 5,85$ % порівняно з контролем.

Виявилось, що під впливом норадреналіну (після попередньої 30-хвилинної дії пептидоглікану) сила скорочення міометрія у щурів I групи збільшилася на $3,4 \pm 0,26$ %, II групи зменшилася на $27,06 \pm 0,55$ %, а III - зросла на $48,51 \pm 0,55$ % відносно контролю. Частота скорочень мала незначні зміни як під дією пептидоглікану, так і при подальшому прикладанні норадреналіну на його тлі. У тварин I та III груп при сумісній дії норадреналіну та пептидоглікану значення амплітуд скорочень були більші порівняно з контролем (див. рис. 1).

Різницю у скоротливій активності міометрія щурів між трьома групами тварин під дією пептидоглікану та при його сумісній

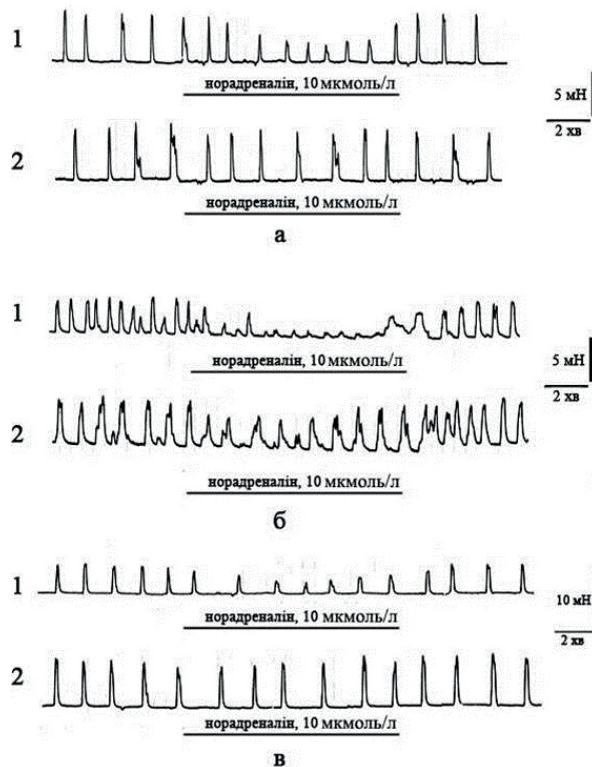


Рис. 1. Вплив пептидоглікану клітинної стінки золотистого стафілокока на викликане норадреналіном пригнічення спонтанних скорочень міометрія шурів: а - тварини, яким вводили препарат естрогену, б - щури на 14-ту та в- на 20-ту добу псевдовагітності. 1 - пригнічення спонтанної активності під дією норадреналіну; 2 - дія норадреналіну на 30-й хвилині аплікації пептидоглікану

дії з норадреналіном добре видно при зіставленні показника скоротливого індексу МУ (рис. 2). Пептидоглікан у трьох групах тварин статистично вірогідно збільшував МУ, а саме: у I групі – на $13,2 \pm 0,73$ %, у II – на $34,58 \pm 2,63$ % та у III – на $57,01 \pm 2,49$ % відносно контролю. На тлі сумісної дії пептидоглікану та норадреналіну значення МУ для тварин I та II груп зменшувалися щодо контролю на $9,53 \pm 1,22$ та $27,06 \pm 1,55$ % відповідно. Для III групи тварин значення МУ, навпаки, перевищувало контрольне на $29,95 \pm 2,89$ %. Таким чином, пептидоглікан пригнічує гальмівну дію норадреналіну на спонтанні скорочення міометрія як у невагітних, так і у псевдовагітних шурів внаслідок підсилення скоротливої активності.

Оскільки відповіді м'язових смужок матки від псевдовагітних та невагітних шурів

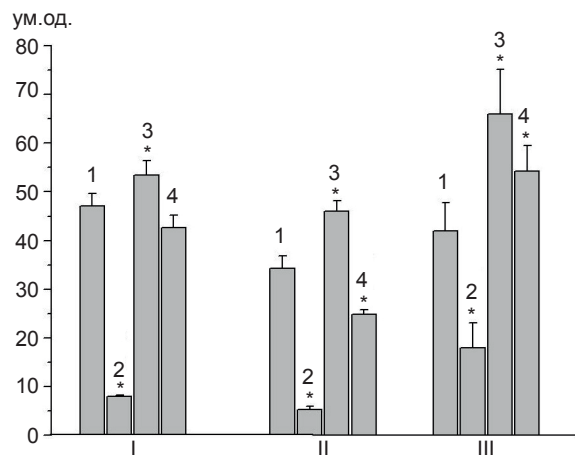


Рис. 2. Зміни активності матки шурів під дією норадреналіну та пептидоглікану. I – щури, після прийому препарату естрогену; II і III – щури на 14-ту та 20-ту добу псевдовагітності. Значення одиниць Монтевідео в контролі (1), під дією норадреналіну (2) і пептидоглікану (3) та при сумісній їх дії (4); приведені середні значення \pm середня похибка, $n=15$ для кожного випадку; * $P < 0,0125$ порівняно з контролем

були подібні, подальші експерименти проводили на міометрії тварин, які попередньо отримували лише препарат 17- β -естрадіол.

Для того, щоб виявити, чи реалізується блокувальний ефект пептидоглікану на розслаблення простагландиніндукованих скорочень міометрія, викликаних різними активаторами АЦС, крім неспецифічного агоніста адренорецепторів норадреналіну, ми використали також салбутамол, селективний агоніст β_2 -адренорецепторів, та форсколін, прямий активатор аденілатциклаз. Під дією цих речовин амплітуда та тривалість викликаних скорочень міометрія зменшувалися. Однак прикладання пептидоглікану нівелювало їхню гальмівну дію: скоротливість у більшості випадків відновлювалася майже до вихідних значень (рис. 3).

Оскільки бактеріальні патогени можуть впливати безпосередньо на різні ланки проведення сигналу АЦС від рецептора до ефектора, результати наступної серії досліджень мали показати, чи впливає пептидоглікан на активність Gs- та Gi/o-

білків, а також на розслаблення ГМ матки. Для з'ясування ролі G-білків в ефектах пептидоглікану досліди проводили після тривалого витримання смужок міометрія в розчині Кребса з додаванням холерного або коклюшного токсинів. Активація Gs-білка холерним токсином зменшувала амплітуду спонтанних скорочень до 0,5 - 1 мН, та ніяк не перешкождала стимулювальній дії пептидоглікану. Скоротлива активність під його впливом зростала в середньому у 8 разів відносно контролю (рис. 4, а1). Слід зазначити, що прикладання простагландину F2 α теж активувало скоротливу активність, яку пептидоглікан дещо підсилював. Амплітуда викликаних пептидогліканом скорочень збільшувалася внаслідок зниження базального тону. Відновлення простагландином F2 α скоротливої активності ГМ матки, попередньо оброблених холерним токсином, відбувається, очевидно, внаслідок кальційіндукованого пригнічення активності аденілатциклаз [13], а дія пептидоглікану за цих умов, можливо, зумовлена іншим механізмом.

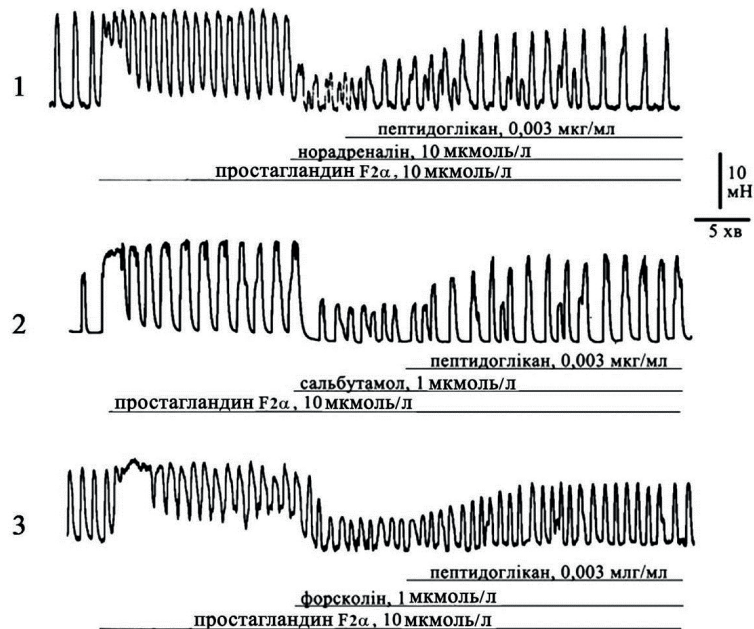


Рис. 3. Блокування пептидогліканом розслаблення міометрія шурів, викликаного активацією β_2 -адренорецепторів або аденілатциклази. Типові реєстрації відновлення пептидогліканом, пригнічених норадреналіном (1), салбутамолом (2) і форсколіном (3) скоротливих реакцій міометрія шурів, викликаних прикладанням простагландину F2 α

При обробці смужок міометрія коклюшним токсином аплікація сальбутамолу або форсколіну зменшувала спонтанні скорочення на 80, а викликані – в середньому на 75 %. Прикладання пептидоглікану на тлі сальбутамолу або форсколіну, як у разі спонтанних або викликаних скорочень, не відновлювало скоротливої активності

міометрія (див. рис. 4, б). Отже, за умов інактивації Gi/o-білків коклюшним токсином пептидоглікан не виявив стимулювальних властивостей. Останнє свідчить про його здатність прямо чи опосередковано активувати саме цей клас G-білків, що призводить до пригнічення активності аденілатциклаз міометрія.

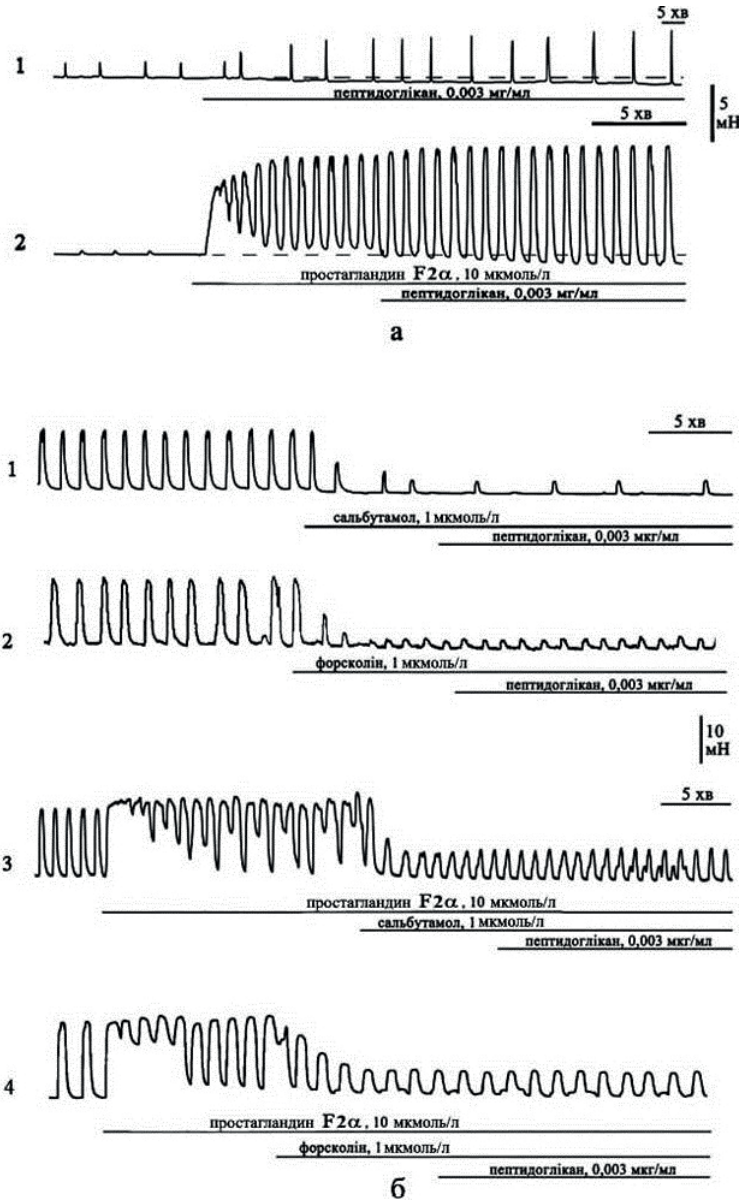


Рис. 4. Вплив пептидоглікану на скорочення міометрія шурів, попередньо оброблених холерним (а) та коклюшним (б) токсинами. На а: спонтанна скоротлива активність (1) і скорочення, викликане прикладанням простагландину F2α (2). Пунктирна лінія під кривою скорочення – вихідний рівень базального тонусу. На б: спонтанна скоротлива активність (1, 2); скорочення, активовані прикладанням простагландином F2α (3, 4)

Збільшення внутрішньоклітинного вмісту цАМФ аденілатциклазою стимулює активність протеїнкінази-А (ПК-А), що призводить: 1) до фосфорилування легких ланцюгів міозину, знижуючи спорідненість цього ферменту до комплексу кальцій-кальмодулін; 2) активації кальційзалежних калієвих каналів великої провідності або інактивації потенціалзалежних кальцієвих каналів; 3) фосфорилування Rho-кінази тощо [13]. Врешті кожна з цих подій розслаблюватиме міометрій. Враховуючи вищезгадане, дослідили дію пептидоглікану на скоротливість міометрія за умов підвищеного внутрішньоклітинного вмісту цАМФ у гладеньком'язових клітинах матки, яке не пов'язане з активацією зв'язаної з рецептором аденілатциклази. Для цього використали мембранопрониклу форму цАМФ 8-бром-цАМФ та блокатор цАМФ-залежних фосфодіестераз папаверин. З рис. 5 видно, що 8-бром-цАМФ пригнічує спонтанну і викликану скоротливу активність, яка після прикладання пептидоглікану залишалася незмінною. У разі блокування цАМФ-залеж-

них фосфодіестераз папаверином він теж не відновлював скорочення (див. рис. 5,1). Таким чином пептидоглікан не впливає на механізми розслаблення ГМ матки активованими цАМФ.

Відомо, що β 2-адренорецептори експресовані на багатьох типах клітин, що беруть участь в імунорегуляції, включаючи клітини неімунної системи зі здатністю викликати імунну відповідь (клітини глії та ендотелію, фібробласти тощо). Відповідно до сучасних поглядів [14] при активації β -адренорецепторів, спряжених з Gs-білком, міометрій розслаблюється внаслідок підвищення внутрішньоклітинного вмісту цАМФ, зумовленого стимуляцією аденілатциклази. Цей фермент діє як вторинний посередник, здатний активувати ПК-А або ЕРАС – обмінні білки, що прямо активуються цАМФ. ПК-А відноситься до внутрішньоклітинних ферментів АЦС та каталізує процес фосфорилування за серином або треоніном цитоплазматичні мітогенактивовані протеїнкінази р38 (р38 МАПК) або проникає в ядро і фосфорилує

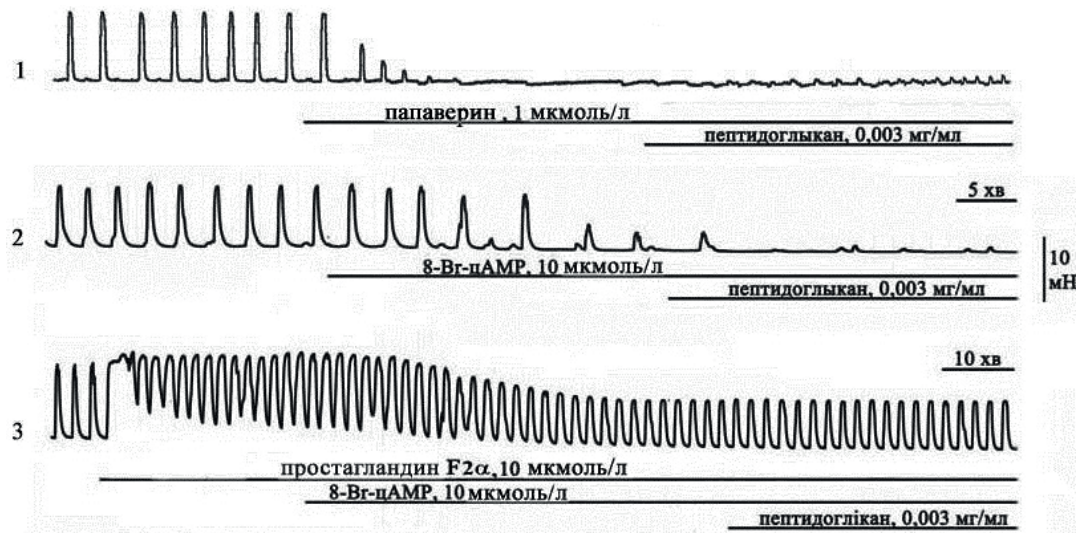


Рис. 5. Відсутність впливу пептидоглікану на розслаблення міометрія шурів, зумовлена дією 8-бром-цАМФ або папаверину. 1 і 2 – спонтанна скоротлива активність міометрія; 3 – скорочення міометрія, викликане прикладанням простагландину F2 α

цАМФ-залежний транскрипційний фактор CREB (від англ. cAMP response element-binding protein), в той час як білки ERAC-1 і ERAC-2 додатково трансформують сигнали з залученням малих Ras-подібних ГТФаз. У клітинах міометрія підвищення внутрішньоклітинного вмісту цАМФ залежно від гормонального статусу тварини може призводити до МАПК-залежного збільшення експресії циклооксигенази-2 та синтезу простагландинів E2, I2 та F2 α [15]. Наші результати показали, що пептидоглікан не має впливу на механізми передачі внутрішньоклітинної сигналізації, активованої цАМФ/ПК-А.

Також ми виявили, що активація Gs-білка за допомогою холерного токсину не впливала на утеротонічні властивості пептидоглікану. Навпаки, за умов інактивації Gi/o-білків коклюшним токсином пептидоглікан втрачав здатність активувати скорочення міометрія. Гетеротримерні регуляторні Gi-білки гальмівного класу теж можуть бути залучені у передачу внутрішньоклітинних сигналів від мікробних подразників. Відомо, що ліпополісахариди здатні прямо активувати Gai-білки [16,17]. Gai2-білки є важливим негативним регулятором запалення [18]. Під дією трансформуючого фактора росту β Gi-білок активує ERK 1/2, що призводить до пригнічення ліпополісахаридіндукованої запальної реакції внаслідок блокування сигнальної ланки ядерного фактора $\kappa\beta$ і p38 МАПК.

Таким чином, зміни в скоротливій активності міометрія шурів контрольної групи агоністом TLR-2 пептидогліканом клітинної стінки золотистого стафілокока зумовлені швидкою десенситизацією аденилатциклази внаслідок збільшення функціональної активності Gi-білка. Отже, ми визначили, що зниження чутливості АЦС до гормонів при інфікуванні лежить в основі розвитку патологічних змін в репродуктивній системі.

Л.С. Насибян, И.Б. Филиппов

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОГЛИКАНА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА НА МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМОЙ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИОМЕТРИЯ КРЫС

Исследовано влияние пептидогликана клеточной стенки золотистого стафилококка на отдельные звенья аденилатциклазной сигнальной системы, участвующих в регуляции сократительной активности миометрия крыс. Спонтанные и вызванные простагландином F2 α сокращения миометрия были подавлены приложением неселективного агониста адренорецепторов норадреналина и селективного агониста β 2-адренорецепторов сальбутамола, после чего аппликация на их фоне пептидогликана приводила к полному восстановлению сократительной активности. То же самое происходило при прямой активации аденилатциклазы форсколином. Когда же с помощью 8-бром-цАМФ или приложением неселективного блокатора цАМФ-зависимых фосфодиэстераз папаверина внутриклеточное содержание циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) было повышено, а сократимость миометрия угнетена, пептидогликан не проявлял модулирующего действия. В условиях активации Gs-белка холерным токсином пептидогликан восстанавливал спонтанную активность и усиливал простагландинвызванные сокращения. При деактивации коклюшным токсином Gi/o- белков он терял способность восстанавливать спонтанную и вызванную сократительную активность миометрия, которые были подавлены приложением агонистов β -адренорецепторов или форсколином. Сделан вывод, что влияние пептидогликана на сократимость миометрия крыс связано с его способностью приводить к быстрой десенситизации аденилатциклазы за счет увеличения функциональной активности Gi-белка.

Ключевые слова: пептидогликан; золотистый стафилококк; миометрий; сократимость; β -адренорецепторы; G-белки; аденилатциклазная сигнальная система; G-белки.

L.S. Nasibyan, I.B. Philippov

EFFECT OF PEPTIDOGLYCANE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS CELL WALL ON THE MECHANISM OF REGULATION OF CONTRACTILE ACTIVITY OF RAT MYOMETRIUM BY ADENYLATE CYCLASE SYSTEM

The revue deals with the role of each component of adenylate cyclase regulatory system in the rat myometrial contractile activity modulation by the peptidoglycane of Staphylococcus

aureus. Noradrenalin and salbutamol were used to investigate peptidoglycane impact on the myometrial β -adrenergic receptors. It was shown that inhibited by these substances myometrial contractility increased to the initial level after peptidoglycane application. The same effect we observed under the cAMP level elevation by forskolin. Peptidoglycan's ability to strengthen contractions was inhibited by the 8-brom-cAMP and papaverine application. Stimulation of Gs-protein by the cholera toxin didn't influence on the peptidoglycane effect while the blocking of Gi/o-protein by the pertussis toxin caused stopping it's manifestation. We concluded that the modulating effect of peptidoglycane implemented via Gi/o-protein activation, which causes adenylatcyclase desensitization.

Key words: peptidoglycane; Staphylococcus aureus; myometrium; contractility; β -adrenoceptors; adenylate cyclase regulatory system; G-protein.

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

REFERENCES

- Challis JR, Sloboda DM, Alfaidi N, Lye SJ, Gibb W, Patel FA, Whittle WL, Newnham JP. Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction*. 2002; Jul;124(1):1-17.
- Casey ML, Smith J, Alasbrook G, MacDonald PC. Activation of adenylyl cyclase in human myometrial smooth muscle cells by neuropeptides. *J Clin Endocrinol Metabol* 1998; Sep;82(9):3087-92.
- Clouse AK, Riedel E, Hieble JP, Westfall TD. The effects and selectivity of β -adrenoceptor agonists in rat myometrium and urinary bladder. *Eur J Pharmacol* 2007 Nov 14;573(1-3):184-9.
- Liu YL, Nwosu UC, Rice PJ. Relaxation of isolated human myometrial muscle by β 2-adrenergic receptors but not β 1-adrenergic receptors. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; Oct;179(4):895-8.
- Olsson OA, Persson CG. Relaxing potency of terbutaline and orciprenaline on rat uterus. *J Pharm Pharmacol*. 1971; Nov;23(11):878-9.
- Nasibyan L, Philippov I. Modulation of rat myometrium contractile activity by peptidoglycane of Staphylococcus Aureus cell wall. *Fiziol zh* 2014; 60(5):62-72.
- Lin HY, Tang CH, Chen YH, Wei IH, Chen JH, La CH, Lu DY. Peptidoglycan enhances proinflammatory cytokine expression through the TLR2 receptor, MyD88, phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and NF-kappaB pathways in BV-2 microglia *Int Immunopharmacol*. 2010 Aug;10(8):883-91.
- Liu YL, Nwosu UC, Rice PJ. Relaxation of isolated human myometrial muscle by β 2-adrenergic receptors but not β 1-adrenergic receptors. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; Oct;179(4):895-8.
- Ahuja N, Kumar P, Bhatnagar R. The adenylate cyclase toxins. *Crit Rev Microbiol*. 2004; 2004;30(3):187-96.
- Li P, Neubig RR, Zingarelli B, Borg K, Halushka PV, Cook JA, Fan H. Toll-like receptor-induced inflammatory cytokines are suppressed by Gain of function or overexpression of Gai2 protein. *Inflammation*. 2012 Oct;35(5):1611-7.
- O'Brien M, Morrison JJ, Smith TJ. Upregulation of PSCDBP, TLR2, TWIST1, FLJ35382, EDNRB, and RGS12 gene expression in human myometrium at labor. *Reprod Sci*. 2008; Apr;15(4):382-93.
- MacKenzie LW, Cole WC, Garfield RE. Structural and functional studies of myometrial gap junctions. *Acta physiol Hung*. 1985;65(4):461-72.
- Nasibyan L, Philippov I. Modulation of rat myometrium contractile activity by peptidoglycane of Staphylococcus Aureus cell wall. *Fiziol Zh*. 2014; 60(5):62-72.
- Caldwell KK, Boyajian CL, Cooper DMF. The effects of Ca^{2+} and calmodulin on adenylyl cyclase activity in plasma membranes derived from neural and nonneural cell. *Cell Calcium*. – 1992; Feb;13(2):107-21.
- Li P, Neubig RR, Zingarelli B, Borg K, Halushka PV, Cook JA, Fan H. Toll-like receptor-induced inflammatory cytokines are suppressed by Gain of function or overexpression of Gai2 protein. *Inflammation*. 2012 Oct;35(5):1611-7.
- Benovic JL. Novel β 2-adrenergic receptor signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; des; 110(6): S229-S235.
- Lentschat A, Karahashi H, Michelsen KS, Thomas LS, Zhang W, Vogel SN, Arditi M. Mastoparan, a G protein agonist peptide, differentially modulates TLR4- and TLR2-mediated signaling in human endothelial cells and murine macrophages. *J Immunol*. 2005 Apr 1; 174(7):4252-61.
- Fan H, Li P, Zingarelli B, Borg K, Halushka PV, Birnbaumer L, Cook JA. Heterotrimeric G α (i) proteins are regulated by lipopolysaccharide and are anti-inflammatory in endotoxemia and polymicrobial sepsis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Mar;1813(3):466-72.

Матеріал надійшов до редакції 28.04.2015

Реакція організму на гостру гіпоксичну пробу у здорових людей і осіб з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну

О.В. Коркушко, В.Б. Шатило, В.П. Чижова, С.С. Наскалова, Є.Д. Осьмак, А.В. Грем'яков, І.А. Антонюк-Щеглова, Г.В. Гавалко, Н.С. Наумчук

ДУ "Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України", Київ;
e-mail: vshatilo@ukr.net, vchizhova@ukr.net

Метою дослідження було з'ясувати особливості реакції організму на гостру гіпоксичну пробу у осіб з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну. Обстежено 22 здорові особи та 18 осіб з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну віком від 50 до 74 років. Всім проведено гостру гіпоксичну пробу (дихання газовою сумішшю з 12 % кисню тривалістю до 20 хв) з моніторингом сатурації крові (SpO_2), частоти дихання, артеріального тиску, частоти серцевих скорочень; стандартний глюкозолерантний тест (ГТТ) з визначенням концентрації в плазмі глюкози та інсуліну. У хворих виявлено більш значне зниження SpO_2 і менш ефективне функціонування дихальної та серцево-судинної системи при дозованій гіпоксичній пробі, ніж у здорових осіб. Після перерозподілу обстежених залежно від ступеня зниження SpO_2 при дозованій гіпоксичній пробі на підгрупи із задовільною стійкістю до гіпоксії (1-ша підгрупа, SpO_2 більше ніж 80 %) та зі зниженою (2-га підгрупа, SpO_2 80 % або менше) встановлено, що у 2-й підгрупі вміст глюкози натще та через 2 год ГТТ значно вищий, ніж у осіб 1-ї підгрупи. Отримані результати свідчать про наявність взаємозв'язку реакції організму на гіпоксію, зокрема ступеня артеріальної гіпоксемії при гострій гіпоксичній пробі та показників глікемії натще і при стандартному ГТТ. Хворі з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну характеризуються більш низькою стійкістю до гіпоксичної гіпоксії.
Ключові слова: переддіабетичні порушення вуглеводного обміну; глюкозолерантний тест; інсулінорезистентність; гіпоксія.

ВСТУП

Нині в світі нараховують близько 314 млн. осіб з переддіабетичними порушеннями (глікемії натще та толерантності до глюкози) вуглеводного обміну і за прогнозами їх чисельність збільшиться майже в 1,5 раза [1]. З віком зростає частота виявлення не лише переддіабетичних порушень (від 8,8% у чоловіків і 11% у жінок середнього віку до 24,3% у чоловіків і 34,7% у жінок старших за 85 років), а і цукрового діабету (ЦД) 2-го типу [2, 3]. За даними епідеміологічних досліджень, у групі пацієнтів з переддіабетом перехід в ЦД 2-го типу в середньому становить 5% на рік (від 3,6 до 8,7%) [3]. Крім того, передді-

абетичні порушення є значущим фактором ризику серцево-судинних захворювань [3, 4]. Тому актуальною є розробка та впровадження методів їх корекції у людей літнього віку. Відомо, що з віком зростає чутливість і знижується стійкість організму до нестачі кисню: знижується вміст вільного кисню в тканинах та підвищується - недоокиснених продуктів в організмі, зростає поглинання кисню з гіпероксичних газових сумішей, активуються реакції гліколізу [5, 6]. При гіпоксії в старечому віці тканини перебувають в більш несприятливих умовах, що викликає включення компенсаторних механізмів, спрямованих на підтримку гомеостазу. Проте при збільшенні інтенсивності гіпоксичного

© О.В.Коркушко, В.Б. Шатило, В.П. Чижова, С.С. Наскалова, Є.Д. Осьмак, А.В. Грем'яков, І.А. Антонюк-Щеглова, Г.В. Гавалко, Н.С. Наумчук

впливу компенсаторні реакції в старості є недостатніми для підтримки кисневого постачання тканин, що призводить до зменшення парціального тиску кисню (pO_2) нижче від критичного рівня [7, 8].

Таким чином, дані літературних джерел та результати власних досліджень свідчать, з одного боку, про наявність зниженої стійкості до гіпоксії у людей літнього віку [9-12]. З іншого боку, значно частіше виявляються переддіабетичні порушення вуглеводного обміну. Однак в літературі відсутні дані про зв'язок між станом вуглеводного обміну та реакцією організму на гіпоксію, а також між стійкістю до гіпоксії та розвитком переддіабетичних порушень вуглеводного обміну у людей літнього віку.

Мета нашого дослідження - з'ясувати особливості реакції організму на гостру гіпоксичну пробу у осіб з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну.

МЕТОДИКА

Клінічне дослідження проведено відповідно до законодавства України і принципів Гельсінської Декларації з прав людини. Програма дослідження, інформація для пацієнта і форма інформованої згоди на участь у дослідженні розглянуті і ухвалені на засіданні комісії з питань етики клінічного відділу ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України» (протокол № 9 від 11 червня 2013 р.). Своє добровільне рішення про участь у дослідженні пацієнт підтверджував підписом у формі інформованої згоди. Практично здорові люди віком від 50 до 74 років були госпіталізовані в клініку ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України», де їм проведено комплексне клініко-лабораторне обстеження, оральний глюкозотолерантний тест, гостру гіпоксичну пробу.

Переддіабетичні порушення вуглеводного обміну виявляли стандартним глюкозотолерантним тестом (ГТТ) за методикою ВООЗ

(WHO Consultation, 1999) та Американської асоціації з вивчення цукрового діабету (American Diabetes Association/ADA, 1997) [13]. Дослідження проводили на фоні не менш ніж 3-денної звичайної (лікарняної) дієти (вміст вуглеводів 250-300 г) і звичайної фізичної активності. Перший забір венозної крові для визначення вмісту глюкози здійснювали вранці натще після 10-14-ї години нічного голодування. Потім обстежуваний протягом 3 хв випивав 75 г глюкози, розчиненої в 250 - 300 мл води, забір венозної крові повторювали через 30, 60 та 120 хв.

Вміст глюкози сироватки крові визначали глюкозооксидазним методом на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі BTS – 330, використовуючи реагенти «Глюкоза» набору «Bio LATEST Lachema Diagnostica. Референтні концентрації глюкози, виміряні в сироватці крові цим методом, становлять 4,2-6,2 моль/л.

Відповідно до рекомендацій ADA (1997) толерантність до глюкози вважали нормальною, якщо її вміст у плазмі венозної крові через 2 год після навантаження був менше ніж 7,8 ммоль/л. Якщо він був менше ніж 7,0 ммоль/л, але через 2 год перебував у межах від 7,8 до 11,1 ммоль/л, то цей стан класифікували як порушення толерантності до глюкози (ПТГ) незалежно від віку обстежених [13].

Артеріальний тиск (АТ) вимірювали ртутним сфігмоманометром Erkameter 3000 (Німеччина) на плечовій артерії на обох руках тричі з інтервалом більше ніж 1 хв відповідно до рекомендацій ESH у стані спокою після 5-хвилинного відпочинку. Визначали середнє арифметичне значення цього показника.

Вміст інсуліну в плазмі крові досліджували імуноферментним методом використовуючи набір DRG Insulin ELISA (DRG Instruments GmbH, Німеччина). Для визначення інсулінорезистентності (IP) застосовували метод розрахунку його індексу HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance) за формулою [14]:

$HOMA-IR = \frac{\text{вміст глюкози плазми нат-}}$

ще, ммоль/л × вміст інсуліну плазми натще, мкМО/мл) / 22,5. Цей індекс тісно корелює із результатами еуглікемічного clamp-тесту. Значення індексу НОМА-IR 2,77 ум.од. та більше є одним із широко застосовуваних у клінічних дослідженнях маркерів інсуліно-резистентності.

Для оцінки реакції організму на гіпоксичний стимул не раніше ніж через 24 год після ГТТ проводили гостру гіпоксичну пробу: вранці, через 2-3 год після сніданку. Тривалість гіпоксичного впливу була 20 хв, вихідного і відновлювального періодів – по 5 хв. Стан ізокапічної нормобаричної гіпоксії викликався вдиханням готової стандартизованої газової суміші зі зниженим вмістом кисню (12% O₂ і 88% N₂). При проведенні гострої гіпоксичної проби щохвилини визначали рівень SpO₂, кожні 2 хв реєстрували частоту дихання, частоту серцевих скорочень та АТ. Забори венозної крові для визначення в плазмі вмісту глюкози та інсуліну проводили безпосередньо перед та на 18-20-й хвилині гіпоксичної проби. Сатурацію крові (SpO₂) реєстрували за допомогою монітора «ЮМ-300» фірми «ЮТАС» (Україна) пульсоксиметричним методом.

Враховуючи те, що показники мали розподіл, наближений до нормального, результати тесту наведено у форматі M±m. Їх статистичну обробку виконували за допомогою програми Statistica 6,0 for Windows (“StatSoft”, США). Вірогідність різниці між групами оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента. Різниця вважалася значимими при P<0,05 [15].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

До групи з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну відібрано 18 осіб, у яких концентрація глюкози в плазмі натще була в межах від 5,6 до 6,9 ммоль/л (ізольоване порушення глікемії натще) та /або через 120 хв ГТТ становила від 7,8 до 11 ммоль/л (порушення толерантності до глюкози). До групи здорових людей увійшли 22 особи, у яких концентрація глюкози в плазмі натще була менше ніж 5,6 ммоль/л, а через 120 хв ГТТ менше ніж 7,8 ммоль/л (табл. 1).

Групи не відрізнялися за віком, співвідношенням кількості чоловіків і жінок, масою тіла, індексом маси тіла, обхватом талії. Водночас у групі з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну концен-

Таблиця 1. Характеристика груп обстежених людей

Показники	Здорові люди (n=22)	Люди з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну (n=18)
Вік, роки	64,7±2,7	60,8±2,8
Маса тіла, кг	83,3±4,3	79,6±3,3
Індекс маси тіла, кг·м ⁻²	29,6±0,9	29,2±0,6
Обхват талії, см	98,0±2,6	93,9±1,7
Концентрація глюкози в плазмі крові, ммоль·л ⁻¹		
натще	4,8±0,2	5,8±0,2 *
через 30 хв глюкозо-толерантного тесту (ГТТ)	7,5±0,4	7,7±0,6
через 60 хв ГТТ	6,5±0,5	8,5±0,9 *
через 120 хв ГТТ	5,0±0,3	8,1±0,8 *
Площа під кривою концентрації глюкози, ммоль·л ⁻¹ ·хв ⁻¹	709±44	962±62 *
Концентрація інсуліну в плазмі крові, мкОД · мл ⁻¹		
натще	8,8±0,6	11,7±3,2
через 120 хв глюкозо-толерантного тесту	11,4±1,5	43,3±14,3 *
Індекс інсулінорезистентності НОМА-IR, ум. од.	1,9±0,1	3,4±0,6 *

Примітка. Тут і в табл.2 і 5 * P < 0,05 порівняно із здоровими людьми.

трація глюкози натще та через 60 і 120 хв стандартного ГТТ була статистично значимо вища порівняно зі здоровими людьми. Також групи відрізнялися за показниками площі під кривою концентрації глюкози, концентрації інсуліну в плазмі та індексу інсулінорезистентності, які також були вищі у хворих осіб.

Слід відмітити відмінності між групами стосовно змін SpO_2 під час проведення гострої гіпоксичної проби (табл.2). Так, у осіб з переддіабетичними порушеннями вже на 10-й хвилині гіпоксії спостерігався вірогідно нижчий рівень цього показника порівняно зі здоровими. Надалі ці відмінності посилилися, на що вказують значення SpO_2 на 16-й та 20-й хвилинах гіпоксичної проби. Після її припинення у хворих спостерігалось повільніше відновлення цього показника до початкового рівня. Отримані результати свідчать про більш низьку стійкість організму до впливу гіпоксичної гіпоксії у обстежених з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну.

Гостра гіпоксія не впливала на концентрацію глюкози та інсуліну в плазмі крові в обох групах обстежених (табл. 3).

Приріст показників гемодинаміки у відповідь на гостру гіпоксичну пробу був однаковий в обох групах обстежених (табл. 4), проте на 5-й хвилині відновного періоду систолічний і діастолічний АТ, частота серцевих скорочень у осіб з переддіабетичними порушеннями були вищими, ніж у здорових. Крім того, у них реакція на дозовану гіпоксію

відрізнялася більш значним приростом частоти дихання та відсутністю нормалізації на 5-й хвилині відновного періоду.

Таким чином, отримані результати вказують на меншу стійкість організму до впливу гіпоксії у хворих з предіабетичними порушеннями вуглеводного обміну. Про це свідчить більш значне зниження SpO_2 та менше ефективне функціонування дихальної і серцево-судинної системи при гострій гіпоксичній пробі.

Враховуючи дані наших попередніх досліджень, люди літнього відрізняються індивідуальними особливостями реакції на гостру гіпоксичну пробу, тобто мають різну стійкість організму до гіпоксії. Для розмежування обстежених на групи з задовільною та зниженою стійкістю організму до гіпоксії використано такий критерій, як значення SpO_2 на 20-й хвилині дозованої гіпоксичної проби [12, 13]. У підгрупу із задовільною стійкістю до гіпоксичної гіпоксії включені 26 осіб, у яких у цей період рівень SpO_2 перевищував 80 %, із зниженою - 14 обстежених, у яких SpO_2 була 80 % або менше (табл. 5).

Слід відмітити, що у осіб зі зниженою стійкістю до гіпоксії концентрація глюкози в плазмі крові значно вища як натще ($P<0,05$), так і під час проведення стандартного ГТТ, особливо на його 120-й хвилині ($P<0,05$), що свідчить про наявність порушеної толерантності до глюкози. Відповідно у цих обстежених достовірно більша площа під

Таблиця 2. Динаміка показника сатурації крові (%) при гострій гіпоксичній пробі (12 % кисню) у здорових і хворих людей ($M\pm m$)

Схема дослідження	Здорові люди (n=22)	Люди з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну (n=18)
До гіпоксичної проби	98,2±0,3	98,3±0,3
Під час виконання гіпоксичної проби		
6 хв	91,5±1,5	89,4±2,0
10 хв	89,0±1,7	83,5±2,2 *
16 хв	88,5±2,4	81,1±1,3 *
20 хв	85,2±2,8	79,1±1,5 *
Через 5 хв після припинення гіпоксичної проби	99,0±0,2	94,3±3,7

Таблиця 3. Динаміка концентрації глюкози та інсуліну в плазмі крові при гострій гіпоксичній пробі (12 % кисню) у здорових і хворих людей (M±m)

Показники	Здорові люди (n=22)	Люди з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну (n=18)
Глюкоза, ммоль·л ⁻¹		
до гіпоксичної проби (ГП)	4,9±0,5	5,7±0,5
на 18-20-й хвилині ГП	4,9±0,4	5,4±0,4
Інсулін, мкОД·мл ⁻¹		
до гіпоксичної проби (ГП)	5,2±0,8	6,0±0,7
на 18-20-й хвилині ГП	4,5±0,6	5,8±0,3

кривою концентрації глюкози. З іншого боку, люди із зниженою стійкістю до гіпоксії крім підвищеного вмісту глюкози мали вищу концентрацію інсуліну в плазмі крові, особливо на 120-й хвилині ГТТ, що у поєднанні з підвищеним індексом НОМА вказує на наявність інсулінорезистентності.

У всіх обстежених із задовільною стійкістю до гіпоксії переддіабетичні порушення

вуглеводного обміну були виявлені лише у 5 осіб (19,2%), а саме: глікемії натще – у 3 (11,5%), толерантності до глюкози - у 2 (7,7%), їх поєднання – не виявлено в жодного обстеженого. Водночас серед 14 обстежених зі зниженою стійкістю організму до впливу гіпоксичної гіпоксії переддіабетичні порушення спостерігалися значно частіше – 11 осіб (78,6 %), 4 (28,6%), 4 (28,6%), їх поєд-

Таблиця 4. Динаміка частоти дихання, артеріального тиску та частота серцевих скорочень при гострій гіпоксичній пробі (12 % кисню) у здорових і хворих людей (M±m)

Показники	Здорові люди (n=22)	Люди з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну (n=18)
Частота дихання, хв ⁻¹		
до гіпоксичної проби (ГП)	15,2±1,0	13,8±1,5
наприкінці ГП	20,7±2,2 *	25,2±2,4 **
абсолютний приріст	5,5±2,3 *	11,4±2,8 **
на 5-й хвилині після ГП	15,5±3,2	19,0±2,0 *
Систолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.		
до ГП	122,7±4,7	122,9±4,4
наприкінці ГП	137,8±7,6 *	138,7±6,8 *
абсолютний приріст	14,9±7,2 *	15,8±7,4 *
на 5-й хвилині після ГП	120,0±4,1	132,0±4,8 ***
Діастолічний артеріальний тиск, мм рт. ст.		
до ГП	80,8±3,8	78,2±3,0
наприкінці ГП	94,1±6,6 *	90,1±5,3 *
абсолютний приріст	14,7±6,9 *	11,9±5,7 *
на 5-й хвилині після ГП	76,0±4,0	83,0±2,1 *
Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹		
до ГП	65,5±2,3	73,6±1,9 ***
наприкінці ГП	71,5±2,2 *	80,7±2,0 ***
абсолютний приріст	6,0±2,5 *	7,1±2,4 *
на 5-й хвилині після ГП	67,8±3,2	71,0±3,6

* P<0,05; ** P<0,01 вірогідність зрушення показника при дозованій гіпоксії, *** P < 0,05 вірогідність відмінностей між групами.

нання – у 3 (21,4%) відповідно.

Концентрації глюкози та інсуліну в плазмі крові не змінилися під час проведення гіпоксичної проби як у осіб із задовільною, так і зі зниженою стійкістю до гіпоксії. Тобто однократний сеанс гострої гіпоксичної гіпоксії (дихання 12% кисню протягом 20 хв) не впливає на стан вуглеводного обміну. Це можна пояснити тим, що за такий короткий відрізок часу ще не відбувається активації генетичних механізмів регуляції, зокрема посилення експресії фактора, індукованого гіпоксією (HIF), який сприяє зниженню вмісту глюкози в крові посиленням її транспорту через судинний ендотелій [16, 17].

Водночас сеанси періодичної гіпоксії посилюють загальну неспецифічну резистентність організму до несприятливих факторів навколишнього середовища, внаслідок чого вони широко використовуються як засіб підвищення фізіологічних можливостей організму [18, 19].

Вплив короткотривалих сеансів гіпоксії проявляється в адаптації до неї самої. У разі короткотривалого гіпоксичного впливу основну роль в адаптації відіграють рефлекторні фізіологічні реакції, спрямовані на підтримання швидкості поетапної доставки кисню.

Проте значна за вираженістю періодична гіпоксія (синдром нічного апное) призводить до дисфункції β-клітин підшлункової залози (порушення базальної секреції інсуліну), підвищення резистентності до інсуліну, зниження толерантності до глюкози, зміни метаболізму глюкози в печінці [20]. Після усунення нічного апное та зумовленої ним гіпоксії вміст глюкози натще нормалізувався, але порушення толерантності до неї, інсулінорезистентність і порушення функції β-клітин зберігалися.

У процесах адаптації організму до впливу гіпоксії важлива роль належить киснечутливому протеїновому комплексу, що має транскрипційну активність – HIF, котрий вважається

Таблиця 5. Показники сатурації крові та вуглеводного обміну в підгрупах обстежених з задовільною (1-ша підгрупа) і зниженою стійкістю організму до впливу гострої гіпоксичної гіпоксії (2-га підгрупа), (M±m)

Показники	1-ша підгрупа (n=24)	2-га підгрупа (n=16)
Сатурація крові, %		
до гіпоксичної проби (ГП)	98,1±0,3	98,1±0,4
на 6-й хвилині ГП	90,5±1,4	84,8±2,0 *
на 10-й хвилині ГП	86,6±1,5	80,3±1,0 *
на 16-й хвилині ГП	86,3±1,3	79,7±2,1 *
на 20-й хвилині ГП	83,3±0,4	77,3±1,1 *
Концентрація глюкози в плазмі крові, ммоль·л ⁻¹		
натще	4,8±0,2	5,6±0,3 *
через 30 хв глюкозо-толерантного тесту (ГТТ)	7,9±0,4	8,2±0,8
через 60 хв ГТТ	7,1±0,6	8,9±0,9
через 120 хв ГТТ	5,2±0,5	8,0±1,0 *
Площа під кривою концентрації глюкози, ммоль·л ⁻¹ ·хв ⁻¹	765±49	977±89 *
Концентрація інсуліну в плазмі крові, мкОД·мл ⁻¹		
натще	8,3±0,8	16,7±6,5
через 120 хв ГТТ	9,8±1,9	70,2±21,7 *
Індекс інсулінорезистентності НОМА-IR, ум. од.	1,8±0,2	4,6±1,9
Концентрація глюкози в плазмі крові, ммоль·л ⁻¹		
до ГП	5,1±0,6	5,7±0,5
на 20-й хвилині ГП	5,3±0,6	5,2±0,3
Концентрація інсуліну в плазмі крові, мкОД·мл ⁻¹		
до ГП	5,2±0,8	6,1±0,7
на 20-й хвилині ГП	5,0±0,6	5,4±0,5

провідним транскрипційним регулятором генів ссавців, відповідальних за реакцію на нестачу кисню. Він активується в фізіологічно важливих місцях регуляції кисневих шляхів, забезпечуючи швидкі й адекватні відповіді на гіпоксичний стрес [21]. За умов гіпоксії посилюється утворення HIF, який, в свою чергу, запускає експресію таких гіпоксизалежних генів, як еритропоетин (EPO) і судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF). Активація HIF, в свою чергу, покращує секрецію інсуліну і підвищує толерантність до глюкози [21, 22]. У осіб з генетично зумовленим еритроцитозом, наприклад у мешканців Чувашії, цей показник підвищений навіть за умов нормоксії, що викликає посилення синтезу еритропоетину [21]. Вміст глюкози в крові і глікозильованого гемоглобіну у них ймовірно нижчий порівняно з особами без такого генетичного дефекту. Цей факт можна розглядати як доказ того, що підвищений вміст HIF істотно впливає на стан вуглеводного обміну, зменшуючи вміст глюкози в крові [24].

Незважаючи на зацікавленість фахівців різних спеціальностей проблемою стійкості організму до гіпоксії, питаннями підвищення резистентності організму до впливу гіпоксії, їх вирішення потребує проведення подальших досліджень. Відрізняються дані, отримані в експерименті, з дослідженнями клінічних проявів станів, що супроводжуються «шкідливим» впливом гіпоксії (нічне апное, гірська хвороба, цукровий діабет 2-го типу тощо). Майже відсутні праці, в яких би вивчався зв'язок між стійкістю організму до впливу гіпоксії та станом вуглеводного обміну, а також вплив інтервальної короткотривалої гіпоксії на вуглеводний обмін у людей літнього віку. В нашій роботі ми довели, що у осіб з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну знижена стійкість до гіпоксичної гіпоксії. В свою чергу серед обстежених осіб із зниженою стійкістю до гіпоксичної гіпоксії частіше виявляється гіперглікемія як натще, так і під час проведення стандартного ГТТ. Також обстежені зі зниженою стійкістю до

гіпоксії мали вищу концентрацію інсуліну в плазмі крові, що зумовлювало підвищення індексу НОМА та свідчить про наявність інсулінорезистентності.

Таким чином, обстежені з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну мають більш низьку стійкість організму до впливу гострої гіпоксичної гіпоксії порівняно зі здоровими людьми, на що вказує істотне зниження SpO_2 при дозованій гіпоксичній пробі. У людей зі зниженою стійкістю до гострої гіпоксичної гіпоксії вони визначалися значно частіше, ніж у обстежених із задовільною стійкістю до гіпоксії: порушена глікемія натще спостерігалася у 28,6 та 11,5 % відповідно, порушена толерантність до глюкози - у 28,6 та 7,7 %, а їх поєднання у 22 % осіб зі зниженою стійкістю до гіпоксії. Обстежені із зниженою стійкістю до гіпоксії мали вищу концентрацію інсуліну в плазмі крові, особливо на 120-й хвилині стандартного ГТТ, що у поєднанні з підвищеним індексом НОМА вказує на наявність у них інсулінорезистентності. Обстежені з переддіабетичними порушеннями вуглеводного обміну відрізняються від здорових осіб більш значним приростом частоти дихання при гіпоксичній пробі та відсутністю її нормалізації.

Подяка

Дослідження крові з використанням імуноферментних методик проводили в лабораторії патофізіології та імунології ДУ "Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України" (керівник – акад. НАМНУ Г.М. Бутенко, виконавець – д.м.н. І.М. Пішель).

О.В.Коркушко, В.Б. Шатило, В.П. Чижова, С.С. Наскалова, Е.Д. Осьмак, А.В. Гремяков, И.А. Антонюк-Щеглова, А.В. Гавалко, Н.С. Наумчук

РЕАКЦИЯ ОРГАНИЗМА НА ОСТРУЮ ГИПОКСИЧЕСКУЮ ПРОБУ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ЛИЦ С ПРЕДИАБЕТИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Целью исследования было выяснить особенности реакции организма на острую гипоксическую пробу у лиц с

предиабетическими нарушениями углеводного обмена. Обследовано 22 здоровых человека и 18 человек с предиабетическими нарушениями углеводного обмена в возрасте от 50 до 74 лет. Всем проведено острую гипоксическую пробу (дыхание газовой смесью с 12% кислорода продолжительностью до 20 мин) с мониторингом сатурации крови (SpO_2), частоты дыхания, артериального давления, частоты сердечных сокращений; стандартный глюкозотолерантный тест (ГТТ) с определением концентрации в плазме глюкозы и инсулина. У больных выявлено более значительное снижение SpO_2 и менее эффективное функционирование дыхательной и сердечно-сосудистой системы при дозированной гипоксической пробе, чем у здоровых людей. После перераспределения обследованных в зависимости от степени снижения SpO_2 при гипоксической пробе на подгруппы людей с сохраненной устойчивостью к гипоксии (1-я подгруппа, SpO_2 более 80%) и со сниженной (2-я подгруппа, SpO_2 80% или меньше) установлено, что во 2-й подгруппе концентрация глюкозы натощак и через 2 ч ГТТ значительно выше, чем у лиц 1-й подгруппы. Полученные результаты свидетельствуют о наличии взаимосвязи реакции организма на гипоксию, в частности между степенью артериальной гипоксемии при гипоксической пробе, и показателями гликемии натощак и при стандартном ГТТ. Больные с предиабетическими нарушениями углеводного обмена характеризуются более низкой стойкостью к гипоксической гипоксии.

Ключевые слова: предиабетические нарушения углеводного обмена; глюкозотолерантный тест; инсулинорезистентность; гипоксия.

**O.V. Korkushko, V.B. Shatilo, V.P. Chyzhova,
S.S. Naskalova, Ye.D. Osmak, A.V. Gremiakov,
I.A. Antoniuk-Scheglova, G.V. Gavalko,
N.S. Naumchuk**

ORGANISM REACTION TO DOSED HYPOXIC HYPOXIA IN THE HEALTHY SUBJECTS AND INDIVIDUALS WITH PREDIABETIC HYDROGEN METABOLISM DISTURBANCES

To assess organism reaction to dosed hypoxic hypoxia in the human individuals with pre-diabetic hydrogen metabolism disturbances. Altogether 40 subjects, age range 50-74 years, were examined, including 18 persons with pre-diabetic hydrogen metabolism disturbances and 22 essentially healthy subjects. All of them underwent dosed hypoxic test (breathing gas mixture containing 12 % of oxygen during nearly 20 min. The following monitorings were performed: blood saturation (SpO_2), breathing rate, arterial blood pressure and heart rate; and standard glucose tolerance test (GTT) for blood plasma glucose and insulin concentration. The patients with pre-diabetic hydrogen metabolism disturbances displayed a more significant decrease of SpO_2 and less effective functioning of the respiratory and cardiovascular systems during dosed hypoxic test compared with the healthy individuals without

hydrogen metabolism disturbances. After redistribution of study subjects relative the degree of SpO_2 decrease at dosed hypoxic test in the subgroup with satisfactory resistance to hypoxia (subgroup 1: SpO_2 more than 80 %) and with reduced (subgroup 2: SpO_2 80 % or less) we have found that the fasting glucose level after 2-hour GTT was significantly higher in subgroup 2 versus subgroup 1. The obtained results indicate the interrelationship between organism reaction to hypoxia, in particular between the degree of arterial hypoxemia during performance of the dosed hypoxic test and the indices of fasting glycemia and at standard GTT. The patients with pre-diabetic hydrogen metabolism disturbances are characterized with lower resistance to hypoxic hypoxia.

Key words: pre-diabetic hydrogen metabolism disturbances; glucose tolerance test; insulin resistance; hypoxia.

D.F. Chebotarev Institute of Gerontology AMS Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Tian H, Pan C, Lu J. Prevalence and risk factors of hypertension and coronary heart disease in the subjects with abnormal glucose metabolism. *Cien Saude Colet.* 2010;15(1):1073-1080.
2. Stolk RP, Pols HA, Lamberts SW et al. Diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, and hyperinsulinemia in an elderly population. The Rotterdam Study. *Am J Epidemiol.* 1997; 145 (1):24-32.
3. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes 1995–2025. Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 1998;21:1414–31.
4. Diabetes Association. Diabetes and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care.* 2004; 27:5–10.
5. Berezovsky VA., Oxygen starvation and ways of correction of a hypoxia. Kiev: Naukova Dumka. 1990; 211 p. [Russian].
6. Kolesnikova EE, Serebrovskaya TV. Age features of reaction of system of breath to a hypoxia and a giperkapniya and exchange of catecholamines at adaptation to a periodic hypoxia. *Archive of clinical and experimental medicine.* 2001;10(2):165-166. [Russian].
7. Chebotarev DF, Korkushko OV, Ivanov LA. About mechanisms of development of a hypoxia at advanced and senile age. Ageing and physiological systems of an organism. 1969: 221-235. [Russian].
8. Smith ML, Decker MJ, Strohl KP. Peripheral and central chemoreflexes operate significantly below the threshold for activation in healthy humans. *Physiologist.* 1992;35:238.
9. Korkushko OV. Significance of respiratory, haemodynamic and tassis factors in development of a hypoxia at advanced and senile age. *Problems of aging and longevity.* 1998; 4: 376-384. [Russian].
10. Asanov EA. Dr. of medical sci. diss. Kiev: In-t of gerontology of AMN of Ukraine Publ. 2008.; 42 p.
11. Korkushko OV, Ivanov LA. Modern ideas of pathogenetic factors of a hypoxia at advanced and senile age. *Vestn. USSR Academy of Medical Sciences.* 1990; (1):41-5.

12. Korkushko OV, Ivanov LA, Chebotarev ND, Pizaruk AV. Peculiarities of the reaction of respiration to hypoxia in aging. *Fiziol Zh.* 2003;49(3): 63-9.
13. Ryden L, Standl E, Bartnik M. Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC); European Association for the Study of Diabetes (EASD) Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J.* 2007; 28 (1):88–136.
14. McAuley KA, Williams SM, Mann JI. Diagnosing insulin resistance in the general population. *Diabetes Care.* 2001; 24:460-464.
15. Rebrova OYu. Statistichesky analysis medical dates application of a package of the applied STATISTICA programs. M: Mediasfera, 2002; 312 p.
16. Meerson FZ. Adaptation to stressorny situations and physical activities. Moscow. 1988; 256 p.
17. Meerson FZ. General mechanism of adaptation and prevention. Moscow, 1973; 366 p.
18. Berezovsky VA, Deynega VG. Physiological mechanisms sanogennykh of effects of mountain climate. Kiev. 1988:224 p.
19. Ushakov IB, Izmerov NF, Bukhtiiarov IV. Methodic approaches using normobaric interval hypoxia and impulse magnetic eld to increase nonspecic and anti-radio resistance in workers of ecologically unfavorable industries. *Med Tr Prom Ekol.* 2005; (2): 11-5.
20. Polak J, Shimoda LA, Drager LF, Undem C, McHugh H, Polotsky VY, Punjabi NM. Intermittent hypoxia impairs glucose homeostasis in C57BL6/J mice: partial improvement with cessation of the exposure. *Sleep.* 2013; 1;36(10):1483-90; 1490A-1490B.
21. Drager LF, Jun JC, Polotsky VY. Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010; 24(5):843-51.
22. Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D, Sharma SD, Bosch-Marce M, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol.* 2006; 1;577(Pt 2):705-16.
23. McClain DA, Abuelgasim KA, Nourai M, Salomon-Andonie J, Niu X, Miasnikova G, Polyakova LA, Sergueeva A, Okhotin DJ, Cherqaoui R, Okhotin D, Cox JE, Swierczek S, Song J, Simon MC, Huang J, Simcox JA, Yoon D, Prchal JT, Gordeuk VR. Decreased serum glucose and glycosylated hemoglobin levels in patients with Chuvash polycythemia: a role for HIF in glucose metabolism. *J Mol Med (Berl).* 2013;91(1):59-67.
24. Semenza G. L. O2 - regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol.* 2004; 96 (3):1173–1177.

*Матеріал надійшов
до редакції 01.02.2015*

Аналіз асоціації між 11 однонуклеотидними поліморфізмами та рівнем ендотеліозалежної вазодилатації у дітей, хворих на цукровий діабет 1-го типу

Н.Б. Праник¹, С.В. Гончаров², В.Л. Гур'янова², В.Г. Майданник¹, М.В. Хайтович¹,
О.О. Мойбенко², В.Є. Досенко²

¹Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця МОЗ України, кафедра педіатрії №4, м. Київ;

²Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: natapranik@gmail.com

Досліджено асоціацію між 11 однонуклеотидними поліморфізмами 10 генів із рівнем ендотеліозалежної вазодилатації (ЕЗВД) у 45 дітей, хворих на цукровий діабет 1-го типу. Вивчали такі поліморфізми: G⁸⁹⁴→T екзону 7 та T⁷⁸⁶→C промотору eNOS, A¹²⁶⁶→G 16 екзону Eln, T³⁸¹→C промотору NPPB, I/D ACE, Arg₆₀→His LMP2, Met²³⁵→Thr AGT, A¹¹⁶⁶→C ATR1, C¹⁵⁶²→T MMP9, C¹³⁰⁶→T MMP2, C⁸→G гена PSMA6. Встановлено, що у дітей із генотипами G/T eNOS (G⁸⁹⁴→T), G/G Eln (A¹²⁶⁶→G), C/C NPPB (T³⁸¹→C), I/D ACE ЕЗВД нижча (P<0,05) порівняно із іншими алельними варіантами цих генів, та не залежить від тривалості захворювання, рівня глікозильованого гемоглобіну та вихідного діаметра плечової артерії. Посаднання згаданих генотипів більшою мірою впливало на зниження ЕЗВД (r=0,61; P<0,01), ніж кожен з них окремо. Отже, посаднений вплив генотипів G/T eNOS (G⁸⁹⁴→T), G/G Eln (A¹²⁶⁶→G), C/C NPPB (T³⁸¹→C), I/D ACE на ендотеліальну функцію у дітей, хворих на цукровий діабет 1-го типу, більш значимий, ніж тривалість захворювання та вміст глікозильованого гемоглобіну.

Ключові слова: однонуклеотидні поліморфізми; ендотеліозалежна вазодилатація; цукровий діабет 1-го типу.

ВСТУП

Судинні ускладнення цукрового діабету (ЦД) 1-го типу у вигляді мікро- та макроангіопатій є найбільш значимими в структурі інвалідизації та смертності хворих із цією патологією [1, 2]. Ендотеліальна дисфункція – одна з найбільш показових ознак порушення функціонального стану артеріальних судин, що характеризується неадекватною реакцією на вплив фізіологічних і фармакологічних регуляторів тону судин [3, 4]. Незадовільний глікемічний контроль та тривалість ЦД 1-го типу вважаються основними факторами розвитку ендотеліальної дисфункції, що зумовлює формування пізніх ускладнень ЦД у вигляді діабетичної нефропатії, ретинопатії тощо [5]. Проте ступінь їх прогресування значно відрізняється у різних пацієнтів,

що в літературі пов'язується із генетичною схильністю, а саме із певним набором алельних варіантів – поліморфізмом поодиноких нуклеотидів (SNPs) [6, 7]. Про можливе значення генетичних факторів у розвитку пізніх ускладнень ЦД 1-го типу свідчать наступні факти [8, 9]: 1) значна індивідуальна варіабельність термінів дебюту ускладнень та ступеня ураження органів - мішеней, що не завжди корелює із тривалістю захворювання та якістю компенсації порушень вуглеводного обміну; 2) висока частота виявлення ускладнень, їх тяжкий перебіг та швидке прогресування в певних популяційних групах; 3) підвищений ризик тяжких ускладнень у хворих на ЦД 1-го типу, родичі яких також мають такі ускладнення; 4) пік розвитку діабетичної нефропатії в межах 15-25 років тривалості захворювання

© Н.Б. Праник, С.В. Гончаров, В.Л. Гур'янова, В.Г. Майданник, М.В. Хайтович, О.О. Мойбенко, В.Є. Досенко

згідно з епідеміологічними дослідженнями та невисокий ризик формування тяжкої нефропатії, що виникла після 25 років у хворих на ЦД.

У зв'язку з цим останнім часом активізувався пошук SNPs, асоційованих і з схильністю або стійкістю до розвитку судинних ускладнень ЦД. Нині досліджено більше 100 SNPs на предмет їх зв'язку із розвитком та прогресуванням мікроангіопатій (діабетичної нефропатії, ретинопатії) при ЦД 1-го типу серед хворих різних етнічних груп (дані узагальнено в нашому огляді [10]). Проте поза увагою дослідників залишається роль SNPs у патогенезі макроангіопатій у хворих на ЦД 1-го типу, раннім маркером яких є порушення ендотелійзалежної вазодилатації (ЕЗВД).

Мета нашої роботи - пошук асоціації між поліморфізмом поодиноких нуклеотидів 10 генів (11 поліморфізмів) із рівнем ЕЗВД, яка відображає функціональний стан ендотелію великих судин еластично-м'язового типу (плечової артерії).

МЕТОДИКА

Обстежено 45 дітей (18 дівчат та 27 хлопців) хворих на ЦД 1-го типу віком від 7 до 17 років ($14,1 \pm 2,5$), які перебували на стаціонарному лікуванні в Міському ендокринологічному відділенні ДКЛ №6 м. Києва. Тривалість захворювання була від 3 до 16 років ($6,2 \pm 3,5$).

ЕЗВД визначали за допомогою манжеткової проби за стандартною методикою [11]. При порівнянні показників ЕЗВД у групах хворих із різними алейними варіантами досліджуваних генів враховували фактори, що суттєво впливають на ступінь вазодилатації, а саме компенсацію вуглеводного обміну (за вмістом глікозильованого гемоглобіну), тривалість захворювання, вихідний діаметр плечової артерії. Вміст глікозильованого гемоглобіну визначали методом іонообмінної хроматографії за допомогою набору GlycohemoglobinHbA₁-Test (Німеччина) і

він коливався від 5,9 до 11,5% (в середньому $8,4 \pm 1,4\%$).

Для генотипування використовували ДНК, що виділяли за допомогою набору „DIAtom DNA Prep100” (Росія) з букального епітелію. Інсерційно-делеційний поліморфізм 16-го інтрону гена ангіотензинперетворювального ферменту (*ACE*) визначали із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із наступним електрофорезом отриманих ампліфікатів [12]. Для виявлення поліморфізмів наступних генів: G⁸⁹⁴→T - поліморфізм 7-го екзону гена ендотеліальної NO-синтази (*eNOS*) [13], Arg₆₀→His - поліморфізм гена, що кодує одну з індукбельних субодиниць протеасоми (*LMP2*) [14], Met²³⁵→Thr - поліморфізм гена ангіотензиногена (*AGT*) [15], A¹¹⁶⁶→C - поліморфізм гена рецептора 1-го типу ангіотензину II (*ATRI*) [16], C⁻¹⁵⁶²→T - поліморфізм гена металопротеїнази 9 (*MMP9*) [17], T⁻³⁸¹→C - поліморфізм гена натрійуретичного пептиду типу В (*NPPB*) [18] застосовували ПЛР із наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів. C⁻¹³⁰⁶→T - поліморфізм гена металопротеїнази 2 (*MMP2*) визначали із застосуванням алей - специфічної ПЛР [19]. Праймери для ПЛР синтезовані Fermentas (Литва) та Metabion (Німеччина). ПЛР проводили в термоциклері Applied Biosystems 2700 («PerkinElmer», США). Для здійснення рестрикційного аналізу використовували такі рестриктази: Eco24I, Hin6I, PsyI (Tth111I), BsuRI (HaeIII), PaeI (SphI), MspI (HpaII) (Fermentas, Литва). Візуалізацію ампліфікатів генів після горизонтального електрофорезу (160 В протягом 30-45 хв) проводили за допомогою трансільюмінатора та програмного забезпечення ViTran («Біоком», Росія).

Методом ПЛР у реальному часі досліджували такі поліморфізми: T⁻⁷⁸⁶→C промотору гена ендотеліальної NO-синтази (*eNOS*), C⁻⁸→G - поліморфізм гена, що кодує α-6 субодиницю протеасоми (*PSMA6*) та A¹²⁶⁶→G - поліморфізм 16-го екзону гена еластину (*Eln*) із застосуванням CustomTaqMan® SNP

Assay, TaqMan® SNP Assay C_11599359_10 та TaqMan® SNP Assay C_1253630_1 відповідно. Ампліфікацію проводили за допомогою термоциклера “7500 Fast Real-Time PCR System” (Applied Biosystems, Foster City, США). Після ампліфікації визначали дискримінаційний аналіз алелей зазначених генів.

Для визначення ролі поліморфізму вказаних генів на ЕЗВД хворих розділяли на 2 групи залежної від рівня останнього ≤ 10 та $> 10\%$.

Отримані результати обробляли статистично з використанням програм Origin 7.0 та Excel 2000. При цьому вірогідність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм. Значення $P < 0,05$ вважали вірогідним.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати ЕЗВД у дітей із різними алельними варіантами генів, поліморфізм яких було вивчено, наведено у табл. 1. Тільки 4 із 11 визначених поліморфізмів суттєво впливають на ЕЗВД, а саме: $G^{894} \rightarrow T$ *eNOS*, $A^{1266} \rightarrow G$ *Eln*, $T^{-381} \rightarrow C$ *NPPB*, *I/D ACE*.

При дослідженні $G^{894} \rightarrow T$ - поліморфізму 7-го екзону гена *eNOS* виявлено наступний розподіл генотипів: G/G – 43,9%, G/T – 46,3%, T/T – 9,8%. У хворих із генотипом G/G рівень ЕЗВД був $15,2 \pm 1,6\%$, G/T – $10,0 \pm 1,7\%$, T/T – $15,0 \pm 0,4\%$. А у носіїв обох алельних варіантів генів він виявився вірогідно нижчим, ніж у дітей з двома Т-алелями. Слід зазначити, що показники ЕЗВД, вміст глікозилизованого гемоглобіну, тривалість захворювання і вихідний діаметр плечової артерії у хворих з генотипами G/G та T/T вірогідно не відрізнялися. Отже, існує зв'язок рівня ЕЗВД із цим поліморфізмом.

При вивченні $A^{1266} \rightarrow G$ - поліморфізму 16-го екзону гена *Eln* розподіл генотипів був таким: A/A – 17,1%, A/G – 40,0%, G/G – 42,9%. У хворих із генотипом рівень ЕЗВД становив $16,0 \pm 3,3\%$, A/G – $14,8 \pm 1,9\%$, G/G – $10,3 \pm 1,6\%$. У носіїв обох G- алелей він був нижчим ($P < 0,05$) ніж у дітей з генотипами A/A та A/G. Показники ЕЗВД у дітей з A/G-

та A/A-генотипами вірогідно не відрізнялися між собою див табл. 1. При цьому не спостерігалось вірогідної різниці в групах з різними генотипами за вмістом глікозилизованого гемоглобіну, тривалістю захворювання та вихідним діаметром плечової артерії.

Ми використали рецесивну модель аналізу результатів, оскільки найнижчі значення ЕЗВД виявлено у носіїв різних алелей гена *eNOS*. При порівнянні ЕЗВД у хворих із G/G- та G/T+T/T- генотипами виявляються вірогідно нижчі показники в останій групі ($10,9 \pm 1,4\%$), порівняно із носіями обох G-алелей ($15,2 \pm 1,6\%$). Результати є порівнюваними за вмістом глікозилизованого гемоглобіну, тривалістю захворювання та вихідним діаметром плечової артерії (табл. 2). Із вищенаведеного випливає, що на рівень ЕЗВД негативно впливає Т-алель в 894 положенні 7 екзону гена *eNOS*.

Хворих розподілили на 2 групи згідно з рівнем ЕЗВД ($\leq 10\%$ та $> 10\%$). В групі пацієнтів із вазодилатацією $\leq 10\%$ переважали носії генотипу G/T (G/G – 27,3%, G/T – 63,6%, T/T – 9,1%), а у дітей із вищими цифрами ЕЗВД – G/G (G/G – 65,0%, G/T – 25,0%, T/T – 10,0%). Різниця вірогідна за критерієм Пірсона ($P < 0,05$).

Таким чином, у дітей із ЦД 1-го типу спостерігається асоціація Т-алеля та генотипу G/T поліморфізму $G^{894} \rightarrow T$ 7-го екзону гена *eNOS* із найнижчою ЕЗВД в групах хворих, які однорідні за рівнем компенсації глікемії, тривалістю захворювання та вихідними даними вазометрії. Функціональне значення вище вказаної трансверсії в екзоні, яка призводить до заміни глутаміну на аспарагін у 298-му положенні білка *eNOS*, остаточно не з'ясоване. Нами встановлено деяке зменшення експресії вмісту мРНК та активності продукції NO в ізольованих тромбоцитах у гетерозиготному стані порівняно G/G-генотипом [20], що повністю узгоджується з даними визначення ЕЗВД.

Порівняння значень ЕЗВД в групах з A/A+A/G- та G/G-генотипами, які становили $15,2 \pm 1,6$ та $10,3 \pm 1,6$ % ($P < 0,05$), вказує на

те що, найвищі показники вазодилатації асоціюються із А-алелем та генотипом А/А-поліморфізму 16-го екзону гена *Eln*. Найнижчий рівень ЕЗВД асоціюється із генотипом G/G (табл. 2).

Коефіцієнт кореляції між кількістю поліморфних алелей та значеннями ЕЗВД $A^{1266} \rightarrow G$ - поліморфізму 16-го екзону гена *Eln* становив $-0,32$ ($P < 0,05$), що підтверджує асоціацію А/А-генотипу із найвищими показ-

Таблиця 1. Рівень ендотелійзалежної вазодилатації, вміст глікозильованого гемоглобіну, тривалість цукрового діабету 1-го типу та вихідний діаметр плечової артерії у дітей із різними алельними варіантами досліджуваних генів (M±m)

Поліморфізм	Алельні варіанти	Ендотелій-залежна вазодилатація %	Глікозильований гемоглобін, %	Тривалість цукрового діабету, роки	Вихідний діаметр артерії, мм
$G^{894} \rightarrow T$ - ендотеліальної NO-синтази (<i>eNOS</i>)	G/G	15,2±1,6	8,4±0,5	6,8±1,1	2,8±0,1
	G/T	10,0±1,7*	8,3±0,3	5,7±0,7	2,8±0,1
	T/T	15,0±0,4	8,4±0,3	4,9±0,6	2,8±0,1
$A^{1266} \rightarrow G$ - ген еластину (<i>Eln</i>)	A/A	16,0±3,3	8,1±0,6	4,0±0,4	2,8±0,2
	A/G	14,8±1,9	8,5±0,5	5,5±0,6	2,7±0,1
	G/G	10,3±1,6**	7,9±0,4	6,2±0,9	2,8±0,1
$T^{-381} \rightarrow C$ - ген натрійуретичного пептиду типу В (<i>NPPB</i>)	T/T	13,1±2,1	8,1±0,2	5,9±0,8	2,8±0,1
	T/C	16,4±2,9	8,8±0,5	7,9±1,9	2,8±0,1
	C/C	10,7±2,0***	8,8±0,5	6,7±0,9	2,8±0,1
I/D ген ангіотензин-перетворювального ферменту (<i>ACE</i>)	I/I	12,6±1,5	8,6±0,4	7,3±1,3	2,9±0,1
	I/D	11,6±1,3	7,9±0,3	5,8±0,8	2,9±0,1
	D/D	17,2±2,8***	8,5±0,4	5,0±1,3	2,6±0,1*
$T^{-786} \rightarrow C$ ген ендотеліальної NO-синтази (<i>eNOS</i>)	T/T	13,8±1,7	8,2±0,4	5,6±0,8	2,8±0,1
	T/C	12,6±1,5	8,5±0,4	6,5±0,7	2,9±0,1
	C/C	12,0±4,5	8,2±1,1	7,8±1,9	2,9±0,2
$Met^{235} \rightarrow Thr$ - ген ангіотензиногена (<i>AGT</i>)	Met/ Met	12,8±2,1	8,7±0,5	5,9±0,9	3,0±0,1
	Met/ Thr	12,6±1,5	8,2±0,3	6,7±0,8	2,8±0,1*
	Thr/ Thr	15,8±2,7	8,3±0,4	5,3±1,1	2,6±0,2
$A^{1166} \rightarrow C$ - поліморфізм гена рецептора 1-го типу ангіотензину II (<i>ATRI</i>)	A/A	13,1±1,2	8,6±0,4	6,8±0,8	2,9±0,1
	A/C	11,9±2,2	8,1±0,3	5,5±0,8	2,7±0,1
	C/C	13,8±2,1	8,9±0,9	7,6±2,5	2,9±0,1
$C^{-1306} \rightarrow T$ - ген металопротеїнази 2 (<i>MMP2</i>)	C/C	13,8±1,4	8,3±0,4	6,5±0,8	2,9±0,1
	C/T	12,9±1,7	8,7±0,4	6,5±0,9	2,9±0,1
	T/T	12,1±4,8	7,6±0,9	4,3±0,9	2,6±0,2
$C^{-1562} \rightarrow T$ - ген металопротеїнази 9 (<i>MMP9</i>)	C/C	12,9±1,2	8,5±0,2	6,6±0,6	2,9±0,1
	C/T	9,3±2,3	6,0±0,7*	4,0±0,6	2,4±0,2*
	T/T	13,8±7,1	9,1±1,5	7,0±1,0***	2,7±0,3
$Arg_{60} \rightarrow His$ - ген, що кодує одну з індукційних субодиниць протеасоми (<i>LMP2</i>)	Arg/ Arg	13,2±1,4	8,5±0,3	5,7±0,6	2,9±0,1
	Arg/ His	15,1±2,3	8,0±0,4	6,6±1,5	2,6±0,1****
	His/ His	7,1±0,9	8,5±0,9	6,0±1,0	2,9±0,4
$C^{-8} \rightarrow G$ - ген, що кодує α -6 субодиницю протеасоми (<i>PSMA6</i>)	C/C	13,1±1,2	8,3±0,3	6,3±0,6	2,8±0,1
	C/G	12,4±0,9	9,3±0,9	6,8±2,3	2,8±0,2
	G/G	—	—	—	—

* $P < 0,05$ порівняно з більш розповсюдженим генотипом, ** $P < 0,05$ порівняно з гетерозиготним станом та більш розповсюдженим генотипом, *** $P < 0,05$ порівняно з гетерозиготним станом, **** $P < 0,01$ порівняно з більш розповсюдженим генотипом

Таблиця 2. Рівень ендотелійзалежної вазодилатації, вміст глікозильованого гемоглобіну, тривалість цукрового діабету 1-го типу та вихідний діаметр плечової артерії у дітей із різними алельними варіантами досліджуваних генів (рецесивна та домінантна моделі) (M±m)

Поліморфізм	Алельні варіанти	Ендотелій-залежна вазодилатація %	Глікозильований гемоглобін, %	Тривалість цукрового діабету, роки	Вихідний діаметр артерії, мм
G ⁸⁹⁴ →T - ендотеліальної NO-синтази (<i>eNOS</i>)	G/G	15,2±1,6	8,4±0,5	6,8±1,1	2,8±0,1
	G/T+ T/T	10,9±1,4*	8,3±0,3	5,6±0,6	2,8±0,1
	G/G+ G/T	12,6±1,4	8,3±0,3	6,2±0,6	2,8±0,1
A ¹²⁶⁶ →G - ген еластину (<i>Eln</i>)	T/T	15,0±0,4	8,4±0,3	4,9±0,6	2,8±0,1
	A/A	16,0±3,3	8,1±0,6	4,0±0,4	2,8±0,2
	A/G+G/G	12,3±1,4	8,2±0,7	5,9±0,6	2,8±0,1
T- ³⁸¹ →C - ген натрійуретичного пептиду типу В (<i>NPPB</i>)	A/A+G/G	15,2±1,6	8,4±0,7	5,1±0,5	2,7±0,1
	G/G	10,3±1,6*	7,9±0,4	6,2±0,9	2,8±0,1
	T/T	13,1±2,1	8,1±0,2	5,9±0,8	2,8±0,1
I/D ген ангіотензин-перетворювального ферменту (<i>ACE</i>)	T/C+C/C	13,2±1,8	8,8±0,4	7,2±0,9	2,7±0,1
	I/I	12,6±1,5	8,6±0,4	7,3±1,3	2,9±0,1
	I/I+D/D	13,8±1,4	8,1±0,3	5,8±0,6	2,8±0,1
T- ⁷⁸⁶ →C ген ендотеліальної NO-синтази (<i>eNOS</i>)	I/I+D/D	12,1±1,1	8,2±0,3	6,9±0,7	2,9±0,1
	D/D	17,2±2,8*	8,5±0,4	5,0±1,3	2,6±0,1*
	T/T	13,8±1,7	8,2±0,4	5,6±0,8	2,8±0,1
Met ²³⁵ →Thr - ген ангіотензиногена (<i>AGT</i>)	T/C+C/C	12,3±1,4	8,4±0,3	6,8±0,7	2,9±0,1
	T/T+T/C	13,2±1,3	8,4±0,3	6,1±0,6	2,8±0,1
	C/C	12,0±4,5	8,2±1,1	7,8±1,9	2,9±0,2
Met/Thr+ Thr/Thr	Met/Met	12,8±2,1	8,7±0,5	5,9±0,9	3,0±0,1
	Met/Thr+ Thr/Thr	13,1±1,3	8,2±0,3	6,4±0,7	2,8±0,1*
	Met/Met+ Met/Thr	12,7±1,2	8,4±0,3	6,4±0,6	2,9±0,1
A ¹¹⁶⁶ →C - поліморфізм гена рецептора 1-го типу ангіотензину II (<i>ATRI</i>)	Thr/Thr	15,8±2,7	8,3±0,4	5,3±1,1	2,6±0,2
	A/A	13,1±1,2	8,6±0,4	6,8±0,8	2,9±0,1
	A/C+C/C	12,4±1,7	8,3±0,3	6,1±0,9	2,8±0,1
C- ¹³⁰⁶ →T – ген металопротейнази 2 (<i>MMP2</i>)	A/A+A/C	12,6±1,3	8,3±0,3	6,3±0,6	2,8±0,1
	C/C	13,8±2,1	8,9±0,9	7,6±2,5	2,9±0,2
	C/C	13,8±1,4	8,3±0,4	6,5±0,8	2,9±0,1
C- ¹⁵⁶² →T - ген металопротейнази 9 (<i>MMP9</i>)	C/T+T/T	12,7±1,7	8,4±0,4	5,9±0,8	2,8±0,1
	C/C+C/T	13,5±1,1	8,5±0,3	6,5±0,6	2,9±0,1
	T/T	12,1±4,8	7,6±0,9	4,3±0,9	2,6±0,2
Arg ₆₀ →His - ген, що кодує одну з індукцибельних субодиниць протеасоми (<i>LMP2</i>)	C/C	12,9±1,2	8,4±0,2	6,6±0,6	2,9±0,1
	C/T+T/T	11,1±2,3	9,1±1,1	7,0±1,0	2,7±0,2*
	C/C+C/T	12,6±1,2	8,3±0,3	6,4±0,6	2,9±0,1
Arg/Arg	T/T	13,8±7,1	9,1±1,5	7,0±1,0	2,7±0,3
	Arg/Arg	13,2±1,4	8,5±0,3	5,7±0,6	2,9±0,1
	Arg/His+ His/His	13,8±2,1	8,1±0,4	6,5±1,2	2,6±0,1**
	Arg/Arg+ Arg/His	13,8±1,2	8,4±0,3	5,9±0,6	2,9±0,1
His/His	7,1±0,9	8,5±0,9	6,0±1,0	2,9±0,4	

*P<0,05 порівняно з іншим генотипом, **P<0,01 порівняно з іншим генотипом.

никами ЕЗВД, а генотипу G/G – з найнижчими. Не спостерігалось вірогідної різниці між генотипами дітей у групах із ЕЗВД $\leq 10\%$ та $>10\%$ за критерієм Пірсона.

Трансверсія А на G в 16-му екзоні гена *Eln* призводить до зміни серину на гліцин у 422-му положенні білка еластину, але патологіологічні наслідки такої заміни практично не вивчено. Немає даних й щодо значення цього поліморфізму для розвитку судинних ускладнень при ЦД 1-го типу. Можна припустити, що поліморфізм 16-го екзону впливає на чутливість еластину судинної стінки до еластолізу. Як відомо, пептиди еластину, що утворюються внаслідок цього, взаємодіють із еластинламініновими рецепторами ендотеліальних та гладеньком'язових клітин судинної стінки, стимулюючи синтез простагландинів і продукцію NO із розвитком незалежної вазодилатації [21]. З іншого боку, на фоні активації еластолізу відбувається деградація еластину судинної стінки, підвищується обмін еластину (на це вказує зростання в крові вмісту еластинових пептидів), спостерігається ремоделювання судинної стінки, що асоціюється із збільшенням її ригідності та вищим ризиком ангіопатій у хворих на ЦД 1-го типу [19]. Таким чином, підвищена стійкість еластинових волокон до еластолізу зберігає структурний матрикс судини та одночасно дає меншу продукцію NO і навпаки, менша стійкість молекул еластину до гідролізу повинна асоціюватися із порушенням архітектоники судинної стінки та більшим синтезом NO. Співвідношення цих різноспрямованих процесів, вплив поліморфізму 16-го екзону гена *Eln* потребують подальшого вивчення.

При вивченні T⁻³⁸¹→C - поліморфізму промотору гена *NPPB* розподіл хворих за генотипами виявився таким: T/T – 36,4%, T/C – 40,9%, C/C – 22,7%. В групі хворих із генотипом T/T ЕЗВД становила $13,1 \pm 2,1\%$, T/C – $16,4 \pm 2,9\%$, C/C - $10,7 \pm 2,0\%$. Значення ЕЗВД в групі дітей, що мали обидва C-алелі, було нижчим, ніж у носіїв різних алелей

($P < 0,05$). Показники ЕЗВД в групах носіїв обох T- та різних алелей достовірно не відрізнялися між собою (табл. 1). При цьому не спостерігалось вірогідної різниці в групах з різними генотипами за вмістом глікозильованого гемоглобіну, тривалістю захворювання та вихідним діаметром плечової артерії.

Порівнюючи показники ЕЗВД у групах хворих із поєднаними генотипами T/T з T/C+C/C та T/T+T/C з C/C достовірної різниці не спостерігалось. Кореляції між кількістю поліморфних алелей та рівнем ЕЗВД - T⁻³⁸¹→C - поліморфізму гена *NPPB* виявлено не було. Не спостерігалось також достовірної різниці між генотипами дітей у групах із ЕЗВД $\leq 10\%$ та $>10\%$ за критерієм Пірсона.

Таким чином, нами було встановлено, що найнижчі показники ЕЗВД асоціюються із C/C-генотипом поліморфізму T⁻³⁸¹→C промотору гена *NPPB*. Найвищі показники вазодилатації спостерігаються у гетерозиготному стані.

Вплив T⁻³⁸¹→C - поліморфізму промотору гена *NPPB* на ЕЗВД може бути реалізовано через наступні фізіологічні механізми дії натрійуретичного пептиду типу В: збільшення синтезу внутрішньоклітинного циклічного гуанозинмонофосфату в гладеньких м'язах судин, що викликає їх розслаблення та вазодилатацію (NO-подібна дія); зниження активності ренін-ангіотензин-альдостеронової та симпатичної нервової системи, збільшення натрійурезу та діурезу, що знижує системний артеріальний тиск; антипроліферативна дія (попереджає ремоделювання стінки судин) [22, 23]. Згідно з літературними даними у хворих на ЦД 1-го типу T/C- та C/C-генотипи промотору гена *NPPB* асоціюється із більшими концентраціями в плазмі крові натрійуретичного пептиду типу В порівняно із носіями обох T-алелей [24]. Звідси випливає, що найкращі показники вазодилатації очікуються у носіїв цих генотипів. У нашому дослідженні найвищі показники ЕЗВД реєструвалися у носіїв поліморфних варіантів гена, що підтверджують літературні дані. Та-

кої закономірності не виявлено у носіїв обох С-алелей, для яких були характерні найнижчі показники вазодилатації.

При вивченні I/D - поліморфізму гена ACE виявлено такий розподіл генотипів: I/I – 33,3%, I/D – 41,1%, D/D – 25,6%. У хворих із генотипом I/I рівень ЕЗВД становив 12,6±1,5%, I/D – 11,6±1,3%, D/D - 17,2±2,8%. При гомозиготності за D-алелем рівень ЕЗВД був вірогідно вищим ніж при гетерозиготності (P<0,05). Показники ЕЗВД в групах носіїв обох I- та поліморфних алелях вірогідно не відрізнялися між собою. При цьому не спостерігалось достовірної різниці в групах з різними генотипами за вмістом глікозильованого гемоглобіну та тривалості захворювання.

При зіставленні рівня ЕЗВД дітей із I/I+I/D- та D/D-генотипами вірогідно вищими показники вазодилатації були у останніх. Найнижчі значення ЕЗВД асоціювалися із I-алелем даного поліморфізму. В групі дітей із D/D-генотипом реєстрували достовірно менший (P<0,05) вихідний діаметр плечової артерії (2,6±0,1мм), ніж у I/I та I/I+I/D-групах (2,9±0,1мм). Це явище можна пояснити реалізацією пресорного ефекту на судини в хворих з D/D-генотипом, оскільки при гомозиготності за поліморфним алелем спостерігається підвищена активність ангіотензинперетворювального ферменту, що збільшує продукцію ангіотензину II та прискорює деградацію брадикініну із виник-

ненням вазоспастичних реакцій [25].

Також нами було проведено кореляційний аналіз асоціації поєднання генотипів *eNOS* (G⁸⁹⁴→T), *Eln* (A¹²⁶⁶→G), *NPPB* (T⁻³⁸¹→C), *ACE* (I/D), при яких зустрічалися найнижчі показники вазодилатації, із рівнем ЕЗВД. Отримано достовірний кореляційний зв'язок (P<0,01), який найбільш сильним був при поєднанні G/T-генотипу *eNOS* (G⁸⁹⁴→T), G/G-генотипу *Eln* (A¹²⁶⁶→G), C/C - генотипу *NPPB* (T⁻³⁸¹→C) та I/D - генотипу *ACE* (I/D) і становив 0,61 (табл. 3).

При індивідуальному аналізі вищевказаних поліморфізмів та показників ЕЗВД у дітей із нетривалим перебігом захворювання (до 4 років) та низькими показниками ЕЗВД (<12%) виявляється поєднання наведених генотипів. У дітей із перебігом захворювання більше 15 років і високими показниками ЕЗВД (<18%) ці генотипи зустрічаються рідше, виявляються генотипи, асоційовані із кращими показниками вазодилатації (табл. 4).

Отже, генотипування хворих із визначенням G⁸⁹⁴→T - поліморфізму 7 екзону гена *eNOS*, A¹²⁶⁶→G - поліморфізму 16 екзону гена *Eln*, T⁻³⁸¹→C - поліморфізму промотору гена *NPPB*, I/D - генотипу *ACE* може дати змогу виділити групу ризику судинних ускладнень у дітей під час встановлення діагнозу, проводити профілактику розвитку ендотеліальної дисфункції та більш інтенсивну терапію мікро- та макроангіопатій.

Таблиця 3. Кореляційний аналіз впливу різних поєднань алельних варіантів G⁸⁹⁴→T-поліморфізму екзону 7-го гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS), A¹²⁶⁶→G гена еластину (Eln), T⁻³⁸¹→C гена натрійуретичного пептиду типу В (NPPB), I/D 16-го інтрону гена ангіотензинперетворювального ферменту (ACE) на зниження ендотеліальної вазодилатації

		Різновиди поєднання алельних варіантів поліморфізмів										
Поліморфізм	G ⁸⁹⁴ →T eNOS	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T
	A ¹²⁶⁶ →G Eln	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	T ⁻³⁸¹ →C NPPB	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
	I/D ACE	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D	I/D
Коефіцієнт кореляції		0,61	0,51	0,50	0,49	0,45	0,42	0,39	0,38	0,37	0,36	0,30

Таблиця 4. Індивідуальний аналіз поліморфізмів G⁸⁹⁴→T екзону 7-го гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS), A¹²⁶⁶→G гена еластину (Eln), T⁻³⁸¹→C гена натрійуретичного пептиду типу В (NPPV), I/D 16-го інтрону гена ангіотензин-перетворювального ферменту (ACE), показників ендотеліязалежної вазодилатації, тривалості захворювання, вміст глікозильованого гемоглобіну та вихідного діаметра плечової артерії.

Індивідуальний шифр зразка ДНК	CD63	CD35	CD52	CD16	CD32	CD51	CD54	CD53
Ендотеліязалежна вазодилатація %	0	3,7	4,8	8,1	8,3	11,5	21,4	18,5
Полі-морфізм	G ⁸⁹⁴ →T eNOS	G/T	G/T	G/T	G/T	G/T	G/G	G/G
	A ¹²⁶⁶ →G Eln	G/G	G/G	A/G	G/G	G/G	G/G	
	T ⁻³⁸¹ →C NPPV	C/C	T/T	T/T	T/C	T/T	C/C	T/C
	I/D ACE	I/I	I/I	I/D	I/D	I/I	D/D	I/D
Тривалість цукрового діабету, роки	4	3	3	4	4	4,5	15	16
Глікозильований гемоглобін, %	6,5	8,0	5,9	7,8	7,2	8,3	10,7	7,6
Вихідний діаметр артерії, мм	3,2	2,7	2,1	3,7	3,6	3,2	2,8	2,7

Генотипи, які асоціюються із низькими показниками ендотеліязалежної вазодилатації, генотипи, які асоціюються із високими показниками ендотеліязалежної вазодилатації

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що поліморфізми генів G⁸⁹⁴→T eNOS, A¹²⁶⁶→G Eln, T⁻³⁸¹→C NPPV та I/D ACE суттєво впливають на рівень ЕЗВД у дітей, хворих на ЦД 1-го типу.

2. Не виявлено асоціації поліморфізмів Arg₆₀→His гена LMP2, Met²³⁵→Thr гена AGT, A¹¹⁶⁶→C гена ATR1, C⁻¹⁵⁶²→T гена MMP9, C⁻¹³⁰⁶→T гена MMP2, T⁻⁷⁸⁶→C гена eNOS, C⁻⁸→G гена PSMA6 із показниками ЕЗВД в досліджуваній групі хворих.

3. У дітей із нижчими показниками глікозильованого гемоглобіну та тривалістю ЦД 1-го до 10 років із порушеннями ЕЗВД асоціюються G/T-генотип G⁸⁹⁴→T - поліморфізму 7 екзону гена eNOS, G/G-генотип A¹²⁶⁶→G - поліморфізм 16-го екзону гена Eln, C/C-генотип T⁻³⁸¹→C - поліморфізму промотору гена NPPV, I/D - генотип інсерційно-делеційного поліморфізму гена ACE. Поєднання згаданих генотипів більшою мірою впливає на зниження ЕЗВД, ніж кожен з них окремо.

4. У дітей із тривалістю ЦД до 4 років із показником ЕЗВД менше 12% спостерігається поєднання G/T-генотипу (G⁸⁹⁴→T) eNOS, G/G-генотипу (A¹²⁶⁶→G) Eln, C/C-генотипу (T⁻³⁸¹→C) NPPV, I/D-генотипу (I/D) ACE в той

час як у дітей із тривалим перебігом захворювання (більше 15 років) і високим показником ЕЗВД (>18%) ці генотипи виявляються рідше, спостерігаються алельні варіанти генів, асоційовані із кращими показниками вазодилатації.

Н.Б. Праник, С.В. Гончаров, В.Л. Гурьянова, В.Г. Майданник, Н.В. Хайтович, А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ 11 ПОЛИМОРФИЗМОВ ОДИНОЧНЫХ НУКЛЕОТИДОВ С УРОВНЕМ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОЙ ВАЗОДИЛАТАЦИИ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА

Представлены результаты поиска ассоциации 11 полиморфизмов одиночных нуклеотидов 10 генов с уровнем эндотелийзависимой вазодилатации (ЭЗВД) у 45 детей с сахарным диабетом 1-го типа. Изучены следующие полиморфизмы: G⁸⁹⁴→T экзона 7 и T⁻⁷⁸⁶→C промотора eNOS, A¹²⁶⁶→G экзона 16 Eln, T⁻³⁸¹→C промотора NPPV, I/D ACE, Arg₆₀→His LMP2, Met²³⁵→Thr AGT, A¹¹⁶⁶→C ATR1, C⁻¹⁵⁶²→T MMP9, C⁻¹³⁰⁶→T MMP2, C⁻⁸→G PSMA6. Установлено, что у детей с генотипами G/T eNOS (G⁸⁹⁴→T), G/G Eln (A¹²⁶⁶→G), C/C NPPV (T⁻³⁸¹→C), I/D ACE уровень ЭЗВД ниже (P<0,05), чем в группах пациентов с другими аллельными вариантами данных генов, который не зависит от длительности заболевания, уровня гликозилированного гемоглобина и исходного диаметра плечевой артерии.

Сочетание вышеуказанных генотипов в большей мере влияет на снижение ЭЗВД ($r=0,61$; $P<0,01$), чем каждый генотип в отдельности. При анализе влияния сочетания указанных полиморфизмов на эндотелиальную функцию установлено, что генетические факторы являются более значимыми в уменьшении ЭЗВД, чем длительность заболевания и уровень гликозилированного гемоглобина.

Ключевые слова: полиморфизм одиночных нуклеотидов; эндотелийзависимая вазодилатация; сахарный диабет 1-го типа.

**N.B. Pranic¹, S.V. Goncharov², V.L. Gurianova²,
V.G. Maidannik¹, M.V. Khaitovych¹,
A.A. Moibenko², V.E. Dosenko²**

ASSOCIATION ANALYSIS OF 11 POLYMORPHISMS OF SNPs WITH ENDOTHELIUM DEPENDENT VASODILATION IN CHILDREN WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1

We have studied the association with the level of the endothelium dependent vasodilatation (EDVD) among 11 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of 10 genes in 45 children suffering from diabetes mellitus type 1. Following polymorphisms have been studied: G⁸⁹⁴→T of the eNOS exon 7 and T⁻⁷⁸⁶→C of the eNOS promotor, A¹²⁶⁶→G of the Eln exon 16, T⁻³⁸¹→C of the NPPB promotor, I/D of the ACE, Arg₆₀→His of the LMP2, Met²³⁵→Thr of the AGT, A¹¹⁶⁶→C of the ATR1, C⁻¹⁵⁶²→T of the MMP9, C⁻¹³⁰⁶→T of the MMP2, and C⁻⁸→G of the PSMA6. It was shown that children with genotypes G/T by eNOS (G⁸⁹⁴→T), G/G by Eln (A¹²⁶⁶→G), C/C by NPPB (T⁻³⁸¹→C) and I/D by ACE genes have lower EDVD ($P<0,05$) than patients with others allelic variants of these genes, and this does not depend on duration of the disease, level of glycosylated hemoglobin and initial diameter of a humeral (brachial) artery. The combination of the above-stated genotypes influences most significantly on EDVD decrease ($r=0,61$; $P<0,01$), comparing to each genotype separately.

Key words: single nucleotide polymorphism; endothelium dependent vasodilatation; diabetes mellitus type 1

¹Bogomolets National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv

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

REFERENCES

1. Efimov A, Zueva N, Skrobonskaya N. Diabetic angiopathy: etiology and pathogenesis. *Liky Ukrayiny*. 2004; 10: 36-8. [Russian].
2. Zargar AH, Wani AI, Masoodi SR, Bashir MI. Mortality in diabetes mellitus - data from a developing region of the world. *Diabetes Res Clinical Pract*. 1999; 43: 67-74.
3. Esper R, Nordaby R, Vilarino J, Paragano A, Cacharron J, Machado R. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol*. 2006; 5: 1470-5.
4. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci*. 2005; 109: 143-159.
5. Schiavoni M, Cosentino F, Camici G, Luescher T. Diabetes and Endothelial Dysfunction: What's the Culprit? *High Blood Pressure & Cardiovasc. Prevention*. 2007; 14 (1): 5-10.
6. Balabolkin MI, Klebanov EM, Kreminskaya VM. Treatment of diabetes and its complications. Guidelines for doctors. Moscow: Medicine: 2003. [Russian]
7. Ewens K, George R, Sharma K, Ziyadeh F, Spielman R. Assessment of 115 Candidate Genes for Diabetic Nephropathy by Transmission/Disequilibrium Test. *Diabetes*. 2005; 54: 3305-18.
8. Marre M, Hadjadj S, Bouhanick B. Hereditary factors in the development of diabetic renal disease. *Diabetes Metab*. 2000; 26 (4): 30-5.
9. Dedov II, Shestakova MV. Diabetes. Guidelines for doctors. Moscow: The Universe Publishing: 2003.
10. Maidannik VG, Pranic NB. Genetic markers of late complications of 1 type of diabetes mellitus. *Pediatrics, Akusherstvo ta Ginekologiya*. 2009; 434 (4): 16-27. [Ukrainian].
11. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE., Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 340(8828): 1111-5.
12. Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero J, Iglesias-Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, Gonzales I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. *Nitric Oxide*. 2001; 5 (4): 343-8.
13. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*. 1998; 32 (3): 521-6.
14. Vinasco J, Fraile A, Nieto A, Beraun Y, Pareja E, Mataran L, Martin J. Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1998; 57: 33-7.
15. Tiago AD, Samani NJ, Candy GP, Brooksbank R, Libhaber EN, Sareli P, Woodiwiss AJ, Norton GR. Angiotensinogen gene promoter region variant modifies body size-ambulatory blood pressure relations in hypertension. *Circulation*. 2002; 17: 1483-7.
16. Buraczynska M, Ksiazek P, Drop A, Zaluska W, Spasiewicz D, Ksiazek A. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 979-83.
17. Jones GT, Phillips VL, Harris EL, Rossaak JI, Rij AM. Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C⁻¹⁵⁶²T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2003; 38: 1363-7.

18. Meirhaeghe A, Sandhu MS, McCarthy MI, de Groote P, Cotel D, Arveiler D, Ferrières J, Groves CJ, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Wareham NJ, Amouyel P. Association between the T-381C polymorphism of the brain natriuretic peptide gene and risk of type 2 diabetes in human populations. Hum Mol Genet. 2007 Jun 1;16(11):1343-50.
19. O-charoenrat P, Khantapura P. The role of genetic polymorphisms in the promoter of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes in head and neck cancer. J Oral Oncol. 2006; 42: 257-67.
20. Dosenko VE, Zagoriy VYu, Moibenko AA, Parchomenko AN. Pathophysiological aspects of endothelial NO-synthase genetic polymorphysm. Fiziol Zh. 2002; 48 (6): 86-102. [Ukrainian].
21. Faury G, Ristori M, Verdeti J, Jacob M, Robert L. Effect of Elastin Peptides on Vascular Tone. J Vasc Res. 1995; 32 (2): 112-9.
22. Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro) BNP. Eur J Heart Fail. 2004; 15(6): 257-60.
23. Sear J, Howard-Alpe G. Preoperative plasma BNP concentrations: do they improve our care of high-risk non-cardiac surgical patients? Br J Anaesth 2007; 99 (2): 151-4.
24. Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, Parving H. Polymorphisms in the B-type natriuretic peptide (BNP) gene are associated with NT-proBNP levels but not with diabetic nephropathy or mortality in type 1 diabetic patients. Nephrol Dial Transplant. 2007; 22(11): 3235-9.
25. Danser AH, Schalekamp MA, BaxWA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. Circulation. 1995; 92: 1387-88.

*Матеріал надійшов
до редакції 31.03.2015*

Експресія генів *REG1A*, *GAST* та *TGFB1* за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка щурів

А.С. Драницина, О.О. Моргаєнко, Д.М. Гребіник, Л.І. Остапченко

Навчально-науковий центр "Інститут біології" Київського національного університету
ім. Тараса Шевченка; e-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com

У роботі досліджено експресію гена Reg1a у слизовій оболонці шлунка щурів за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень. Підвищення було зафіксовано після 1 - годинної дії пошкоджувального чинника – у 2,1 раза, а максимальний рівень відзначали після 3 год стресового впливу – у 3,5 раза, при цьому вказані зміни відбувалися на фоні інтенсифікації процесів пероксидації ліпідів та порушення функціонування антиоксидантної системи. Через 12 та 24 год після припинення дії стресора різко знижувався рівень експресії гена Reg1a: в 1,6 та 2 рази відповідно. Аналіз експресії гена Gast не підтвердив, що саме гастрин є одним із головних стимуляторів експресії Reg1a в слизовій шлунка за умов водно-імерсійного стресу. У динаміці розвитку та загоєння стрес-індукованих уражень виявлено позитивну кореляцію між експресією генів Reg1a та Tgfb1, що може свідчити про залучення гена Tgfb1 до прискорення загоєння уражень.

Ключові слова: стрес; виразкові ураження слизової оболонки шлунка; загоєння; експресія генів; Reg1a; Gast; Tgfb1.

ВСТУП

Серед поширених проблем сучасної гастроентерології провідне місце посідають патології шлунково-кишкового тракту, при цьому особлива увага приділяється виразковим ураженням шлунка і дванадцятипалої кишки (ДПК).

Незважаючи на численні дослідження, біохімічні аспекти формування і загоєння виразкових уражень остаточно нез'ясовані і потребують нових підходів і глибшого вивчення. Виявлення збудника *Helicobacter pylori* дало змогу певною мірою розкрити причини виникнення виразкових уражень, однак залишилося нез'ясованим питання, як відбувається ульцерогенез за відсутності цього мікроорганізму [1, 2]. Поширеними факторами виразкоутворення є нервово-психічні чинники, адже перенапруження нервової системи та стреси – невід'ємні риси життя людини у сучасному суспільстві.

© А.С. Драницина, О.О. Моргаєнко, Д.М. Гребіник, Л.І. Остапченко

Відомо, що формування виразкових уражень слизової оболонки шлунка (СОШ) і ДПК пов'язано з розвитком запалення, зміщенням рівноваги у про- та антиоксидантній системі. Окисний стрес, що при цьому виникає, супроводжується порушенням молекулярних механізмів регуляторних процесів у клітині й призводить до зміни експресії окремих генів [1, 3].

Ген *Reg1a* кодує однойменний регенеративний білок (regenerating islet-derived protein 1a or a lectin-related protein). Він забезпечує формування ендокринних островців і регенерацію підшлункової залози в патологічних умовах, а також залучений до диференціації її клітин за умов регенерації [4-6]. На експериментальних моделях було показано, що продукт зазначеного гена є потенційним фактором росту, має трофічний вплив на клітини СОШ і відіграє важливу роль при регенерації ушкоджень шлунка. Зокрема, він є необхід-

ним для загоювання виразок у непухлинному епітелії шлунка [5, 7-9]. Рівень експресії гена *Reg1a* підвищувався під час загоювання гострих уражень СОШ щурів, спричинених як водно-імерсійним стресом, так і введенням індометацину [10].

Ген *Reg1a* переважно експресується у фундальних ентерохромафіноподібних (ЕХП) клітинах СОШ [7, 10]. Гастрин (кодується геном *Gast*) є важливим фактором росту ЕХП-клітин, адже він регулює експресію генів хромограніну А (необхідний для процесингу пропептиду гістаміну), везикулярного моноамінного транспортера 2, гістидиндекарбоксілази внаслідок зв'язування з гастриним рецептором у цих клітинах [9]. Також було зазначено, що саме гастрин є одним із стимуляторів експресії гена *Reg1a* в СОШ, зокрема при гіпергастринемії, яка виникає саме після водно-імерсійного стресу та в інфікованих *Helicobacter pylori*.

Крім того, було показано, що експресія гена *Reg1a* в ацинарних клітинах ПЗ та під час пошкодження і загоєння СОШ за рахунок різних чинників регулюється цитокінами: трансформуючим фактором росту α (TGF- α), епідермальним фактором росту (EGF), інтерлейкінами (ІЛ) 6, 8, інтерферонами, цитокініндукованим нейтрофільним хемоатрактантом CINC-2 β (мишачий гомолог – ІЛ 8), трефоліновими факторами (TFFs) тощо [5, 6, 10, 11].

Цитокін TGF- β 1 (ізоформа 1 TGF- β , кодується геном *Tgfb1*) є потужним онкосупресором у нормальних клітинах, спричиняє множинні впливи на різні їх типи, беручи участь у регуляції росту, їх диференціації, апоптозі, регенерації при пошкодженні та в імунній відповіді внаслідок активації дозрівання Т-регуляторних клітин із подальшим інгібуванням запалення [12-14].

Метою нашої роботи було визначити експресію генів *Reg1a*, *Gast* та *Tgfb1* за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень СОШ щурів.

МЕТОДИКА

У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій стосовно проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин відповідно до Європейської конвенції (Страсбург, 1986).

Досліди проводили на самцях нелінійних білих щурів масою 250 – 270 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. За добу до проведення експерименту вони мали доступ лише до води. Нейродистрофічні ураження шлунка викликали за допомогою іммобілізаційного водно-імерсійного стресу, для цього щурів поміщали в металеві перфоровані патрони з прозорим вікном у верхній частині для голови. Патрони занурювали у вертикальному положенні в резервуар так, щоб 2/3 тіла тварини перебувало під водою (23°C) [15]. Щурів забивали методом дислокації шийних хребців через 0,5, 1, 2, 3 год стресового впливу, а також через 12 та 24 год після його припинення. Тварин у кожній експериментальній групі було 7. Визначали вміст малонового діальдегіду за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [16], каталазну активність за здатністю пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [17], а також концентрацію білка за методом Лоурі [18].

РНК отримували за методом Chomczynski та Sacchi [19]. Зворотнотранскрипційну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ-ПЛР) проводили в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 2 мкг РНК, 1 ммоль/л дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ), 200 од. зворотної транскриптази «Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase», відповідний буферний розчин, 20 од. рибонуклеазного інгібітора «Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor» («Thermo Scientific», Литва), 1 мкмоль/л зворотного праймера. Синтез відбувався при 65°C – 5 хв, 42°C – 60 хв. ПЛР проводили в 30 мкл реакційної суміші, що містила 3 мкл кДНК, буферний розчин, по 200 мкмоль/л кожного дНТФ («Thermo Scientific», Литва),

по 1 мкмоль/л кожного праймера, до 2,5 ммоль/л $MgCl_2$ та 1 од. ДНК полімерази «Taq DNA Polymerase (recombinant)» («Thermo Scientific», Литва). Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за таких температурних умов: ініціююча денатурація 95°C – 3 хв; далі 35 циклів (для *Actb* - β -актин - ген, що використовується як внутрішній контроль реакції завдяки конститутивній експресії – 28 циклів): денатурація ДНК 95°C – 45 с; гібридизація праймерів 48°C – 45 с для *Reg1a* (608 п.н.), 52°C – 40 с для *Gast* (310 п.н.), 52°C – 45 с для *Tgfb1* (298 п.н.) та 49°C – 40 с для *Actb* (521 п.н.); добудова ланцюга 72°C – 1 хв 15 с (для *Reg1a* та *Tgfb1*) або 1 хв (для *Gast* та *Actb*). Після цього проводили елонгацію ампліфікатів при 72°C – 5 хв.

У реакціях було використано послідовності праймерів: для *Reg1a* – прямий – AGCCTGCAGAGATTGTTGAC і зворотний – CCATAGGGCAGTGAGGCAAG; для *Gast* – прямий – GCCCAGCCTCTCATCATC і зворотний – GGGGACAGGGCTGAAGTG; для *Tgfb1* – прямий – CTTCAGCTCCACAGAGAAGA ACTGC і зворотний – CACGATCATGTTG GACAACCTGCTCC; для *Actb* – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT і зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT. Відтворюваність результатів ампліфікації була перевірена в паралельних експериментах повторенням ПЛР на кДНК усіх тварин, із кожним праймером, не менше ніж 3 рази.

Розділення продуктів ПЛР проводили електрофоретично в 1,6 %-му агарозному гелі («Agarose LE», «Roche», Німеччина), у 0,5-кратному тріс-боратному буферному розчині (ТВЕ), при напруженні 5-10 В/см [20]. Для напівкількісного аналізу експресії ампліконів на основі денситометрії було використано програму ImageJ 1.45s (НИН, США). Індeksi експресії мРНК визначали для кожного зразка [21].

Математичну та статистичну обробку результатів досліджень проводили на комп'ютері з використанням програмного пакета GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Soft-

ware Inc., США). Їх перевіряли на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Подальший обрахунок відбувався за допомогою односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) із пост-тестом Тукеея. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного \pm середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Оцінку сили взаємозв'язку окремих показників визначали за допомогою коефіцієнта лінійної кореляції Пірсона (r). Кореляцію вважали сильною при $r > 0,5$; помірною – від 0,3 до 0,5; слабкою – від 0,1 до 0,3 [22]. Значення розглядали як вірогідні при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За умов експериментального стресіндукованого виразкоутворення відбувалась інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у клітинах СОШ: вміст ТБК-активних сполук істотно перевищував контрольні значення після 1 год впливу (в 1,9 раза), зростав протягом усього періоду дії стресора і сягав максимуму на 3-тю годину: в 2,8 раза порівняно з контрольною групою тварин ($P \leq 0,001$). Незважаючи на те, що загоювання СОШ супроводжувалося зниженням вмісту вторинних продуктів ПОЛ, їх значення лишалися підвищеними щодо контролю: в 1,9 і 1,7 раза відповідно ($P \leq 0,001$). Виявлене вірогідне підвищення каталазної активності в СОШ за умов виникнення (в 1,3, 1,4 і 1,6 раза за 1, 2 і 3 год дії чинника відповідно) та загоєння (у 2 і 2,2 раза через 12 і 24 год після припинення дії відповідно, $P \leq 0,001$) стресіндукованих уражень шлунка вказують на суттєві порушення функціонування антиоксидантної системи в організмі. Отже, зміни вищезазначених біохімічних показників характеризують стан організму і дають змогу встановити передумови як порушень у СОШ за умов стресіндукованих уражень, так і процесу загоєння. Важливо було охарактеризувати рівні експресії генів *Reg1a*, *Gast* та *Tgfb1* у разі виразкового патогенезу

та загоєння, оскільки вільні радикали прямо чи опосередковано впливають на них.

Дослідження характеру експресії гена *Reg1a* показало, що рівень його мРНК в контрольній групі становив $0,044 \pm 0,0064$ ум. од. відносно *Actb*. При дії пошкоджувального чинника було виявлено вірогідне підвищення експресії цього гена в 2,1 та 2,8 раза (1 і 2 год відповідно), максимальне значення було зафіксовано через 3 год після впливу (збільшення в 3,5 раза) порівняно з контрольною групою тварин ($P \leq 0,001$, див. рис. 1.). Під час регенерації ушкоджених ділянок СОШ рівень мРНК гена *Reg1a* різко знижувався: в 1,6 та 2 рази через 12 і 24 год відповідно ($P \leq 0,001$) порівняно з показниками в тварин, що піддавалися 3 - годинній дії стресора, проте залишалися підвищеними порівняно з контролем в 2,2 та 1,8 раза відповідно ($P \leq 0,001$; див. рис. 1.).

Ген *Reg1a* відіграє важливу роль при загоюванні виразок у непухлинному епітелії шлунка [5, 7-9]. Рівень його експресії зростає при гострих і хронічних запальних процесах [4, 9, 10], однак починає повертатися до контрольних значень при зниженні інтенсивності патологічного процесу [5, 6, 9, 10]. Таким чином, антиапоптотичні та пропроліферативні властивості цього гена при регенерації слизової шлунка повинні чітко регулюватися, наприклад, інгібуванням сигнальних шляхів STAT3 та Akt/Bad/Bcl-xL для запобігання пухлинній трансформації епітеліальних клітин шлунка [5, 6].

У нашому дослідженні показано зростання рівня мРНК *Reg1a* за умов розвитку нейродистрофічних уражень шлунка щурів. Отримані результати підтверджуються даними літератури, де показано, що при іммо-

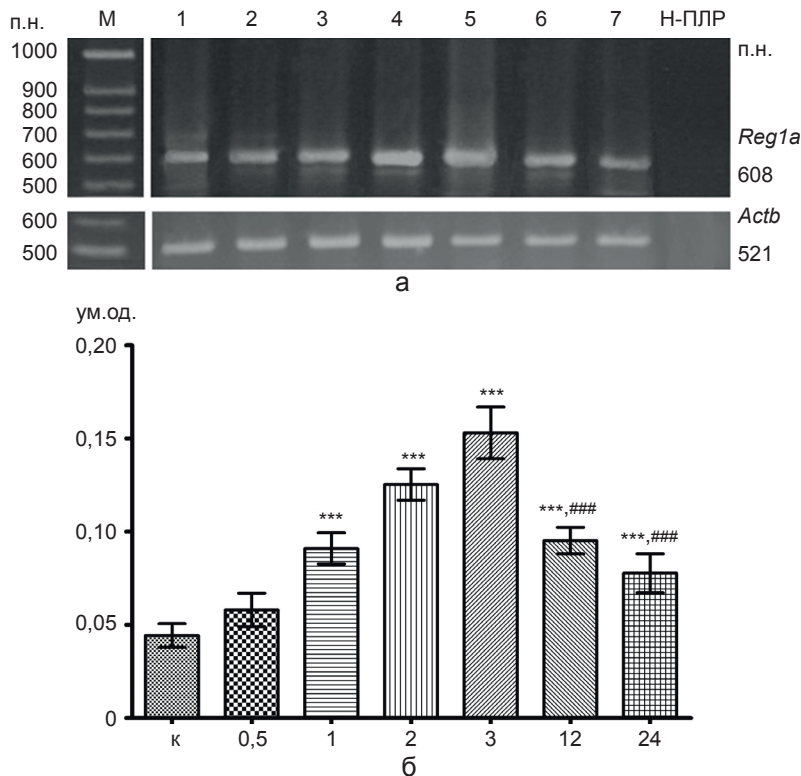


Рис. 1. Рівень експресії мРНК гена *Reg1a* за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка: а – електрофореграма розділення продуктів зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції, б – гістограма відносного рівня експресії, М – маркер молекулярної маси; 1 – контроль; 2 – 5 днів стресу впродовж 0,5; 1; 2 і 3 год відповідно; 6, 7 – 12 і 24 год після припинення дії стресора відповідно; *** $P \leq 0,001$ порівняно з контролем; ### $P \leq 0,001$ порівняно з групою тварин, що піддавалися 3-годинній дії стресора

білізаційному водно-імерсійному стресі в СОШ щурів зростає як кількість клітин, які експресують цей ген, так і власне рівень експресії *Regla*, особливо в ділянках виразкового ураження [7, 9]. Після припинення дії стресора зменшувався ступінь ураження СОШ, що супроводжувалося різким зниженням рівня експресії гена *Regla*. Наші результати підтверджують важливу роль *Regla* під час загоювання гострих уражень СОШ щурів, спричинених водно-імерсійним стресом, як і у разі виразкоутворення, індукованого введенням оцтової кислоти чи індометацину [9, 10]. Деякі автори відмічають [8-10], що саме гастрин опосередковує експресію *Regla* в ЕХП-клітинах слизової шлунка, що, у свою чергу, може свідчити про ключову роль гена *Gast* в її активації за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень СОШ.

Нами було виявлено, що в зразках СОШ

контрольної групи щурів рівень експресії гена *Gast* становив - $0,051 \pm 0,0054$ ум. од. відносно *Actb*, а за умов розвитку стресіндукованих уражень - підвищення в 2,8 раза через 0,5 год впливу ($P \leq 0,001$). Надалі при розвитку стресу, як і при загоюванні уражень, було зафіксовано поступове зниження цього показника з поверненням до контрольних значень, починаючи з 3-ї години (див. рис. 2.).

Отже, рівень експресії зазначеного гена тимчасово зростає на початку впливу пошкоджувального фактора й поступово наближався до свого базального рівня на 3-й годині іммобілізаційного водно-імерсійного стресу. Також у нашому дослідженні не було виявлено кореляційного взаємозв'язку рівнів експресії генів *Regla* та *Gast* ($r = -0,2, P = 0,70$).

Хоча *Regla* переважно експресується в ЕХП-клітинах, які мають рецептор до гастрину, нами, як і в інших працях (зокрема

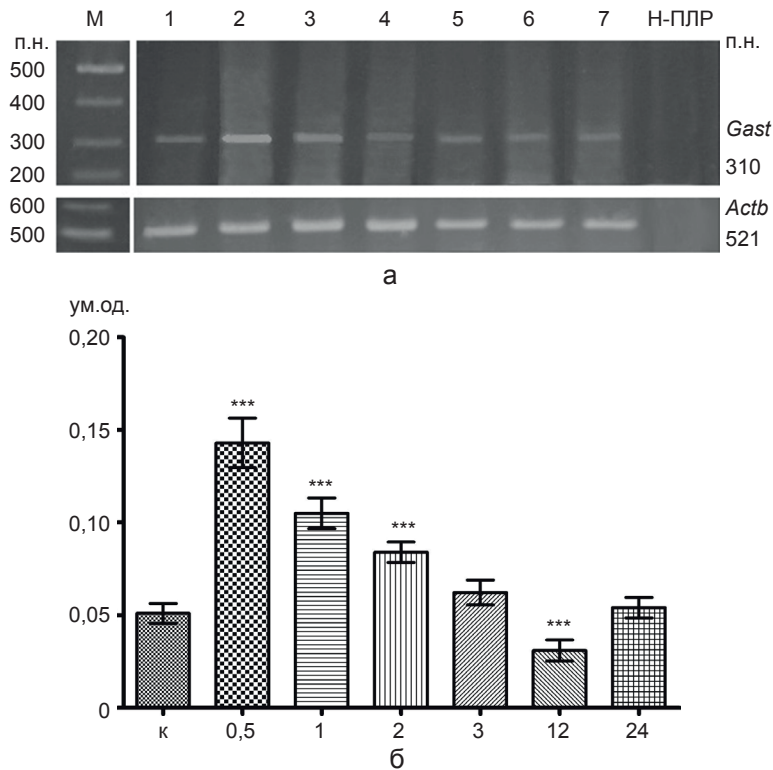


Рис. 2. Рівень експресії мРНК гена *Gast* за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка: а – електрофореграма розділення продуктів зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції, б – гістограма відносного рівня експресії, М – маркер молекулярної маси; 1 – контроль; 2 – 5 днів стресу впродовж 0,5; 1; 2 і 3 год відповідно; 6, 7 – 12 і 24 год після припинення дії стресора відповідно; *** $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

при аналізі вмісту гастрину в сироватці крові та використанні селективних антагоністів гастринового рецептора), не було показано суттєвого впливу гастрину на рівень експресії цього гена при розвитку та загоєнні стресіндукованих уражень СОШ [9, 10]. Таким чином, одержані нами результати також не підтверджують, що саме гастрин є одним із головних стимуляторів експресії *Reg1a* за умов водно-імерсійного стресу.

Відомо, що підвищення рівня як експресії гена *Reg1a*, так і синтезу *Reg1a* не завжди є наслідком впливу пошкоджувальних агентів у шлунку або асоційовані з розвитком різних патологічних станів, зокрема канцерогенезом [10]. Через це здається ймовірним участь інших стимуляторів експресії *Reg1a* в слизовій шлунку, потрібних або для активації загоєння уражень, або для загострення патологічних процесів [10, 13]. Зокрема на рівень експресії гена *Reg1a* під час пошкодження та загоєння

СОШ впливають різні цитокіни [5, 6, 10, 23].

Дослідження характеру експресії гена *Tgfb1* показало, що рівень його мРНК в контрольній групі становив $0,068 \pm 0,0067$ ум. од. відносно *Actb*. Нами було виявлено достовірне підвищення експресії *Tgfb1* при збільшенні тривалості впливу стресового фактора: в 2,1 та майже 3 рази (1 і 3 год відповідно) порівняно з контролем ($P \leq 0,001$). Максимальне значення було зафіксовано вже через 2 год (збільшення в 3,4 раза; $P \leq 0,001$). Під час регенерації нейродистрофічних уражень СОШ рівень мРНК гена *Tgfb1* різко знижувався та сягав контрольних значень через 12 год після припинення дії стресора (див. рис. 3.).

Різними авторами показано зростання експресії генів, що кодують наступні цитокіни: CINC-2 β (ген *Cxcl3*), ІЛ-1b, ІЛ-6, TNF-a, EGF, HGF (фактор росту гепатоцитів, ген *Hgf*) тощо за умов іммобілізаційного водно-імер-

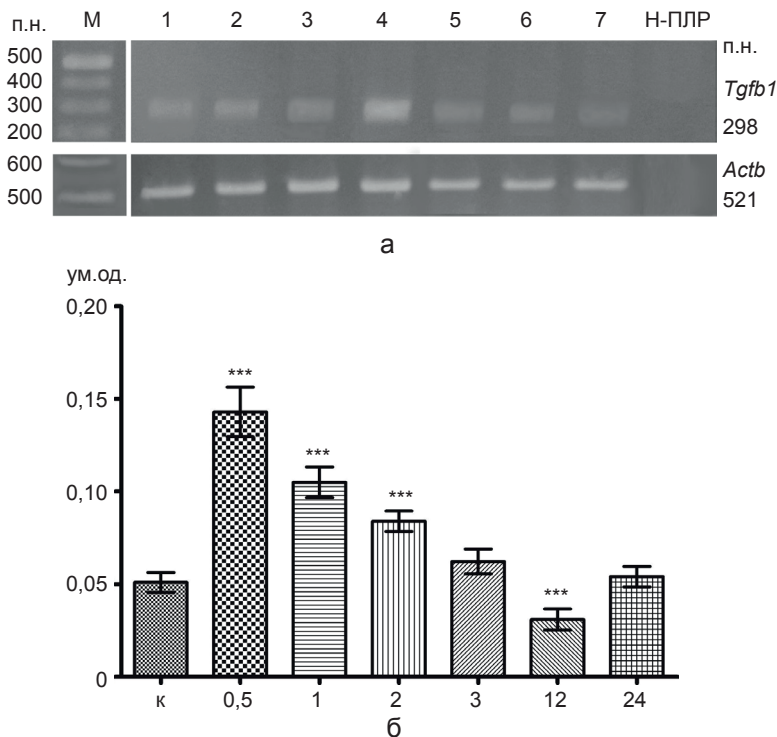


Рис. 3. Рівень експресії мРНК гена *Tgfb1* за умов розвитку та загоєння стрес-індукованих уражень слизової оболонки шлунка: а – електрофореграма розділення продуктів зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції, б – гістограма відносного рівня експресії, М – маркер молекулярної маси; 1 – контроль; 2 – 5 дія стресу впродовж 0,5; 1; 2 і 3 год відповідно; 6, 7 – 12 і 24 год після припинення дії стресора відповідно; *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$ порівняно з контролем

сійного стресу [5, 6, 9, 23]. Зокрема при інкубації ЕХП-клітин із зазначеними цитокинами виявлено їх різну здатність до стимуляції експресії *Regla* [9, 10]. Окрім того, інгібування їх дії за допомогою нейтралізуючих антитіл призводило до гальмування процесу загоювання виразок у шлунку [9, 10, 23].

У нашому дослідженні зростання рівня експресії *Tgfb1* передувало збільшенню експресії гена *Regla* за умов іммобілізаційного водно-імерсійного стресу. Отримані нами результати можна зіставити з даними літератури, де продемонстровано підвищення експресії *Cxcl3*, яке передувало збільшенню рівня експресії *Regla* за стресових умов [9, 10].

Як видно з рис. 4, у проведеному нами дослідженні було виявлено сильну позитивну кореляцію між експресією генів *Regla* та *Tgfb1* ($r = 0,8$, $P = 0,038$) у динаміці розвитку та загоєння стресіндукованих уражень шлунка. Виходячи з одержаних результатів, ми припускаємо, що підвищення експресії гена *Tgfb1* за умов розвитку стресіндукованих уражень СОШ може додатково стимулювати зростання рівня експресії *Regla* та прискорювати загоювання виразкових уражень внаслідок регулювання клітинного поділу й диференціації та інгібування запалення [9,

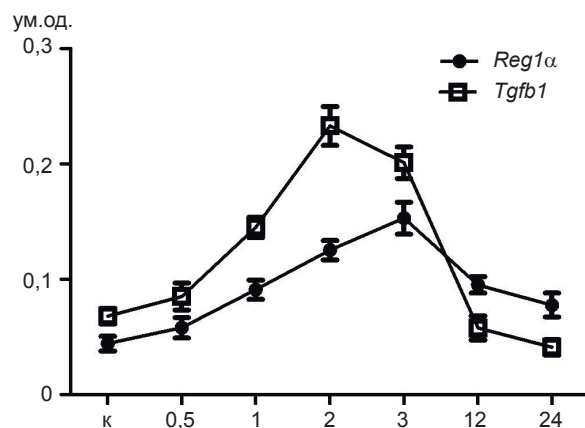


Рис. 4. Кореляційні зв'язки між експресією генів *Regla* та *Tgfb1* за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка: 1 – контроль; 2 – 5 дія стресу впродовж 0,5; 1; 2 і 3 год відповідно; 6, 7 – 12 і 24 год після припинення дії стресора відповідно

10]. Отримані нами результати узгоджуються з даними, де було показано збільшення синтезу в слизовій шлунка TGF- β , рецепторів до нього (TGF- β receptor II, TGF- β receptor I (ALK5)) і експресії відповідних генів за умов розвитку уражень СОШ [12, 14, 23]. Хоча ген *Tgfb1*, з одного боку, є потужним онкосупресором у нормальних клітинах, а з іншого – онкопротомом у малігнізованих клітинах [13]. А розвиток пухлин часто асоційований із втратою чутливості до гальмівного ефекту TGF- β_1 або із надмірною експресією цього фактора. Нещодавно було продемонстровано, що зменшення активних форм TGF- β_1 призводить до посилення запалення, подальшого продукування медіаторів запалення, зростання експресії гена *Hgf*, а також посилення проліферації епітеліальних клітин аденокарциноми шлунка [13].

Звичайно на процес загоювання стресіндукованих уражень СОШ та стимулювання експресії *Regla* можуть впливати різні трофічні фактори і TGF- β_1 лише один із них [10, 13]. Проте ми робимо припущення про можливий вплив цитокіна TGF- β_1 (на відміну від гастрину) на зростання рівня експресії *Regla* та його додатковий внесок у загоювання деструктивних уражень СОШ за умов стресу. Проте остаточне підтвердження або спростування цього припущення потребує проведення подальших досліджень із застосуванням селективних антагоністів гастринного рецептора та аналізу прямого впливу цитокіна TGF- β_1 на експресію гена *Regla* в культурі ЕХП-клітин.

Таким чином, нами показано, що за умов розвитку стресіндукованих уражень СОШ щурів на фоні інтенсифікації процесів пероксидації ліпідів і зміни каталазної активності зростає експресія гена *Regla*, у той час як після припинення дії стресора спостерігається її зменшення. Аналіз експресії гена *Gast* за тих самих умов не підтвердив, що саме гастрин є одним з головних стимуляторів експресії гена *Regla* в слизовій шлунка. У динаміці розвитку та загоєння стресіндукованих

уражень шлунка виявлено позитивну кореляцію між експресією генів *Reg1a* та *Tgfb1*, що може свідчити про залучення останнього до прискорення загоєння уражень.

**А.С. Драницина, А.А. Моргаєнко,
Д.Н. Гребиньк, Л.И. Остапченко**

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *REG1A*, *GAST* И *TGFβ1* В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ И ЗАЖИВЛЕНИЯ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС

В работе исследовано экспрессию гена *Reg1a* в слизистой оболочке желудка крыс в условиях развития и заживления стрессиндуцированных повреждений. Повышение было зафиксировано после 1-часового воздействия повреждающего фактора – в 2,1 раза, а максимальный уровень экспрессии отмечали после 3 ч стрессового воздействия – в 3,5 раза, при этом указанные изменения происходили на фоне интенсификации процессов ПОЛ и нарушения функционирования антиоксидантной системы. Через 12 и 24 ч после прекращения действия стрессора наблюдалось резкое снижение уровня экспрессии гена *Reg1a*: в 1,6 и 2 раза соответственно. Анализ экспрессии гена *Gast* не подтвердил, что именно гастрин является одним из главных стимуляторов экспрессии *Reg1a* в слизистой желудка в условиях водно-иммерсионного стресса. В динамике развития и заживления стресс-индуцированных поражений желудка выявлена положительная корреляция между экспрессией генов *Reg1a* и *Tgfb1*, что может свидетельствовать о вовлечении гена *Tgfb1* к ускорению заживления повреждений.

Ключевые слова: стресс; язвенные повреждения желудка; заживление; экспрессия генов; *Reg1a*; *Gast*; *Tgfb1*.

**A.S. Dranitsina, O.O. Morgaienko, D.M. Grebinyk
L.I. Ostapchenko**

EXPRESSION OF *REG1A*, *GAST* AND *TGFβ1* GENES IN CONDITIONS OF STRESS-INDUCED GASTRIC MUCOUS LESIONS DEVELOPMENT AND HEALING IN RATS

Analysis of *Reg1a* gene expression in rat gastric mucosa under development and healing of stress-induced lesions was carried out. Increased expression of *Reg1a* was observed after 1 hour of stressor impact - 2,1 times, and achieved the maximum level expression after 3 hours of stress exposure - 3,5 times, that occurred on the background of lipid peroxidation intensification and antioxidant system dysfunction. The sharp decrease in 1,6 and 2 times of *Reg1a* gene expression was shown in 12 and 24 hours respectively after termination of the stressor action. Analysis of *Gast* gene expression did not confirm that gastrin stimulated *Reg1a* expression in gastric

mucosa under water immersion restraint stress. The positive correlation between *Reg1a* and *Tgfb1* genes expression was determined in the dynamics of stress-induced gastric lesions' development and healing, which may indicate the involvement of *Tgfb1* to acceleration of lesion's healing.

Key words: stress-induced lesions; gastric mucosa; healing; gene expression; *Reg1a*; *Gast*; *Tgfb1*.

*Educational and Scientific Center «Institute of Biology»,
Taras Shevchenko National University of Kyiv*

REFERENCES

1. Singh LP, Mishra A, Saha D, Swarnakar S. Doxycycline blocks gastric ulcer by regulating matrix metalloproteinase-2 activity and oxidative stress. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(28):3310-21.
2. Yeomans ND. The ulcer sleuths: The search for the cause of peptic ulcers. *Gastroenterol. Hepatol*. 2011; 26(1):35–41.
3. Dvorshchenko KO, Bernyk OO, Dranitsina AS, Senin SA, Ostapchenko LI. Influence of oxidative stress on the level of genes expression *TGFβ1* and *HGF* in rat liver upon long-term gastric hypochlorhydria and administration of multiprobiotic Symbiter. *Ukr Biochem J*. 2013; 85(5):114-23. [Ukrainian].
4. Peterson KM, Xiaoti Guo, Elkahoul AG., Mondal D., Bardhan PK., Sugawara A, Duggal P, Haque R, Petri Jr. WA. The expression of *REG 1A* and *REG 1B* is increased during acute amebic colitis. *Parasitol Int*. 2011; 60(3):296–300.
5. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Nanakin A, Kanda N, Uenoyama Y, Sawabu T, Hisatsune H, Kusaka T, Ueno S, Nakase H, Seno H, Fujimori T, Chiba T. Possible role of *REG 1a* protein in ulcerative colitis and colitic cancer. *Gut*. 2005; 54:1437–44.
6. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Chiba T, Fujimori T. *REG 1a* protein mediates an anti-apoptotic effect of *STAT3* signaling in gastric cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008; 29(1):76–83.
7. Asahara M, Mushiaki S, Shimada S, Fukui H, Kinoshita Y, Kawanami C, Watanabe T, Tanaka S, Ichikawa A, Uchiyama Y, Narushima Y, Takasawa S, Okamoto H, Tohyama M, Chiba T. *Reg* gene expression is increased in rat gastric enterochromaffin-like cells following water immersion stress. *Gastroenterology*. 1996; 111:45-55.
8. Fukui H, Franceschi F, Penland RL, Sakai T, Sepulveda AR, Fujimori T, Terano A, Chiba T, Genta RM. Effects of *Helicobacter pylori* infection on the link between regenerating gene expression and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Lab Invest*. 2003; 83(12):1777-86.
9. Kazumori H, Ishihara S, Hoshino E, Kawashima K, Nobuyuki M, Suetsugu H, Sato H, Adachi K, Fukuda R, Watanabe M, Takasawa S, Okamoto H, Fukui H, Chiba T, Kinoshita Y. Neutrophil chemoattractant 2b regulates expression of the *Reg* gene in injured gastric mucosa in rats. *Gastroenterology*. 2000; 119:1610–22.
10. Yoshino N, Ishihara S, Rumi MAK, Ortega-Cava CF, Yuki

- T, Kazumori H, Takazawa S, Okamoto H, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Interleukin-8 regulates expression of Reg protein in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *American Journal of Gastroenterology*. 2005; 100:2157–66.
11. Ernst H, Konturek P, Hahn EG, Brzozowski T, Konturek SJ. Acceleration of wound healing in gastric ulcers by local injection of neutralising antibody to transforming growth factor β 1. *Gut*. 1996; 39:172–5.
 12. Kim Seok-Hyung, Lee Seung-Hyun, Choi Yoon-La, Wang Li-Hui, Park CK, Shin YK. Extensive alteration in the expression profiles of TGFB pathway signaling components and TP53 is observed along the gastric dysplasia-carcinoma sequence. *Histol Histopathol*. 2008; 23:1439–52.
 13. Ota M, Horiguchi M, Fang V, Shibahara K, Kadota K, Loomis C, Cammer M, Rifkin DB. Genetic suppression of inflammation blocks the tumor-promoting effects of TGF- β in gastric tissue. *Cancer research*. 2014; 74(9):1–9.
 14. Shih Shou-Chuan, Tseng Kwang-Wen, Lin Shee-Chan, Kao Chin-Roa, Chou Sun-Yen, Wang Horng-Yuan, Chang Wen-Hsiung, Chu Cheng-Hsin, Wang Tsang-En, Chien Chung-Liang. Expression patterns of transforming growth factor-beta and its receptors in gastric mucosa of patients with refractory gastric ulcer. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(1):136-41.
 15. Takagi K, Okabe S. The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. *Jpn. J Pharmacol*. 1968; 18:9-18.
 16. Stalnaya ID, Garishvili TG Method for determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. *Modern methods in biochemistry. Medicine*. 1977; 66–68. [Russian].
 17. Koroliuk M, Ivanova L, Mayorova I, Tokarev V. Method of katalase activity determination. *Lab delo*. 1988; 1:16–9. [Russian].
 18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265–75.
 19. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156–9.
 20. Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4th ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
 21. Konturek PC., Brzozowski T, Pierzchalski P, Kwiecien S, Pajdo R, Hahn EG, Konturek SJ. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998; 12:767-77.
 22. Cohen J, editor. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd ed., Routledge; 1988.
 23. Milani S, Calabrò A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microscopy Research and Technique*. 2001; 53(5):360–71.

Матеріал надійшов до редакції 13.08.2015

Стабілографічні показники у людини в позиціях нахилів тіла вперед і назад

¹В.В. Гаркавенко, ¹О.В. Колосова, ²В.Д. Максимова

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ; ²Національний університет фізичного виховання та спорту України, Київ; e-mail: olena_kolos@ukr.net

В групі з 15 обстежуваних з використанням стабілографічної методики порівнювали постурологічні характеристики у трьох позах: пряма вертикальна стійка, поза нахилу тіла вперед та поза нахилу назад. Досліджували зміни положення центру тиску стоп (ЦТС) на горизонтальній площині опори та спектральні характеристики постуральних коливань у сагітальній та фронтальній площинах (У- та Х-коливань). Тести проводили при відкритих і закритих очах. Спектральна потужність коливань суттєво залежала від пози, а саме збільшувалася при нахилах. У всіх трьох позах блокування зорового входу призводило до збільшення спектральної потужності як У-, так і Х-коливань у декількох частотних діапазонах. Показана суттєва залежність від зорового контролю і для середнього значення ЦТС при нахилі назад. Порівняльний аналіз спектральних характеристик постуральних фронтальних та сагітальних коливань при відкритих і закритих очах вказує на істотну взаємодію пропріоцептивної та зорової аферентації у разі утримання рівноваги за умов нахилів тіла відносно прямої вертикальної стійки.

Ключові слова: стабілографія; спектральна потужність; пряма вертикальна стійка; пози нахилів тіла вперед і назад; сагітальні коливання; фронтальні коливання.

ВСТУП

В останні роки стабілометрія досить успішно використовується як метод дослідження механізмів постурального контролю, диференційної діагностики при вирішенні медико-біологічних завдань та контролю за реабілітаційними та тренувальними процесами [1-5]. Дослідження найчастіше проводяться в умовах прямої вертикальної стійки, яку в стабілографії звичайно позначають терміном «основна стійка». Тіло людини, що стоїть, виконує коливальні рухи, інколи непомітні, в різних площинах. Підтримання рівноваги, тобто балансу тіла при стоянні – активний динамічний процес, в якому беруть участь різні функціональні системи організму, насамперед опорно-рухова та нервова (центральна та периферична), а також задіяні органи чуття – пропріоцептивний, зоровий та частково вестибулярний апарат. Характеристики коливань (амплітуда, частота, напрямок) є чутливими

параметрами, що відображають стан різних систем, які беруть участь у підтриманні балансу тіла.

Підвищення інформативності стабілографічної методики може бути досягнуто в результаті порівняльного аналізу постуральних характеристик, отриманих при різних модифікаціях пози стояння, а також із застосуванням додаткових методів обробки результатів, насамперед спектрального аналізу постуральних коливань [6-13].

Мета нашої роботи – дослідження особливостей постуральних коливань людини, а також взаємодії зорової та пропріоцептивної аферентації при утриманні рівноваги за умов нахилів тіла відносно прямої вертикальної стійки.

МЕТОДИКА

Дослідження було проведено за участю 15 обстежуваних обох статей (5 жінок, 9

чоловіків) віком від 19 до 58 років (середній вік 36 років), без неврологічних захворювань в анамнезі і ознак неврологічної патології на момент обстеження. Всі учасники були ознайомлені з процедурою тестів і дали інформовану згоду.

Зміни положення центру тиску стоп (ЦТС) в ортогональній системі координат реєстрували за допомогою стабілографічної силової платформи, забезпеченої чотирма датчиками. Під час тестування обстежувані знаходилися без взуття на горизонтальній площині платформи. Проводили реєстрації в трьох позиціях - основній стійці, позі нахилу тіла вперед і позі нахилу назад (НВ і НН відповідно).

Під основною стійкою мали на увазі вертикальну позу стояння з випрямленим тулубом і випрямленими у суглобах ногами (в межах зручності для обстежуваного). Голову тримали рівно, прямо, погляд спрямований уперед, руки вільно звисають по боках тулуба. Що стосується розташування ступнів, то використовували один із традиційних варіантів, відомий як американський, а саме: вони розташовувалися паралельно одна одній, симетрично відносно центральної поздовжньої осі платформи [11]. Відстань між осями ступнів була 18 см.

Інструкція для обстежуваних передбачала виконання нахилів до рівнів, що будуть сприйматися як граничні щодо зберігання стійкості за умов випрямленого стану основної осі тіла - «голова - тулуб - ноги». Слідкували, щоб нахили супроводжувалися змінами кутів насамперед у гомілковостопних, а не у колінних та кульшових суглобах, в яких вони були мінімальними.

Вимірювали різницю кутів між положенням осі гомілки у основній стійці і при нахилах. За умов нахилів вперед різниця знаходилася в межах 5-8°, а при нахилах назад -3-6°. Слід відмітити, що показники варіювали протягом дотримання тестової позиції як для одного й того ж, так і для різних обстежуваних.

У кожній з позицій реєстрацію проводили спочатку при відкритих, а потім при закритих очах. З кожним обстежуваним виконували 6 реєстрацій в різних умовах: основна стійка, очі відкриті; основна стійка, очі закриті; нахил вперед, очі відкриті; нахил вперед, очі закриті; нахил назад, очі відкриті; нахил назад, очі закриті. Тривалість реєстрацій в кожній з проб становила 20 с. Вважали, що в такому досить короткому інтервалі часу стан рівноваги обстежуваних можна розглядати як відносно стаціонарний.

Реєстрацію і аналіз сигналів від датчиків платформи проводили на комп'ютері за допомогою плати введення-виведення NI 6070E («National Instruments», США) і програм, написаних мовою *LabView*. Частота дискретизації сигналів становила 100 с⁻¹. Перед введенням сигнали піддавали аналоговій фільтрації зі смугою пропускання 0,5-200 Гц. Реєстрували траєкторії переміщення ЦТС (статокінезіограми): на їх основі розраховували середні значення координат ЦТС для кожної з проб.

Спектральний аналіз виконували за допомогою програмного пакета «Mathcad 2001 Professional». Отримували спектральні характеристики зміни положення ЦТС у сагітальній та фронтальній площинах (Y- і X-коливань, відповідно). Значення спектральної потужності коливань (квадратні міліметри) розраховували для 6 частотних діапазонів: 0-0,2; 0,2-0,5; 0,5-1,0; 1,0-2,0; 2,0-3,0; 3,0-6,0 Гц. Для оцінки статистичної значимості міжгрупових відмінностей для різних пар показників використовували критерій t Стьюдента для парних вибірок.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що під час нахилів вперед та назад у всіх обстежуваних відбуваються відповідні переміщення ЦТС на опорній поверхні відносно його положення при основній стійці. При закритих очах у всіх пробах розмах коливань, як правило, пере-

вищував такий за умов відкритих очей (рис.1).

Порівнювали положення ЦТС в основній стійці та у позі нахилу і розраховували середні значення X- та Y-координат відхилень у позиціях НВ та НН відносно основної стійки (рис.2). Значення сагітального відхилення у позиції НВ становило $56,1 \pm 3,9$ мм при відкритих очах, а при закритих очах - $55,5 \pm 3,8$ мм. У позиції НН за умов візуального контролю сагітальне відхилення ЦТС було $-48,5 \pm 2,7$ мм, а при закритих очах суттєво меншим, $-42,3 \pm 2,4$ мм; $P < 0,01$. Фронтальне відхилення не залежало від пози та стану зорового контролю. У частини обстежуваних ЦТС був зміщений дещо праворуч, у інших - ліворуч від центральної поздовжньої осі платформи. Так, наприклад, на статокінезіограмі одного з обстежуваних (див. рис.1) можна бачити, що у всіх позах ЦТС був зміщений

праворуч, особливо при нахилах назад.

Результати аналізу спектрів постуральних коливань у сагітальній та фронтальній площинах підтверджують спостереження багатьох дослідників про переважання в спектрах порівняно низьких частот і зниження потужності у діапазонах з більшою частотою [3, 11]. Такий тип профілю стабілографічних спектрів виявився характерним і для основної стійки, і при нахилах.

Блокування зорового входу призводило до збільшення потужності в різних діапазонах спектра постуральних коливань. Подібні дані за умов закритих очей отримані також в інших дослідженнях вертикальної стійки та її модифікацій [7-9, 14].

При відкритих очах спектральна потужність X-коливань в умовах нахилів перевищувала таку в аналогічних діапазонах коливань в основній стійці. Для НВ таке переви-

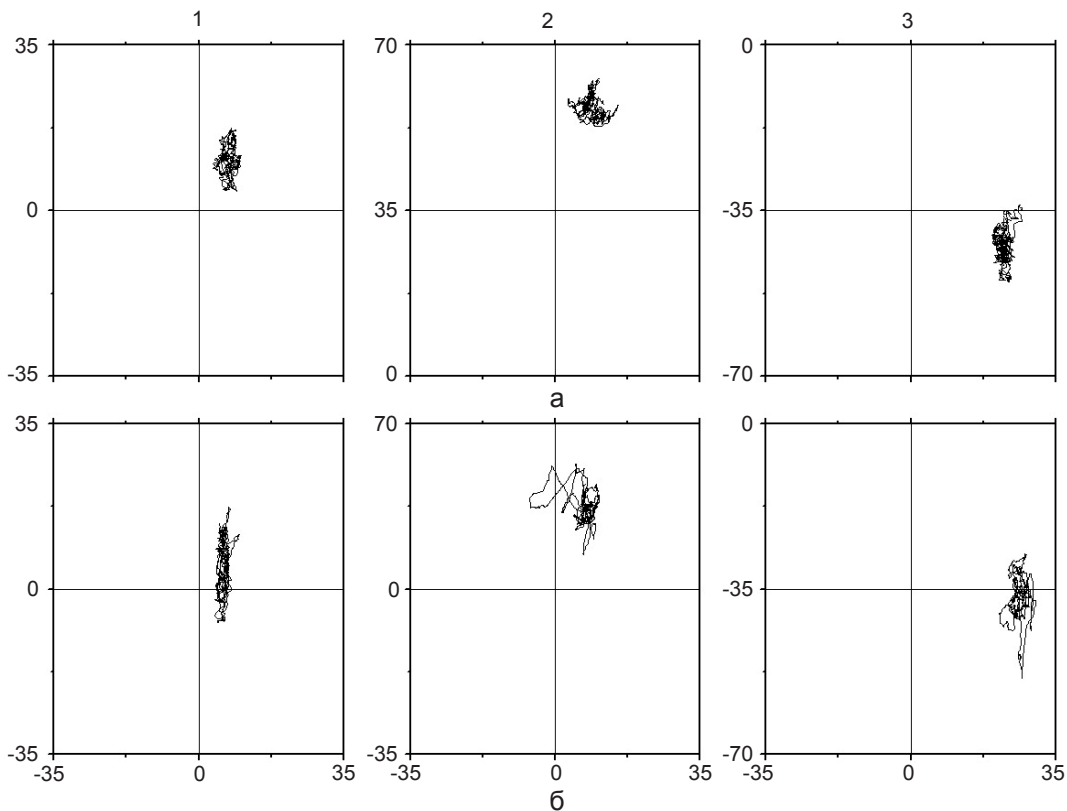


Рис.1. Траєкторії переміщення центру тиску стоп (статокінезіограми), зареєстровані під час дослідження одного з обстежуваних при відкритих (а) і закритих (б) очах: 1 – основна стійка, 2 – нахил вперед, 3 – нахил назад

щення спостерігалось в 4 (0-0,2; 0,2-0,5; 0,5-1,0; 2,0-3,0 Гц), а для НН в 5 з 6 (за винятком 0,2-0,5 Гц) діапазонів спектра. Потужності сагітальних коливань при нахилах вперед і назад за умов відкритих очей також перевищували величини для основної стійки в 5 (за винятком 0-0,2 Гц) і 4 (0,5-1,0; 1,0-2,0; 2,0-3,0; 3,0-6,0 Гц) діапазонах. При закритих очах спектральна потужність бічних коливань при нахилах також була більшою щодо показників для основної стійки, при нахилах вперед – істотно для 3 діапазонів (0-0,2; 0,2-0,5; 1,0-2,0), тоді як при нахилах назад - у всіх 6 діапазонах. Для сагітальних коливань при закритих очах за умов НВ перевищення спектральної потужності щодо основної стійки спостерігалось у 2 діапазонах (2,0-3,0; 3,0-6,0 Гц), а при НН – в 5 з 6 (за винятком 0-0,2 Гц). Певні відмінності виявлені і

між значеннями потужності коливань при НВ і НН. За умов відкритих очей при НН потужність Х-коливань була більшою, ніж при НВ, в діапазоні 3,0-6,0 Гц. Однак в умовах закритих очей вона при НВ була більшою, ніж при НН, у діапазоні 0-0,2 Гц. Порівняння між НВ і НН за потужністю У-коливань показало її більш високі значення при НН: в діапазоні 0,2-0,5 Гц при відкритих очах і в діапазоні 0,5-1,0 Гц при закритих. Таким чином, при порівнянні позицій нахилів і основної стійки було показано, що спектральна потужність як У-, так і Х-коливань у декількох частотних діапазонах у разі нахилів була істотно більшою, ніж в основній стійці, а різниця залежала від наявності зорового контролю.

Обчислювали різницю між значеннями потужності коливань в позі нахилу (в обох варіантах) і в основній стійці при проведенні

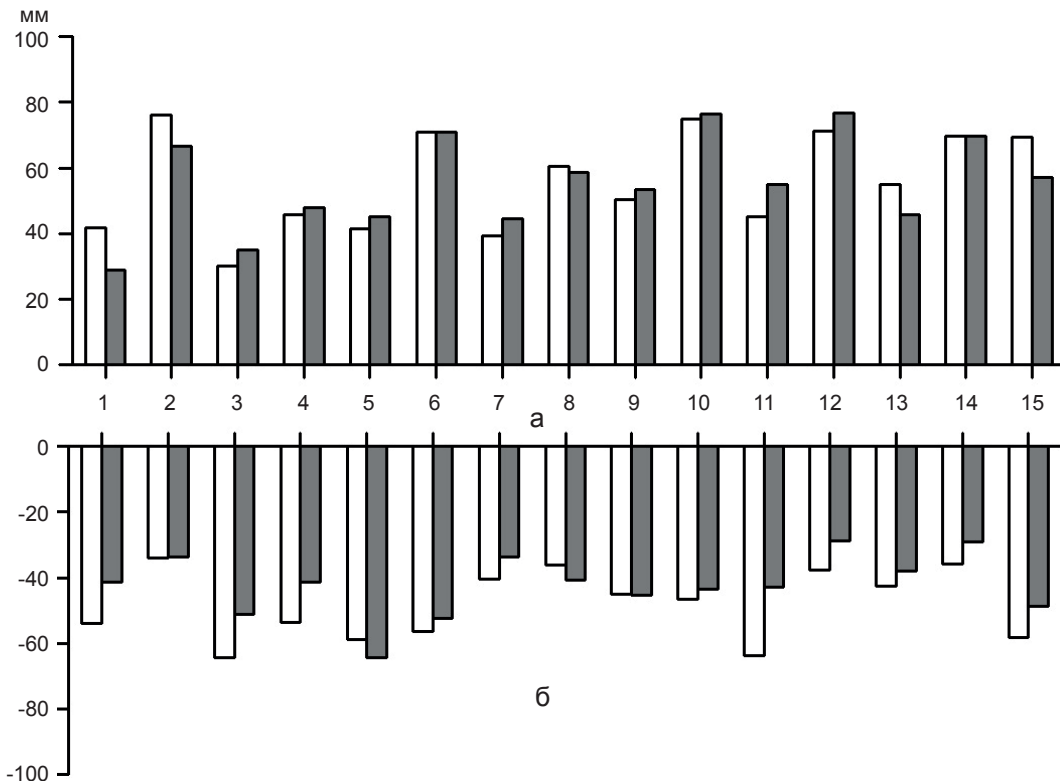


Рис.2. Зміни положення центру тиску стоп (ЦТС) при нахилах у сагітальній площині (а – нахил вперед; б – нахил назад) у різних обстежуваних за умов відкритих та закритих очей. За горизонталлю – порядкові номери обстежуваних (1–15); за вертикаллю – значення різниці між усередненими положеннями ЦТС при нахилах та в основній стійці; позитивні значення відповідають зміщенню ЦТС вперед, а негативні – назад. Світлі та темні стовпчики – значення зміщення ЦТС при відкритих та при закритих очах

тестів за умов відкритих очей і за відсутності зорового контролю. При нахилах вперед і назад різниця за умов закритих очей була більшою, ніж при відкритих очах. Для Х-коливань у разі відкритих і закритих очей відмінності були істотними при НВ у діапазонах 0-0,2 і 0,2-0,5 Гц та при НН в діапазоні 0,2-0,5 Гц, тоді як для У-коливань при НВ тільки в діапазоні 3,0-6,0 Гц, а при НН – в 5 з 6 діапазонів, за винятком самого низькочастотного (0-0,2 Гц).

Проведений також аналіз різниці потужності стабілографічних коливань в одній і тій самій позі при закритих і відкритих очах. Для Х-коливань збільшення потужності при закритих очах відносно умов відкритих очей у позиціях НВ і НН виявилось неістотним. Водночас збільшення потужності при закритих очах для У-коливань в діапазоні 0,5-1,0 Гц при нахилах назад виявилось значно більшим, ніж при НВ ($P < 0,05$).

Отримані результати дають змогу стверджувати, що фактор зорового контролю має істотний вплив на параметри постуральних коливань при обох варіантах нахилів тіла. При цьому змінюється спектральна потужність Х-коливань за умов НВ і НН у відносно низькочастотних діапазонах; водночас зміна потужності У-коливань за умов НН помітно більш виражена порівняно з НВ. Збільшення У-коливань при відсутності зорового контролю в позиції НН щодо НВ відображає більш високий рівень складності утримання пози відхилення назад, що, вочевидь, зумовлено особливостями пропріорецептивної аферентації при утриманні рівноваги. Особливості виконання нахилу назад, можливо, пов'язані з певним психологічним фактором, а саме, більш високим рівнем відчуття суб'єктивної безпеки в ситуації нахилів вперед [15, 16], навіть в умовах страхування. Можливо, саме цим фактором значною мірою спричинено зменшення зміщення ЦТС при НН за умов закритих очей.

Нахили вперед і назад, безумовно, відрізняються системою активації пропріорецепторів

різних частин тіла і супроводжуються складною взаємодією м'язів - згиначів і розгиначів. Вважається, що в таких умовах задіяні насамперед гомілковостопні та кульшові суглоби. В наших дослідженнях при виконанні нахилів тіла ми намагалися мінімізувати зміни кутів у кульшових суглобах. В обох випадках, як при нахилах вперед і нахилах назад, протилежних за напрямком, спостерігається істотне збільшення фронтальних коливань. Аналогічне підвищення було показано раніше в дослідженнях при нахилах поверхні опори в сагітальній площині протилежної спрямованості (вперед та назад) [8].

Зміни бічних коливань у разі нахилів тіла і нахилів поверхні опори в сагітальній площині свідчать про істотну роль пропріорецепторів системи гомілковостопних суглобів у генезі фронтальних коливань при утриманні рівноваги під час стояння. Цей висновок узгоджується з іншими даними літератури [17].

Отримані результати аналізу спектральних характеристик постуральних коливань при відкритих і закритих очах вказують на істотну взаємодію пропріорецептивної та зорової аферентації при нахилах тіла відносно основної стійки.

¹В.В. Гаркавенко, ¹Е.В. Колосова,
²В.Д. Максимова

СТАБИЛОГРАФИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ЧЕЛОВЕКА В ПОЗИЦИЯХ НАКЛОНОВ ТЕЛА ВПЕРЕД И НАЗАД

В группе из 15 обследуемых с использованием стабیلграфической методики сравнивали постурологические характеристики в трех позах: прямая вертикальная стойка, наклон тела вперед и наклон назад. Исследовали изменения положения центра давления стоп (ЦДС) на горизонтальной плоскости опоры и спектральные характеристики постуральных колебаний в сагитальной и фронтальной плоскостях (У- и Х-колебаний). Тесты проводили при открытых и закрытых глазах. Спектральная мощность колебаний существенно зависела от позы, а именно, увеличивалась при наклонах. Во всех трех позах блокировка зрительного входа приводила к увеличению спектральной мощности как У-, так и Х-колебаний в нескольких частотных диапазонах. Показана существенная зависимость от зрительного контроля и для среднего

значения ЦДС при наклоне назад. Сравнительный анализ спектральных характеристик постуральных фронтальных и сагиттальных колебаний при открытых и закрытых глазах указывает на существенное взаимодействие проприоцептивной и зрительной афферентации при удержании равновесия в условиях наклонов тела относительно прямой вертикальной стойки.

Ключевые слова: стабилосография; спектральная мощность; прямая вертикальная стойка; позы наклонов тела вперед и назад; сагиттальные колебания; фронтальные колебания.

V.V. Garkavenko¹, E.V. Kolosova¹, V.D. Maksimova²

STABILOMETRIC VALUES OF HUMANS UNDER THE CONDITIONS OF FORWARD AND BACKWARD BENT POSITIONS

Using stabilometry study the center of pressure (COP) displacement over the horizontal surface and power spectrum characteristics of postural sway in the sagittal and frontal planes (Y and X- oscillations, respectively) during an upright stance (US) and under the conditions of body bents forward and backward (BF and BB, respectively) were investigated in a group of 15 volunteers. The tests were performed under the conditions of opened and closed eyes. It was demonstrated that the power spectrum of sway depended on posture, it was greater under the conditions of body bents than during the upright stance. In all three positions blocking of optical input resulted in an increase in power spectrum as well of Y- and X-oscillations in a number of frequency bands of body sway. A significant dependence on the visual control for the mean value of COP under the conditions of bents backward was also found. Data on changes in the lateral oscillations under the conditions of body bents in the sagittal plane showed the essential role of ankle proprioceptors in the genesis of the lateral oscillations at keeping balance during standing. The comparative analysis of power spectrum characteristics of postural sway in the sagittal and frontal planes under the conditions of opened and closed eyes indicated a significant interaction between proprioceptive and visual afferentation at positions of body bents relative to upright stance.

Keywords: stabilometry; power spectrum; upright stance; forward and backward body bent positions; anteroposterioroscillations; medio-lateral oscillations.

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

²*National University of Physical Education and Sports of Ukraine, Kyiv*

REFERENCES

1. Nakagawa H, Ohashi N, Watanabe Y, Mizukoshi K. The contribution of proprioception to posture control in normal subjects. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1993;504:112-6.

2. Karpova EA, Ivanova-Smolenskaja IA, Chernikova LA. Clinico-stabilometric analysis of postural disorders in Parkinson's disease. *Zhurnal nevrologii i psichiatrii im. S.S.Korsakova.* 2004;104(1):37-41. [Russian].
3. Demura S, Kitabayashi T. Comparison of power spectrum characteristics of body sway during a static upright standing posture in healthy elderly people and young adults. *Percept Mot Skills.* 2006;102(2):467-76.
4. Zhang Y, Kiemel T, Jeka J. The incoherence of sensory information on two-component coordination during quiet stance. *Gait Posture.* 2006;26(2):263-71.
5. Heuvel MR, Balasubramaniam R, Daffertshofer A. Delayed visual feedback reveals distinct time scales in balance control. *Neurosci Lett.* 2009;452(1):37-41.
6. Savin AA. Relationship between stability of posture and physical performance of wrestlers during upright standing posture and in a semisquatting position. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta.* 2011;5(107):62-5. [Russian].
7. Mezzarane RA, Kohn AF. Control of upright stance over inclined surfaces. *Exp Brain Res.* 2007;180(2):377-88.
8. GarkavenkoVV, GorkovenkoAV, KolosovaEV, KorneyevVV, ShevkoAN, VasilenkoDA, Mel'nichoukAP. Modifications of the stabilogram during upright standing posture under conditions of inclines of the support surface. *Neurophysiology.* 2012;44(2):131-7.
9. Garkavenko VV, Kolosova YeV, Mel'nichouk AP, Vasilenko DA. Stabilographic indices of humans in a semi-squatting position. *Neurophysiology.* 2013;45(1):49-59.
10. Cimmerman GS. *Ear and brain.* Moscow: Medicina; 1967. [Russian].
11. Skvortcov DV. *Stabilometric research: a brief guide.* Moscow: Maska;2010. [Russian].
12. Boloban VN, Mistulova TE. *Stabilography: achievements and prospects.* Nauka v olimpijskom sporte. Special issue of Physical Culture Research Institute. 2000:5-13. [Russian].
13. Ivonina NA, Shmidt IR. Stabilometry in the diagnosis of various forms of disequilibrium. In: *Modern aspects of electroneurostimulation and new technologies in neurosurgery and neurology. Proceedings of the Russian scientific-practical conference.* Saratov; 1998. p. 103-5. [Russian].
14. Javorskij AB, Sologubov EG, Nemkova SA. Kinesthetic vertical stability characteristics of patients with cerebral palsy. *Zhurnal nevrologii i psichiatrii im S.S.Korsakova.* 2004;104(2):21-6. [Russian].
15. Gurfinkel' VS, KocJaM, ShikML. *Regulation of human posture.* Moscow: Nauka; 1965. [Russian].
16. Gurfinkel' VS, Levik JuS, Lebedev MA. The concept of body scheme and motor control. The scheme of the body in the management of postural automatisms. In: Chernavskij AV, editor. *Intelligent processes and their modelling. Spatio-temporal organization.* Moscow: Nauka; 1991. p. 24-53. [Russian].
17. Deniskina NV, Levik YS. Relative contribution of ankle and hip muscles in regulation of the human orthograde posture in a frontal plane. *Neurosci Lett.* 2001;310(2-3):165-8.

Матеріал надійшов до редакції 28.04.2015

Systemic effects of unspecific inflammatory reaction at traumatic brain injury

Sergey V. Ziablitsev, Svetlana V. Pishchulina, Svetlana V. Kolesnikova, Ruslan N. Boris

Ukrainian Science-Practical Centre of Endocrine Surgery, Transplantation of Endocrine Organs and Tissues Ministry of Healthcare of Ukraine, Kyiv, Ukraine; e-mail: zsv1965@gmail.com

To determine the role of systemic effects of inflammation at traumatic brain disease caused by severe traumatic brain injury. The study is performed on 65 white outbred male rats. TBI is applied with one blow on animal's cranial vaults with blow energy of 0.52 J. The rate of mortality within the first 5 days after the injury is 87%. Experimental animals have got severe closed TBI. Blood contents of circulating immune complexes, C-reactive protein, ceruloplasmin, proinflammatory - interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor α -TNF- α) are investigated. The circulating immune complexes levels are increased 3.1 times in 24 hours and 4.4 times on the 5th days of trauma reflecting the progressive accumulation of metabolites and toxins in brain tissue and in the blood of injured animals. Blood levels of C-reactive protein are markedly increased in all periods of observation exceeding the control levels 3.5 times in 3 hours and 21.3 times after 5th day of trauma. Thus the study results suggest that the acute phase of systemic inflammation sets at the end of the 1st day after the trauma and it progresses in the course of traumatic brain disease. Blood contents of IL-1 β increases continuously: 4.7 times in 3 hours; 7.6 times in 24 hours; and 17.4 times on the 5th day after trauma. The other interleukins levels are also increased but to a lesser extent. The coherence of changes in levels of circulating immune complexes, acute-phase proteins and interleukins indicates a pathogenic pattern of the acute period of traumatic disease at traumatic brain injury: spreading of damage processes with the involvement of body organs and tissues and the establishment of a systemic inflammatory reaction stage from the second day of posttraumatic period.

Key words: traumatic brain injury; acute phase proteins; proinflammatory interleukins.

INTRODUCTION

In recent years systemic signs of the organism's involvement in the inflammatory reaction are in increasing interest. The systemic inflammatory reaction is involved in pathogenesis of extreme and terminal conditions [1-3]. It is known that systemic effects of inflammation are mediated by different mediators including cytokines, prostaglandins, kinins, and hormones, of which proinflammatory interleukins are the most important [4-6].

Along with fever, intoxication, leukocytosis and an increased erythrocyte sedimentation rate the systemic effects of inflammation include an increase in acute phase proteins (positive acute phase reactants), of which C-reactive protein (CRP) and ceruloplasmin (CP) are most researched [3, 7, 8]. Unspecific signs of the

inflammatory reaction include increased blood levels of proinflammatory cytokines as well as a presence of circulating immune complexes (CIC) which consist of endogenous antigens formed from tissue necrosis, complement and precipitating antibody IgM, IgG₁, IgG₂ and IgG₃.

It can be assumed that traumatic brain injury (TBI) which is due to severe traumatic disease causes systemic inflammatory reaction that in turn results in multiple organ dysfunction syndrome.

METHODS

The study was performed on 65 white male rats weighing 200 ± 10 g. TBI was applied with one blow on the cranial vault by means of free-falling plummet [9]. The blow energy was 0.52 J;

© Sergey V. Ziablitsev, Svetlana V. Pishchulina, Svetlana V. Kolesnikova, Ruslan N. Boris

and the mortality within the first 5 days after the injury was 87 %. Animal experiment was carried out according to European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). The subsequent brain autopsy revealed the presence of subperiosteal, subdural, epidural and skull base hematomas, as well as foci of crushed brain tissue and dedit in the blow zone and swelling of the pituitary gland. The received data suggested that experimental animals have got severe closed TBI with skin hematomas, fractures of the cranial vault without displacement, crushing of the parietal and temporal lobes cortex, a damage of the brain in the form of diffuse petechial hemorrhages and “cladding” hematoma (in the blow zone) the frontal and temporal lobes bases (in the anti-blow zone). The control group included 15 sham-operated animals. Blood contents of CIC, CRP, CP, proinflammatory interleukins: interleukin1 β (IL-1 β), 6 (IL-6), 8 (IL-8) and tumor necrosis factor α (TNF- α) were investigated in 3, 24, 48, 72 hours and in the 5th day after trauma. The CIC and CP contents were measured photometrically using a spectrophotometer SPECORD-200 (Germany). The CRP blood levels were measured by means of ELISA kit from DRG International, Inc. (United States). The interleukins blood levels were measured using the reagents “ProCon” (Russia) with the result registration on the reader PR2100 (“Sanofi Diagnostic Pasteur”, France). The study results were processed using the method of multiple comparisons in the program of the statistical

analysis MedCalc v.15.11.0 (MedCalc Software bvba, 1993-2015).

RESULTS AND DISCUSSION

The results of investigation of the CIC and acute-phase proteins (CRP and the CP) in the blood of animals with TBI are presented in Table 1. It shows an increase in the CIC levels 1.4 times after 3 hours after trauma. More significant increase of the CIC is revealed in the course of TBI: 3.1 times in 24 hours and 4.4 times in the 5th days ($P < 0.05$ in both cases).

It is known that severe TBI causes brain tissue crushing and the blood brain barrier impairment. As a result neuronal antigens enter the bloodstream and bind antibodies activating the complement system and producing the CIC [1]. Thus an increase in the CIC can be conceded as unfavorable pathogenic factor that reflects accumulation of metabolites and toxins in brain tissue and in the blood of injured animals. The immune complexes are deposited in vessel walls causing generalized inflammation in the microcirculation vessels [6, 8]. On the other hand a marked increase in the CIC within the early period of traumatic disease can be regarded as a protective reaction designed to binding an excess of neuronal antigens. However further increase in the CIC must be interpreted as a damage reaction leading to a generalization of the inflammatory reaction.

Blood CRP content is markedly increased in all periods of observation. It scientifically

Table1. Blood contents of the circulating immune complexes (CIC) and acute-phase proteins (CRP and CP) in the course of traumatic brain injury; M \pm m

Index	Control	Time after trauma				
		3 hours	24 hours	48 hours	72 hours	5 days
CIC, units of OD	40.6 \pm 5.12	55.4 \pm 5.57	124.2 \pm 10.3*	167.3 \pm 17.8 *	170.4 \pm 16.7*	175.9 \pm 18.4*
CRP, mg/L	1.52 \pm 0.09	5.32 \pm 0.48 *	16.03 \pm 2.08*	17.55 \pm 2.46*	28.59 \pm 2.37*	32.46 \pm 2.52*
CP, mmol/L	2.34 \pm 0.26	5.47 \pm 0.46*	7.85 \pm 0.67 *	3.57 \pm 0.36	1.42 \pm 0.11	0.47 \pm 0.03 *

P < 0.05 compared with the average values of the control group

increases (3.5 times) in 3 hours after trauma. In 24 hours after trauma the CRP content increases 3 times comparing to those of the 3-hours level and this exceeds its control levels 10.5 times. The CRP content continuously increases thus exceeding its control levels 18.8 times in 72 hours and 21.3 times in the 5th day.

CRP is a major component of the acute phase of inflammation. It is actively involved in the formation of protein-ligand complexes, which are then removed by the system of mononuclear macrophages [1]. Furthermore, CRP inhibits and neutralizes toxic protease molecules. In this regard, CRP is considered the most sensitive and specific clinical and laboratory markers of acute inflammation [5].

In our opinion, such a pronounced increase in the content of CRP, as well as an increase in the content of CIC suggests that the acute phase of inflammation sets by the end of the 1st day after the trauma. Hence, the early stage of TBI can be referred to as the inflammatory stage. Further increase in CRP indicates the progression of the inflammatory response and its generalization.

In recent years CP is viewed as one of the acute phase proteins [7]. Blood CP levels changes ambiguously within the course of traumatic disease. They increase in 3 and 24 hours after trauma exceeding their control levels 2.3 and 3.3 times correspondently ($P < 0.05$ in both cases). However further the blood CP levels decrease in 72 hours and in the 5th day after trauma to 61 % and 20 % of their control levels correspondently ($P < 0.05$ in both cases).

The increase in the blood CP content at the first days after injury is associated with the stimulating effect of inflammatory mediators on its hepatic synthesis during the acute phase of inflammatory response. The subsequent decline in the blood CP content is likely due to the exhaustion of serum antioxidant enzymes to which CP belongs because of its ability to bind oxygen

free radicals and to inactivate them [7]. Second day after trauma is characterized by the development of systemic effects of inflammation thus it can be considered a turning point in the course of post-traumatic period.

On the first day after trauma inflammation can be activated by proinflammatory interleukins [4], of which IL-1 β is known as a major mediator of inflammation. It is released by macrophages, B-lymphocytes and fibroblasts. In the brain IL-1 β is formed, as well as other proinflammatory interleukins, by glial cells in the affected and in the perifocal areas [3, 6]. TNF- α is another inflammatory mediator producing by activated monocytes and macrophages in the site of injury. It is responsible for synthesis of the key nuclear transcription factor NF- κ B, which switches the spectrum of the synthesized proteins to inflammatory factors – cytokines and adhesion molecules [4, 10]. IL-6 is a interleukin of “secondary cascade” because its synthesis is activated by TNF- α and IL-1 β [5]. IL-6 stimulates B-cells for the production of antibodies. IL-6 is also responsible for the induction of acute phase inflammatory response via its stimulation of the liver to produce acute-phase proteins. IL-8 is released by activated macrophages, endothelial and epithelial cells. It is a chemotaxis factor for neutrophils, T-lymphocytes, macrophages, lymphocytes and eosinophils, thereby contributing to secondary alteration, development edema, and spreading of the damage zone [5].

The results of blood interleukins contents in the in the course of traumatic brain injury are shown in the table 2.

In our study, blood content of IL-1 β increases continuously: 4.7 times in 3 hours; 7.6 times in 24 hours; and 17.4 times in the 5th day after trauma. The content of TNF- α increases 1.8 times in 3 hours; 2.2 times in 24 hours; and 2.9 times in the 5th day after trauma ($P < 0.05$ in all cases). There is a maximal increase in the content of both IL-1 β and TNF- α on the 5th day after trauma. IL-1 β increases more

Table 2. Blood interleukins contents in the course of traumatic brain injury, M ± m

Index	Control	Time after trauma				
		3 hours	24 hours	48 hours	72 hours	5 days
IL-1 β . pkg/ml	3.28±0.25	15.42±1.48*	24.83±2.37*	49.75±5.33*	55.43±6.37*	57.22±5.61*
TNF- α . pkg/ml	29.52±3.32	52.06±4.29*	66.28±7.49*	76.58±8.7*	81.09±7.53*	86.27±8.29*
IL-6. pkg/ml	4.28±0.44	10.27±1.55*	15.86±1.63*	27.39±3.60*	30.28±3.09*	33.92±3.59*
IL-8. pkg/ml	11.23±1.28	15.39±2.48	36.94±3.57*	45.84±3.28*	42.38±4.58*	47.38±5.60*

P < 0.05 compared with the average values of the control group

than TNF- α indicating its greater involvement in the inflammatory process at traumatic disease. The content of IL-6 exceeds its control levels 2.4 times in 3 hours; 3.7 times in 24 hours and 7.9 times in the 5th day after trauma.

The content of IL-8, exceeds its control levels 1.4 times in 3 hours after trauma but it is not statistically significant (P > 0.05). Significant increase in IL-8 content occurs only after 24 hours – by 3.3 times; and in the 5th day it exceeds the control 4.2 times.

Assessment of the interleukins blood content dynamics one can note the succession of cytokines cascade (Fig. 1).

The highest increase in the blood IL-1 β levels reflects its role in pathogenesis of

inflammation at traumatic disease: IL-1 β can be regarded as major reactant of the immune system. Changes in the blood contents of IL-6 и TNF- α are similar to those of IL-1 β but their increase is less significant. In our opinion this reflects sequential activation primary and secondary mediators of inflammation at traumatic brain in TBI. Marked increase in secondary mediators in the blood in 48 hours after trauma indicates likely the formation of a new stage of the pathogenesis of inflammatory reaction. Generalization of inflammation is suggested by “cytokine storm” which is revealed in our study. Coherence of changes in the levels of interleukins, the CIC and the acute-phase proteins shows significant

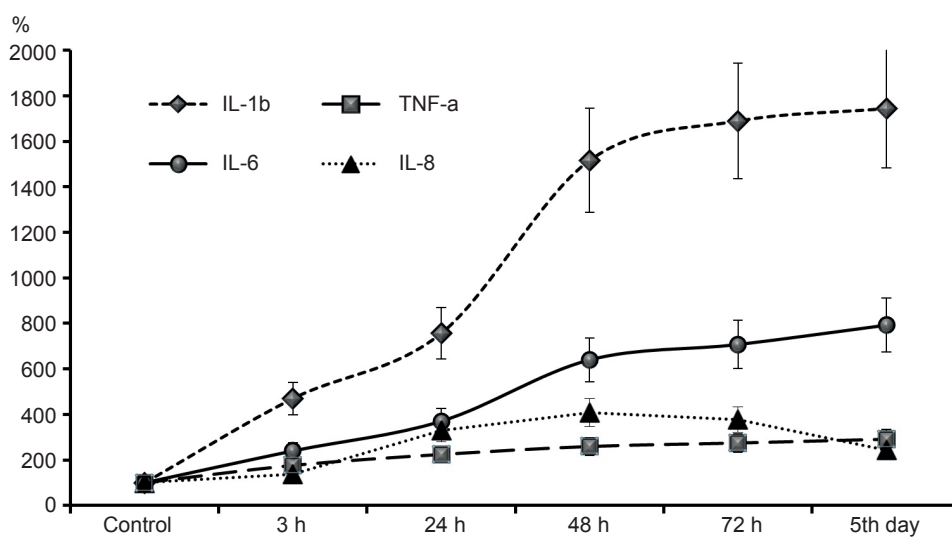


Fig. 1. Contents of proinflammatory interleukins in the course of posttraumatic period (all indexes are expressed in % of the control group levels, which are 100 %)

feature of the pathogenesis of this period of traumatic disease – the generalization of the inflammatory response involving the organs and tissues.

CONCLUSION

Thus, the study of the blood levels of CIC, CRP, CP and proinflammatory interleukins in the course of severe TBI reveals a common pattern in the reaction of pro-inflammatory cascade markers with a maximum gain on the second day of post-traumatic period, reflecting the initial activation of the inflammatory response with further its generalization.

The initial moderate increase in the blood levels of interleukins can be regarded as the response of the immune system to damage which contributes to the mobilization of the body's defenses, while the subsequent marked increase indicates the start of damage processes and set the inflammatory stage in the course of traumatic disease in TBI.

**С. В. Зяблицев, С. В. Пищулина,
С. В. Колесникова, Р. М. Борис**

СИСТЕМНІ ПРОЯВИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ ЗАПАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ ПРИ ТРАВМАТИЧНІЙ ХВОРОБИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Наведено аналіз динаміки при важкій експериментальній черепно-мозковій травмі вмісту у крові циркулюючих імунних комплексів, С-реактивного білка, церулоплазміну та прозапальних цитокінів. Виявлена загальна закономірність реакції маркерів прозапального каскаду з максимальним їх приростом на другу добу післятравматичного періоду, що відображало первинну активацію запальної реакції, а у подальшому – її генералізацію. Максимальний приріст вмісту у крові цитокінів, особливо, ІЛ-1β, в цей період вказував на прогресування процесів пошкодження та формування стадії системної запальної реакції у перебігу травматичної хвороби головного мозку.

Ключові слова: травматична хвороба головного мозку; білки гострої фази запалення; прозапальні цитокіни.

Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин Міністерства охорони здоров'я України, Київ

**С. В. Зяблицев, С. В. Пищулина,
С. В. Колесникова, Р. Н. Борис**

СИСТЕМНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Приведен анализ динамики при тяжелой экспериментальной черепно-мозговой травме содержания в крови циркулирующих иммунных комплексов, С-реактивного белка, церулоплазмينا и провоспалительных цитокинов. Выявлена общая закономерность реакции маркеров провоспалительного каскада с максимальным их приростом на вторые сутки посттравматического периода, что отражало первичную активацию воспалительной реакции, а впоследствии – ее генерализацию. Максимальный прирост содержания в крови цитокинов, особенно, ІЛ-1β, в этот период указывал на прогрессирование процессов повреждения и формирования стадии системной воспалительной реакции в течении травматической болезни головного мозга.

Ключевые слова: травматическая болезнь головного мозга; белки острой фазы воспаления; провоспалительные цитокины.

REFERENCES

1. Vologzhanin DA. The metabolic bases of secondary immune deficiency at traumatic disease [dissertation]. St. Petersburg [Russia]: Kirov War-Med. Academy; 2005. [Russian].
2. Jelsky VN, Ziablitsev SV, Pishchulina SV, et al. The role of neuroimmunoendocrine mechanisms in the formation of endogenous intoxication in traumatic disease. Tauride Med and Biol Bull. 2012;15(3):115-7. [Russian].
3. Clausen F, Hånell A, Bjtsrk M, et al. Neutralization of interleukin-1beta modifies the inflammatory response and improves histological and cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. Eur J Neurosci. 2009;30(3):385-96.
4. Abu Saleh Ammar Ibrahim. The role of cytokines in the pathogenesis of the acute period of traumatic brain injury [dissertation]. Moscow : Tver State Med. Academy; 2007. [Russian].
5. Sadova VA. The processes of lipid peroxidation and cytokine response in acute traumatic brain injury in the right- and left-hemispheric brain damage [dissertation]. Chelyabinsk (Russia): Ural State Univ.; 2008. [Russian].
6. Sokolova TF. The interaction of the immune, nervous and endocrine systems in traumatic disease [dissertation]. Omsk : Omsk State Med. Academy; 2004. [Russian].
7. Kuchin DG. Pathophysiological role (predictive value) of metalloproteins (ferritin and ceruloplasmin) in the acute period of traumatic brain and cranial-facial injuries [dissertation]. Chelyabinsk (Russia): Ural State Univ.; 2005.
8. Patyukov KA. Optimization of the pathogenetic evaluation

- of endotoxemia in patients with traumatic brain disease [dissertation]. Omsk : Omsk State Med. Academy; 2008. [Russian].
9. Ziablitsev SV. The pathogenesis of the neuroregulatory systems disorders at the acute period of traumatic brain disease caused by traumatic brain injury[dissertation]. Donetsk : Gorky National Med. Univ.; 2005. [Ukrainian].
10. Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF-kB in the heart: to be or not to NF-kB. *Circ Res.* 2011;108(9):1122-32.

Received 19.05.2015

Кореляційні зв'язки показників церебральної гемодинаміки та електричної активності головного мозку у дітей з порушенням рухової активності

І.В. Головченко, М.І. Гайдай

Херсонський державний університет; e-mail: dinatouya@yandex.ru

Досліджували кореляційні зв'язки між показниками церебральної гемодинаміки та електричної активності головного мозку у дітей з дитячим церебральним паралічем. Встановлена більша кількість зв'язків між показниками реоенцефалограми та електроенцефалограми у лівій півкулі головного мозку, ніж у правій. У фронтотомастодальному – 59, що відображає компенсаторний перерозподіл мозкового кровопостачання більш уражених структур стовбурових відділів мозку, які пов'язані з забезпеченням кіркових функцій. У дітей з порушенням рухової активності центрального походження відбувається міжсистемна динамічна перебудова взаємозв'язків показників електричної активності мозку та церебральної гемодинаміки з формуванням нових достовірно значущих позитивних і негативних кореляцій, що свідчить про прояв компенсаторно-приспосувальної реакції мозку в умовах дизонтогенетичного розвитку.

Ключові слова: кореляційні зв'язки у реоенцефалограмі та електроенцефалограмі; церебральна гемодинаміка; електрична активність головного мозку.

ВСТУП

Рух – універсальний прояв життєдіяльності, що забезпечує можливість активної взаємодії як основних частин тіла, так і цілого організму з навколишнім середовищем забезпечуючи виживання виду [1, 2]. Останні роки характеризуються зростанням рухових порушень у загальній структурі уражень нервової системи в дитячому віці, наслідком є зниження рівня здоров'я дітей та погіршення якості їхнього життя. Одним з найбільш поширених у світі порушенням рухової активності центрального походження, що виявляється на ранніх етапах онтогенезу людини, є дитячий церебральний параліч (ДЦП) [3], який досліджувався у гемодинамічному [4], біохімічному [5], біомеханічному [6], нейропсихологічному [7] аспектах. Нейрофізіологічними дослідженнями доведено, що важлива роль у механізмах розвитку ДЦП належить дисфункціям неспецифічних структур голо-

© І.В. Головченко, М.І. Гайдай

ного мозку, що інтегрують складні регуляторні та адаптаційно-компенсаторні процеси в організмі [8]. З іншого боку, зниження рівня рухової активності, яким супроводжується церебральний параліч, призводить до зменшення притоку пропріоцептивної аферентації до головного мозку, що відіграє важливу роль у його розвитку на ранніх етапах онтогенезу [9]. У зв'язку з цим вбачається доцільним з'ясування закономірностей становлення структурно-функціональної організації головного мозку у дітей з рано набутими порушеннями рухової активності центрального походження.

Дослідженню електричної активності головного мозку при порушеннях рухової активності присвячено багато робіт, в яких виявлені: прояви дезорганізації основного ритму і патологічна повільна активність [10]; парціальне або загальне зниження біоелектричного тону кори у вигляді осередкового

або дифузного надлишку повільних хвиль і підвищення тонуку кори мозку при незначних сенсорних стимулах [11]; згладженість зональних відмінностей та регіонарні асиметрії, що виявляються як у стані природного сну, так і у стані неспання [12]. Автори переважно акцентують свою увагу лише на візуальному аналізі електроенцефалографічних показників з виявленням патологічних комплексів та зональних відмінностей.

Слід підкреслити, що церебральна гемодинаміка реагує на незначні зміни активності головного мозку, забезпечуючи збереження ієрархії рівнів управління фізіологічними функціями в організмі людини [13, 14]. Нами встановлено, що у дітей з порушенням рухової активності спостерігається недостатність кровопостачання головного мозку, що найбільш виражене у системі хребетних артерій правої гемісфери. Також низька об'ємна швидкість кровотоку у системах внутрішніх сонних та хребетних артерій. Це може вказувати на порушення венозного відтоку з порожнини черепа, що супроводжується змінами венозної циркуляції в синусах мозку. В системі хребетних артерій спостерігається міжпівкулева асиметрія зростання в правій півкулі, на відміну від лівої півкулі головного мозку, показників тонуку судин артеріального та венозного типу дрібного калібру [4]. Таким чином, можливо припустити, що спастичні стани внаслідок порушення іннервації м'язів при ДЦП ускладнюють церебральний кровоток, створюючи невідповідність між метаболічними потребами структур головного мозку та рівнем кровопостачання, що в свою чергу змінює електричну активність головного мозку.

Мета нашої роботи - дослідження електричної активності та кровообігу головного мозку у дітей з порушенням рухової активності центрального походження.

МЕТОДИКА

Для дослідження, яке проводили на базі Херсонського державного університету та

Херсонської міської клінічної лікарні ім. О.С. Лучанського, було відібрано 78 дітей (38 дівчаток та 40 хлопчиків) віком від 8 до 12 років з порушенням рухової активності (спастична форма ДЦП). Всі діти навчалися у Цюрупинському будинку-інтернаті для дітей-інвалідів Херсонської області та були здатні до самостійного самообслуговування. В сімейному аналізі хворих були відсутніми вказівки на неврологічні захворювання серед родичів, зокрема, випадки порушення рухової активності центрального походження. Дослідження проводили з дотриманням біоетичних норм (протокол біоетичної експертизи № 3 від 15 листопада 2010 р.). Контрольну групу склали 100 учнів Херсонської багатопрофільної гімназії № 20 (з них 50 хлопчиків та 50 дівчаток) аналогічного віку.

Електричну активність реєстрували на комп'ютерному електроенцефалографі «Braintest» (Харків, 1999) у стані розслабленого неспання із заплющеними очима. Смуга частот була обмежена знизу (1 Гц) і зверху (30 Гц), стала часу становила 0,3 с, а частота дискретизації сигналу - 50 с⁻¹. Швидкість повторення смуги - 30 мм/с. Міжелектродний опір був меншим за 5 кОм. Частотну вісь (від 0 до 30 Гц) розбивали на відрізки з кроком 0,2 Гц та діапазони: δ (0,2-3,8 Гц), θ (4,0-7,8 Гц), α (8,0-12,8 Гц) і β (13,0-30 Гц). Електроди для реєстрації ЕЕГ розмішували за міжнародною системою 10 - 20 у восьми симетричних проєкціях лівої і правої півкулі. Реєстрація здійснювали монополярно з референтним об'єднаним вушним електродом. Церебральну гемодинаміку досліджували за допомогою автоматизованої системи реограф Р4-О2, який був з'єднаний з ІВМ-сумісним комп'ютером через послідовний порт, застосовуючи фронтотомо- та окципітотомо-відведення. Розраховували такі параметри: кровонаповнення артеріального русла, периферичний опір, дикротичний індекс, діастолічний індекс, венозний відтік, об'ємну швидкість кровотоку. Комп'ютерна програма дослідження кореляційних зв'язків

включала визначення коефіцієнтів кореляцій (r), між показниками фонові EEG (амплітуда ритмів) і РЕГ. Числові значення цього коефіцієнта коливаються в межах від $-1,0$ до $+1,0$. Його позитивні значення вказують на прямий зв'язок, а негативні – на зворотну кореляцію. Числові значення коефіцієнтів кореляції (r) нормувались в межах від $0,08$ до $0,98$ і, відповідно, виражали: до $0,49$ – слабку ступінь кореляції, $0,50$ – $0,69$ – значущу, $0,70$ і вище – високу. Математичні операції проводили у програмних пакетах Microsoft Exel 2003 та Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дітей з порушенням рухової активності вірогідно більша кількість зв'язків між значеннями показників РЕГ та EEG, ніж у дітей контрольної групи, особливо у лівій півкулі головного мозку. При зіставленні амплітуди δ -діапазону з показниками церебральної

гемодинаміки в дітей основної групи, було зафіксовано: у хлопчиків 16 (всі негативні) кореляційних зв'язків ($P < 0,05$), а у дівчаток – 37 (із них 20 позитивних та 17 негативних). Дівчатка мали 16 зв'язків у лівій та 21 в правій, а хлопчики 13 у лівій та 3 у правій півкулі. У дівчаток зафіксовано 11 зв'язків при фронто- та 26 при окципіто- відведеннях, а у хлопчиків – 7 та 9 відповідно.

Встановлено набагато більше кореляційних зв'язків у дівчаток, ніж у хлопчиків між значеннями амплітуди δ -діапазону та РЕГ (рис. 1, а, б). Венозний відтік лівої півкулі (позитивний) каротидної системи та (негативний) вертебро-базиллярної системи лівої півкулі має значущі зв'язки з амплітудою δ -діапазону лівої лобової зони, яка в свою чергу має значущі як позитивні, так і негативні зв'язки з тонусом судин артеріального типу дрібного калібру лівої півкулі; периферичним опором судин, тонусом судин венозного типу дрібного калібру, кровонаповненням ар-

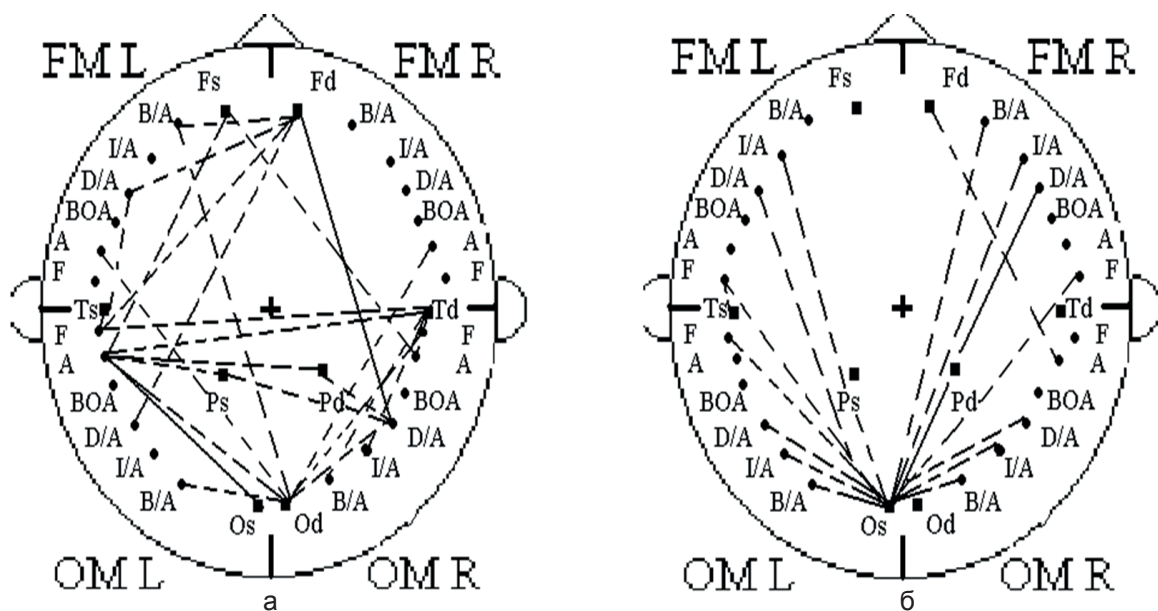


Рис. 1. Просторовий розподіл кореляційних зв'язків між амплітудою δ -діапазону (0,2-3,8 Гц) та величинами реоенцефалографічних показників у великих півкулях головного мозку дівчаток (а) та хлопчиків (б) з порушенням рухової активності. Примітка: тут і надалі на рис. 2-4 пунктиром позначено - значимі кореляції ($r=0,51$ - $0,70$); лінією - високі кореляції ($r=0,71$ - $1,00$). Fs, Fd – лобна зона; Ts, Td – скронева зона; Ps, Pd – тим'яна зона; Os, Od – потилична зона; FM – фронтотемпоромастоїдальне відведення; OM – окципітотемпоромастоїдальне відведення; R – праворуч; L – ліворуч; A – кровонаповнення артеріального русла; B/A – периферичний опір судин головного мозку; I/A – тонус артеріол; D/A – тонус венул; BOA – венозний відтік з певної зони мозку; F – швидкість об'ємного кровотоку

теріального русла вертебро-базиллярної системи правої півкулі (в лівій півкулі реєструється негативний зв'язок). Амплітуда δ -діапазону правої лобової зони мала негативну значущу ступінь кореляції з периферичним опором судин, тонусом судин венозного типу дрібного калібру лівої півкулі каротидної системи, венозним відтоком, швидкістю об'ємного кровотоку вертебро-базиллярної системи та високу позитивну ступінь з тонусом судин венозного типу дрібного калібру правої півкулі вертебро-базиллярної системи. Тонус судин венозного типу дрібного калібру (негативний) та кровонаповнення артеріального русла (позитивний) мали значущі зв'язки з амплітудою δ -діапазону тім'яної зони. Амплітуда δ -діапазону лівої потиличної зони мала зв'язки з кровонаповненням артеріального русла каротидної системи (тісні позитивні), вертебро-базиллярної системи лівої півкулі (тісні позитивні). Спостерігався значущий негативний зв'язок амплітуди δ -діапазону лівої тім'яної зони з швидкістю об'ємного кровотоку вертебро-базиллярної системи лівої півкулі, а в правій тім'яній зоні - зв'язки з тонусом судин венозного типу дрібного калібру каротидної системи лівої півкулі, периферичним опором судин та тонусом судин артеріального типу дрібного калібру вертебро-базиллярної системи правої півкулі. Кровонаповнення артеріального русла лівої півкулі мали значущі позитивні зв'язки з амплітудою δ -діапазону правої потиличної зони, яка в свою чергу мала зв'язок з периферичним опором судин каротидної системи лівої півкулі, тонусом судин венозного типу дрібного калібру (негативний), швидкістю об'ємного кровотоку вертебро-базиллярної системи правої півкулі.

У хлопчиків були встановлені значущі зв'язки між амплітудою δ -діапазону та показниками РЕГ (див рис. 1, б). Амплітуда δ -діапазону правої лобової, скроневої та тім'яної зон мала значущу негативну ступінь кореляції з кровонаповнення артеріального русла правої півкулі та швидкістю об'ємного

кровотоку, периферичним опором судин вертебро-базиллярної системи лівої півкулі. Негативні зв'язки спостерігалися між амплітудою δ -діапазону лівої потиличної зони з периферичним опором судин та тонусом судин артеріального типу дрібного калібру каротидної системи правої півкулі та вертебро-базиллярної системи як правої, так і лівої півкулі.

Найбільша кількість зв'язків у дітей основної групи була зафіксована між амплітудою θ -діапазону та значеннями показників РЕГ ($P < 0,05$), у дівчаток - 22 зв'язки в лівій півкулі та 26 в правій півкулі (із них 22 позитивних та 26 негативних), а у хлопчиків - 13 зв'язків в лівій півкулі та 5 у правій півкулі (із них 4 позитивних та 14 негативних). Амплітуда θ -діапазону правої лобової зони у дівчаток (рис. 2, а) мала позитивну значущу ступінь кореляції з периферичним опором судин, тонусом судин венозного типу дрібного калібру, венозним відтоком каротидної системи лівої півкулі; тонусом судин артеріального типу дрібного калібру вертебро-базиллярної системи та високу ступінь з швидкістю об'ємного кровотоку вертебро-базиллярної системи лівої півкулі. Найбільша кількість тісних позитивних взаємозв'язків була встановлена при зіставленні амплітуди θ -діапазону лівої скроневої зони з периферичним опором судин, тонусом судин артеріального та венозного типу дрібних калібрів, швидкістю об'ємного кровотоку вертебро-базиллярної системи правої півкулі та кровонаповненням артеріального русла каротидної системи правої півкулі. А в правій скроневої зоні, навпаки взаємозв'язки були негативними та значущими. Тонус судин артеріального та венозного типів дрібного калібру та швидкість об'ємного кровотоку вертебро-базиллярної системи лівої півкулі та каротидної системи обох півкуль мали значущі негативні взаємозв'язки з амплітудою θ -діапазону тім'яної та потиличної зон. Спостерігалися значущі позитивні взаємозв'язки амплітуди θ -діапазону тім'яної та потиличної зон з кровонаповненням артеріального русла

каротидної системи лівої півкулі та периферичним опором судин вертебро-базиллярної системи правої півкулі. Слід відмітити, що у хлопчиків (див. рис. 2, б) було встановлено менше зв'язків, ніж у дівчаток, між амплітудою θ -діапазону та РЕГ і всі вони були значущі. Найбільша кількість зв'язків була між амплітудою θ -діапазону в лівій потиличній зоні та показниками РЕГ і всі вони були негативні. Амплітуда θ -діапазону в лівій лобовій зоні мала тільки позитивні значущі взаємозв'язки з швидкістю об'ємного кровотоку каротидної системи лівої півкулі, периферичним опором судин лівої та правої півкулі та тонусом судин венозного типу дрібного калібру вертебро-базиллярної системи правої півкулі. Тонус судин венозного типу дрібного калібру каротидної системи правої півкулі мав негативні зв'язки з амплітудою θ -діапазону правої тім'яної та потиличної зон.

У хлопчиків зафіксовано 6 (2 позитивних та 4 негативних), а у дівчаток - 24 (11 позитивних та 13 негативних) кореляційних зв'язків між величинами церебральної гемодинаміки та амплітудою α -ритму. Дівчатка

мали 8 зв'язків у лівій півкулі та 16 у правій, а хлопчики 1 зв'язок у лівій півкулі та 5 в правій. При фронтотомастоїдальному відведенні зафіксовано 10 зв'язків - всі в дівчаток, а при окципітомастоїдальному відведенні - 20 кореляційних зв'язків (у хлопчиків - 6 зв'язків, у дівчаток - 14 зв'язків).

Амплітуда α -ритму у дівчаток (рис. 3, а) в правій скроневій зоні мала значущі зв'язки з показниками РЕГ: позитивні - в лівій півкулі з тонусом судин артеріального та венозного типів дрібного калібру, венозним відтоком каротидної системи та швидкістю об'ємного кровотоку вертебро-базиллярної системи; негативний з тонусом судин венозного типу дрібного калібру вертебро-базиллярної системи правої півкулі. Негативні взаємозв'язки між амплітудою α -ритму лівої тім'яної зони з тонусом судин венозного типу дрібного калібру, венозним відтоком лівої півкулі каротидної системи та кровонаповненням артеріального русла вертебро-базиллярної системи в правій півкулі. Найбільша кількість високих і значущих ступеней кореляції у дівчаток було виявлено при зіставленні амплітуди α -ритму

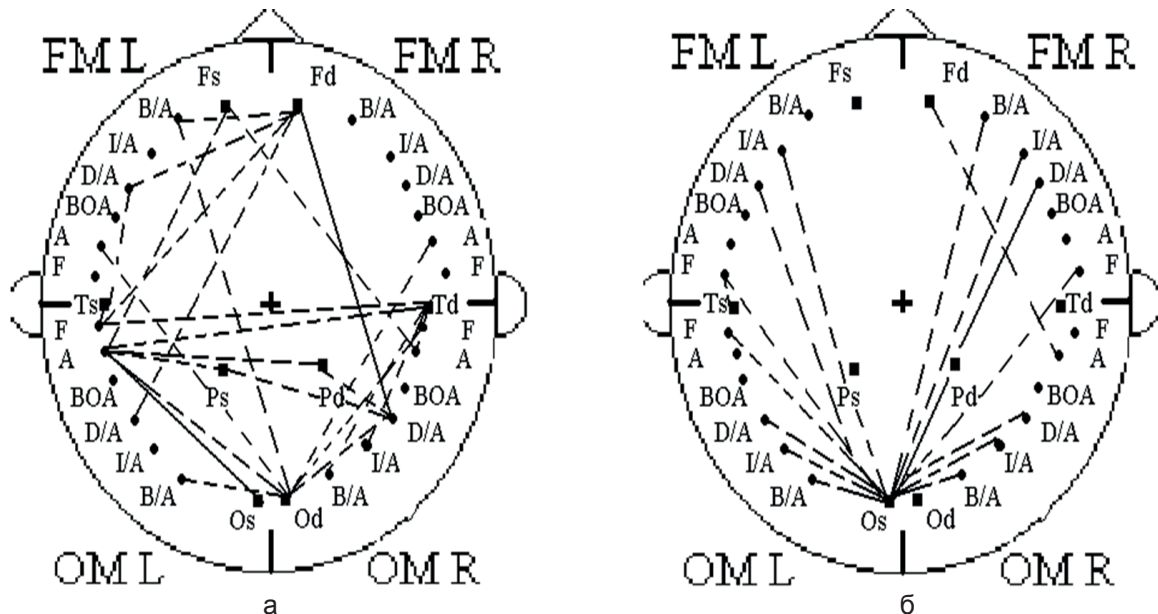


Рис. 2. Просторовий розподіл кореляційних зв'язків між амплітудою θ -діапазону (4,0-7,8 Гц) та величинами реоенцефалографічних показників у великих півкулях головного мозку дівчаток (а) та хлопчиків (б) з порушенням рухової активності

правої тім'яної зони з швидкістю об'ємного кровотоку каротидної системи, кровонаповненням артеріального русла каротидної та в лівій півкулі вертебро-базиллярної системи, периферичним опором судин та швидкістю об'ємного кровотоку в правій півкулі. Слід відзначити, що у дівчаток був тісний зв'язок між амплітудою α -ритму лівої півкулі потиличної зони та тонусом судин венозного типу дрібного калібру системи хребетних артерій правої півкулі.

Спостерігалось менше зв'язків між амплітудою α -ритму та РЕГ у хлопчиків, і всі вони були значущі (див. рис. 3, б). Кровонаповнення артеріального русла вертебро-базиллярної системи правої півкулі мало позитивні зв'язки з амплітудою α -ритму лобової зони. Амплітуда α -ритму правої скроневої зони мала негативні зв'язки з тонусом судин артеріального та венозного типів дрібного калібру вертебро-базиллярної системи правої півкулі.

У хлопчиків – 10 в лівій півкулі та 2 в правій (4 позитивних та 8 негативних), а у дівчаток – 17 у лівій півкулі та 16 у правій

півкулі (23 позитивних та 10 негативних) кореляційних зв'язків між церебральною гемодинамікою та амплітудою β -ритму. У дівчаток (рис. 4, а) найбільша кількість тісних зв'язків між амплітудою β -ритму в лівій лобовій зоні з кровонаповненням артеріального русла каротидної системи, швидкістю об'ємного кровотоку вертебро-базиллярної системи правої півкулі на відміну від зв'язків цього показника каротидної системи, які були негативними. Амплітуда β -ритму в правій лобовій зоні мала позитивні високі та значущі ступені кореляції з кровонаповненням артеріального русла каротидної системи, периферичним опором судин каротидної системи лівої півкулі та вертебро-базиллярної системи правої півкулі, тонусом судин артеріального типу дрібного калібру вертебро-базиллярної системи правої півкулі, тонусом судин венозного типу дрібного калібру каротидної системи лівої півкулі, швидкістю об'ємного кровотоку вертебро-базиллярної системи лівої півкулі. Периферичний опір судин та тонус судин венозного типу дрібного калібру вертебро-базиллярної системи правої півкулі

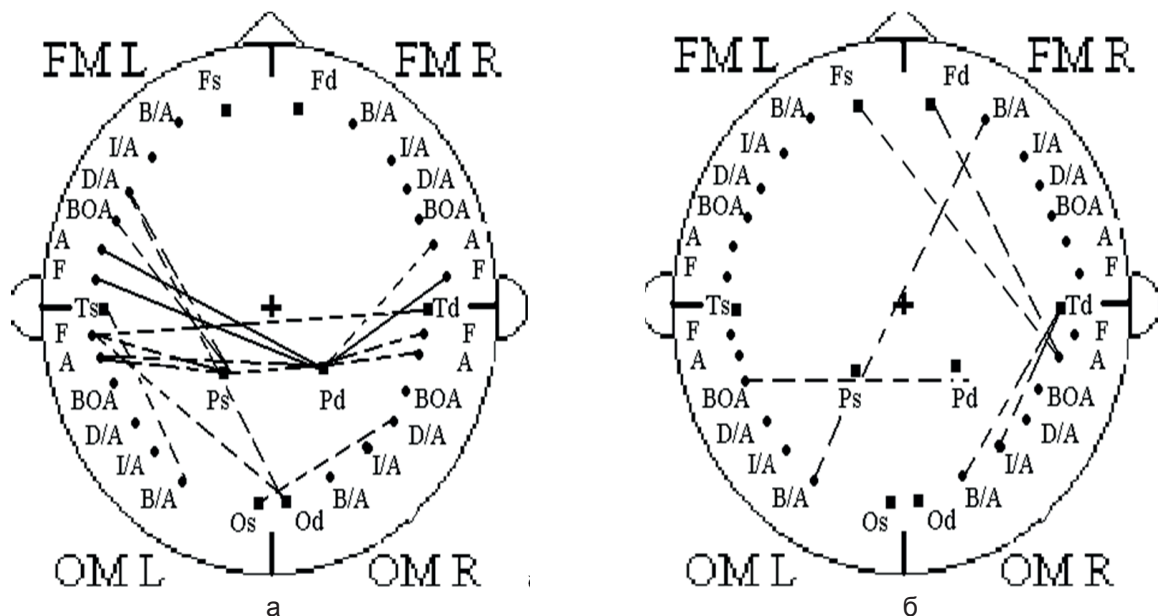


Рис. 3. Просторовий розподіл кореляційних зв'язків між амплітудою α -ритму (8,0-12,8 Гц) та величинами реоенцефалографічних показників у великих півкулях головного мозку дівчаток (а) та хлопчиків (б) з порушенням рухової активності

мають високі та значущі зв'язки з амплітудою β -ритму тім'яної та лівої потиличної зон.

У хлопчиків менше зв'язків між амплітудою β -ритму та РЕГ і всі вони значущі (рис. 4, б). Найбільшу кількість зафіксовано між амплітудою β -ритму в лівій лобовій зоні з периферичним опором судин каротидної і вертебро-базиллярної систем лівої півкулі, тонусом судин артеріального типу дрібного калібру каротидної системи правої півкулі, тонусом судин венозного типу дрібного калібру та кровонаповненням артеріального русла каротидної системи лівої півкулі, швидкістю об'ємного кровотоку в правій півкулі та кровонаповненням артеріального русла вертебро-базиллярної системи лівої півкулі. Тонус судин артеріального типу дрібного калібру та швидкість об'ємного кровотоку вертебро-базиллярної системи лівої півкулі мали позитивні значущі зв'язки з амплітудою β -ритму в правій скроневій зоні.

Церебральні венозні дисфункції супроводжуються патологією підкіркової білої речовини, наслідком якої є порушення кірково-підкіркової взаємодії. Венозна гіпертензія,

що постійно виявляється, має пароксизмальні кореляти на ЕЕГ. За наявності на РЕГ порушення церебрального кровообігу саме в вертебро-базиллярній системі на ЕЕГ зазвичай реєструються ознаки стовбурової патології у вигляді появи δ - та θ -активності. Встановлено, що порушення кровообігу в вертебро-базиллярній системі мало високі та значущі кореляційні зв'язки з амплітудними показниками ЕЕГ дітей зі спастичною формою ДЦП [4]. Ми вважаємо, що порушення кровообігу в вертебро-базиллярній системі призводить до ураження стовбура мозку, який, за допомогою аферентних шляхів ретикулярної формації, через таламус поєднаний з корою головного мозку. В ретикулярній формації відбувається гальмування висхідних активуючих впливів, що спричинює зниження тону кори. Можна говорити про функціональну незрілість системи неспецифічної активації з боку ретикулярної формації стовбура мозку. Діти з порушенням рухової активності мали значно більше позитивних і негативних значущих та високих кореляційних зв'язків між показниками фонових ЕЕГ і РЕГ із усіх можливих,

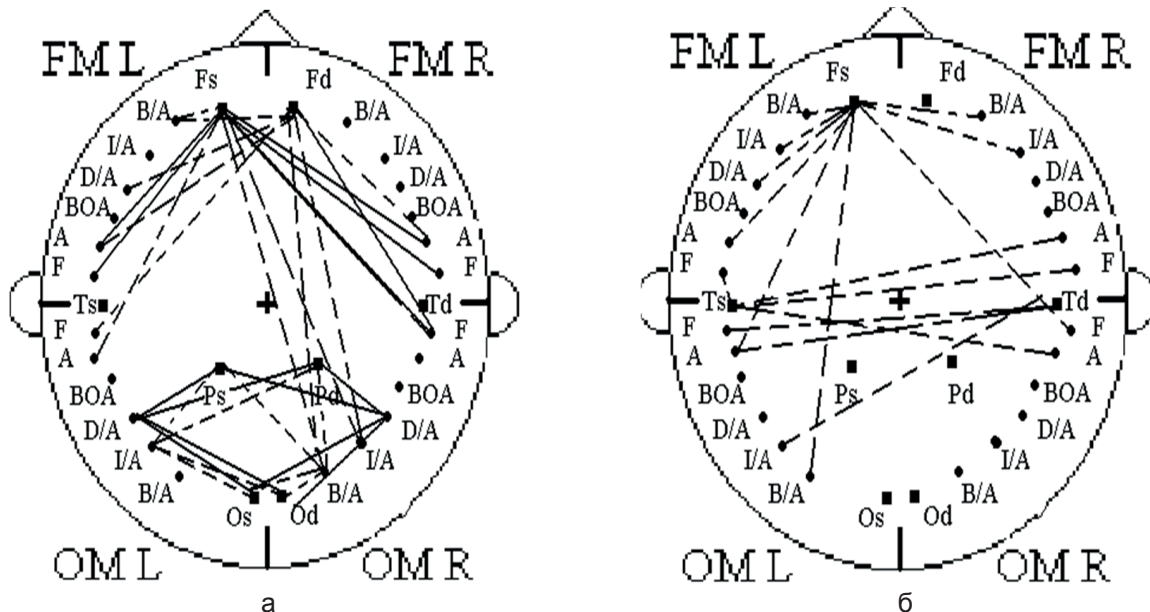


Рис. 4. Просторовий розподіл кореляційних зв'язків між амплітудою β -ритму (13,0-30 Гц) та величинами реоенцефалографічних показників у великих півкулях головного мозку дівчаток (а) та хлопчиків (б) з порушенням рухової активності

що, на наш погляд, зумовлено розвитком міжсистемної компенсації, яка здійснюється за допомогою перебудови функціональних систем і формування нових форм адаптивних реакцій в умовах дизнейроонтогенезу. Особливістю кореляційної структури показників ЕЕГ у дітей з порушеннями рухової активності є достовірно більша кількість високих і значущих кореляційних зв'язків між показниками електричної активності головного мозку в δ - та θ -діапазонах, особливо у скроневих зонах кори головного мозку. За даними візуального аналізу ЕЕГ виявлено загальний прояв змін біоелектричної активності мозку в таких дітей. Таке проявлялося в розвитку пароксизмальної активності біопотенціалів δ - та θ -ритмів з фокусом активності в передніх зонах кори головного мозку; формуванням мозаїчної представленості θ -ритмів у скроневих зонах; наявністю гіперсинхронних α -пароксизмів у задніх зонах кори головного мозку [15]. Зазначене свідчить про активацію механізмів лімбіко-неокортикальних систем та синхронізуючих впливів з боку ретикулярної формації стовбура і діенцефальних структур. Це можна розглядати як адаптаційно-приспосувальну реакцію, оскільки у дітей з порушенням рухової активності центрального походження за результатами спектрального аналізу виявлена недостатність нейронних мереж кори, які приймають участь у генерації α -ритму.

И.В.Головченко, Н.И. Гайдай

КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ И ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ С НАРУШЕНИЯМИ МОТОРИКИ

Исследованы корреляционные связи между показателями церебральной гемодинамики и электрической активности головного мозга у детей с детским церебральным параличом. Установлено большее количество связей между показателями реоэнцефалограммы и электроэнцефалограммы в левом полушарии головного мозга, чем в правом. В фронтотастоидальном отведении зафиксировано 19 корреляционных связей, а в окципитотастоидальном

отведении - 59 связей, что отражает компенсаторное перераспределение мозгового кровоснабжения более пораженных структур стволовых отделов мозга, которые связаны с обеспечением корковых функций. У детей с нарушением двигательной активности центрального генеза происходит межсистемная динамическая перестройка взаимосвязей между показателями электрической активности мозга и церебральной гемодинамики с формированием новых достоверно значимых положительных и отрицательных корреляций, что свидетельствует о проявлении компенсаторно-приспособительной реакции мозга в условиях дизонтогенетического развития.

Ключевые слова: корреляционные связи; церебральная гемодинамика; электрическая активность головного мозга.

I.V. Golovchenko, M.I. Hayday

CORRELATION INDICES OF CEREBRAL HEMODYNAMICS AND ELECTRICAL ACTIVITY IN CHILDREN WITH IMPAIRED MOTOR SKILLS

The correlations between the indicators of cerebral hemodynamics and electrical activity in children with impaired motor skills of central origin (children with cerebral palsy) were investigated. There is established a high number of links between indicators of rheoencephalogram (REG) and electroencephalogram (EEG) in the left cerebral hemisphere than in the right. In frontotastoidal allocation 19 correlations and in occipitotastoidal - 59 links. We suppose that poor circulation in vertebroplasty-basilar system leads to the defeat of the brain stem, which, with afferent pathways of the reticular formation, connects the thalamus with the cortex. In the reticular formation there is an inhibition of ascending activators influences, which eland to decreasing of the cortex is tonus. You can talk about the functional immaturity of the system of nonspecific activation by the reticular formation of the brain stem. Children with violation of motor activity had significantly more negative and positive significant and high correlation among the existing indicators of electric brain activity and cerebral hemodynamics, in our opinion, is due to the development of interconnection compensation that is carried out by adjustment of the functional systems and the formation of new forms of adaptive responses in conditions of disontogenetik. Feature correlation pattern of the EEG, of children with disorders of motor activity, is associated with a significantly great number of high and significant correlations between measures of electrical brain activity in the δ - and θ - rhythms, especially in the temporal areas of the cerebral cortex. According to visual analysis of EEG there is revealed a common manifestation of changes of bioelectric brain activity in children with disorders of motor activity. This is manifested in the development of paroxysmal activity of action potentials of θ - and δ -rhythms with the focus of activity in the anterior areas of the cerebral cortex; the formation of a mosaic representation of the θ -rhythms in temporal

areas; the presence of hypersynchronous α -paroxysms in the posterior areas of the cerebral cortex. The given facts testify to activation of mechanisms of limbic-neocortical systems and synchronizing influences of the reticular formation of the stem and diencephalic structures. There is also detected greater number of correlations when occipitomastoidal registration was done it reflects compensatory redistribution of cerebral blood flow over the affected structures of brain stem structures that are associated with the provision of cortical functions.

Key words: α , β , δ , θ - subbands; EEG; intercortical interactions; violation of motor activity; children.

Kherson State University.

REFERENCES

1. Batuev AS, Tairov OP Brain and the organization of movements. The conceptual model. Leningrad: Nauka; 1978. [Russian].
2. Bernstein NA Physiology of movements and activity. Moscow: Nauka; 1990. [Russian].
3. Semenova KA Neurology of childhood. Shanko GG, Bondarenko ES editor. Minsk; 1990. [Russian].
4. Golovchenko IV, Hayday NI Cerebral hemodynamic children 8-12 years in violation of the motor activity of the central origin. Fiziol Zh. 2013; 59(5): 31-25. [Ukrainian].
5. Brin IL Effect of low doses of L-DOPA on the synergies tonic response in patients with cerebral palsy. Zh Neuropathol Psikhatri. 1992; 92(2):87-86. [Russian].
6. Vitenson AC Artificial correction of movements in pathological walking. Moscow: Mirror; 1999. [Russian].
7. Bronnikov CA, Abramova NA Higher mental functions in children with spastic forms of cerebral palsy. Zh Nevrol Psikhatri. 2004; (10): 65-68. [Russian].
8. Numata Y, Onuma A, Kobayashi Y Brain magnetic resonance imaging and motor and intellectual functioning in 86 patients born at term with spastic diplegia. Dev Med Child Neurol. 2013; 55: 162-66.
9. Dumoulin IV Spasticity after stroke. Rus Med Zh. 2005; 13(7): 506-501. [Russian].
10. Yakhno NN, Parfenov VA General neurology. Moscow: MIA, 2006. [Russian].
11. Kozyavkin VI, Babadagli MA, Potebenko TF Dynamics of EEG changes in children cerebral palsy in the process of rehabilitation. Ukr Zh Psychoneurol. 1993. (2): 44-43. [Ukrainian].
12. Sheinkman OG Effect of correction of musculoskeletal disorders on the functional state of the brain in cerebral palsy. Zh Nevrol Psikhatri. 2000; (3): 37-22. [Russian].
13. Odinak MM, Mikhailenko AA Vascular diseases of the brain. St. Petersburg: Hippocrates; 2003. [Russian].
14. Symonenko VB The basics of cardioneurology. Moscow: Medicine; 2001. [Russian].
15. Golovchenko IV, Hayday NI Visual analysis of electroencephalograms in children with disorders of motor activity of central origin. Fiziol Zh. 2014; 60(3): 33. [Ukrainian].

Матеріал надійшов до редакції 22.12.2014

Морфологічні зміни у печінці мишей за умов конканавалін А-індукованого гепатиту

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

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

Вивчали пошкодження тканини печінки, її інфільтрацію клітинами природного та адаптивного імунітету в динаміці конканавалін А (КонА)-індукованого гепатиту у мишей. Використовували напівкількісний метод оцінки пошкодження судинного русла і паренхіми, досліджували лейкоцитарну інфільтрацію печінки і клітинний склад інфільтратів. Первинна реакція печінки на введення КонА полягала у змінах запального характеру в судинному руслі, за якими слідували порушення в паренхімі. Виявлено значне посилення міграції лейкоцитів у печінку, причому спочатку зростала нейтрофільна інфільтрація з максимумом на 6-ту годину експерименту (63,9±4,6%, P<0,001 до рівня контролю) і лише потім – лімфоцитарна з утворенням багатоклітинних лімфоцитарно-макрофагальних інфільтратів (62% через 48 год порівняно з 6-годинним експериментом) з істотною кількістю плазматичних клітин (4,9%, P<0,05 порівняно з 6-годинним експериментом). Отримані результати дають підставу припускати, що посилена інфільтрація тканини печінки лейкоцитами, зокрема лімфоцитами та моноцитами, у поєднанні зі зростанням некротичної загибелі, створює передумови для ефективної міжклітинної взаємодії та імунної відповіді на власні антигени. Це може бути суттєвим патогенетичним механізмом при розвитку аутоімунних захворювань печінки. Ключові слова: експериментальний імунний гепатит; конканавалін А; лейкоцитарна інфільтрація; морфологія печінки.

ВСТУП

Для вивчення ураження печінки, опосередкованого імунними механізмами, використовується експериментальна модель конканавалін А (Кон А)-індукованого гострого гепатиту, що відтворює низку рис, притаманних таким захворюванням людини, як аутоімунні та вірусні гепатити, а також антиген-незалежні пошкодження печінки (алкогольне ураження, неалкогольний стеатогепатит, пошкодження при ішемії-реперфузії) [1-3]. Найважливішим ланцюгом при Кон А-гепатиті є активація Т-клітин, в тому числі печінкових лімфоцитів-кіллерів, а також взаємодія Т-хелперів і макрофагів [1,4,5]. Однак серед чисельних літературних даних патоморфологічні особливості дії лектину на печінку описані поверхнево [6-8]. Ці фрагментарні відомості не дають повної уяви

щодо динаміки процесів, котрі відбуваються при експериментальному гепатиті.

Інфільтрація печінки запальними клітинами робить певний внесок в її пошкодження або як першопричина (при аутоімунному гепатиті і первинному біліарному цирозі), або як вторинна відповідь на інші процеси (за умов хронічної вірусної інфекції). Проте динаміка запальної інфільтрації печінки лейкоцитами за умов введення Кон А вивчена недостатньо. При некрозі лейкоцитів, що інфільтрують ділянку запалення, вивільнюються біологічно активні і тканинопошкоджувальні молекули. При цьому може запускатися імунна відповідь на приховані раніше власні внутрішньоклітинні антигени [9,10], що становить собою важливий, самопідсилювальний механізм аутоімунного ураження.

Метою нашої роботи було дослідити гістоструктуру тканини печінки та інфільтра-

цію її клітинами природного і адаптивного імунітету у динаміці Кон А-індукованого імунного гепатиту у мишей.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на статевозрілих самцях мишей лінії СВА масою 18-20 г. Постановка експериментів відповідала міжнародним біоетичним принципам, міжнародним угодам і національному законодавству у цій галузі [11].

Імунне ушкодження печінки викликали одноразовим внутрішньовенним введенням поліклонального Т-клітинного стимулятора мітогена Кон А («Sigma», США) в дозі 25 мг/кг. Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин у відповідному об'ємі. Дослідження проводили з використанням 5-8 тварин у кожній групі через 2, 6, 12, 20 та 48 год.

Визначали активність аланінамінотрансферази (АлАТ) у сироватці крові, найбільш характерного біохімічного показника ушкодження гепатоцитів [12]. Для морфологічного вивчення шматочки печінки (отримані від 5 тварин у кожній групі) після фіксації 10%-м нейтральним формаліном обробляли за загальноприйнятою гістологічною методикою і заливали у парафін. Зрізи фарбували гематоксилін-еозином і піддавали світлооптичному дослідженню. Морфологічну оцінку змін гістоструктури печінки проводили за розробленим нами комплексом показників, найбільш важливих для характеристики розвитку імунного запалення у печінці: 1) порушення часточкової структури, 2) дистрофія гепатоцитів, 3) загибель гепатоцитів, 4) активація зірчастих ретикулоендотеліоцитів (ЗР). Патологічні зміни мікроциркуляторного русла характеризували за такими показниками: 1) розширення судин, 2) повнокрів'я судин, 3) порушення судинних стінок, 4) периваскулярні набряки, 5) тромбоутворення. Оцінку морфологічних змін проводили за результатами напівкількісного аналізу з використанням 5-бальної шкали: 0 - відсутність

змін, 1- незначні зміни, 2 – зміни середньої важкості, 3 – суттєві зміни, 4- значно виражені ушкодження. Підраховували окремо суму балів стану паренхіми та судин за вищезгаданою шкалою, а також загальну суму балів морфологічних змін у тканині печінки.

При аналізі запальної інфільтрації тканини печінки визначали кількість клітин в інфільтратах. За цим показником характеризували осередки інфільтрації як дрібно- (3–9 клітин), середньо- (10–19 клітин), великовогнищеві (більше ніж 20 клітин). Підраховували кількість інфільтратів вказаних типів у 10 полях зору, об'єктив х20. Клітинний склад (лімфоцити, нейтрофілії та еозинофілії гранулоцити, плазмоцити, макрофаги і моноцити) підраховували в 5 випадково вибраних інфільтратах (х40) та визначали відсоток кожного типу клітин. Залежно від клітинного складу диференціювали наступні типи інфільтратів: лімфоцитарні, лімфоцитарно-макрофагальні, лімфоцитарно-нейтрофілії, нейтрофілії та змішаного типу. Виразували відсоток кожного типу інфільтратів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою непараметричного аналогу ANOVA - критерію Крускала-Волліса з подальшим порівнянням між групами за тестом множинних порівнянь Данна з використанням програми GraphPad Prism (version 5.01, «GraphPad Software», San Diego California США). Результати представлено як $M \pm m$ або як середнє значення та розкид (M , мінімальне та максимальне значення). Критичний рівень значимості при перевірці статистичних гіпотез $P=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

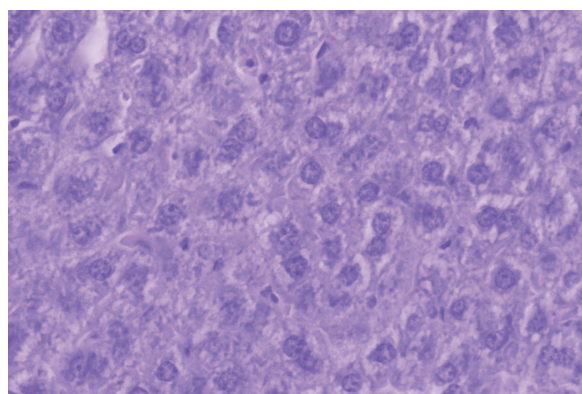
Введення поліклонального активатора Т-клітин КонА спричиняло ушкодження печінки із суттєвим підвищенням вмісту АлАТ у сироватці крові в 2,7, 3,2 та 2,9 раза порівняно з контролем через 6, 12 та 20 год після ін'єкції відповідно ($P < 0,001$). Це свідчило про порушення цілісності плазматичної мембрани

гепатоцитів. Через 48 год статистично значуще підвищення вмісту АЛАТ не виявлялося.

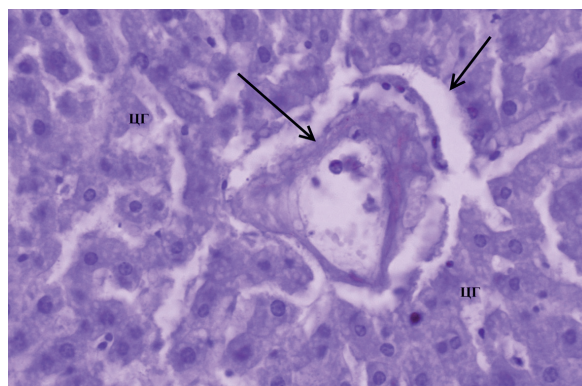
Морфологічне дослідження гістроструктури печінки показало, що у контрольних тварин нормальна архітектоніка печінки зберігалася протягом усього терміну експерименту. Введення КонА призводило до поступового зростання патологічних змін з максимумом через 20 год після введення (рис. 1), пошкодження печінки зберігалася до 48 год. Вірогідні зміни судинного русла, а саме значне розширення судин, периваскулярні набряки, порушення судинної стінки, набухання і десквамація ендотеліоцитів та тромбоутворення спостерігалася вже через 6 год дії КонА як у перипортальних, так і периферичних зонах печінкових ацинусів (табл. 1). Водночас перші статистично значущі морфологічні зміни паренхіми печінки прослідковувалися лише через 12 год (табл. 2) і стосувалися загибелі гепатоцитів та активації ЗР. Виражена вакуольна і білкова дистрофія з ушкодженням цитоплазми, гіпертрофією ядер та ядерця, некробіоз і цитоліз окремих клітин, збільшення кількості дво- та багатоядерних гепатоцитів, а також порушення часточкової структури печінки були виражені тільки через 20 год після введення КонА і зберігалися локально до 48 год.

Виявлені ранні зміни мікроциркуляції супроводжувалися посиленою міграцією лейкоцитів у тканину печінки. Суттєве збільшення дифузної інфільтрації печінки (вже через 6 год після введення КонА), ймовірно, пов'язано зі збільшенням синтезу хемокінів і молекул міжклітинної адгезії. ІФН- γ , що виділяється при активації Т-клітин Кон А, стимулює синусоїдальні ендотеліальні клітини, ЗР і гепатоцити до продукції численних хемокінів та адгезивних молекул, відповідальних за розвиток інфільтрації в печінку лейкоцитів, що, зрештою, призводить до розвитку гепатиту [5,13,14]. Вогнищева інфільтрація, що спостерігалася периваскулярно та у стромі органа, на тлі локального геморагічного просякання паренхіми посилювалася пізніше. Це

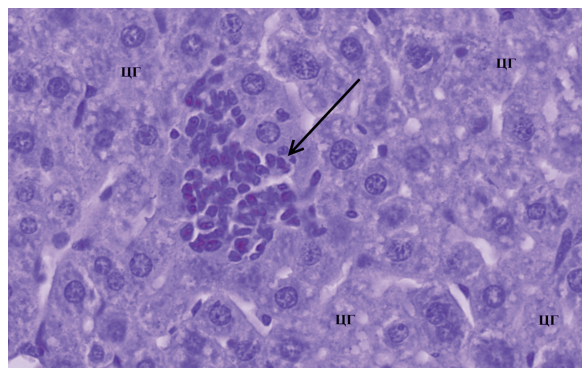
пов'язано, вірогідно, з виявленим у нашому дослідженні більш глибоким ушкодженням судинних стінок через 20 год дії КонА (див. табл. 1), що зумовлює вихід більшої кілько-



а



б



в

Рис. 1. Гістоструктура печінки контрольних мишей (а) та через 20 год після введення конканавалін А (б, в): стрілки на б вказують на судину з периваскулярним набряком та ушкодженою судинною стінкою, на в - на багатоклітинний лімфоцитарно-макрофагальний інфільтрат. ЦГ - зони цитолізу гепатоцитів. Забарвлення гематоксилін-еозином, об'єктив х40

сті клітинних елементів з кров'яного русла у вогнище запалення (див. рис. 1). Цей висновок підтверджується аналізом інфільтратів з різним числом клітин (рис. 2). Встановлено, що введення КонА призводить через 20 і 48 год до значного збільшення відсотка інфільтратів (від їх загальної кількості) із великим вмістом клітин в них (понад 20). Водночас на цей термін дослідження відсоток малоклітинних інфільтратів істотно зменшувався (див. рис. 2).

Підрахунок відносної кількості різних типів клітин, що інфільтрують печінку (у відсотках від загальної кількості лейкоцитів в інфільтратах), показав, що вже в ранні терміни розвитку КонА індукованого гепатиту значно посилювалася інфільтрація нейтрофільними гранулоцитами із максимумом на 6-ту годину. Кількість нейтрофілів становила в контролі $3,6 \pm 2,4\%$, через 2 год - $36,2 \pm 6,0\%$ ($P < 0,05$), через 6 год - $63,9 \pm 4,6\%$ ($P < 0,001$), через 12 год - $35,0 \pm 5,0\%$ ($P < 0,05$), через 20 год - $11,9 \pm 1,7\%$, через 48 год - $11,4 \pm 3,6\%$. Змі-

ни лімфоцитарної інфільтрації відбувалися в протифазі відносно нейтрофільної (рис. 3), з істотно вірогідним наростанням кількості лімфоцитів у інфільтратах через 12, 20 і 48 год. Ці результати узгоджуються з даними Bonder і співавт. [15], які виявили через 4 год після введення Кон А значне збільшення числа лейкоцитів, адгезованих до постінусоїдальних венул, і лише мала частина з них (близько 20%) була Т-лімфоцитами. Збільшення відносної кількості лімфоцитів у складі інфільтратів в поєднанні із посиленням дифузної та вогнищевої інфільтрації (в 5-6 разів) свідчить про значне зростання міграції лімфоцитів у тканину печінки через 12-48 год після введення КонА. Відносна кількість моноцитів/макрофагів, інфільтруючих печінку, практично не змінювалася в часі, однак загальне їх число зростало через посилення дифузної та вогнищевої інфільтрації.

У нашому дослідженні була проведена гістологічна оцінка наявності в тканині

Таблиця 1. Динаміка гістологічних показників ураження судинного русла печінки при введенні Кон А

Показник	Години після введення Кон А					
	0 год	2 год	6 год	12 год	20 год	48 год
Розширення судин						
М	0,2	2,0	2,4*	2,5**	3,3***	2,3
min-max	0-1	2-2	2-3	2-3	3-4	2-3
Повнокров'я судин						
М	0,3	0,3	1,8	1,0	2,1**	2,3***
min-max	0-1	0-1	1-2	0-2	1-3	1-3
Периваскулярні набряки						
М	0	0,5	2,0*	1,5	2,8***	2,0*
min-max	0-0	0-1	2-2	1-3	2-4	1-3
Порушення судинних стінок						
М	0	1,0	2,2**	1,7	2,7***	1,9
min-max	0-0	0-2	2-3	1-2	2-4	1-3
Тромбоутворення						
М	0	0,9	1,9*	1,3	1,9**	2,0**
min-max	0-0	0-1	1-3	1-2	1-3	1-3
Сумарна оцінка ушкодження судин						
М	0,5	4,7	10,3**	8,0	12,8***	10,5**
min-max	0-2	4-6	8-12	7-10	10-14	8-13

Примітка. Тут і в таблиці 2: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ відносно контролю за тестом Крускала-Уолліса та критерієм Данна

Таблиця 2. Зміна гістологічних показників ураження паренхіми печінки при введенні Кон А

Показник	Години після введення Кон А					
	0 год	2 год	6 год	12 год	20 год	48 год
Ступінь дистрофічних змін гепатоцитів						
М	1,0	1,4	2,1	2,3	3,1**	3,2**
min-max	1-1	1-2	1-3	2-3	2-4	2-4
Кількість загиблих гепатоцитів						
М	0,6	1,0	1,8	2,5*	3,4***	3,0**
min-max	0-1	0-2	1-2	2-3	3-4	2-4
Ступінь порушення балкової структури						
М	0	0,2	0,6	1,9	3,0***	2,4**
min-max	0-0	0-1	0-1	1-3	2-4	1-4
Наявність активованих клітин Купфера						
М	0,5	1,1	1,8	2,4**	3,1***	2,0
min-max	0-2	0-2	1-2	2-3	2-4	1-3
Сумарна оцінка змін паренхіми						
М	2,1	3,7	6,3	9,1*	12,8***	10,6**
min-max	1-4	3-6	5-8	7-12	11-14	8-13
Патологічні зміни тканини печінки в цілому						
М	2,6	8,4	16,6	17,1	25,6***	21,1**
min-max	1-4	7-12	13-19	14-19	22-28	19-26

печінки інфільтратів, різних за клітинним складом (лімфоцитарних, лімфоцитарно-макрофагальних, нейтрофільних, лімфоцитарно-нейтрофільних, змішаних). Показано, що

в пізній термін розвитку КонА-індукованого гепатиту збільшувалася відносна кількість лімфоцитарно-макрофагальних інфільтратів, яка становила 58 % (розкид 40 - 80%) через

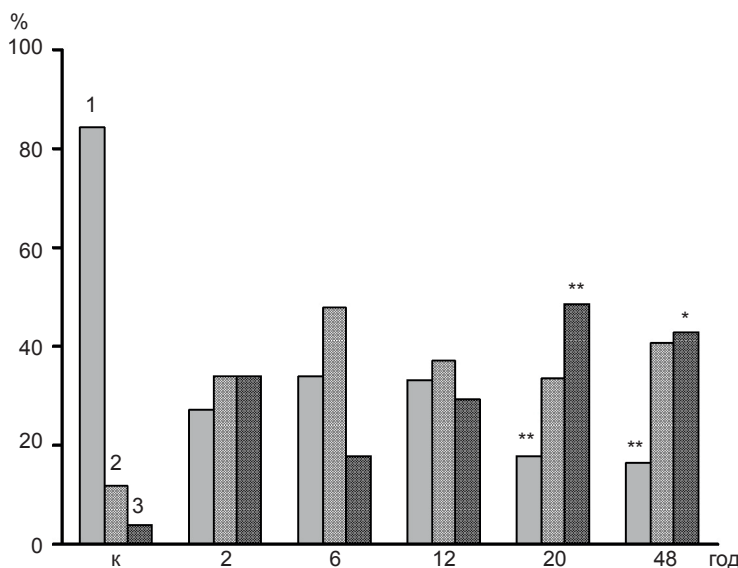


Рис. 2. Розподіл інфільтратів за кількістю у них клітин в динаміці після введення конканаваліну А. За віссю ординат – відсоток інфільтратів із зазначеною кількістю клітин (3-9, 10-19, більше ніж 20 клітин в інфільтраті) від загальної кількості інфільтратів; 1 – 3-9 клітин в інфільтраті; 2 – 10-19 клітин; 3 – понад 20 клітин в інфільтраті. * P<0,05, ** P<0,01 відносно контролю за тестом Крускала-Уоллеса та порівнянням між групами за критерієм Данна

20 і через 48 год 62 % (20 - 80 %) в порівнянні з 6-ю годиною ($P < 0,01$), коли спостерігалось максимальне число нейтрофілів. Саме лімфоцитарно-макрофагальний тип інфільтратів сприяє міжклітинній взаємодії імунітетів, необхідній для розвитку імунної реакції. Таким чином, на 20-48-му годину експерименту створюються передумови для ефективної взаємодії клітин моноцитарно-макрофагального ряду та лімфоцитів, що може призводити до імунної відповіді проти власних антигенів. Як було показано нами раніше, введення КонА призводить до посилення некротичної загибелі як гепатоцитів, так і лейкоцитів, котрі в значній кількості інфільтрують печінку [13,16]. В результаті посиленого некрозу вивільняється значна кількість аутоантигенів та молекул-індукторів запалення, що також сприяє розвитку аутоімунної відповіді. Це було підтверджено виявленням нами суттєвим збільшенням у печінці популяції плазматичних клітин, які синтезують імуноглобуліни. На 48-му годину збільшувалося число плазмоцитів,

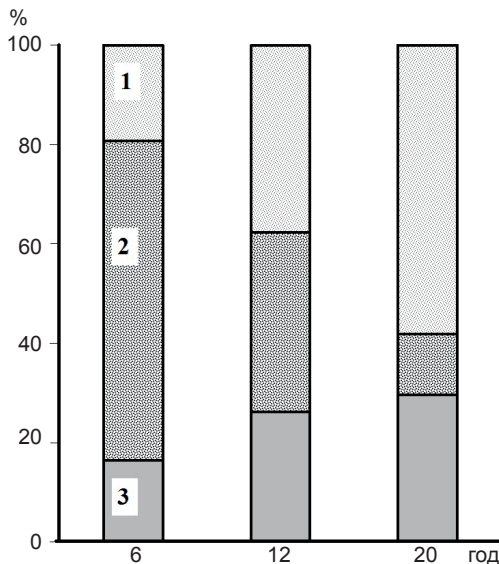


Рис. 3. Нормована гистограма відносної кількості різних популяцій клітин в інфільтратах через 6, 12 та 20 год після введення конканаваліну А. За всією ординат – відсоток від загальної кількості клітин, підрахованих у 5 інфільтратах: 1 – лімфоцити; 2 – нейтрофільні гранулоцити, 3 – моноцити/макрофаги

яке становило 4,9 % від загальної кількості інфільтруючих клітин ($P < 0,05$ порівняно з 6-ю годиною, коли вони в досліджуваних інфільтратах не виявлялись). Отже, у другій фазі імунозапального процесу в печінці створюються передумови для розвитку імунної відповіді на власні антигени, пов'язані з посиленням некротичної загибелі клітин та лімфоцитарно-макрофагальною взаємодією у досліджуваному органі, що призводить до появи значного пулу плазматичних клітин.

Таким чином, введення Кон А мишам призводило до виникнення гострого запального процесу в печінці. Гістологічні дослідження показали, що при Кон А-індукованому гепатиті насамперед спостерігалися процеси запального характеру в судинному руслі, за якими відбувалися морфологічні зміни в паренхімі. На тлі ранніх судинних запальних проявів у печінці реєструвалося істотне збільшення кількості клітин природного та адаптивного імунітету. Інфільтрація тканини печінки лейкоцитами є характерною морфологічною рисою аутоімунних захворювань органа [1,3,6,15]. Вважають, що, імуноопосередковане пошкодження підтримується повторюваними циклами безперервної міграції, утримання, виживання і загибелі ефektorних лейкоцитів [9,17]. У дослідженнях останніх років отримані суперечливі дані, що стосуються ролі нейтрофілів при гострому Кон А-індукованому гепатиті. Так, встановлено [15], що протягом декількох годин після введення препарату збільшується кількість макрофагів і нейтрофілів у печінці. Деплеція нейтрофілів при Кон А-гепатиті призводила до зниження міграції Т-лімфоцитів-хелперів (СД 4⁺) в печінку і значного зменшення її пошкодження. Це підтверджує дані про те, що нейтрофіли, які в багатьох патологічних умовах є першим типом клітин, що мігрують у вогнище запалення, є ключовими в залученні інших лейкоцитів. З іншого боку, не виявлено кореляції ступеня ураження печінки та кількості інфільтруючих її нейтрофілів при дії Кон А на мишей, дефіцитних за молекулами адгезії

L-селектину та ICAM-1 [18].

На моделі імунного запалення печінки Т-клітинного генезу нами встановлено, що в ранній період (2-6 год) істотно зростала інфільтрація печінки клітинами-ефекторами запалення нейтрофілами з подальшим збільшенням кількості клітин адаптивного імунітету - лімфоцитів. Ці результати свідчать на користь припущення, що інфільтрація і активація нейтрофілів може бути суттєвим патогенетичним механізмом на початковій стадії розвитку захворювань печінки, опосередкованих Т-клітинами. Надалі активовані нейтрофіли сприяють збільшенню інфільтрації лімфоцитів та моноцитів і у досліджуваному органі створюються передумови для розвитку аутоімунного ушкодження. Іншим важливим патогенетичним фактором при гепатитах може бути некроз клітин, що циркулюють в крові і інфільтрують печінку. Введення Кон А посилює загибель клітин природного та адаптивного імунітету як у печінці, так і в імунокомпетентних органах [13,16,19]. Також виявлено підвищення активності ефекторного апоптотичного ферменту каспази-3, що було пов'язано, зокрема, з інфільтруючими печінку лімфоцитами, які піддаються апоптотичній активаційноіндукованій клітинній загибелі [20]. У наших попередніх дослідженнях [13,16] спостерігалось зростання некрозу лейкоцитів на тлі посиленої інфільтрації ними тканини печінки, ще до настання виражених ушкоджень гепатоцитів. Ми припускаємо, що некроз, який посилюється при розвитку запальної реакції, і вихід у тканину внутрішньоклітинного вмісту (все це, в свою чергу, має прозапальні і пошкоджувальні властивості), може за типом позитивного зворотного зв'язку додавати істотний внесок в пошкодження печінки. Посилення некротичної загибелі клітин в поєднанні з ефективною лімфоцитарно-макрофагальною взаємодією призводить до появи значної кількості плазматичних клітин у печінці, що вказує на розвиток імунної відповіді на власні антигени.

ВИСНОВКИ

1. Гістологічні дослідження показали, що першими при Кон А-індукованому імунному гепатиті відбувалися процеси запального характеру в судинному руслі, до яких пізніше приєднувалися морфологічні зміни в паренхімі печінки.

2. Виявлено значне посилення міграції лейкоцитів у печінку, що супроводжувалося збільшенням дифузної інфільтрації та змінами якісного складу інфільтратів, причому спочатку істотно зростала нейтрофільна інфільтрація і лише потім – лімфоцитарна.

3. Встановлено, що в динаміці КонА-індукованого гепатиту змінювався кількісний склад інфільтратів з утворенням багатоклітинних лімфоцитарно-макрофагальних з наявністю плазмоцитів.

4. Отримані результати дають підставу припускати, що розвиток аутоімунного гепатиту значною мірою опосередкований інфільтрацією тканини печінки клітинами природного й адаптивного імунітету, що створює передумови для імунної відповіді на власні антигени.

5. Урахування патоморфологічних особливостей динаміки КонА-індукованого гепатиту сприятиме вдосконаленню терапевтичних підходів при запальних захворюваннях печінки Т-клітинного генезу.

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

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ В ДИНАМИКЕ КОНКА-НАВАЛИНА-ИНДУЦИРОВАННОГО ГЕПАТИТА

Изучали повреждение ткани печени, ее инфильтрацию клетками естественного и адаптивного иммунитета в динамике КонА-индуцированного гепатита у мышей. Использовали полуколичественный метод оценки повреждения микроциркуляторного русла и паренхимы, исследовали лейкоцитарную инфильтрацию печени и клеточный состав инфильтратов. Первичная реакция печени на введение КонА заключалась в изменениях воспалительного характера в сосудистом русле, за которыми следовали нарушения в паренхиме. Выявлено значительное усиление миграции лейкоцитов в печень, причем вначале

возрастала нейтрофильная инфильтрация с максимумом на 6-й час ($63,9 \pm 4,6\%$, $P < 0,001$ относительно контроля), а затем - лимфоцитарная с образованием многоклеточных лимфоцитарно-макрофагальных инфильтратов (62% через 48 ч в сравнении с 6-часовым экспериментом) и существенным количеством плазматических клеток (4,9%, $P < 0,05$ сравнительно с 6-часовым экспериментом). Полученные результаты дают основание предполагать, что усиленная инфильтрация тканей печени лейкоцитами, в частности лимфоцитами и моноцитами, в сочетании с возрастанием некротической гибели, создает предпосылки для эффективного межклеточного взаимодействия и иммунного ответа на собственные антигены. Это может быть существенным патогенетическим механизмом при развитии аутоиммунных заболеваний печени.

Ключевые слова: экспериментальный иммунный гепатит; конканавалин А; лимфоцитарная инфильтрация; морфология печени.

S.I. Pavlovych, N.V. Makogon, N.G. Grushka, T.M. Bryzgina, R.I. Janchiy

MORPHOLOGICAL CHANGES IN MICE LIVER IN DYNAMICS OF CONCAVALIN A - INDUCED HEPATITIS

The injure of the liver tissue and its infiltration by cells of the innate and adaptive immunity in dynamics of Con A-induced hepatitis in mice was studied. The semiquantitative method of damage rate of microcirculation channel and liver parenchyma was used, leukocyte liver infiltration and cellular composition of infiltrates were investigated also. Primary liver reaction to the Con-A was the inflammatory changes in the vascular bed, followed by disturbances in the parenchyma. The sufficient increasing of leukocyte migration to the liver was revealed. Besides, the neutrophile infiltration was increased first with a maximum at 6 hours of the experiment ($63,9 \pm 4,6\%$, $p < 0,001$ to the control level), and then the lymphocyte infiltration was increased with creation of manycellular lymphocyte-macrophage infiltrates (62% at 48 hours comparing to 6 hours of experiment) and sufficient quantity of plasma cells population (4,9%, $p < 0,05$ comparing to 6 hours of experiment). The obtained data gives the base to suggest that the elevated infiltration of liver tissue by leukocytes, particularly by lymphocytes and monocytes, together with necrotic death increasing creates the conditions for effective intracellular interaction and immune response to autoantigenes. This can be the essential pathogenic mechanism of development of autoimmune liver diseases.

Key words: experimental immune hepatitis; concanavalin A; leukocyte infiltration; liver morphology.

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

REFERENCES

1. Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, Tacke F. The

concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim.* 2015 Apr; 49(1 Suppl):12-20.

2. Ponezheva JB. Clinical and immunological aspects of pathogenesis of chronic hepatitis C and ways to optimize the therapy. [dissertation]. Nalchik: 2011. [Russian].
3. Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(21): 3306 -12.
4. Tieg G. Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury. *Z Gastroenterol.* 2007; 45(1): 63 -70.
5. Wang HX, Liu M, Weng SY et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012 Jan 14;18(2):119-25.
6. Hu B, Zou Y, Liu S et al. Salidroside attenuates concanavalin A-induced hepatitis via modulating cytokines secretion and lymphocyte migration in mice. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:314081.
7. Massaguer A, Perez-Del-Pulgar S, Engel P et al. Concanavalin A-induced injury is severely impaired in mice deficient in P-selectin. *J Leukoc Biol.* 2004; 72 (2): 262-70.
8. Obernihin SS Morphological changes of the immune system in Concanavalin A-induced hepatitis. [dissertation]: Moscow. 2005 [Russian].
9. Magrone T, Jirillo E. Mechanisms of neutrophil-mediated disease: innovative therapeutic interventions. *Curr Pharm Des.* 2012;18(12):1609-19.
10. Miyake Y, Yamasaki S. Sensing necrotic cells. *Adv Exp Med Biol.* 2012;738:144-52.
11. Commission Recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. *Off J Europ Union.* 2007; 50, № L197; 1–89.
12. Kamishnikov VS. Handbook of clinical and biochemical studies and laboratory diagnosis. Moscow: Medpress-inform; 2009.
13. Pavlovich SI, Bryzgina TM, Makogon NV et al. Infiltration of the liver by cells of innate and adaptive immunity and their destruction in development of experimental immune concanavalin-A-induced hepatitis. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2011; 21(6): 42-48.
14. Jaruga B, Hong F, Kim W, Gao B. IFN-gamma/STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 207, (5):1044 – 52.
15. Bonder C, Ajuebor M, Zbutnuik L et al. Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin A – induced hepatitis. *J Immunol.* 2004; 172: 45 – 53.
16. Makogon NV, Pavlovych SI, Bryzgina TM, Aleksyuk LI, Sukhina VS, Grushka NH, Alekseyeva IM. Proliferation and death of liver mononuclear cells in immune lesions induced by concanavalin A and anti-liver antibodies in mice. *Fiziol Zh.* 2008; 54(6): 49-57.
17. Eksteen B, Afford S, Wigmore S et al. Immune-mediated

- liver injury. *Semin Liver Dis.* 2007; 27(4): 351 – 66.
18. Kawasuji A, Hasegawa M, Horikawa M et al. L-selectin and intercellular adhesion molecule – 1 regulate the development of Concanavalin A – induced liver injury. *J Leukoc Biol.* 2006; 79, (4): 696 – 705.
19. Fayad R, Sennello J, Kim S et al. Induction of thymocyte apoptosis by systemic administration of concanavalin A in mice: role of TNF- α , IFN- γ and glucocorticoids. *Eur J Immunol.* 2005; 35(8): 2304 – 12.
20. Biburger M, Tiegs G. α -Galactosylceramide – induced liver injury in mice is mediated by TNF- α but independent of Kupffer cells. *J Immun.* 2005;175:1540 – 50.

Матеріал надійшов до редакції 13.02.2015

Вміст загального імуноглобуліну Е у крові щурів різного віку при алергічному дерматиті

А.І. Березнякова, О.Д. Жемела, В.Ф. Черемісіна

Національний фармакологічний університет МОЗ України, Харків,
e-mail: marina.ostapets.22@mail.ru

Вивчено зміни вмісту загального імуноглобуліну Е у здорових щурів різного віку та при алергічному дерматиті. Показано вірогідно підвищені середній вміст цього білка у щуренят препубертатного періоду, молодих, зрілих та старих тварин, що може мати діагностичне та прогностичне значення при алергічних захворюваннях.

Ключові слова: алергічний дерматит; щури-самці різного віку; імуноглобулін Е.

ВСТУП

Нині кількість алергічних захворювань значно зростає. Цьому сприяють фактори навколишнього середовища, незбалансоване харчування, добавки модифікованих сполук, неконтрольоване використання антибіотиків, зростаюча урбанізація, зміни способу життя, стресові ситуації, збільшення кількості людей з асоціальною поведінкою (нарко- та алкозалежні), з патологією органів травлення, а також генетично зумовлена схильність [1, 2]. Високий вміст у крові загального імуноглобуліну Е (IgE) спостерігається при багатьох алергічних захворюваннях, які спричинені IgE-антитілами (алергічний риніт, екзогенна бронхіальна астма, atopічний дерматит, алергічна гастроентеропатія, системна анафілаксія, кропив'янка, ангіоневротичний набряк, генетично детерміновані імунодефіцити тощо) [3, 4]. Тому визначення вмісту цього білка у пацієнтів з алергічними захворюваннями є важливою умовою для діагностики та прогнозування згаданої патології [5].

Оскільки розповсюдженість алергічного дерматиту серед дітей становить до 20%, а серед дорослих – до 10% [1], і захворювання шкіри та підшкірної клітковини в Україні © А.І. Березнякова, О.Д. Жемела, В.Ф. Черемісіна

постійно збільшуються [6], мета нашої роботи – визначити вміст IgE в сироватці крові здорових щурів різного віку та при гострому алергічному дерматиті.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 80 білих нелінійних щурах-самцях різного віку, які були розподілені на 8 груп по 10 тварин у кожній: 4 групи здорових щурів та 4 – з алергічним дерматитом. 1-ша і 5-та групи – щуренята препубертатного періоду масою 50 – 60 г; 2-га і 6-та групи – молоді щури масою 100 – 120 г; 3-тя та 7-ма групи – зрілі тварини масою 200 – 220 г, та 4-та і 8-ма групи – старі щури масою 350 – 400 г. Алергічний дерматит викликали за методом Залкан, Ієвлевої [7] введенням 2,4-динітрохлорбензолу (ДНХБ). Спонтанна запальна реакція (реакція спалювання) з тотальним некрозом епідермісу та утворенням великих субепідермальних міхурців розвивалася на 8-му добу. Вміст IgE визначали методом імуноферментного аналізу з застосуванням моноклональних антитіл (ООО НПО «Альт», Росія), використовували кров із хвостової вени щурів, яку забирали вранці натще (тварин у клітках на ніч лишали залишків їжі та води). Статис-

тичну обробку результатів проводили за допомогою прикладної програми «Statistica 6,0». Результати порівнювали за критерієм t Стьюдента з поправкою Бонфероні [8, 9].

Усі дослідження проводили відповідно до національних «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2011), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), та схвалені 1-м Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що у молодих щурів середній вміст загального IgE перевищує ($P < 0,001$) аналогічний показник у інтактних щуренят препубертатного віку в 30 разів (таблиця). Крім того, концентрація загального IgE в групі щуренят препубертатного віку була нижче ($P < 0,001$), ніж у зрілих (в 60 разів) та старих (в 190 разів) щурів відповідно. Вірогідною була і різниця показників між іншими віковими групами.

IgE у щурів з алергічним дерматитом (див. таблицю) на тлі підвищення вмісту IgE зберігалася вірогідна різниця між віковими групами.

Порівняно зі здоровими тваринами у щурів з алергічним дерматитом вміст IgE ($P \leq 0,001$) підвищувався: у щуренят препубертатного періоду в 2,25 рази, у молодих щурів – в 2 рази, у дорослих тварин – у 1,5 рази, у старих щурів – в 1,2 рази.

Вміст загального імуноглобуліну E (мО/л) в сироватці крові здорових щурів різного віку та з алергічним дерматитом ($M \pm m$, $n=10$)

Щури різного віку	Маса тіла, г	Групи щурів	
		здорові	хворі
Препубертатні	50-60	0,20±0,026	0,45±0,029
Молоді	100 – 120	6,0±0,47*	12,0±0,72*
Зрілі	200 – 220	12,0±0,56**	18,5±1,12**
Старі	350 – 400	38,0±1,03***	44,8±1,25***

$P \leq 0,001$ відносно значень щуренят препубертатного віку, ** – відносно молодих щурів, *** – відносно зрілих щурів.

Більшість тварин з відтвореним алергічним дерматитом мали значення загального IgE вище від верхніх меж норми відповідних вікових груп. Слід зазначити, що щури, у яких концентрація загального IgE перевищувала верхні межі норми більше ніж у 1,5–2 рази, як правило, мали більш тяжку клінічну картину дерматиту. Разом з тим у деяких щурів (один чи два з кожної групи) з вираженим алергічним дерматитом, у котрих або визначали «сліди» IgE, або його не було зовсім.

Відсутність специфічного IgE в сироватці крові у окремих щурів і розвиток у них алергічного дерматиту, з нашої точки зору, не виключає можливої участі в патогенезі захворювання Ig E-залежного механізму, оскільки місцевий синтез цього білка та сенсибілізація тканинних базофілів відбувається і за відсутності специфічних IgE в крові (наприклад, при алергічному риніті [4]). Окрім того, антитіла інших класів, специфічних для цього алергену, особливо класу IgG, можуть бути причиною псевдонегативних результатів.

Таким чином, наші дослідження показали збільшення концентрації IgE з віком тварин. Аналогічних результатів у науковій літературі ми не зустрічали. Однак є поодинокі праці, які свідчать про підвищення вмісту загального IgE у людей з віком [11, 12]. Отримані нами результати про підвищення, інколи різке (при тяжкій клінічній картині захворювання), вмісту загального IgE у щурів різного віку, особливо у щуренят препубертатного періоду та у молодих щурів, зумовлюють діагностичне значення Ig E в патогенезі дерматита, підтверджуючи алергічну етіологію захворювання.

ВИСНОВКИ

1. Вміст загального ІgЕ підвищується з віком як у здорових, так і хворих тварин. Його концентрація значно збільшується при алергічному дерматиті у всіх вікових групах тварин.

2. Відсутність загального ІgЕ в сироватці крові при патології у окремих щурів будь-якого віку не виключає можливості участі в патогенезі захворювання ІgЕ-залежного механізму.

3. Найбільш інформативним в діагностичному та прогностичному значенні є визначення вмісту загального ІgЕ у щуренят препубертатного періоду та молодих щурів в умовах алергічного дерматиту при обов'язковому порівнянні з показниками здорових тварин.

**А.И. Березнякова, О.Д. Жемела,
В.Ф. Черемисина**

СОДЕРЖАНИЕ ОБЩЕГО ИММУНОГЛОБУЛИНА Е У КРОВИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ

Изучено содержание и значение общего иммуноглобулина Е у крыс разного возраста при аллергическом дерматите. Показано существенное повышение среднего содержания этого белка у крысят препубертатного возраста, зрелых и старых животных, что может иметь диагностическое и прогностическое значение данного показателя при аллергических заболеваниях.

Ключевые слова: аллергический дерматит; крысы-самцы разного возраста; иммуноглобулин Е

A.I. Bereznyakova, O.D. Jemela, V.F. Cheremisina

THE LEVEL OF GENERAL IMMUNOGLOBULIN E (IGE) IN RATS OF DIFFERENT AGE WITH ATOPIC DERMATITIS

In the article we studied the level of general immunoglobulin E in rats of different age with atopic dermatitis. On the basis of the obtained results characteristics are given of levels the

general IgE in rats of different age and it's increasing with age. In rats which had been experimentally reproduced atopic dermatitis the average value of general IgE was increased in prepubertal rats, mature and old animals significantly ($p < 0,001$). That can have a diagnostic and predictive value of this indicator at atopic dermatitis.

Key words: allergic dertatitis; rat males of different ages; immunoglobulin E.

REFERENCES

1. Volkoslavskaya VN, Hutnev AL. Condition morbidity of pathology of the skin and infections are sexually transmitted, in the population of Ukraine over the past decade. Clin immunology, allergology, infectology. 2012;1:19–22.
2. Cocco R, Sole D. Patch test in the diagnosis of food allergy. Allergol. Immunopathol.2009;37(4):205–7.
3. Regeda MS, Kresiun VJ, Regeda MM. The state of oxidant and antioxidant systems on bronchus of guinea pigs in conditions development the experimental pneumonia and correction that disorders by corvitin. Odessa Med J.2013;1:21–4. [Ukrainian].
4. Novak N. New insights into the mechanism and management of allergic disease: atopic dermatitis. Allergy.2009;64(2):265–75.
5. Prylutskyi AS, Mailian EA, Kovalenko VV. The levels of immunoglobulin E in the serum blood of healthy persons different age and sick persons with individual disease. J Health Child.2006;2(2):35–7.
6. Berezovskiy VA., Bogomolec OV., Derkach NN. About question of endogen regulation of physiological regeneration the human skin. Ukr J Derm Vener Cosmet.2011;42(3):9–14. [Ukrainian].
7. Zalkan P, Ievleva E. Effect of synthetic detergents on the reactivity skin of guinea pigs: actual problems of occupational dermatology. Moscow; 1965. [Russian].
8. Hmurman VE. Probability theory and medical statistics. Moscow: High School;2001. [Russian].
9. Lopach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statistic in the science and business. Kyiv: Morion, 2002. [Ukrainian]
10. Iancovici Kidon M, Stein M, Geller-Bernstein C. et al. Serum immunoglobulin E levels in Israeli-Ethiopian children: environment and genetics. Issr Med Assoc J.2005;7(12):799–802.
11. Simoni M, Biavati P, Baldacci S. et al. The Po River Delta epidemiological survey: reference values of total serum IgE levels in a normal population sample of North Italy (8-78 yrs). Eur J Epidemiol.2001;17(3):231–9.

*Матеріал надійшов
до редакції 13.05.2015*

Роль гістаміну в механізмах антибіотиквикликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки

Т.В. Довбинчук, Т.М. Червінська, Л.В. Закордонець¹, Г.М. Толстанова

Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка;

¹Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ; e-mail: gtolstanova@gmail.com

Вперше досліджено роль гістаміну та H1-гістамінових рецепторів у механізмах цефтріаксон-викликаного діареї у щурів-самців лінії Вістар (180-250 г). Визначали потік води та електролітів через епітелій товстої кишки методом перфузії ізольованої ділянки in vivo, за дії цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово), гістаміну (1,8; 3,6; 7,2 мг/кг, внутрішньоочеревинно; і 3,6 мг·кг⁻¹·год⁻¹, внутрішньовенно) та лоратадину (1,7 мг/кг, per os). Гістамін при внутрішньовенному введенні, аналогічно до цефтріаксону, чинить просекреторну дію на потік води та іонів натрію. Блокада H1-гістамінових рецепторів лоратадином попереджає клінічні прояви цефтріаксонвикликаного діареї, що супроводжувалося відновленням сумарного потоку води та калію через епітелій товстої кишки. Лоратадин може бути рекомендований для попередження антибіотикасоційованої діареї не інфекційної етіології.

Ключові слова: товста кишка; цефтріаксон; гістамін; діарея; лоратадин.

ВСТУП

За даними літератури, антибіотикасоційована діарея (ААД) розвивається у пацієнтів, які лікувалися виключно ампіциліном (5-10%), амоксициліном, клавуланатом (10 до 25%), цефіксимом (15 до 20 %) та які приймали цефалоспорицини, фторхінолони, азитроміцин, кларитроміцин, еритроміцин та тетрациклін (2-5%) [1]. Механізм, що лежить в основі ідіопатичної (не інфекційної природи) ААД до кінця не з'ясований, зокрема не встановлено роль транспортерів води та електролітів епітелію товстої кишки. Крім того, дані про вплив антибіотиків на транспорт води електролітів в кишечнику були отримані при безпосередньому їх додаванні в омиваючий розчин у дослідях *in vitro* та *in situ* [2-5] і не враховували системний ефект.

Одним із найбільш живаних антибіотиків є цефтріаксон (III покоління цефало-

споринів). Його призначають при сепсисі, ускладнених гострих респіраторних захворювань, менінгітах, інфекціях черевної порожнини тощо. Встановлено, що цефтріаксон викликає діарею у 30% пацієнтів. В дослідях *in vivo* на щурах, доведено, що цефтріаксон-зумовлена діарея спричинена зниженням рівня всмоктування води через епітелій товстої кишки [6].

Відомо, що у пацієнтів на фоні дисбіотичних процесів, які розвиваються при застосування антибіотиків, виникають прозапальні зміни в слизовій оболонці кишечника [7-9], що може, у свою чергу, викликати розлади транспортної функції епітелію.

Як відомо, тучні клітини залучені до процесів запалення в кишечнику [10]. Їх дегрануляція під дією нейромедіаторів та цитокінів є маркером запального процесу [11]. Вивільняється гістамін під час дегрануляції

тучних клітин [12]. Підвищений його вміст виявлено як у слизі, так і у вільному стані просвіту шлунково-кишкового тракту пацієнтів з запальними захворюваннями кишечника [13, 14]. Встановлено, що H1-гістамінові рецептори беруть участь у регуляції транспорту іонів хлору через епітелій товстої кишки [15], а гістамін є важливим просекреторним агентом [16]. Нами показано, що застосування цефтріаксону призводить до дегрануляції тучних клітин слизової оболонки товстої кишки щурів [6]. Роль гістаміну та його рецепторів, зокрема H1-рецепторів, як потенційних чинників розвитку ААД не досліджувалося.

Метою нашої роботи було дослідити вплив антибіотика цефтріаксону та з'ясувати роль H1-гістамінових рецепторів у механізмах цефтріаксонвикликаної діареї.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 76 білих лабораторних щурах-самцях масою 180-250 г, яких утримували в стандартних умовах віварію при сталій температурі та вологості повітря. Експерименти проводили згідно з етичними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики, міжнародним угодам, національному законодавству у цій галузі [17] та біоетичною комісією ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Перед початком експерименту щури були розподілені на 6 груп. До 1-ї (n=19) та 5-ї (n=6) групи (контроль) ввійшли щури, яким вводили воду для ін'єкцій внутрішньом'язово 0,1 мл та перорально (*per os*) 1 мл відповідно; до 2-ї (n=14) - 50 мг/кг цефтріаксон внутрішньом'язово ("Артеріум", ВАТ "Київ-медпрепарат", Україна); до 3-ї групи (n=3) - *per os* лоратадин (1,7 мг/кг) з 0,1 мл води для ін'єкцій; до 4-ї (n=5) - лоратадин одночасно з цефтріаксоном. Тваринам 6-ї групи (n=7) робили ін'єкцію гістаміну внутрішньовенно в дозі 3,6 мг·кг⁻¹·год⁻¹ через годину від початку перфузії (для визначення вихідного рівня

транспорту води та електролітів). Результати представлено як значення сумарних потоків за 20 хв. Контрольній групі щурів через годину перфузії внутрішньовенно вводили 0,1 мл води для ін'єкцій.

На 6-ту добу після початку експерименту (початок введення антибіотика - перший день експерименту) визначали сумарний транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки методом перфузії ізольованої ділянки кишки *in vivo*.

Сумарний транспорт води через епітелій товстої кишки щурів досліджували методом перфузії ізольованої ділянки *in situ* [18]. Перед початком експерименту щурів утримували на голоді з вільним доступом до води протягом 12 год. Наркотизували їх уретаном ("Sigma Chemical Co". США) з розрахунку 1,15 г/кг (внутрішньоочеревинно). Сталу температуру тіла щурів (37°C) підтримували за допомогою грілки. Для попередження респіраторної недостатності виконували трахеотомію. Оперативні втручання проводили за попередньо описаною та модифікованою методикою [19]. Перфузійний розчин подавали за допомогою багатоканального перистальтичного насоса ("Minipuls 3", Gilson®), з постійною швидкістю 0,18-0,2 мл/хв (37°C). Ізотонічний розчин Кребса-Хенслайта використовували як перфузійний (ммоль/л): NaCl - 117; KCl - 5,9; NaHCO₃ - 24,8; CaCl₂ - 2,5; MgCl₂ - 1,2; NaH₂PO₄ - 1,2; глюкоза - 5,5 (рН 7,4) до якого додавали неабсорбований маркер феноловий червоний (20 мг/л).

Після 60-хвилинної перфузії (еквілібраційний період) відтікаючий розчин збирали впродовж 180 хв, через кожні 20 хв. Результати, отримані за кожний період, усереднювали та виражали у мікролітрах (для води) або у мікромолях на 1 г сухої маси за 1 хв. Наприкінці експерименту щурів умертвляли введенням летальної дози наркозу. Сегмент кишки, що перфузувався, швидко видаляли, розрізали в повздовжньому напрямку та висушували в термостаті (60°C, 20 год) для отримання сухої маси в грамах.

Для розрахунку сумарного потоку (J_{net}) води вимірювали вміст неабсорбованого маркера фенолового червоного колориметричним аналізом на спектрофотометрі (Synergy HT BioTek) при трьох довжинах хвиль 520, 560 та 600 нм для визначення поправки на неспецифічну абсорбцію [18] та сумарний потік води вираховували за формулою [19, 20]:

$$J_{\text{net води}} = \frac{v \cdot \left(1 - \frac{C_n}{C_a}\right)}{W}, \text{ де}$$

$J_{\text{net води}}$ – сумарний потік води (мкл/хв·г);

v – швидкість подачі перфузату (мл/хв);

C_n і C_a – концентрація фенолового червоного в перфузійному і в аспірованому розчині відповідно;

W – суха маса сегмента кишки (г).

Концентрацію іонів хлору у перфузаті вимірювали на іонометрі (ЭВ-74) з використанням іонселективного хлорного електрода. Концентрацію натрію та калію визначали за допомогою полум'яно-фотометричного аналізатора рідин (ПАЖ-2). Позитивний результат свідчив про всмоктування, негативний – про секрецію.

Аналіз результатів проводили з використанням програми Statistica 8.0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Уїлка. Для порівняння вибірок сумарних потоків води та електролітів підраховували середнє арифметичне та похибку середнього арифметичного. Вірогідність різниці між порівнюваними групами оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

П'ятидобове введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг викликало діарею у 6-12% шурів (рис. 1), що супроводжувалася зменшенням сумарного рівня всмоктування води з $36,76 \pm 27,73$ до $19,30 \pm 20,70$ мкл/хв*г ($P < 0,001$), іонів натрію з $18,87 \pm 18,55$ до $13,44 \pm 12,53$ мкмоль/хв·г

($P < 0,05$), та секрецією калію з $-1,38 \pm 0,76$ до $-1,03 \pm 0,52$ мкмоль/хв·г ($P < 0,001$). Не спостерігалось змін сумарного потоку іонів хлору (з $23,43 \pm 22,99$ до $21,25 \pm 11,27$ мкмоль/хв·г) через епітелій товстої кишки. Зважаючи на те, що цефтріаксон призводить до дегрануляції тучних клітин слизової оболонки товстої кишки [6], ми порівняли його ефект з гістаміном. Слід відмітити, що при внутрішньоочеревинному введенні гістамін в дозах 1,8; 3,6 чи 7,2 мг/кг не викликав статистично значущих змін в транспорті води через епітелій товстої кишки шурів.

Внутрішньовенне введення гістаміну в дозі $3,6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$ спричинювало ($P < 0,05$) зменшення абсорбції води, а в деяких випадках навіть її реверсію на секрецію. Ефект розвивався через 60 хв після початку інфузії гістаміну і тривав впродовж всього експерименту. Також спостерігалось вірогідне зниження всмоктування іонів натрію та підвищення секреції калію вже через 40 хв після початку інфузії (рис. 2). Статистично вірогідних змін у рівні всмоктування іонів хлору не зареєстровано. При внутрішньовенному введенні, на відміну від внутрішньоочеревинного, одночасно спостерігається висока концентрація гістаміну в крові, яка характерна для запальних процесів. За рівнем всмоктування води, іонів натрію та хлору ефект гістаміну збігається з цефтріаксоном,

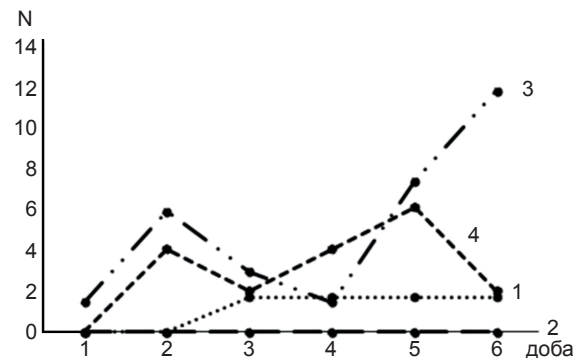


Рис. 1. Розвиток діареї у шурів на фоні 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг внутрішньов'язово) та лоратадину (1,7 мг/кг, per os): 1 – контроль, 2 – лоратадин, 3 – цефтріаксон, 4 – цефтріаксон і лоратадин

що може опосередковано свідчити про можливу участь медіатора в механізмах розвитку діареї на фоні введення препарату.

У дослідах на ізольованих препаратах товстої кишки людини було показано, що саме H1, а не H2 і H3-гістамінові рецептори опосередковують просекреторну дію гістаміну на транспорт електролітів через епітелій товстої кишки [16]. Для перевірки гіпотези про те, що ефект цефтріаксону на потік води та електролітів пов'язаний з виділенням гістаміну з тучних клітин, була проведена серія експериментів з сумісним введенням антибіотика та блокатора H1-гістамінових рецепторів лоратадину (див. рис. 1). За дії цефтріаксону діарея розвивалась у 6-12% щурів, тоді як на фоні лоратадину – лише у 2-4%. Ці зміни супроводжувалися підвищенням сумарного рівня всмоктування води (на 95,2%, $P < 0,01$) та секреції калію (на 42,4%, $P < 0,01$) порівняно з дією самого цефтріаксону та не

впливало на потік натрію та хлору (рис. 3).

Інкубація колоноцитів людини лінії T84 з гістаміном чи агоністом H1, але не H2-гістамінових рецепторів, стимулювала секрецію хлору. Цей ефект за механізмом схожий на реакцію карбахоліну і безпосередньо впливає підвищенням вмісту внутрішньоклітинного кальцію, активацією базолатеральних калієвих каналів і потенціюється цАМФ та цГМФ-залежними секретогогами [22]. У дослідженнях на ізольованій ділянці дистального відділу товстої кишки щурів, гістамін дозозалежно підвищував секреторний потенціал епітелію через вплив на хлорні і калієві канали апікальної та калієві канали базолатеральної мембран. Ця дія не залежала від вивільнення нейротрансмітерів чи простагландинів [15]. Активація H1-гістамінових рецепторів посилювала секрецію іонів хлору через епітелій товстої кишки мурчаків. Цей ефект залежав від вмісту простагландинів

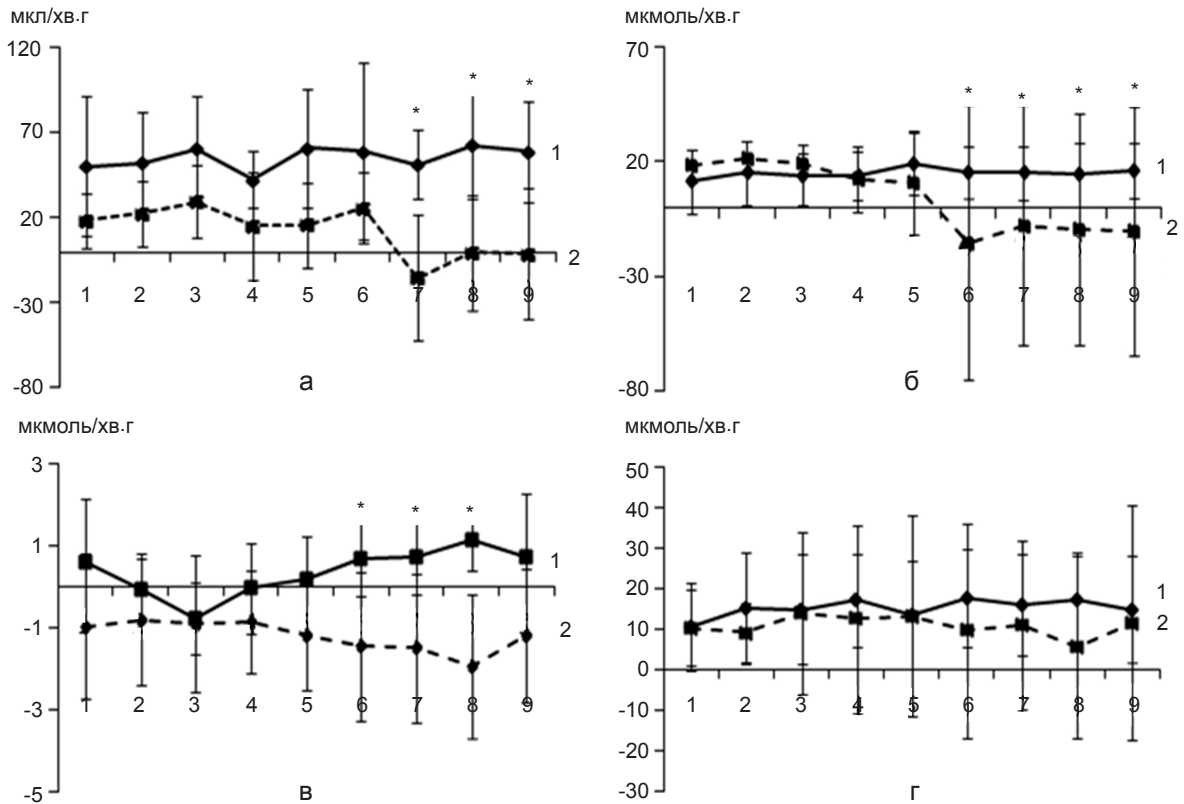


Рис. 2. Вплив гістаміну (3,6 мг·кг⁻¹·год⁻¹, внутрішньовенно) на сумарний потік води та іонів натрію, калію і хлору через епітелій товстої кишки: а – вода, б – натрій, в – калій, г – хлор, 1 – контроль, 2 – гістамін. * P < 0,05 відносно контролю

та інтактного стану ентеральних нейронів [21, 23]. Непрямий шлях впливу гістаміну на транспортну функцію епітелію товстої кишки може бути опосередкованим через метаболічне перетворення ейкозаноїдів [21, 24, 25].

Таким чином, гістамін здійснює просекреторний вплив на епітелій товстої кишки *in vitro*, але й досі залишається невідомим шлях його дії на транспорт води та електролітів *in vivo*. Адже всі дослідження були зроблені на ізольованих препаратах так само, як і дослідження впливу антибіотиків на транспорт води та електролітів. В умовах *in vivo* гістамін посилював секрецію води, іонів натрію, калію, але не викликав змін у транспорті хлору, подібно до результатів з 5-добовим введенням цефтріаксону. Це свідчить про відмінність механізмів дії останнього *in vivo* від дослідів *in vitro*, котрі залучають гістамін та H1-гістамінові рецептори.

Прийом антибіотиків може супроводжуватися запаленням у слизовій оболонці мишей

[9]. При цьому гістамін бере безпосередню участь у здійсненні реакцій, що супроводжують запалення у товстій кишці. Як було показано у дослідях на щурах [26], де вивчалися наслідки гострого коліту, H1- та H4 - гістамінові рецептори залучені у забезпечення вісцеральної гіперчутливості після розвитку запалення, та була показана експресія H1 - гістамінових рецепторів у дорсальних гангліях, блокада яких пригнічувала вісцеральну гіперчутливість. Цефаклор (антибіотик II покоління цефалоспоринов) може опосередковано через ССКА рецептори посилювати евакуаторну функцію шлунку за рахунок капсаїцинчутливих аферентних зв'язків [27]. Тобто можна зробити припущення, що цефтріаксон впливає на моторну функцію товстої кишки, посилюючи її та, відповідно, зменшуючи час перебування хімусу в просвіті кишки та зменшуючи реабсорбцію води та електролітів.

Таким чином, ААД, викликана цефтріаксоном, може бути опосередкована, принаймні

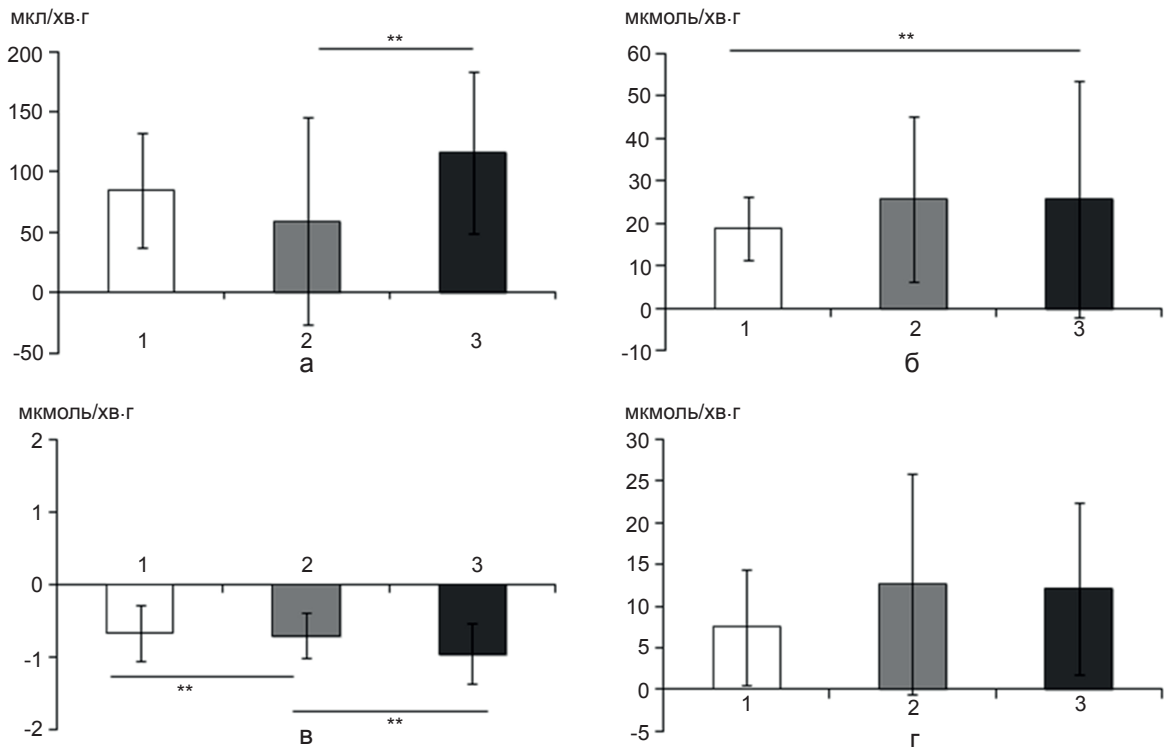


Рис. 3. Рівень сумарного потоку води та електролітів натрію, калію, хлору після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово) та лоратадину (1,7 мг/кг, *per os*): а – вода, б – натрій, в – калій, г – хлор; 1 – лоратадин, 2 – цефтріаксон, 3 – цефтріаксон і лоратадин. ** P < 0,01 відносно контролю

частково, вивільненим з тучних клітин гістаміном, ефект якого спрямований так само, як і антибіотика: зниження рівня всмоктування води та натрію. А блокада H1 - гістамінових рецепторів лоратадином попереджала просекреторну дію цефтріаксону на потік води та іонів натрію. Отже, у клінічній практиці доречним може бути призначення лоратадину не тільки для запобігання алергічним реакціям, але і для попередження розвитку діареї.

ВИСНОВКИ

1. Гістамін чинить аналогічну до цефтріаксону (просекреторну) дію на транспорт води та натрію через епітелій товстої кишки шурів.

2. Блокада H1-гістамінових рецепторів лоратадином попереджає клінічні прояви цефтріаксонвикликаної діареї, що супроводжувалося відновленням показників сумарного потоку води та калію через епітелій товстої кишки шурів.

3. Лоратадин може бути рекомендований для попередження ААД не інфекційної етіології.

**Т.В. Довбинчук, Т.М. Червинская,
Л.В. Закордонец¹, А.Н. Толстанова**

РОЛЬ ГИСТАМИНА В МЕХАНИЗМЕ АНТИБИОТИКВЫЗВАННЫХ НАРУШЕНИЙ ТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ ЭПИТЕЛИЯ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Впервые исследована роль гистамину и H1-рецепторов в механизмах цефтриаксонвызванной диареи у крыс-самцов линии Вистар (180-250 г). Исследование потока воды и электролитов через эпителий толстой кишки методом перфузии изолированного участка *in vivo*, фоне действия цефтриаксона (50 мг/кг, внутримышечно), гистамина (1,8; 3,6; 7,2 мг/кг, интраперитонеально, и 3,6 мг·кг⁻¹·ч⁻¹, внутривенно) и лоратадина (1,7 мг/кг, *per os*). Гистамин при внутривенном введении, аналогично цефтриаксону, производит просекреторное действие на поток воды и натрия. Блокада H1-рецепторов лоратадином предупреждает клинические проявления цефтриаксонвызванной диареи, сопровождалось восстановлением показателей суммарного потока воды и калия через эпителий толстой кишки крыс. Лоратадин может быть рекомендован для предупреждения антибиотикассоциированной диареи не инфекционной этиологии.

Ключевые слова: толстая кишка; цефтриаксон; гистамин; диарея; лоратадин.

**T.V. Dovbynchuk, T.M. Chervinska,
L.V. Zakordonets¹, G.M. Tolstanova**

THE ROLE OF HISTAMINE IN THE MECHANISM OF ANTIBIOTIC-INDUCED CHANGES IN COLONIC ION AND WATER TRANSPORT

The first time the role of histamine and H1-histamine receptors in the mechanisms of ceftriaxone-induced diarrhea in rats. Investigation of the flow of water and electrolytes through the epithelium of the colon performed male rats Wistar (180-250 g), isolated area by perfusion *in vivo*, for the actions of ceftriaxone (50 mg/kg intramuscularly), histamine (1,8; 3,6; 7,2 mg/kg, intraperitoneal, and 3,6 mg·kg⁻¹·h⁻¹ intravenously) and loratadine (1,7 mg/kg, *per os*). Histamine intravenous administration, similar to ceftriaxone, makes a pro-secretory effect on the transport of water and sodium. Blockade of H1-histamine receptors loratadine prevents clinical signs ceftriaxone-induced diarrhea that accompanied the restoration of total water flow indicators and potassium through the epithelium of the colon of rats. Loratadine can be recommended for the prevention of diarrhea antybiotykasotsiyovanoyi not infectious etiology. Key words: colon; ceftriaxone; histamine; diarrhea; loratadine.

Education and Research center «Institute of Biology» Taras Shevchenko National University of Kyiv;

¹*O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv*

REFERENCES

1. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med.* 2002 Jan 31;346(5):334–9.
2. Lemaire J, Maestracci D, Laprade R, Sauvé R. Mechanism of neomycin stimulation of D-glucose uptake in rabbit intestinal brush border membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Mar 23;686(1):119–29.
3. Roberts M, Hladky SB, Pickles RJ, Cuthbert a W. Stimulation of sodium transport by duramycin in cultured human colonic epithelia. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;259(3):1050–8.
4. Goldhill JM, Rose K, Percy WH. Effects of antibiotics on epithelial ion transport in the rabbit distal colon *in-vitro*. *J Pharm Pharmacol.* 1996 Jun; 48(6):651–6.
5. Percy WH, Christensen J. Antibiotic depression of evoked and spontaneous responses of opossum distal colonic muscularis mucosae *in vitro*: a factor in antibiotic-associated colitis? *Gastroenterology.* 1985 Apr;88(4):964–70.
6. Dovbynchuk T, Zakordonets L, Putnikov A, Vareniuk I, Tiapko O, Roslova N, Sergiychuk T, Lynchak O, Dzerzhynsky M, Beregova T, Tolstanova G Multidirectional effect of macrolide and cephalosporin antibiotics on colonic water transport in rats. *Fiziol. Zh.* 2015; 61(№6). [Ukrainian].

7. Bringiotti R, Ierardi E, Lovero R, Losurdo G, Leo A Di, Principi M. Intestinal microbiota: The explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease? *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014 Nov 15 [cited 2014 Nov18]; 5(4):550–9.
8. Kronman MP, Zaoutis TE, Haynes K, Feng R, Coffin SE. Antibiotic Exposure and IBD Development Among Children: A Population-Based Cohort Study. *Pediatrics.* 2012;130(4):e794–803.
9. Wlodarska M, Willing B, Keeney KM, Menendez a., Bergstrom KS, Gill N, et al. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infect Immun.* 2011;79(4):1536–45.
10. Hansbro PM, Hamilton MJ, Fricker M, Gellatly SL, Jarnicki AG, Zheng D, et al. Importance of mast cell Prss31/transmembrane tryptase/tryptase- γ in lung function and experimental chronic obstructive pulmonary disease and colitis. *J Biol Chem.* 2014 Jun 27;289(26):18214–27.
11. De Winter BY, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* Elsevier B.V.; 2012;1822(1):66–73.
12. Fox CC, Lazenby AJ, Moore WC, Yardley JH, Bayless TM, Lichtenstein LM. Enhancement of human intestinal mast cell mediator release in active ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1990 Jul;99(1):119–24.
13. Rampton DS, Murdoch RD, Sladen GE. Rectal mucosal histamine release in ulcerative colitis. *Clin Sci (Lond).* 1980 Nov;59(5):389–91.
14. Knutson L, Ahrenstedt O, Odland B, Hällgren R. The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1990 Apr;98(4):849–54.
15. Schultheiss G, Hennig B, Schunack W, Prinz G, Diener M. Histamine-induced ion secretion across rat distal colon: involvement of histamine H1 and H2 receptors. *Eur J Pharmacol.* 2006 Sep 28;546(1-3):161–70.
16. Keely SJ, Stack WA, O'Donoghue DP, Baird AW. Regulation of ion transport by histamine in human colon. *Eur J Pharmacol.* 1995 Jun 12;279(2-3):203–9.
17. The first national congress on bioethics. *Ezhenedelnyk PHARMACY.* 2001;308(37) (from 24.09.2001). [Ukrainian].
18. Sladen GE, Harries JT. Studies on the effects of unconjugated dihydroxy bile salts on rat small intestinal function in vivo. *Biochem Biophys Acta.* 1972;288(2):P.443–456.
19. Harries JT, Sladen GE. The effects of different bile salts on the absorption of fluid, electrolytes, and monosaccharides in the small intestine of the rat in vivo. *Gut.* 1972 Aug [cited 2015 Jul 27];13(8):596–603.
20. Schedl HP. Use of polyethylene glycol and phenol red as unabsorbed indicators for intestinal absorption studies in man. *Gut.* 1966;7(2):159–63.
21. Wang YZ, Cooke HJ, Su HC, Fertel R. Histamine augments colonic secretion in guinea pig distal colon. *Am J Physiol.* 1990 Mar;258(3 Pt 1):G432–9.
22. Wasserman SI, Barrett KE, Huott PA, Beuerlein G, Kagnoff MF, Dharmasathaphorn K. Immune-related intestinal Cl⁻ secretion. I. Effect of histamine on the T84 cell line. *Am J Physiol.* 1988 Jan [cited 2015 Jul 27];254(1 Pt 1):C53–62.
23. Cooke HJ, Nemeth PR, Wood JD. Histamine action on guinea pig ileal mucosa. *Am J Physiol.* 1984 Apr [cited 2015 Jul 27];246(4 Pt 1):G372–7.
24. Hardcastle J, Hardcastle PT. Involvement of prostaglandins in histamine-induced fluid and electrolyte secretion by rat colon. *J Pharm Pharmacol.* 1988 Feb;40(2):106–10.
25. Berschneider HM, Powell DW. Fibroblasts modulate intestinal secretory responses to inflammatory mediators. *J Clin Invest.* 1992 Feb;89(2):484–9.
26. Deiteren A, De Man JG, Ruysseers NE, Moreels TG, Pelckmans PA, De Winter BY. Histamine H4 and H1 receptors contribute to postinflammatory visceral hypersensitivity. *Gut.* 2014 Dec;63(12):1873–82.
27. Bozkurt A, Deniz M, Yegen BC. Cefaclor, a cephalosporin antibiotic, delays gastric emptying rate by a CCK-A receptor-mediated mechanism in the rat. *Br J Pharmacol.* 2000;131(3):399–404.

*Матеріал надійшов
до редакції 20.08.2015*

Вміст ендотеліального моноцитаактивуєчого пептиду II в сироватці крові при цукровому діабеті 1-го типу

Л.А. Могильницька, О.Є. Могильницька

Хмельницька обласна лікарня; e-mail: mogylnytska@mail.ua

Досліджували вміст ендотеліального моноцитаактивуєчого пептиду II (EMAP-II) в сироватці крові при цукровому діабеті (ЦД) 1-го типу, ендотелійзалежну дилатацію, встановлювали можливий зв'язок між цими показниками у обстежених осіб. Виявлено підвищення вмісту EMAP-II в сироватці крові та ослаблення ендотелійзалежної дилатації. Вміст пептиду прямо корелював зі вмістом глікозильованого гемоглобіну, глюкози крові, загального холестерину, ліпопротеїдів низької щільності, тригліцеридів та зворотно – зі вмістом ліпопротеїдів високої щільності та ендотелійзалежною дилатацією. Підвищення вмісту EMAP-II може бути одним з проявів ендотеліальної дисфункції при ЦД 1-го типу, а порушення вуглеводного та ліпідного обміну – впливати на розвиток виявлених зрушень.

Ключові слова: ендотеліальний моноцитаактивуєчий пептид II; цукровий діабет 1-го типу; ендотеліальна дисфункція.

ВСТУП

Численні дослідження вказують на підвищення рівня серцево-судинних захворювань при цукровому діабеті (ЦД) 1-го типу [1]. Відомо, що такі три основні дефекти, як ендотеліальна дисфункція, зміни в продукції/вивільненні гормонів і порушення метаболізму в клітинах гладенької мускулатури є основними у розвитку ушкоджень дрібних артерій і капілярів (мікроангіопатій) внаслідок гіперглікемії, а також сприяють атерогенезу при ЦД [2, 3].

Ендотеліальна дисфункція – ранній та важливий крок у розвитку діабетичних ангіопатій [4]. Вона відіграє важливу роль у розвитку атеросклеротичного процесу. Функціональний стан ендотелію характеризується, з одного боку, ендотелійзалежною дилатацією, а з іншого, – вмістом ендотеліальних вазоактивних факторів у сироватці крові.

Виявлено зворотний зв'язок між ендотелійзалежною дилатацією, систолічною,

діастолічною дисфункцією міокарда та тривалістю ЦД [5]. Показано також ослаблення ендотелійзалежної дилатації та збільшення товщини інтима-медіа каротидних артерій у дітей, хворих на ЦД 1-го типу порівняно зі здоровими однолітками та взаємозв'язок цих показників. Інші дослідження виявили ослаблення ендотелійзалежної дилатації хворих, що корелювало з показниками глікемічного контролю [6, 7].

Ендотеліальний моноцитаактивуєчий пептид II (EMAP-II) – це мультифункціональний поліпептид з прозапальною та антиангіогенною активністю. Він викликає прокоагулянтні зміни на поверхні ендотеліальних клітин, посилює експресію E-, P-селектину та туморнекротичного фактора α , впливає на міграцію моноцитів та нейтрофілів, індукує апоптоз в ендотеліальних клітинах [8]. EMAP-II бере участь у процесі реваскуляризації та відновлення ушкодженої тканини при інфаркті міокарда [9]. В інших дослідженнях

показано, що його блокада моноклональними антитілами індукє ангіогенез та покращує відновлення серцевої функції після інфаркту міокарда через зменшення фіброзу серцевого м'язу та розмірів рубця, збільшує кількість капілярів та запобігає накопиченню моноцитів у вогнищі захворювання [10].

Вважають, що вазодилатація, яка відбувається під час ЕМАР-II-індукованого запалення, пов'язана з оксидом азоту. Це було продемонстровано на легеневих артеріях. Пептид викликає дилатацію легеневої артерії. ЕМАР-II-опосередкована вазодилатація – ендотелійзалежна, пов'язана з активацією експресії індукцйбельної NO-синтази мРНК в легеневій артерії. При блокаді оксиду азоту L-NAME – інгібітором NO-синтази, ЕМАР-II-індукована вазодилатація ослаблювалася [11]. Проте його роль у розвитку ендотеліальної дисфункції при ЦД 1-го типу невідома.

Метою нашого дослідження було визначити вміст ЕМАР-II в сироватці крові хворих на ЦД 1-го типу, вивчити ендотелійзалежну дилатацію, а також встановити можливий зв'язок між цими показниками.

МЕТОДИКА

Обстежено 58 осіб, з них 30 хворих на ЦД 1-го типу, 28 контрольних осіб. Групи були відповідні за статтю та віком.

Серед хворих на ЦД 1-го типу було 17 жінок (59%) та 13 чоловіків (41%). Середня тривалість захворювання становила $11,08 \pm 0,8$

років. В групу були включені пацієнти з такими вираженими мікросудинними ускладненнями, як нефро- та ретинопатія. Під час обстеження очного дна хворих у 20 (66,6%) з них виявлено проліферативну, у 5 (16,6%) – препроліферативну ретинопатію, у 5 (16,6%) – діабетичну ангіопатію сітківки за Kohner та Porta [12] У 27 (90%) хворих виявлена діабетична нефропатія IV (протеїнурична стадія). У 3 (10%) хворих – нефропатія III (мікроальбумінурія) [13]. Отже, у більшості пацієнтів незважаючи на молодий вік, були виражені ускладнення, а саме нефро- та ретинопатія III-IV стадії.

Усі хворі отримували інсулін у добовій дозі до 50 од. Артеріальна гіпертензія спостерігалась у 23 (76,6%) пацієнтів, які на момент обстеження знаходились у стані декомпенсації, ніхто з них не дотримувався гіполіпідемічної дієти.

Не обстежували осіб, які приймали препарати, що потенційно здатні впливати на функціональний стан ендотелію, а саме: гіполіпідемічні засоби, інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту, блокатори рецепторів до ангіотензину-II, блокатори кальцієвих каналів, нітрати, гормональні контрацептивні засоби та препарати замісної гормональної терапії. Рівень глікемії визначали натще безпосередньо в тих зразках венозної крові, що використовували для подальших досліджень.

Вміст ЕМАР-II досліджували імуноферментним методом із використанням сорбцій-

Клініко-лабораторна характеристика обстежених осіб.

Показник	Контроль (n=28)	Хворі на ЦД 1-го типу (n=30)
Вік, років	19,96±2,06	20,3±2,07
Індекс маси тіла, кг/м ²	20,48±2,18	20,37±2,19
Глікозильований гемоглобін, %	5,33±0,45	10,32±1,59*
Глюкоза крові натще, ммоль/л	4,6±0,57	10,76±2,36*
Загальний холестерин, ммоль/л	4,14±0,51	5,34±0,92*
Тригліцериди, ммоль/л	1,46±0,29	2,53±0,57*
Ліпопротеїди високої щільності, ммоль/л	1,34±0,23	1,03±0,2*
Ліпопротеїди низької щільності, ммоль/л	2,63±0,4	3,32±1,01*

* P<0,05

них колонок “Ampret” (“Amersham Lifesience”) та тест-систем “Amersham pharmacia biotech” (Велика Британія) на площковому ELISA-аналізаторі «Stat Fax-303 Plus» (США).

Ендотелійзалежну дилатацію вимірювали за стандартною технологією [14, 15]. Діаметр плечової артерії – за допомогою ультразвуку двічі: базальний та протягом реактивної гіперемії, базальний діаметр – після 10 хв спокою. Далі манжету тонометра накладали на передпліччя та нагнітали повітря до тиску 250 мм рт. ст. та утримували протягом 5 хв. Після цього повітря випускали та повторно вимірювали діаметр плечової артерії протягом 1-ї хвилини. Таким чином, виникала реактивна гіперемія та ендотелійзалежна дилатація.

Результати представлені як середнє ± стандартне відхилення. Їх статистичну обробку проводили методами варіаційної та описової статистики за допомогою стандартного пакета статистичного розрахунку даних програми Microsoft Excel. Вірогідність відмінностей середніх значень визначали за критерієм t Стьюдента. Відмінність вважали вірогідною при $P < 0,05$. Кореляційний аналіз розраховували, використовуючи коефіцієнт Пірсона.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

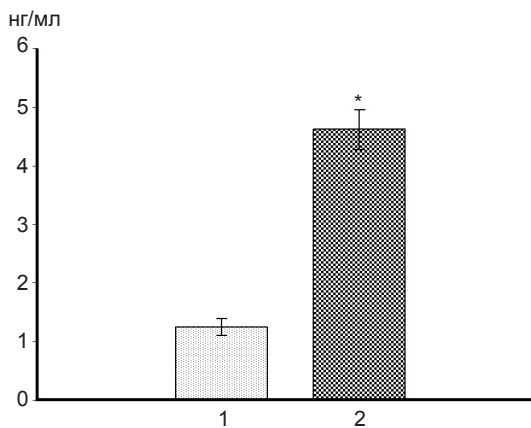
Виявлено, що вміст ЕМАР-II в сироватці крові хворих становив $4,62 \pm 1,91$ нг/мл, у контролі – $1,25 \pm 0,76$ нг/мл (рисунок 1).

Показано підвищення вмісту ЕМАР-II у сироватці крові хворих порівняно з контрольною групою у 3,69 раза ($P < 0,05$). Це може вказувати на те, що така патологія супроводжується підвищенням вмісту ЕМАР-II, а також на роль гіперглікемії в розвитку згаданих зрушень. Наше припущення підтверджує виявлений статистично вірогідний прямий кореляційний зв'язок вмісту ЕМАР-II, глікозильованого гемоглобіну та глюкози в сироватці крові:

Показник	Коефіцієнт кореляції
Глікозильований гемоглобін	0,8
Глюкоза крові	0,66
Загальний холестерин	0,52
Тригліцериди	0,74
Ліпопротеїди низької щільності	0,61
Ліпопротеїди високої щільності	-0,58
Ендотелійзалежна дилатація	-0,54

Зміна концентрації циркулюючих ендотеліальних продуктів може вказувати на ендотеліальну активацію та дисфункцію на доклінічній стадії [16]. ЕМАР-II викликає активацію туморнекротичного фактора- α , інтерлейкіну-1 β , інтерлейкіну-8, запальних білків макрофагів, а також ендотеліальних клітин з посиленням синтезу Е-селектину, ICAM, VCAM, тканинного фактора [17].

Оскільки у обстежених був порушений ліпідний обмін, то потрібно було з'ясувати вплив дисліпідемії на підвищення вмісту ЕМАР-II. Встановлено статистично вірогідний прямий кореляційний зв'язок між вмістом тригліцеридів, загального холестерину, ліпопротеїдів низької щільності та ЕМАР-II та зворотний кореляційний зв'язок між вмістом ЕМАР-II та ліпопротеїдами високої щільності (див. вивід). Ці результати свідчать про взаємозв'язок дисліпідемії та вмісту ЕМАР-II, адже порушення ліпідного



Вміст ЕМАР-II у сироватці крові хворих на ЦД 1-го типу: 1-контроль, 2-цукровий діабет 1-го типу

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

обміну відіграє важливу роль у ініціюванні та прогресуванні атеросклерозу, а також розвитку ендотеліальної дисфункції [18].

Ендотелійзалежна дилатація становила $3,011 \pm 1,9$ % у хворих та $8,4 \pm 4,08$ % у контрольній групі. Показано її ослаблення у 2,79 раза порівняно з контролем. Базовий діастолічний діаметр плечової артерії не відрізнявся від контрольної групи ($P > 0,05$). Спостерігався прямий кореляційний зв'язок між ендотелійзалежною дилатацією та вмістом ЕМАР-II у сироватці крові хворих на ЦД (див. вивід).

ЕМАР-II має потужний вплив на ендотеліальні клітини, викликає їх апоптоз, пригнічує проліферацію, васкуляризацію та неоангіогенез, що може сприяти порушенню функціонального стану ендотелію [19]. Тому підвищення вмісту ЕМАР-II та кореляційний зв'язок з ендотелійзалежною дилатацією у хворих може бути проявом ендотеліальної дисфункції та активації при вказаній патології.

Таким чином, при ЦД 1-го типу підвищується вміст ЕМАР-II в сироватці крові, що пов'язане з гіперглікемією та дисліпідемією. Порушення ендотелійзалежної дилатації пов'язане з підвищенням вмісту ЕМАР-II в сироватці крові. Зміна концентрації цитокіну може бути одним з проявів ендотеліальної дисфункції при ЦД 1-го типу.

Л.А.Могильницкая, О.Е.Могильницкая

СОДЕРЖАНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО МОНОЦИТАКТИВИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА-II В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА

Определяли содержание эндотелиального моноцитактивирующего пептида II (EMAP-II) в сыворотке крови при сахарном диабете (СД) 1-го типа, исследовали эндотелий-зависимую дилатацию, а также устанавливали возможную связь между этими показателями у обследованных лиц. Выявлено повышение содержания ЕМАР-II в сыворотке крови и ослабление эндотелийзависимой дилатации при СД 1-го типа. Содержание ЕМАР-II прямо коррелировал с содержанием гликозилированного гемоглобина, глюкозы крови, общего холестерина, липопротеидов низкой плотности, триглицеридов и обратно коррелировал с содержанием липопротеидов высокой плотности и эн-

дотелийзависимой дилатацией. Повышение содержания ЕМАР-II может быть одним из проявлений эндотелиальной дисфункции при СД 1-го типа, а нарушение углеводного и липидного обмена – влиять на развитие выявленных нарушений.

Ключевые слова: эндотелиальный моноцитактивирующий пептид II; сахарный диабет; эндотелиальная дисфункция.

L.A. Mogylnytska, O.E. Mogylnytska

SERUM LEVELS OF ENDOTHELIAL MONOCYTE ACTIVATING PEPTIDE II IN TYPE 1 DIABETES

Was investigated serum level of endothelial monocyte activating peptide II (EMAP-II) and endothelium-dependent dilatation in type 1 diabetes and possible relation between those. We found an increase serum level of EMAP-II and decrease of endothelium-dependent dilatation in type 1 diabetes. It was significant correlation between EMAP-II and HbA_{1c}, blood glucose, total cholesterol, LDL, triglycerides and inverse correlation between EMAP-II and HDL, endothelium-dependent dilatation. The revealed change of EMAP-II serum level reflects an endothelial dysfunction in type 1 diabetes, alteration of carbohydrate and lipid metabolism could influence of this pathway.

Key words: EMAP-II; diabetes; endothelial dysfunction.

Khmelnitsky regional hospital

REFERENCES

1. Theilade S, Lajer M, Jorsal A, Tarnow L, Parving H.H., Rossing P. Arterial stiffness and endothelial dysfunction independently and synergistically predict cardiovascular and renal outcome in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2012 Aug;29(8):990-4.
2. Adameova A, Dhalla NS. Role of microangiopathy in diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev.* 2014 Jan; 19(1):25-33.
3. Chillarón JJ, Flores Le-Roux JA, Benaiges D, Pedro-Botet J. Type 1 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Metabolism.* 2014 Feb;63(2):181-7.
4. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J.* 2013 Aug;34(31):2436-43.
5. Ladeia AM, Sampaio RR, Hita MC, Adan LF. Prognostic value of endothelial dysfunction in type 1 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2014 Oct 15;5(5):601-5.
6. Hurks R, Eisinger MJ, Goovaerts I, van Gaal L, Vrints C, Weyler J, Hendriks J, van Schil P, Lauwers P. Early endothelial dysfunction in young type 1 diabetics. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009 May;37(5):611-5.
7. Eltayeb AA, Ahmad FA, Sayed DM, Osama AM. Subclinical vascular endothelial dysfunctions and myocardial changes with type 1 diabetes mellitus

- in children and adolescents. *Pediatr Cardiol.* 2014 Aug;35(6):965-74.
8. Van Horsen R, Eggermont AM, ten Hagen TL. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II and its functions in (patho)physiological processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Oct;17(5):339-48.
 9. Thompson JL, Ryan JA, Barr ML, Franc B, Starnes VA, Schwarz MA. Potential role for antiangiogenic proteins in the myocardial infarction repair process. *J Surg Res.* 2004 Jan;116(1):156-64.
 10. Yuan C, Yan L, Solanki P, Vatner SF, Vatner DE, Schwarz MA. Blockade of EMAP II protects cardiac function after chronic myocardial infarction by inducing angiogenesis// *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Feb;79:224-31.
 11. Tsai BM, Wang M, Clauss M, Sun P, Meldrum DR. Endothelial monocyte-activating polypeptide II causes NOS-dependent pulmonary artery vasodilation: a novel effect for a proinflammatory cytokine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Oct;287(4):R767-71.
 12. Kohner EM, Porta M. Protocols for screening and treatment of diabetic retinopathy in Europe. *Eur J Ophthalmol.* 1991 Jan-Mar; 1(1):45-54.
 13. Mogensen CE. Diabetes mellitus and the kidney. *Kidney Int.* 1982 May; 21(5):673-5.
 14. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk for atherosclerosis *Lancet.* 1992 Nov 7;340(8828):1111-5.
 15. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery *J Am Coll Cardiol.* 2002 Jan 16;39(2):257-65.
 16. Eltayeb AA, Ahmad FA, Sayed DM, Osama AM. Subclinical vascular endothelial dysfunctions and myocardial changes with type 1 diabetes mellitus in children and adolescents. *Pediatr Cardiol* 2014; 35: 965-974.
 17. Martinet W, De Meyer I, Cools N, Timmerman V, Bult H, Bosmans J, De Meyer GR. Cell death-mediated cleavage of the attraction signal p43 in human atherosclerosis: implications for plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jul;30(7):1415-22.
 18. Symons JD, Abel ED. Lipotoxicity contributes to endothelial dysfunction: a focus on the contribution from ceramide. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013 March; 14(1): 59–68.
 19. Awasthi N, Schwarz MA, Verma V, Cappiello C, Schwarz RE. Endothelial monocyte activating polypeptide II interferes with VEGF-induced proangiogenic signaling. *Lab Invest.* 2009 Jan;89(1):38-46.

*Матеріал надійшов
до редакції 30.01.2015*

Гени кумулюсних клітин як потенційні біомаркери для діагностики стану розвитку ооцитів та ембріонів

О.А. Шепель, Т.Ю. Вознесенська, Т.В. Блашків, Р.І. Янчій

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАНУ, Україна, Київ; e-mail: elena-shepel@ukr.net

В цьому огляді представлені сучасні дані про гени, що є потенційними біомаркерами для селекції ооцитів та ембріонів у програмі екстракорпорального запліднення (ЕКЗ). Морфологічна оцінка, яка ґрунтується на таких показниках, як швидкість росту, раннє дроблення, ступінь фрагментації, формування бластоцисти, є суб'єктивною і не дає точного прогнозу розвитку ембріона. Потрібні об'єктивні, швидкі та доступні тести для визначення потенціалу розвитку статевих клітин, які б збільшили шанс успішної вагітності та знизили кількість ембріонів для підсадки. З виникненням нових технологій у кумулюсних клітинах виявлені гени, які характеризують здатність ооцитів до мейотичного дозрівання, фертилізації та ембріонального розвитку і можуть бути використані під час ЕКЗ для відбору ооцита або ембріона з більш високим потенціалом імплантації. Серед них циклооксигеназа 2 (ЦОГ2), гремлін 1 (ГРЕМ1) і гіалуранансинтаза 2 (ГС2).

Ключові слова: якість ооцитів; експресія генів у кумулюсних клітинах; циклооксигеназа 2; гремлін 1; гіалуранансинтаза 2.

На фоні збереження тенденції до скорочення населення особливо гострою є проблема безпліддя. Важливу роль у досягненні вагітності в процесі *in vitro* запліднення і перенесення ембріонів відіграє вибір найбільш перспективного клітинного матеріалу (ооцитів, зигот, ембріонів). Нині цей відбір ґрунтується на таких морфологічних показниках, як швидкість росту, раннє дроблення, ступінь фрагментації, формування бластоцисти [1–4]. Однак прогностична можливість цього підходу обмежена, оскільки він є суб'єктивним і недостатньо точним [1, 2, 4–6]. Морфологічний зовнішній вигляд ооцита і ембріона не дає адекватного прогнозу їх розвитку. У 70-80% морфологічно аномальних ембріонів виявлені генетичні порушення, тоді у 40% ембріонів з нормальною морфологією також виявлені хромосомні аберації [3]. Таким чином, для підтримки високих показників вагітності здійснюють трансфер 3-4 ембріонів на

ранніх стадіях розвитку або 2-3 бластоцист. Однак це часто призводить до багатоплідної вагітності, яка пов'язана з підвищеною захворюваністю плода і його смертністю [3, 6, 7].

Трансфер одиничного ембріона стає все більш поширеним при екстракорпоральному заплідненні (ЕКЗ), оскільки означає редукацію багатоплідної вагітності. Відбір ембріонів з більш високим потенціалом імплантації – найважливіше завдання у допоміжних репродуктивних технологіях [1, 6, 8]. Таким чином, будь-який об'єктивний метод оцінки компетентності ооцита і потенціалу імплантації й розвитку ембріона збільшив би успішність допоміжних репродуктивних технологій [2, 3]. З їх виникненням виявлені нові біомаркери, які можуть бути використані самостійно або у комбінації з морфологічними критеріями при ЕКЗ для селекції ооцита і / або ембріона [1, 4–6, 9, 10].

Відомо, що преовуляторні фолікули мі-

стять субпопуляції гранулярних клітин, включаючи пристінкові і кумулюсні (КК). Перші вистилають стінку фолікула, знаходяться в тісній близькості до текальних клітин і експресують гени, потрібні для фолікулярного розриву. КК залишаються пов'язаними з ооцитом протягом фолікулярного розвитку та овуляції. Ооцити і КК ростуть і розвиваються строго координовано і взаємозалежно. Вони є медіаторами розвитку ооцита і фертилізації, а, ооцит у свою чергу регулює розвиток кумулюса [1, 3, 8, 9, 11]. У мишей кумулюсно-ооцитарні клітинні комплекси (КОКК) відіграють центральну роль в овуляції, і здатність ооцитів підтримувати експресію генів у кумулюсі пов'язана з компетентністю ооцитів до розвитку [2, 11, 12]. Для вивчення зв'язку між профілем генної експресії в КК та компетентністю ооцитів, якістю ембріонів і результатом вагітності застосовують технології на основі ДНК-мікрочіпів, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) в реальному часі [2, 6, 12], генетичну діагностику за допомогою порівняльної геномної гібридизації, одонуклеотидний поліморфізм генів. Результатом аналізу геномних і транскриптомних даних є визначення генів, які диференційно експресуються в різних експериментальних умовах [6]. Згідно з сучасною концепцією, КК можуть бути надійною моделлю для з'ясування якості ооцита та ефективності протоколу оваріальної гіперстимуляції і опосередковано прогнозувати анеуплоїдію ооцитів, ембріональний розвиток і результат вагітності [2, 8, 13]. Крім того, аналіз генної експресії в КК може допомогти зрозуміти механізми, які знижують репродуктивну здатність [4, 14]. Нині широко використовується ПЛР в реальному часі як чутливий і ефективний метод для кількісного визначення окремих транскриптів. З іншого боку, використання ДНК-мікрочіпів для визначення профілю експресії в масштабі геному відкрило нові перспективи для дослідників, даючи можливість ідентифікувати транскриптомні сигнатури життєздатних ембріонів. Однак за-

стосування мікрочіпів потребує спеціалізованого обладнання і підготовленого персоналу, що може коштувати непомірно дорого і не зможе давати результати достатньо швидко, щоб використовувати інформацію в клініці в обмежений проміжок часу, прийнятний для ембріонального трансферу. Тому навряд чи для КК від окремих ооцитів доцільно застосовувати такий аналіз, щоб отримати повний профіль транскриптів. Замість цього обмежене число генів, які були ідентифіковані у дослідженнях з використанням мікрочіпів як біомаркерів життєздатності ооцитів та ембріонів, може бути оцінено за допомогою ПЛР у реальному часі. Але в цьому разі важливо встановити чи необхідне визначення абсолютної кількості або лабораторія просто відбере ембріони з найвищою і найнижчою експресією і скільки генів краще досліджувати, оскільки визначення продукту одиничного гена навряд чи передбачить результат [4, 6].

Взаємодія КК і ооцита відбувається через щільні контакти [6, 15] за допомогою паракринних сигнальних факторів. Ці міжклітинні канали забезпечують трансфер малих молекул і сприяють обміну метаболітів глюкози та іонів між ооцитом і КК [1, 4]. Генетичні модуляції в КК (як і в гранулярних клітинах) можуть призвести до репродуктивної недостатності [14]. Аналіз КК має переваги порівняно з прямою оцінкою ооцита. Ооцити на стадії метафази 2 є делікатними клітинами, які можуть бути легко пошкоджені морфологічними дослідженнями [1, 15]. КК, як правило, не використовуються під час класичного ЕКЗ та інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда в яйцеклітину. Ці клітини легко доступні і численні [2], їх відділяють від ооцитів безпосередньо після виділення, тому такий аналіз не заподіє ніякого додаткового стресу ооцитам [1, 4, 15, 16]. Ізольовані КК - це відносно гомогенна фракція, практично не забруднена іншими клітинами. У той час як більшість ізольованих гранулярних клітин містять домішки текальних і кров'яних клітин, що пояснюється методами їх отримання. Все

вищезазначене свідчить про те, що кумулює є зручним матеріалом для неінвазивного методу визначення потенціалу розвитку статевих клітин. Проте слід враховувати, що збір КК може бути пов'язаний з додатковим часом для кожного ооцита за межами інкубатора. Крім того, для підтримки ідентичності кожного зразка КК відносно певного ембріона потрібна індивідуальна культура, а це – додаткова робота і фінансові витрати у лабораторії. Ці аспекти також повинні бути вивчені і проаналізовано співвідношення ризиків і вигоди до реалізації такого підходу у клініці [6].

Серед генів, які експресуються в КК і активно вивчаються, можна виділити циклооксигеназу 2 (ЦОГ2), гремлін 1 (ГРЕМ1) і гіалуронансинтазу 2 (ГС2). Встановлено, що всі вони залучені в фолікулярний розвиток, зокрема, кумулюсне розширення [16–20], що ініціюється хвилею лютеїнізуючого гормону і відіграє надзвичайно важливу роль під час розвитку ооцита, овуляції і фертилізації (тобто сприяє ефективному заплідненню, успішному відриву КОКК від фолікулярної стінки і наступної овуляції, їх транспорту через яйцепровід і підтримці життєздатності ооцита в матковій трубці) [4, 17–19, 21]. Ооцити, виділені із фолікулів з порушенням кумулюсним розширенням, мають обмежений потенціал для імплантації [6]. Альтерації в кумулюсному розширенні можуть відбуватися з віком у жінок і відповідати за їх репродуктивну недостатність як безпосередня причина або як відображення зниження функціональної і структурної якості ооцитів [3]. Враховуючи залучення цих генів у процес кумулюсного розширення, можна припустити, що вони будуть досить надійними маркерами мейотичного дозрівання і якості ооцита, фертилізації і раннього ембріонального розвитку [21].

У пацієнтів, які проходили процедуру ЕКЗ або інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда в яйцеклітину, за допомогою кількісної ПЛР встановлено, що експресія ЦОГ2 та ГС2 була вище в 6 разів, а ГРЕМ1 –

в 15 разів в КК, відокремлених від ооцитів, що дали початок ембріонам високої якості [3]. Показано, що профіль експресії ЦОГ2 і ГС2 в КК мишей був подібний до такого у людини: нижчий у клітин, що були пов'язані з ооцитами із слабким потенціалом розвитку [22]. Наведені результати узгоджуються з даними, отриманими в інших дослідженнях [23]. Значна кореляція була виявлена між ембріональним розвитком на 3-тю добу та експресією ГРЕМ1 [24, 25], а також, проте меншою мірою, між якістю ооцитів та ЦОГ2 і ГС2 [24]. Виявлений взаємозв'язок вмісту мРНК для цих генів і видом гонадотропіну, що використовувався для оваріальної стимуляції [15, 24, 25]. Показано залежність експресії ГС2 в КК від стадії мейотичного дозрівання. Встановлено, що середній вміст мРНК для ГС2 значно вище в КК, пов'язаних з ооцитами, які були запліднені і розвилися у життєздатні бластоцисти [26]. Таким чином, рівень експресії цих генів корелює з морфологічними і фізіологічними характеристиками статевих клітин [3, 19]. Водночас є результати, які демонструють відсутність суттєвих відмінностей між експресією генів, зокрема ЦОГ2, у КК та ГК, які оточували запліднені та незапліднені яйцеклітини, а також між успішно й неуспішно імплантованими ембріонами. Припускають, що причинами розбіжності у результатах можуть бути схема дослідження, протокол стимуляції, фізичний стан пацієнта [8].

Згідно з останніми дослідженнями, у жінок підвищений рівень експресії ГРЕМ1 в КК позитивно корелює з дозріванням ооцитів [23, 27], супроводжується правильним формуванням бластоцисти, високою якістю ембріонів і незначним покращенням показника вагітності [14]. Взаємозалежність якості ооцита і експресії ГРЕМ1 ще треба досліджувати. Але відомо, що ГРЕМ1 – це ген, індукований фактором росту диференціювання-9 (РФД9), який продукується безпосередньо ооцитом. Ще одним таким фактором є кістковий морфогенетичний білок

(БМП). Припускають, що ГРЕМ1 модулює перехресні сигнальні шляхи між РФД9- і БМП-сигналізацією [14, 15], яка потрібна під час фолікулярного розвитку. ГРЕМ1 селективно інгібує БМП-сигналізацію, не порушуючи РФД9-сигналізацію. Тобто ГРЕМ1 є антагоністом БМП, і останні дані показують, що він залучений у внутрішньофолікулярний БМП-сигнальний шлях, який негативно регулює продукцію андрогенів текальними клітинами (як базальну, так і індуковану лютеїнізуючим гормоном) [15]. З одного боку, підвищений вміст андрогенів може сприяти розвитку полікістозу яєчників. З іншого, андрогени потрібні для нормальної оваріальної функції і фертильності [28]. Припускають, що селективне інгібування сигналізації сприяє лютеїнізації пристінкових ГК, підтримуючи при цьому кумулюсне розширення. Якщо це так, то безперервна експресія ГРЕМ1 в КК повинна представляти зрілий ооцит і прогнозує покращений розвиток ембріона [3, 25]. Зниження ж експресії ГРЕМ1 може вказувати на пошкоджену ооцитарну функцію і кумулюсне розширення і, відповідно, свідчить про слабку репродуктивну здатність. Спостерігаються значні варіації експресії ГРЕМ1 у пацієнтів, а, враховуючи те, що нині обмежені знання про функціонування цих генів в кумулюсних клітинах, складно повністю зрозуміти причини їх біологічної кореляції [14].

ГС2 експресується КК у відповідь на спільний ефект фолікулостимулювального гормону і РФД9, як фермент, який відповідає за синтез гіалуронової кислоти, одного з головних компонентів позаклітинного матриксу [1, 15], утворення якого потрібне для кумулюсного розширення у відповідь на овуляторний викид лютеотропіну. Отже, зниження експресії ГС2 порушує синтез гіалуронової кислоти, і відповідно, формування матриксу та пошкоджує процес овуляції. Значний вміст ГС2 транскриптів наявний в ооцитах з субоптимальною морфологією, які розвинулися в ембріони високої якості на відміну

від ооцитів, ізольованих від КК, і ооцитів, що зазнали невдачі при заплідненні [15, 23].

ЦОГ2 запускає сигналізацію простагландинів (ПГ) у яєчнику, які синтезуються з арахідонової кислоти [29]. ПГ є загальними медіаторами запальних реакцій, включаючи й овуляцію. З двох ізоформ циклооксигенази розрізняють конститутивну - ЦОГ1 (функціонує постійно і виконує фізіологічно важливі функції) та індукібельну - ЦОГ2 (функціонує в певних умовах, наприклад, при запаленні). В яєчнику ЦОГ1 конститутивно експресується в текальних клітинах, а ЦОГ2 індукується лютеотропіном або хоріонічним гонадотропіном в пристінкових ГК і КК. Встановлено регуляторний вплив РФД9 на активацію ЦОГ2 в КК [1, 3]. Самиці мишей нульові (нокаутні) за ЦОГ2 або по ПГЕ2 рецептору EP2 є безплідними, у них пошкоджено кумулюсне розширення і порушений процес овуляції. ПГ відіграють надзвичайно важливу внутрішньофолікулярну роль у регуляції генів, залучених у формування матриксу і кумулюсне розширення [15]. ЦОГ2 пов'язаний із стабілізацією матриксу під час кумулюсного розширення [22]. Виявлено кореляцію між експресією ЦОГ2 в КК та дозріванням ооцитів [1, 23]. Хоча механізми, за допомогою яких ПГ опосередковують кумулюсне розширення і подальшу овуляцію, до кінця не зрозумілі.

Припускають, що в механізм може бути задіяний білок TSG6 (ФНПа-стимульований ген 6), який є мішенню дії ПГ [30, 31], оскільки у мишей, нокаутних по ЦОГ2 і EP2 експресія мРНК TSG6 (але не ГС2) знижується. Ланцюг може бути таким: в преовуляторному фолікулі хвиля лютеїнізуючого гормону індукує мРНК ЦОГ2 і ГС2. ЦОГ2 відповідає за синтез ПГ, а ті в свою чергу за експресію мРНК TSG6; ГС2 забезпечує синтез ГК. Остання пов'язує білок TSG6. А далі запускається процес формування матриксу і кумулюсне розширення [30].

Таким чином, порушення експресії кожного з цих трьох генів призводить до пошкодження кумулюсного розширення та форму-

вання матриксу і, як наслідок, – порушення овуляції. Відповідно, аналіз їх експресії в КК може бути непрямую ознакою чи показником мікрооточення, в якому дозріває ооцит, і допомогти ембріологові краще оцінити якість ембріона [2]. В основі порушення експресії ЦОГ2, ГРЕМ1 або ГС2 можуть бути гормональні зміни, які супроводжують ту чи іншу патологію, ушкодження продукції РФД9 [14], який регулює їх активацію.

Загалом точна природа і різноманітність ооцит-КК сигнальних молекул є складною і динамічною, але вони мають величезний вплив на якість ооцитів [1]. Врешті решт, численні гени в КК могли б бути потенційними маркерами для діагностики здатності розвитку ооцитів та ембріонів [3, 5, 8, 32, 33]. Треба визначити профіль їх експресії, важливий для селекції ембріона, провести дослідження, щоб виявити зв'язок між зміненою експресією мРНК в КК і розвитком ембріона, його життєздатністю. Однак слід визнати, що нині не існує загально визнаних біомаркерів. Причиною розходження в результатах можуть бути різні фактори, що впливають на експресію генів: план дослідження, протокол стимуляції та фізичні дані пацієнта, етіологія, лікування, вік тощо [4, 8, 32]. Безумовно, застосування передових транскриптомних і біоінформативних інструментів у лабораторії ЕКЗ є доцільним, а початкові висновки обнадійливими, однак залишаються питання, які треба вирішити перед тим, як вводити ці технології в клінічну практику. Важливим етапом також є проведення рандомізованих контрольованих досліджень, щоб підтвердити клінічний ефект від застосування генів-біомаркерів.

Розвиток неінвазивних методів оцінки ооцитів на основі транскриптомного дослідження фолікулярних соматичних клітин має не тільки клінічне, а й наукове значення. Застосування неінвазивного аналізу КК допоможе поглибити розуміння взаємозалежності зовнішніх і внутрішніх факторів, що впливають на фолікуло- і оогенез, з'ясувати складні

молекулярні механізми, що регулюють розвиток ооцитів та ембріонів. Ці знання у свою чергу можуть бути використані в клініці для вдосконалення протоколів *in vitro* дозрівання ооцитів або індивідуалізації методики контрольованої оваріальної стимуляції.

Е.А.Шепель, Т.Ю.Вознесенская, Т.В.Блашків, Р.И.Янчий

ГЕНЫ КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТКИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАЗВИТИЯ ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ

В этом обзоре представлены современные данные о генах, которые являются потенциальными биомаркерами для селекции ооцитов и эмбрионов в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Морфологическая оценка, основанная на таких показателях, как скорость роста, раннее дробление, степень фрагментации, формирование бластоцисты, является субъективной и не дает точного прогноза развития эмбриона. Необходимы объективные, быстрые и доступные тесты для определения потенциала развития половых клеток, которые бы увеличили шанс успешной беременности и снизили количество эмбрионов для подсадки. С возникновением новых технологий в кумулюсных клетках обнаружены гены, характеризующие способность ооцитов к мейотическому созреванию, фертилизации и эмбриональному развитию и могут быть использованы при ЭКО для отбора ооцита или эмбриона с более высоким потенциалом имплантации. Среди них циклооксигеназа 2 (ЦОГ2), гремлин 1 (ГРЕМ1) и гиалуронансинтаза 2 (ГС2).

Ключевые слова: качество ооцитов; экспрессия генов в кумулюсных клетках; циклооксигеназа 2; гремлин 1; гиалуронансинтаза 2.

E.A. Shepel, T.Yu. Voznesenskaya, T.V. Blashkiv, R.I. Yanchii

CUMULUS CELL GENES AS POTENTIAL BIOMARKERS OF OOCYTE AND EMBRYO DEVELOPMENTAL COMPETENCE

Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Ukraine, Kiev The selection of embryos with high implantation potential is the most important task in assisted reproductive technologies. Today, this selection is based on subjective morphological criteria such as growth rate, early cleavage, the degree of fragmentation, blastocyst formation. However, the morphological assessment alone does not accurately predict oocyte/early stage *embryo* competence. Thus, the development of an objective, accurate, fast and affordable tests to determine oocyte quality and embryo viability could increase the chance

of a successful pregnancy and reduce the number of embryos to transfer. The advent of new technologies, the so-called OMIKS, has allowed to identify novel biomarkers that can be used in cycle of in vitro fertilization (IVF) for oocyte and / or embryo selection. During folliculogenesis oocyte plays a dominant role in regulation of cumulus (CC) and granulosa cell (GC) functions, and it is consequently believed that functions of GC and CC indirectly reflect oocyte's competence. Cell functions and active cell processes are regulated through gene expression therefore, gene expression analysis in GC and/or CC could provide a non-invasive method for identification of the most competent oocytes and embryos. In cumulus cells, genes have been identified that characterize the oocyte ability to undergo meiotic maturation, successful fertilization and early embryonic development. Among them cyclooxygenase 2, gremlin 1 and hyaluronan synthase-2, which play an important roles during oocyte development, ovulation and fertilization. This article reviews the recent data regarding these genes as potential biomarkers for selection of oocytes and embryos in the IVF program.

Key words: oocyte quality; cumulus cell gene expression; cyclooxygenase 2; gremlin 1; hyaluronic acid synthase 2.

REFERENCES

1. Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod.* 2010 Aug;16(8):531-8.
2. Fauser BC, Diedrich K, Bouchard P, Domínguez F, Matzuk M, Franks S, Hamamah S, Simón C, Devroey P, Ezcurra D, Howles CM. Contemporary genetic technologies and female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2011 Nov-Dec;17(6):829-47.
3. McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2004 Dec;19(12):2869-74.
4. Fragouli E, Lalioti MD, Wells D. The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. *Hum Reprod Update.* 2014 Jan-Feb;20(1):1-11.
5. Assidi M, Montag M, Sirard MA. Use of both cumulus cells' transcriptomic markers and zona pellucida birefringence to select developmentally competent oocytes in human assisted reproductive technologies. *BMC Genomics.* 2015;16 Suppl 1:S9.
6. Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril.* 2013 Mar 15;99(4):979-97.
7. Al-Shukri M, Khan D, Al-Hadrami A, Al-Riyami N, Gowri V, Haddabi R, Abdellatif M, Al-Dughaiishi T. Maternal and fetal outcomes of triplet gestation in a tertiary hospital in oman. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2014 May;14(2):e204-10.
8. Burnik Papler T, Vrtacnik Bokal E, Lovrecic L, Kopitar AN, Maver A. No specific gene expression signature in human granulosa and cumulus cells for prediction of oocyte fertilisation and embryo implantation. *PLoS One.* 2015 Mar 13;10(3):e0115865.
9. Assou S, Al-edani T, Haouzi D, Philippe N, Lecellier CH, Piquemal D, Commes T, Aït-Ahmed O, Dechaud H, Hamamah S. MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex. *Hum Reprod.* 2013 Nov;28(11):3038-49.
10. Huang X, Hao C, Shen X, Liu X, Shan Y, Zhang Y, Chen L. Differences in the transcriptional profiles of human cumulus cells isolated from MI and MII oocytes of patients with polycystic ovary syndrome. *Reproduction.* 2013 May 21;145(6):597-608.
11. Moussaddykine S, Assou S, Dechaud H, Hamamah S. Other actors in the oocyte and follicular growth: the role of microRNAs in the cumulus-oocyte dialog. *Gynecol Obstet Fertil.* 2012 Mar;40(3):170-3.
12. Haouzi D, Assou S, Monzo C, Vincens C, Dechaud H, Hamamah S. Altered gene expression profile in cumulus cells of mature MII oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2012 Dec;27(12):3523-30.
13. Iager AE, Kocabas AM, Otu HH, Ruppel P, Langerveld A, Schnarr P, Suarez M, Jarrett JC, Conaghan J, Rosa GJ, Fernández E, Rawlins RG, Cibelli JB, Crosby JA. Identification of a novel gene set in human cumulus cells predictive of an oocyte's pregnancy potential. *Fertil Steril.* 2013 Mar 1;99(3):745-752.
14. Jindal S, Greenseid K, Berger D, Santoro N, Pal L. Impaired gremlin 1 (GREM1) expression in cumulus cells in young women with diminished ovarian reserve (DOR). *J Assist Reprod Genet.* 2012 Feb;29(2):159-62.
15. Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction.* 2007 Nov;134(5):645-50.
16. Li Y, Li RQ, Ou SB, Zhang NF, Ren L, Wei LN, Zhang QX, Yang DZ. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014 Aug 20;12:81.
17. Du M, Fu X, Zhou Y, Zhu S. Effects of trichostatin A on cumulus expansion during mouse oocyte maturation. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2013 Nov;26(11):1545-52.
18. Blaha M, Nemcova L, Kepkova KV, Vodicka P, Prochazka R. Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015 Oct 6;13:113.
19. Wissing ML, Kristensen SG, Andersen CY, Mikkelsen AL, Host T, Borup R, Grondahl ML. Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle. *Hum Reprod.* 2014 May;29(5):997-1010.
20. Lin ZL, Li YH, Xu YN, Wang QL, Namgoong S, Cui XS, Kim NH. Effects of growth differentiation factor 9

- and bone morphogenetic protein 15 on the in vitro maturation of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim.* 2014 Apr;49(2):219-27.
21. Gui LM, Joyce IM. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biol Reprod.* 2005 Jan;72(1):195-9.
 22. Vigone G, Merico V, Prigione A, Mulas F, Sacchi L, Gabetta M, Bellazzi R, Redi CA, Mazzini G, Adjaye J, Garagna S, Zuccotti M. Transcriptome based identification of mouse cumulus cell markers that predict the developmental competence of their enclosed antral oocytes. *BMC Genomics.* 2013 Jun 7;14:380.
 23. Anderson RA, Sciorio R, Kinnell H, Bayne RA, Thong KJ, de Sousa PA, Pickering S. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. *Reproduction.* 2009 Oct;138(4):629-37.
 24. Adriaenssens T, Wathlet S, Segers I, Verheyen G, De Vos A, Van der Elst J, Coucke W, Devroey P, Smitz J. Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Hum Reprod.* 2010 May;25(5):1259-70.
 25. Assou S, Haouzi D, Dechaud H, Gala A, Ferrieres A, Hamamah S. Comparative gene expression profiling in human cumulus cells according to ovarian gonadotropin treatments. *Biomed Res Int.* 2013;2013:354582.
 26. Ekart J, McNatty K, Hutton J, Pitman J. Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. *Hum Reprod.* 2013 Nov;28(11):2930-42.
 27. Machado MF, Caixeta ES, Sudiman J, Gilchrist RB, Thompson JG, Lima PF, Price CA, Buratini J. Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology.* 2015 Aug;84(3):390-8.
 28. Gervasio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sa MF, Rosa-E-Silva AC. The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN Obstet Gynecol.* 2014 Apr 10;2014:818010.
 29. Gershon E, Hourvitz A, Reikhav S, Maman E, Dekel N. Low expression of COX-2, reduced cumulus expansion, and impaired ovulation in SULT1E1-deficient mice. *FASEB J.* 2007 Jun;21(8):1893-901.
 30. Ochsner SA, Russell DL, Day AJ, Breyer RM, Richards JS. Decreased expression of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice. *Endocrinology.* 2003 Mar;144(3):1008-19.
 31. Richards JS. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Apr 29;234(1-2):75-9.
 32. Huang X, Hao C, Shen X, Zhang Y, Liu X. RUNX2, GPX3 and PTX3 gene expression profiling in cumulus cells are reflective oocyte/embryo competence and potentially reliable predictors of embryo developmental competence in PCOS patients. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013 Nov 26;11:109.
 33. Bunel A, Jorssen EP, Merckx E, Leroy JL, Bols PE, Sillard MA Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. *Theriogenology.* 2015 Jan 15;83(2):228-37.

Матеріал надійшов до редакції 05.08.2015

РЕЦЕНЗІЇ

Рецензия на учебник «Патофизиология» под редакцией Н.Н. Зайко, Ю.В. Быця, Н.В. Крышталя, Киев: ВСИ Медицина, 2015.— 744 с., илл.

Рецензируя труд, подготовленный большим творческим коллективом украинских патофизиологов (в составе 19 соавторов), хочется, прежде всего, отметить, что он написан, в главных своих частях, представителями школы академика А.А. Богомольца, основоположника отечественной системы преподавания патофизиологии. В связи с этим, на страницах книги отчетливо прослеживаются характерные для богомольцевской школы подходы и акценты, авторами унаследованы и творчески развиты особенности определенных и описаний некоторых патологических процессов, введенные А.А. Богомольцем еще в его знаменитом «Руководстве» 1938 г. Это придает учебнику дополнительную ценность: он вполне отвечает подходам и информационным потребностям тех российских и русскоязычных патофизиологов, которые, работая в различных странах мира, самоопределяются как ученики и наследники патофизиологических школ, произросших от ствола единого «богомольцевского» дерева. В этом состоит международное значение творческого достижения украинских коллег. Рецензируемый учебник состоит из Предисловия, Вступления и 32 глав, охватывающих как общую патофизиологию, так и основы частной патофизиологии органов и систем. Он может принести пользу как теоретикам медицины, так и клиницистам, так как в нем, особенно в его специальной части прослеживаются клинико-патофизиологические корреляции. В связи с этим выход в свет рецензируемого издания следует признать своевременным и полезным: как дополнительный источник при преподавании патофизиологии оно может быть применено

и в российских медвузах и университетах. Ценность этого труда заключается в том, что он создан высококвалифицированными учеными и педагогами, имеющими множество оригинальных патофизиологических исследований и многолетний опыт проблемного обучения. Авторы в изложении конкретного материала, расширяют рамки образовательного процесса, побуждая читателя к самостоятельному наблюдению и рассуждению на основе новых знаний, к применению этих знаний при осмыслении клинической проблематики. Такой подход обеспечивает интеграцию новых знаний с классическими представлениями патофизиологии и смежных теоретических и клинических дисциплин и позволяет использовать их для решения практических вопросов, стоящих перед врачом.

Особенно удачными по форме и богатыми по содержанию, с точки зрения рецензента, получились главы, посвященные нарушениям кислотно-щелочного равновесия, обмена микроэлементов, патофизиологии периферического кровообращения и воспалению. В разделе о шоке отчетливо и ясно представлена шокогенная роль избыточного системного действия медиаторов воспаления, что не было характерно для множества русскоязычных пособий по патофизиологии шока, в том числе – и сравнительно недавно выпущенных.

Несомненно, не только студенты, но и слушатели различных программ последипломного обучения, уже имеющие врачебный диплом, получают много пользы от ознакомления с этой книгой: ведь она обобщает и систематизирует накопленный огромный материал в области патофизиологии и позволяет врачу с современных позиций определить адекватность объема

и содержания, возможные побочные эффекты различных диагностических и лечебных методов, используемых в практике.

Следует отметить лаконизм учебника, удачное вплетение в тексты справочного типа важнейших концептуальных положений. В результате учебник и не сух по изложению – как некоторые чисто справочные пособия, и не страдает информационной избыточностью, что порой затрудняет восприятие студентами даже хороших концептуальных учебников. Авторы практически везде на страницах книги сохранили общность стилистики, интонации, непротиворечивость отдельных ее частей – что всегда сложно, когда учебник создается большим количеством соавторов. Чувствуется значительная редакторская работа. В едином, сдержанном и информативном ключе выполнены все без малого 80 весьма наглядных двцветных иллюстраций и цветная вкладка, облегчающее усвоение текста.

Конечно, в деле такого масштаба, как успешно осуществленный авторами проект, не может обойтись совершенно без недочетов. К ним рецензент относит отсутствие хотя бы кратких литературных указателей с основным рекомендуемым дополнительным чтением – как это принято во многих авторитетных учебниках и руководствах. Не избежали некоторого архаизма и отдельные главы, так приведены лишь классические, отчасти – уже устаревшие сведения о причинах и механизмах аутоаллергических заболеваний. Не счел бы, вероятно, А.А. Богомолец удачным и определение эмболии как закупорки сосудов – ибо он всегда подчеркивал более богатую суть этого процесса.

Появление столь ценной книги – большая удача авторов, поскольку учебник, несомненно, будет высоко востребован. В СПбГУ, в частности, он уже включен в рекомендуемую студентам дополнительную литературу.

*Л.П. Чурилов
зав. кафедрой патологии СПбГУ,
зарубежный член правления научного
общества патофизиологов Украины*

CONTENTS

D.O. Tsymbal, D.O. Minchenko, I.V. Kryvdiuk, O.O. Riabovol, O.V. Halkin, O.O. Ratushna, O.H. Minchenko. Expression of proliferation related transcription factor genes in U87 glioma cells with IRE1 knockdown: upon glucose and glutamine deprivation	3
A.V. Dragan, O.A. Petrushenko, O.P. Burlak, E.A. Lukyanetz. Effect of TRPA1 receptor activation on TRPV1 channel desensitization in rat dorsal ganglion neurons	16
L.S. Nasibyan, I.B. Philyppov. Effect of peptidoglycane of staphylococcus aureus cell wall on the mechanism of regulation of contractile activity of rat myometrium by adenylate cyclase system	25
O.V. Korkushko, V.B. Shatilo, V.P. Chyzhova, S.S. Naskalova, Ye.D. Osmak, A.V. Gremiakov, I.A. Antoniuk-Scheglova, G.V. Gavalko, N.S. Naumchuk. Organism reaction to dosed hypoxic hypoxia in the healthy subjects and individuals with prediabetic hydrogen metabolism disturbances	34
N.B. Pranik, S.V. Goncharov, V.L. Gurianova, V.G. Maidannik, M.V. Khaitovych, A.A. Moibenko, V.E. Dosenko. Assosiation analysys of 11 polymorphisms of SNPs with endothelium dependent vasodilatation in children with diabetes mellitus type 1	43
A.S. Dranitsina, O.O. Morgaienko, D.M. Grebinyk L.I. Ostapchenko. Expression of <i>REG1α</i> , <i>GAST</i> and <i>TGFBI</i> genes in conditions of stress-induced gastric mucous lesions development and healing in rats	53
V.V. Garkavenko, E.V. Kolosova, V.D. Maksimova. Stabilometric values of humans under the conditions off orward and backward bent positions	62
Sergey V. Ziblitsev, Svetlana V. Pishchulina, Svetlana V. Kolesnikova, Ruslan N. Boris. Systemic effects of unspecific inflammatory reaction at traumatic brain injury	68
I.V. Golovchenko, M.I. Hayday. Correlation indices of cerebral hemodynamics and electrical activity in children with impaired motor skills	74
S.I. Pavlovych, N.V. Makogon, N.G. Grushka, T.M. Bryzgina, R.I. Janchiy. Morphological changes in mice liver in dynamics of concanavalin A - induced hepatitis	83
A.I. Berezhnyakova, O.D. Jemela, V.F. Cheremisina. The level of general immunoglobulin E in rats of different age with atopic dermatitis	92
T.V. Dovbynychuk, T.M. Chervinska, L.V. Zakordonets, G.M. Tolstanova. The role of histamine in the mechanism of antibiotic-induced changes in colonic ion and water transport	95
L.A. Mogylnytska, O.E. Mogylnytska. Serum levels of endothelial monocyte activating peptide II in type 1 diabetes	102
REVIEWS	
E.A. Shepel, T.Yu. Voznesenskaya, T.V. Blashkiv, R.I. Yanchii. Cumulus cell genes as potential biomarkers of oocyte and embryo developmental competence	107