

# Фізіологічний журнал

ТОМ 60 № 6 2014

---

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

---

Виходить 1 раз на 2 місяці

---

## Зміст

- Коцюруба А.В., Коп'як Б.С., Сагач В.Ф., Щербаков О.Б., Жолобак Н.М., Співак М.Я.* Відновлення наночастинками діоксиду церію стійкості еритроцитів старих щурів до кислотного гемолізу 3
- Тарасова К.В., Лагодич Т.С., Древицька Т.І., Французова С.Б., Карвацький І.М.* Вплив фармакологічної активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів на спонтанну скоротливу активність ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура 10
- Басанець А.В., Долінчук Л.В., Андрущенко Т.А.* Зв'язок поліморфізму C<sup>-1562</sup>→T промотору гена матриксної металопротеїнази-9 з ризиком розвитку хронічного обструктивного захворювання легень у шахтарів 16
- Дорофєєва Н.О., Драчук К.О., Сагач В.Ф.* Кардіогемодинаміка та ефективність механізму Франка-Старлінга у щурів за умов старіння 22
- Чорна С.В., Струтинська Н.А., Семенихіна О.М., Таланов С.А., Коцюруба А.В., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф.* Тривалі фізичні навантаження покращують скоротливу функцію серця у старих щурів за допомогою NO-залежного зменшення чутливості мітохондріальної пори до кальцію 27
- Плотнікова Л.М., Березовський В.Я.* Реакція фібробластоподібних клітин крові на знижений парціальний тиск кисню 36
- Федотова Ю.О., Фролова Г.О.* Ефекти стимуляції та блокади дофамінових рецепторів на емоційні форми поведінки самиць щурів 41
- Рамазанов В.В., Воловельська Е.Л., Коптелов В.О., Бондаренко В.А.* Властивості еритроцитів з невисоким ступенем збереження після заморожування в середовищі з непроникними та проникними кріопротекторами 46
- Григорова Н.В.* Вплив адаптивних гормонів на секреторну активність інсулярного апарату та вміст цинку в ньому і клітинах гіпокампа, шишкоподібної і вилочкової залоз щурів з алоксановим діабетом 54

<i>Кравченко О.О., Якубцова І.В., Хілько Т.Д., Преображенська Т.Д., Остапченко Л.І., Чехун В.Ф.</i> Вплив комплексу природних речовин насіння фенугреку на формування аберантних крипт у слизовій оболонці за умов експериментального канцерогенезу товстої кишки у щурів	62
<i>Торянік Е.Л.</i> Особливості системи коагуляційного гемостазу у вагітних щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією	69
<b>ОГЛЯДИ</b>	
<i>Маньковська І.М., Серебровська Т.В.</i> Мітохондрії як мішень інтервальної гіпоксії	75
<b>ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ</b>	
Олександр Григорович Резніков (до 75-річчя з дня народження)	87
Микола Юхимович Макарчук (до 60-річчя з дня народження)	89
<b>ХРОНІКА</b>	
VI пленум наукового товариства патофізіологів України	91

<sup>1</sup>А.В. Коцюруба, <sup>1</sup>Б.С. Коп'як, <sup>1</sup>В.Ф. Сагач, <sup>2</sup>О.Б. Щербаков, <sup>2</sup>Н.М.Жолобак, <sup>2,3</sup>М.Я. Співак

## Відновлення наночастинками діоксиду церію стійкості еритроцитів старих щурів до кислотного гемолізу

<sup>1</sup>Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; <sup>2</sup>Ін-т мікробіології і вірусології ім Д.К. Заболотного, НАН України, Київ; <sup>3</sup>ТОВ «Діапроф»; E-mail: [toliko49@ukr.net](mailto:toliko49@ukr.net)

*У досліджах in vivo та in vitro вивчали дію нанодисперсного діоксиду церію (НДЦ) на стійкість еритроцитів старих щурів до кислотного гемолізу, який викликали проникненням протонів у матрикс еритроцитів. Показано in vivo значне зниження індексу стійкості еритроцитів крові, тривалості їх повного гемолізу, часу максимального гемолізу, частки лабільних „старих” і, навпаки, зниження частки стабільних „молодих” еритроцитів порівняно з дорослими щурами. Введення per os протягом 14 діб в організм старих щурів 0,1 мг/кг НДЦ повністю відновило стійкість їх еритроцитів до кислотного гемолізу. При цьому значно знижувалася в циркуляції частка „старих” лабільних еритроцитів і, навпаки, значно зростала частка „молодих” надстабільних еритроцитів, що свідчить про відчутний „омолоджувальний” ефект НДЦ. Досліди in vitro показали відсутність прямої гемолітичної дії НДЦ у концентрації  $10^{-3}$ – $10^{-12}$  моль/л.*

*Ключові слова: еритроцити, кислотний гемоліз, старі щури, нанодисперсний діоксид церію.*

### ВСТУП

В організмі людини щохвилини утворюється і гине близько 150 млн еритроцитів. Від інтенсивності цих процесів і їх динамічної рівноваги залежить кількість циркулюючих еритроцитів, що забезпечує тканини киснем, а при її зниженні – підвищує вимоги до скоротливої та насосної функцій серця. У фізіологічних умовах така рівновага визначається еритропоезом та ериптозом [1]. Останній ініціюється надходженням до клітини іонів кальцію і залежить від стійкості мембран еритроцитів до таких пошкоджувальних агентів, як оксидативний стрес, енергетична недостатність, гіпертермія тощо. Оксидативний стрес є найбільш відомим тригером ериптозу [2]. Можливо, у зв'язку зі значним підсиленням вільнорадикальних процесів з віком і пов'язано зниження стійкості еритроцитів до пошкоджувальних агентів, що

спостерігається у старих організмів [3–5] (яка може відновлюватися введенням антиоксидантів [6]). Одним з найбільш поширених в організмі пошкоджувальних агентів для мембран еритроцитів є закиснення середовища у зв'язку з порушенням тканинного дихання (гіпоксія, ішемія тощо), тому як тест на стійкість мембран еритроцитів було обрано відомий кислотний гемоліз.

Раніше [7] нами було показано одночасне зі зниженням артеріального тиску внаслідок відновлення ендотеліозалежної скоротливої активності гладеньких м'язів грудної аорти, значне підвищення стійкості еритроцитів старих щурів до кислотного гемолізу після багаторазового опромінення червоним лазером. Це свідчить про залежність артеріального тиску від фізико-хімічних властивостей плазматичної мембрани циркулюючих ери-

троцитів крові. Цей феномен підтверджує важливу їх роль і в регуляції серцево-судинної системи організму (хоча б унаслідок потужного реутилізаційного синтезу NO [8], а не лише, що відомо, імунної системи [9]. Важливою є також наявність прямої кореляції між інтенсивністю гемолізу еритроцитів крові і набуханням мітохондрій [10] для вивчення вазо-і кардіопротекторних механізмів дії нових неорганічних матеріалів. Нами було проведено на еритроцитах піонерське дослідження в Україні біоефектів наномагнетиту з іммобілізованим екдистероном [11], який, як пізніше виявилось [12], є потужним інгібітором і  $\text{Ca}^{2+}$ -, і радикалзалежного відкриття мітохондріальної пори, значно підвищеного в мітохондріях серця старих щурів. За останні роки значно зріс інтерес до вивчення біоефектів наноцерію – нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) – поліфункціонального неорганічного матеріалу, який нині широко застосовується в медицині (кардіологія, офтальмологія, онкологія тощо) за рахунок надпроникливості через мембрани клітин і величезної поверхні з унікальними властивостями [13–16], але вплив його на еритроцити крові не вивчений.

Мета нашої роботи – дослідження дії НДЦ на кислотний гемоліз еритроцитів у старих щурів, більшість з яких мають високу здатність до гемолітичного руйнування плазматичної мембрани.

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на 10 дорослих безпородних щурах віком 6 міс і 10 старих віком 24 міс. Старих щурів розділяли на дві групи по 5 тварин у кожній. Щурам контрольної групи згодовували протягом 14 діб стандартний раціон віварію, а в питну воду добавляли лише буфер, у якому розчиняли НДЦ, тоді як тваринам дослідної групи у питну воду додавали суспензію НДЦ у буфері з розрахунку по 0,1 мг/кг. Через 14 діб тварин декапітували, відбирали кров, з якої виділяли

еритроцити центрифугуванням при  $1500 \text{ хв}^{-1}$  протягом 30 хв. Суспензію еритроцитів крові дорослих, контрольних і дослідних старих щурів в ізотонічному середовищі 0,14 М NaCl використовували для проведення кінетичного аналізу кислотного гемолізу для оцінки мембраностабілізуючої дії НДЦ. Суть методу полягає у визначенні кількості клітин, що гемолізуються під дією слабкої кислоти (0,004 N HCl) за певний проміжок часу. В дослідах *in vitro* еритрограми фіксували при різних концентраціях ( $10^{-3}$ – $10^{-12}$  моль/л) НДЦ у суспензії еритроцитів дорослих щурів.

Всі роботи з тваринами проводили відповідно до Закону України від 21.02.2006 №3447-IV „Про захист від жорстокого поводження” та згідно з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами.

*Мембранопротекторна дія НДЦ у дослідах in vivo.* Кислотна резистентність характеризує цілісність мембрани еритроцитів і ступінь її пошкодження за дії різних факторів у період старіння. Її оцінювали за кінетичними показниками гемолізу, що індукували 0,004 N HCl [17]. Гемоліз реєстрували спектрофотометрично, визначаючи кількість зруйнованих клітин через рівні проміжки часу (30 с) за зміною інтегрального світлорозсіювання суспензії еритроцитів при  $\lambda=750$  нм. Кислотний лізис еритроцитів ініціювали, вносячи 2 мл 0,004N розчину HCl у скляну кювету спектрофотометра (1 см), в яку попередньо поміщали 2 мл їх суспензії з густиною еритроцитів близько  $0,7 \cdot 10^{-6}$  клітин на 1 мл. При такій густині інтегральне світлорозсіювання, що залежить від числа, розмірів і форми клітин, пропорційне числу клітин у суспензії. Тривалість гемолізу окремого еритроцита не перевищує 10 с, тому 30-секундний інтервал між вимірами екстинції гарантує неможливість врахувати його двічі. Виходячи з цього, ми вираховували відсоток розподілу еритроцитів за групами стійкості, реєструючи еритрограми кожного зразка суспензії. Стійкість кожної фракції еритроцитів можна характеризувати часом її виявлення на

еритрограмі, а в цілому еритрограму (див. рисунок) оцінювали за такими кінетичними показниками, як:

- час початку кислотного гемолізу ( $t_0$ );
- час завершення гемолізу ( $t_k$ );
- загальна тривалість гемолізу ( $\Delta t = t_k - t_0$ ), що визначає з одного боку, стан плазматичної мембрани еритроцитів (проникність для протонів), а з іншого – напруженість еритропоезу для дослідів *in vivo*;

- максимум кінетичної кривої ( $t_{max}$ ), що характеризує стабільність основної популяції еритроцитів у цьому зразку крові. Зсув максимуму вліво на осі часу вказує на зниження стабільності і, навпаки, зсув вправо – її зростання. Поява високостабільних чи низькостабільних фракцій свідчить про гетерогенність популяції еритроцитів за показниками стабільності плазматичної мембрани до кислотного гемолізу;

- відсоток максимального гемолізу еритроцитів, кількість еритроцитів, що гемолізуються на максимумі кінетичної кривої.

- відсоток лабільних „старих” еритроцитів – відносна кількість еритроцитів у циркуляції, які гемолізуються за перші 2,5 хв гемолізу;

- відсоток стабільних „молодих” еритроцитів – відносна кількість еритроцитів у циркуляції, які гемолізуються після 7,5 хв гемолізу;

- індекс стійкості еритроцитів (I) що є інтегральним числом, яке характеризує гемолітичну стійкість усієї популяції еритроцитів конкретного дослідного зразка, визначали, додаючи добутки кількості клітин, що гемолізували у цей період ( $\alpha_i$ ) на  $t_i$  ( $I = \sum \alpha_i \cdot t_i$ ).

*Гемолітична дія НДЦ у дослідях in vitro.* Для оцінки можливої мембранопшкоджувальної (гемолітичної) дії НДЦ визначали кислотну резистентність еритроцитів крові дорослих щурів за наявності  $10^{-3}$ – $10^{-12}$  моль/л НДЦ.

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), SDUDENT (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США)

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зрілі еритроцити щурів, як і людини – клітини дископодібної двояковвігнутої форми, розмір і еластичність яких допомагають їм рухатися по капілярах, а форма підвищує площу поверхні та полегшує газообмін. У них відсутнє ядро і мітохондрії. У кістковому мозку в процесі еритропоезу кожен секунду утворюється понад 2 млн нових „молодих” еритроцитів, стійких до гемолізу. Вони циркулюють у крові близько 100–120 діб, перетворюючись у „старі” клітини з підвищеною здатністю до гемолізу. Непшкоджені старі клітини поглинаються макрофагами унаслідок ериптозу (апоптозу еритроцитів), що не супроводжується руйнуванням плазматичної мембрани і виходом у плазму гемоглобіну і аденозинтрифосфату.

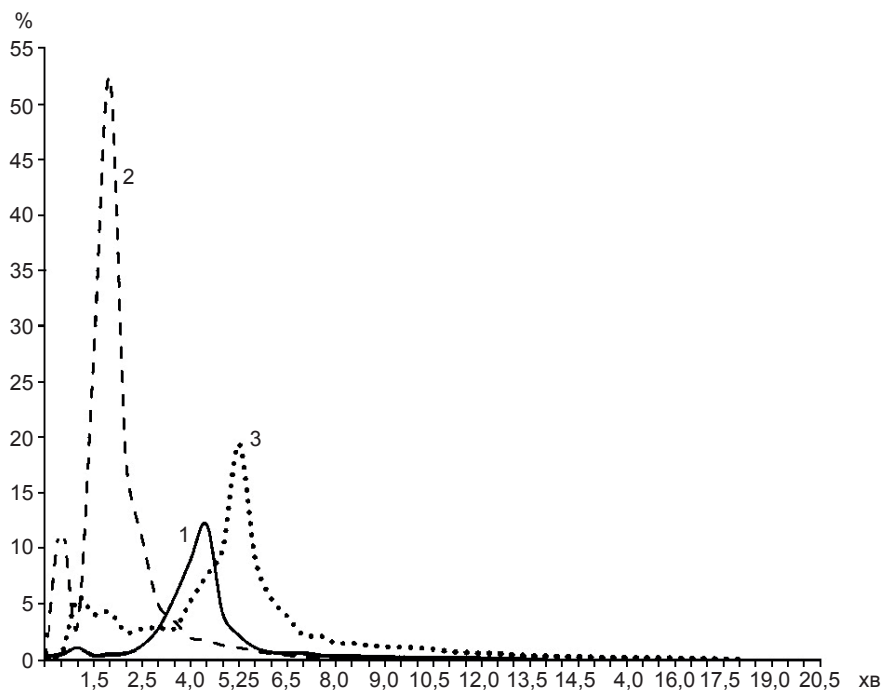
Позаяк стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу (некрозу еритроцитів) визначається проникністю плазматичної мембрани клітин для протонів, речовини, що її інгібують, збільшуватимуть стійкість, а речовини, що збільшують проникність, навпаки, знижуватимуть її. При осмотичному гемолізі еритроцити набухають і перетворюються у круглі сфероцити (цей процес називається сферуляція) унаслідок проникнення води. Надмірне набухання руйнує плазматичну мембрану. При швидкому кислотному гемолізі еритроцитів у старих щурів мембрани дискоцитів можуть руйнуватися і без переходу у форму сфероциту. За ериптозу, що викликається входом  $Ca^{2+}$  у цитозоль клітин, еритроцити не набухають, а, навпаки, „зморщуються”.

На рисунку представлено усереднені кислотні еритрограми еритроцитів щурів різних досліджених груп. У контрольних старих щурів (крива 2) максимум кривої гемолізу зміщено ліворуч, а у тих, що отримували НДЦ (крива 3), навпаки – праворуч від кривої гемолізу дорослих тварин (крива 1). На основі індивідуальних кислотних еритрограм розраховували показники, середні значення яких представлено в таблиці.

У старих щурів частка лабільних („старих”) еритроцитів, які гемолізуються менше ніж за 2,5 хв, становить 63,3 %, що більш ніж у 5 разів більше, ніж у дорослих щурів (12,6 %; див. таблицю). Це зумовлюється легкою проникністю протонів крізь мембрану (через аніонний канал або за рахунок кальційпротонного обміну внаслідок „виходу”  $\text{Ca}^{2+}$  із еритроцитів) у значній кількості клітин (їх мембрана більш проникна для протонів). Такі еритроцити матимуть менший життєвий цикл, швидше руйнуватимуться та викидатимуть назовні АТФ у неконтрольованій великій кількості, що зумовлюватиме менший відсоток еритроцитів, які будуть доносити кисень до тканин, а це може спричиняти виникнення гіпоксичного стану. Короткочасне (протягом 14 діб) введення НДЦ повністю нормалізує (зменшує) частку лабільних „старих” еритроцитів у крові старих щурів. Отже, наноцерій або надзвичайно мінімалізує проникність для протона крізь плазматичну мембрану «старих» лабільних еритроцитів, які циркулювали, або значно стимулює викид у циркуляцію

нових „молодих” еритроцитів, впливаючи на інтенсивність еритропоезу. Про можливу стимуляцію еритропоезу за дії НДЦ свідчить значне (більш ніж у 18 разів) збільшення в крові частки стабільних („молодих”) еритроцитів із малопроникною для протона мембраною (див. таблицю). При цьому у старих щурів достовірно підвищується тривалість кислотного гемолізу (від  $8,3 \pm 1,1$  до  $19,4 \pm 3,1$  хв), час закінчення гемолізу (від  $6,3 \pm 1,1$  до  $20,0 \pm 2,8$  хв) і зростає (від  $190,1 \pm 23,4$  до  $693,8 \pm 74,7$  ум.од.) інтегральний індекс стійкості еритроцитів (див. таблицю).

Загальні молекулярні механізми пошкодження еритроцитів за кислотного гемолізу залишаються нез’ясованими. Раніше було показано, що внаслідок зниження рН зовнішнього середовища глікокалікс на мембрані еритроцитів трансформується в пори, що спричиняє її дестабілізацію з наступним лізісом еритроцитів. Згідно з Zavodnjuk і співавт. [18], лізис еритроцитів у кислому середовищі включає три основні стадії: проникнення протонів через плазматичну мемб-



Усереднені кислотні еритрограми еритроцитів дорослих (1), старих (2) та старих щурів, що отримували наноцерій (3). За вісю абсцис – тривалість, за вісю ординат – рівень гемолізу



## Кінетичні кислотні еритрограми щурів (M ± m)

Показник	Дорослі щури (норма, n=10)	Старі щури (контроль, n=5)	Старі щури, які отримували наноцерій (n=5)
Початок гемолізу ( $t_0$ ), хв	0,3 ± 0,04	0 ± 0	0,6 ± 0,08*
Тривалість гемолізу ( $\Delta t$ ), хв	13,8 ± 1,6	8,3 ± 1,1*	19,4 ± 3,1**
Відсоток максимального гемолізу, %	12,1 ± 1,44	52,41 ± 7,49*	19,44 ± 1,84**
Час максимального гемолізу $t_{max}$ , хв	4,40 ± 0,46	1,70 ± 0,32*	5,20 ± 0,07**
Частка лабільних клітин (гемоліз до 2,5 хв), %	12,06 ± 1,38	63,3 ± 12,94*	7,17 ± 1,13**
Частка стабільних клітин гемоліз (після 7,5 хв), %	28,1 ± 3,1	1,51 ± 0,22*	27,56 ± 3,64**

рану еритроцитів, протонування гемоглобіну та білків мембрани і, як наслідок останнього, осмотичне їх руйнування.

Використовуючи метод кислотного гемолізу, ми мали змогу отримати інформацію про структурну організацію плазматичної мембрани найчисленніших клітин організму – еритроцитів і взаємодії, що її стабілізують чи дестабілізують при старінні, а також оцінити дію НДЦ на кінетику проходження протона через плазматичну мембрану еритроцитів, що залежить від стану її нативності. Раніше нами показано збільшення утворення радикалів кисню й азоту в еритроцитах старих щурів [8], не виключено, що спостережувана нами відновлювальна дія НДЦ на їх гемоліз також реалізується через інгібування процесів генерації радикалів кисню і/чи азоту як у самих клітинах, так і в оточуючому їх середовищі – плазмі крові, білих клітинах крові чи в ендотелії судин. Отже, дослідження *in vivo* показали здатність НДЦ відновлювати стабільність еритроцитів старих щурів до кислотного гемолізу, тобто їхнє значне „омолодження”, внаслідок можливого інгібування проникнення протона через плазматичну мембрану. Останнє може бути наслідком як прямої дії НДЦ на еритроцити (інгібування процесу транспорту протона через аніонний канал або кальцій-протонний обмінник),

так і опосередкованої, через стимуляцію еритропоезу. Показано також ефективність кінетичного методу визначення кислотної резистентності еритроцитів для встановлення фармакологічних властивостей НДЦ як *in vitro*, так і, особливо, *in vivo* і безсумнівно засвідчено потужні мембраностабілізуювальні властивості НДЦ. Простота й ефективність кінетичного методу визначення кислотної резистентності еритроцитів за різних фізіологічних станів організму в досліджах *in vivo*, а також за наявності пошкоджувальних чи стабілізуювальних агентів дають змогу рекомендувати його для широкого використання в наукових дослідженнях і в практичній медицині.

## ВИСНОВКИ

1. Старіння організму супроводжується значним зниженням у циркуляції крові частки стабільних до кислотного гемолізу („молодих”) еритроцитів і, навпаки, значним підвищенням частки лабільних („старих”) еритроцитів із легкою проникністю для протонів.

2. Встановлено *in vivo*, що неорганічні частинки нанодисперсного діоксиду церію (НДЦ) відновлюють стійкість еритроцитів крові старих щурів до кислотного гемолізу внаслідок значного зростання в циркуляції частки стійких до нього „молодих” еритроци-

тів. і, навпаки, зниженням частки лабільних «старих» клітин.

3. Стимуляції кислотного гемолізу при додаванні в гемолізуюче середовище НДЦ в діапазоні концентрацій  $10^{-3}$ – $10^{-12}$  моль/л не відбувається.

**А.В. Коцюрuba, Б.С. Копьяк, В.Ф. Сагач,  
О.Б. Щербакoв, Н.М.Жолобак, Н.Я. Спивак**

### **ВОССТАНОВЛЕНИЕ НАНОЧАСТИЧКАМИ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ СТАРЫХ КРЫС К КИСЛОТНОМУ ГЕМОЛИЗУ**

В опытах in vivo и in vitro исследовали действие нанодисперсного диоксида церия (НДЦ) на устойчивость эритроцитов старых крыс к кислотному гемолизу. Проведен анализ кинетических кривых кислотного гемолиза, вызываемого проникновением протонов в матрикс эритроцитов. В опытах in vivo показали значительное снижение индекса устойчивости эритроцитов, продолжительности их полного гемолиза, времени максимального гемолиза, значительное увеличение доли лабильных «старых» и, наоборот, снижение доли стабильных «молодых» эритроцитов у старых животных по сравнению со взрослыми. Введение старым животным per os в течение 14 сут 0,1 мг/кг НДЦ полностью возобновило устойчивость их эритроцитов к кислотному гемолизу. При этом значительно снижалась в циркуляции доля «старых» лабильных эритроцитов и, наоборот, значительно возрастала доля «молодых» стабильных эритроцитов, что свидетельствует об ощутимом «омолаживающем» эффекте НДЦ. Опыты in vitro показали отсутствие прямого гемолитического действия НДЦ в концентрациях  $10^{-3}$ – $10^{-12}$  моль/л. Ключевые слова: эритроциты, кислотный гемолиз, старые крысы, нанодисперсный диоксид церия .

**A.V. Kotsuruba, B.S. Kopjak, V.F. Sagach,  
A.V. Shcherbakov, N.M.Zholobak, N.JA.Spivak**

### **RESTORATION OF ERYTHROCYTES STABILITY TO ACID HEMOLYSIS BY CERIUM OXIDE NANOPARTICLES IN OLD RATS**

In experiments in vivo and in vitro we investigated the effect of cerium oxide nanoparticles on the stability of red blood cells of old rats. The analysis of the kinetic curves of acid hemolysis caused by the penetration of protons into the matrix of erythrocytes in experiments in vivo showed a significant reduction in the so-called stability index, the times of duration of complete hemolysis, the time of hemolysis maximum, the fate of labile “old” and, conversely, decreased the fate of “young” erythrocytes in old animals blood compared with adults. Introduction to old rats per os for 14 days 0.1 mg /

kg of cerium oxide nanoparticles fully restored resistance of erythrocytes to acid hemolysis. Cerium oxide nanoparticles decreased in circulation the fate of labile “old” erythrocytes and, conversely, significantly increased the fate of “young” stable erythrocytes. Experiments in vitro showed no direct hemolytic action of cerium oxide nanoparticles at concentrations –  $10^{-3}$  M -  $10^{-12}$  M.

Key words: erythrocytes, acid hemolysis, old rats, cerium oxide nanoparticles.

*Bogomoletz Institute of physiology NAS of Ukraine, Kyiv;  
Institute of microbiology and virusology NAS of Ukraine, Kyiv;  
LCL «Diaprof».*

### **REFERENCES**

1. Lang F, Quadri SM. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif.* 2012;33(1-3):125-30.
2. Lang F, Abed M, Lang E, Föller M. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(1):138-53.
3. Renha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, da Costa Huss JC, de Souza TM, de Freitas MV, Netto RC Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes . *Mech Ageing Dev.* 2007;128(7-8):444-9.
4. Ghashghaeinia M, Cluitmans JC, Akel A, Dreischer P, Toulany M, Koberie M et al. The impact of erythrocyte age on eryptosis. *Br J Haematol.* 2012;157(5):606-14.
5. Wang Y, Liu XS Mechanisms of aging and programmed death of erythrocytes. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi .* 2014; 22(4):1124-8.
6. Qadri SM, Föller M, Lang F. Inhibition of suicidal erythrocyte death by resveratrol. *Life Sci.* 2009; 85(1-2):33-8.
7. Fedorov SM, Baziljuk OV, Kotsuruba AV, Korkach YuP, Sagach VF. Magnetic-Laser influence on the system of nitric oxide and contractile activity of smooth muscles of rat aorta under hypertension. *Fiziologichnyj Zhurnal.* 2012; 58( 6):36–47. [Ukrainian].
8. Sagach VF, Baziljuk OV, Stepanenko LG, Korkach YuP, Kotsuruba AV. Enalapril action on nitric oxide synthesis, oxidative metabolism and vascular tone of aging rat. *Fiziol Zh. .* 2007;53(4):15–26. [Ukrainian].
9. Prokopenko LG, Siplivaja LE. Erythrocytes as modulators of immune reactions. *Usp Physiol Nauk .* 1992; 23(4):89-106. [Russian].
10. Goodall AH, Fisher D, Lucy JA. Cell fusion, haemolysis and mitochondrial swelling induced by retinol and derivatives . *Biochem. Biophys. Acta.*1980; 595(1): 9-14.
11. Mykhaylyk O, Kotsuruba A, Dudchenko N, Tozok G. Signal transduction by erythrocytes on specific binding of doxorubicin immobilized on nano dispersed magnetite. *A Magn Magn Mat.* 2005; 293(4): 464-72.
12. Sagach VF, Korkach YuP, Kotsuruba AV, Rudyk OV, Vavilova GL. Mitochondrial permeability transition pore opening inhibition by ecdysterone in heart mitochondria of aging rats. *Fiziol Zh.* 2008; 54(4):3–10. [Ukrainian].



13. Cai X, Seal S, McGinnis JF Sustained inhibition of neovascularization in vldlr<sup>-/-</sup> mice following intravitreal injection of cerium oxide nanoparticles and the role of the ASK1-P38/JNK-NF- $\kappa$ B pathway. *Biomaterials*. 2014; 35(1):249-58.
14. Geraets L, Oomen AG, Schroeter JD, Coleman VA, Cassee FR. Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: results from a 28-day exposure study. *Toxicol Sci*. 2012; 127(2):463-73.
15. Ciofani G, Genchi GG, Mazzolai B, Mattoli V. Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in PC12 cells following treatment with cerium oxide nanoparticles. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840(1):495-506.
16. Cheng G, Guo W, Han L, Chen E, Kong L, Wang L, et al. Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways. *Toxicol In Vitro*. 2013; 27(3): 1082-88.
17. Terskov IA, Gittelzon II. Method chimicheskikh (kislotnich) erythrogram. *Biophysika*. 1957; 2(2) :259-66. [Russian].
18. Zavodnjuk I, Piletskaja TP. Kislotnij lisis erythrocytov cheloveka. *Biophysika*. 1997; 42(5) : 106-12. [Russian].
19. Anderson DR, Davis JL, Carraway KL. Calcium-promoted changes of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem*. 1977; 252(19): 6617-23.
20. Petrov V, Lijnen P. Regulation of human erythrocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by soluble and particulate guanylat cyclase. *Am. J. Physiol*. 1996; 271(8):C1556-64.
21. Iukacs GL, Kapus A, Nanda A. Proton conductance of the plasma membrane: properties, regulation and functional role. *Am. J. Physiol*. 1993; 265(1) :C3-14.

*Матеріал надійшов до редакції 30.09.2014*

<sup>1</sup>К.В. Тарасова, <sup>1</sup>Т.С. Лагодич, <sup>2</sup>Т.І. Древицька, <sup>2</sup>С.Б. Французова, <sup>1</sup>І.М. Карвацький

## Вплив фармакологічної активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів на спонтанну скоротливу активність ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура

<sup>1</sup>Нац. мед. ун-т ім.О.О. Богомольця; Київ; <sup>2</sup>Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; E-mail: fkokalin@volicable.com

*Досліджено спонтанну скоротливу активність ізольованих культивованих неонатальних кардіоміоцитів. Виявлено, що через 48 год після виділення значення показників становило: амплітуда скорочень –  $1,96 \pm 0,362$  мкм, частота –  $59,4 \pm 6,59$  хв<sup>-1</sup>, швидкість скорочення –  $10,39 \pm 1,92$  мкм/с, швидкість розслаблення –  $7,16 \pm 1,89$  мкм/с. У порівняльному вивченні впливу активаторів аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів діазоксиду і його фторвмісного аналога показано, що вони різною мірою впливають на скоротливу функцію ізольованих кардіоміоцитів: діазоксид викликає її повне припинення, а його фторвмісний аналог – незначні зміни: зменшення часу досягнення піку (з  $0,16 \pm 0,02$  до  $0,15 \pm 0,15$  с), амплітуди скорочень (з  $1,91 \pm 0,39$  до  $1,47 \pm 0,28$  мкм), швидкості розслаблення (з  $9,53 \pm 1,62$  до  $7,82 \pm 1,1$  мкм/с) при незмінній частоті та швидкості скорочення. Неістотний гальмівний вплив фторвмісного аналога діазоксиду на скоротливу активність неонатальних кардіоміоцитів є перевагою цієї речовини порівняно з її прототипом (діазоксидом).*

*Ключові слова: ізольовані неонатальні кардіоміоцити, показники спонтанної скоротливої активності, активатори аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів.*

### ВСТУП

Серцево-судинні захворювання є основною причиною смертності населення України, що створює необхідність розробки ефективних фізіологічно обґрунтованих підходів до корекції функції серця, зокрема, через застосування кардіопротекторів. До таких сполук відносять активатори аденозинтрифосфатчутливих калієвих ( $K_{ATP}$ )-каналів, механізм дії яких остаточно не з'ясований. Отже, вивчення функціональних змін серцевого м'яза під впливом модуляторів калієвих каналів є актуальною фізіологічною проблемою.

Використання як об'єкта дослідження ізольованих кардіоміоцитів дає змогу дослідити морфологічні, біохімічні та фізіологічні

характеристики серця. Це зручна модель для оцінки скоротливості, моделювання ішемії, аноксії – реоксигенації, визначення кардіотоксичності різних сполук тощо. Особливістю неонатальних кардіоміоцитів є їх здатність до спонтанних скорочень, що виникають у культурі клітин починаючи з 3-ї доби культивування, а за умови вибіркової адгезії великих клітин – через добу після посіву [1]. Разом з тим практично немає праць у вітчизняних авторів з вивчення показників скорочення ізольованих неонатальних кардіоміоцитів.

Інтерес до дослідження функції  $K_{ATP}$ -каналів зумовлений тим, що, закриті в звичайних умовах (при вмісті АТФ у клітині у межах норми), вони водночас найчисленніші серед усіх каналів у серці (приблизно 2000–3000 у

кожній клітині). Припускають, що активатор цих каналів діазоксид має низку потенційно корисних властивостей, з чим і пов'язана різноплановість досліджень цієї речовини. Так, кардіопротекторну властивість діазоксиду – здатність викликати прекодиціювання серця, вивчали зокрема, на рівні ізольованих кардіоміоцитів [2–4]. Проте немає чітких даних про механізми розвитку цього впливу. Нині діазоксид, препарат з неодноразово підтвердженими на тваринних моделях кардіопротекторними властивостями, як лікувальний засіб практично не використовують, що, очевидно, пов'язано з його численними побічними ефектами (затримка натрію та води, гіперглікемія тощо). Тому науковий інтерес викликає дослідження сполук з корисними властивостями прототипу (діазоксиду), що водночас позбавлені його негативних ефектів. Раніше нами встановлено, що фторвмісний аналог діазоксиду має переваги порівняно з прототипом: не викликає інтерстиційного набряку в міокарді [5], більш ефективно покращує в ньому енергетичний обмін, менше впливає на проникність клітинної мембрани [6], швидше відновлює амплітуду скорочень ішемізованого папілярного м'яза [7].

У літературі є лише поодинокі відомості про вплив активаторів і блокаторів  $K_{ATP}$ -каналів у не стресових для ізольованих кардіоміоцитів умовах [8]. Враховуючи високу спорідненість діазоксиду до  $K_{ATP}$ -каналів ми припустили, що їх фармакологічне відкриття може позначитися на скоротливій функції кардіоміоцитів без моделювання ішемії.

Мета нашої роботи – дослідження порівняльного впливу активаторів  $K_{ATP}$ -каналів (діазоксиду та його фторвмісного аналога) на спонтанну скоротливу активність ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура.

## МЕТОДИКА

Неонатальні кардіоміоцити отримували з міокарда шлуночків дводобових щурів ферментативним гідролізом [9] із модифікаціями

[10]. Шлуночки відокремлювали від передсердь, механічно подрібнювали ножицями, а отримані шматочки міокарда розміром 1–2 мм<sup>3</sup> переносили у буферний сольовий розчин (рН 7,4) такого складу (ммоль/л): HEPES – 20, KCl – 5,4, NaCl – 116,4, глюкоза – 5,5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,4 та K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,4, що містив колагеназу II типу (95 ОД/мл) і панкреатин (0,6 мг/мл). Виділені клітини ресуспендували у живильному середовищі Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 – 4 : 1), теляча сироватка – 15 %, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 462 ммоль/л, HEPES – 15 ммоль /л та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл). Клітини розміщували у чашки для культивування із щільністю 120 000 на 1 см<sup>2</sup>, яке проводили при 37 °С у газовому середовищі – 5 % CO<sub>2</sub> та 95 % атмосферного повітря протягом 2–5 діб.

Частоту спонтанних скорочень кардіоміоцитів визначали й оцінювали за методикою Webster та співавт. [11]: кількість скорочень визначали візуально за 60 с у поодинокі розташованих клітин, починаючи з 2 діб культивування. Скоротливу функцію горизонтально розташованих кардіоміоцитів реєстрували та аналізували за допомогою системи IonOptix, що сканує відхилення лінії краю кардіоміоцита при його скороченні. Механічні властивості клітин оцінювали за такими показниками: пік скорочення (ПС) або амплітуда скорочення в мікрометрах або у відсотках відносно довжини клітини в стані розслаблення), час досягнення ПС (ЧПС, секунди), час відновлення довжини (ЧВД, секунди), максимальна швидкість скорочення (МШС, мікрометри за 1 с) і розслаблення (МШР, мікрометри за 1 с). Кардіоміоцити, що проявляли, або занадто часті скорочення, або ті, що скорочувалися менше ніж на 5 % від вихідної довжини не вивчали.

Для вивчення впливу досліджуваних речовин на показники скорочень клітин їх обробляли препаратом, таку саму кількість клітин досліджували, замінювали середо-

вище, клітини інкубували протягом ще 2 год і втретє визначали показники. На всіх етапах клітини спостерігали під мікроскопом «Olympus СКХ 41» і одночасно на моніторі комп'ютера з використанням камери «IonOptix MyoCam». Результати обробляли за методикою Belostotskaya та співавт. [1]: усереднювали значення кожного експерименту, декількох повторів і різних експериментів з однаковими умовами проведення. Значення представлені як «середнє ± похибка середнього» ( $M \pm m$ ). Результати обробляли статистично з допомогою програми Excel 2000 та Origin 8.0. Вірогідність різниці середніх значень визначали за критерієм t Стюдента. Значення  $P < 0,05$  вважали вірогідними.

Використано речовини: діазоксид (7-chloro-3-methyl-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide) і його аналог, синтезований в Інституті органічної хімії НАН України під керівництвом проф. Л.М. Ягупольського, що містить у положенні 7 конденсованого гетероциклу диформетоксильну групу замість хлору. Обидві сполуки розчиняли в диметилсульфоксиді, кінцева концентрація якого не перевищувала 0,1% і використовували в концентрації 100 мкмоль/л.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При фіксації свіжовиділених кардіоміоцитів на дні чашок швидко змінювалася їхня

форма: округлі клітини діаметром близько 10 мкм, розпластуючись, відпускали від двох відростків, збільшуючись у розмірі приблизно втричі. Через 2 доби після посіву більшість кардіоміоцитів у полі зору проявляли спонтанні скорочення, що неістотно відрізнялися за амплітудою ( $1,96 \pm 0,362$  мкм) і частотою ( $59,4 \pm 6,59$  хв<sup>-1</sup>), МШС становила  $10,39 \pm 1,92$ , МШР –  $7,16 \pm 1,89$  мкм/с. Приклад репрезентативних фрагментів запису кривих скорочення представлено на рисунку.

Зареєстровані нами показники наближені до даних літератури. Так, частота спонтанних скорочень за спостереженнями різних дослідників становить від 61 до 83 хв<sup>-1</sup> [12–14], хоча у різних культурах може значно відрізнятися ( $25$ – $140$  хв<sup>-1</sup>), і при великій частоті неповне розслаблення знижує амплітуду скорочення [15]. Швидкість теж варіює в широких межах: від 3,4 [13] до 30,1 мкм/с [16]. Значне зменшення амплітуди та швидкості скорочення і розслаблення є проявом ішемічного пошкодження кардіоміоцитів.

Показано, що значення скоротливої активності кардіоміоцитів через 48 ( $n=22$ ) і 72 або 96 ( $n=22$ ) год після виділення помітно відрізняються: при збільшенні терміну культивування існує тенденція до зростання амплітуди (з  $1,96 \pm 0,362$  до  $2,55 \pm 0,28$  мкм,  $P > 0,05$ ), збільшується частота (з  $59,4 \pm 6,59$  до  $84 \pm 5,92$  хв<sup>-1</sup>,  $P < 0,05$ ), швидкість скорочення (з  $10,39 \pm 1,92$  до  $16,36 \pm 2,17$  мкм/с,  $P < 0,05$ )



Скорочення інтактних ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура: а – три послідовних скорочення, б – поодинокі скорочення. Цифрами позначено секунди, у відсотках – зменшення довжини кардіоміоцита відносно вихідного значення

і розслаблення (з  $7,16 \pm 1,89$  до  $10,95 \pm 0,72$  мкм/с,  $P < 0,05$ ) й не змінюється тривалість скорочення. Про збільшення скоротливої активності кардіоміоцитів при подовженні терміну культивування свідчать літературні дані [11].

Разом з тим реєстрація показників скоротливої активності саме у поодинокі розташованих закріплених неонатальних кардіоміоцитів при збільшенні часу культивування значно ускладнювалася через їх здатність утворювати міжклітинні з'єднання. Враховуючи достатню (не менше 50 % у полі зору) кількість таких клітин їх було використано як контроль.

Водночас за частотою скорочень ця популяція кардіоміоцитів виявилася неоднорідною, але в межах частот спонтанних скорочень від  $28 \pm 3,69$  до  $68,75 \pm 5,23$  хв<sup>-1</sup> значної різниці відсотка зменшення довжини клітини не було (7,33 і 8,72 % відповідно,  $P > 0,05$ ), тобто властива серцю щура негативна хроноінотропна залежність не спостерігалася. Очевидно, про таку залежність можливо говорити лише у такому разі, коли під дією екзогенних або ендогенних чинників власти-

ва цієї клітини частота скорочень зазнає змін. Кардіоміоцити проявили адекватну реакцію на адреналін (таблиця): істотно підвищилася частота скорочень, МШС і МШР, незначно зменшився ПС, що свідчить про належну якість їх виділення і культивування.

Ми провели порівняльне дослідження впливу потенційних кардіопротекторів – активаторів  $K_{ATP}$ -каналів на показники скоротливої активності ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щура. При додаванні в розчин для культивування діазоксиду протягом 5 хв припинялися спонтанні скорочення усіх кардіоміоцитів. Через 30–60 хв після заміни розчину у більшості клітин така активність відновлювалася до вихідного рівня. Наші результати загалом узгоджуються з даними літератури: на схожих моделях показано негативний хронотропний [17] і, залежно від дози, позитивний [18] чи негативний [19] інотропний вплив діазоксиду.

Установлено, що фторвмісний аналог діазоксиду викликав зникнення спонтанної активності лише у незначній кількості кардіоміоцитів, у яких частота скорочень у вихідному стані була мінімальною (18–

#### Показники спонтанної скоротливої активності ізольованих культивованих неонатальних кардіоміоцитів щура

Показники	До дії адреналіну (n=28)	Адреналін (n=10)	До дії аналога діазоксиду (n=22)	Аналог діазоксиду (n=16)
Частота скорочення, хв <sup>-1</sup>	$45,00 \pm 6,106$	$82,00 \pm 5,686^*$	$48,86 \pm 10,93$	$49,00 \pm 9,768$
Відсоток зменшення довжини	$8,41 \pm 0,687$	$6,13 \pm 0,055^*$	$9,73 \pm 1,969$	$7,53 \pm 1,255$
Час піку скорочення, с	$0,12 \pm 0,016$	$0,06 \pm 0,003^*$	$0,16 \pm 0,019$	$0,15 \pm 0,015$
Час відновлення довжини скорочення, с	$0,14 \pm 0,016$	$0,09 \pm 0,001^*$	$0,19 \pm 0,025$	$0,21 \pm 0,020$
Максимальна швидкість скорочення, мкм/с	$8,30 \pm 0,240$	$16,46 \pm 1,347^*$	$9,53 \pm 1,619$	$8,64 \pm 0,874$
Максимальна швидкість розслаблення, мкм/с	$7,91 \pm 0,255$	$10,44 \pm 0,642^*$	$8,26 \pm 0,818$	$7,82 \pm 1,105$

Примітка. \*  $P < 0,05$ .



24 хв<sup>-1</sup>), що, очевидно, зумовлено більшою порівняно з прототипом ліпофільністю цієї речовини та її меншою токсичністю. У більшості кардіоміоцитів неістотно зменшилась амплітуда скорочень (з  $1,91 \pm 0,39$  до  $1,47 \pm 0,28$  мкм, інші показники практично не змінилися (див. таблицю). Незначний гальмівний вплив діазоксиду на скоротливу активність інтактних неонатальних кардіоміоцитів є перевагою цієї речовини порівняно з її прототипом (діазоксидом). Але слід зазначити, що висновки таких досліджень відносно органа або організму в цілому повинні застосовуватися обережно, бо вони не відображають усієї складності процесів, які відбуваються в позаклітинному просторі, а також судинних, гормональних і нервових впливів. Враховуючи перспективність вивчення і механізмів дії аналога діазоксиду, ми вважаємо за необхідне продовжити дослідження на різних моделях ішемії кардіоміоцитів, зокрема, у віковому аспекті.

**Е.В. Тарасова, Т.С. Лагодич, Т.И. Древицкая, И.Н. Карвацкий, С.Б. Французова**

#### **ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАНАЛОВ НА ПАРАМЕТРЫ СПОНТАННУЮ СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ**

Исследовано спонтанную сократительную активность изолированных культивируемых неонатальных кардиомиоцитов. Показано, что величина ее показателей зависит от длительности культивирования: с 48 до 72–96 ч увеличивается амплитуда (с  $1,96 \pm 0,362$  до  $2,55 \pm 0,28$  мкм), частота (с  $59,4 \pm 6,59$  до  $84 \pm 5,92$  сокращений за 1 мин), скорость сокращения (с  $10,39 \pm 1,92$  до  $16,36 \pm 2,17$  мкм за 1 с) и расслабления (с  $7,16 \pm 1,89$  до  $10,95 \pm 0,72$  мкм за 1 с). В сравнительном исследовании влияния диазоксида и его фторсодержащего аналога показано, что эти активаторы аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов в разной степени воздействуют на сократительную функцию изолированных кардиомиоцитов: диазоксид вызывает ее полное прекращение, а фторсодержащий его аналог – незначительные изменения показателей: уменьшение времени достижения пика (с  $0,16 \pm 0,02$  до  $0,15 \pm 0,15$  с), амплитуды сокращений (с  $1,91 \pm 0,39$  до  $1,47 \pm 0,28$  мкм), скорости расслабления (с  $9,53 \pm 1,62$  до  $7,82 \pm 1,1$  мкм в 1 с)

и не изменяет частоту и скорость сокращения. Небольшое угнетающее влияние фторсодержащего аналога диазоксида на сократительную активность неонатальных кардиомиоцитов является преимуществом данного вещества по сравнению с его прототипом (диазоксидом).

Ключевые слова: изолированные неонатальные кардиомиоциты, показатели спонтанной сократительной активности, активаторы аденозинтрифосфатчувствительных калиевых каналов.

**K.V.Tarasova, T.S.Lagodych, T.I.Drevytska, I.M.Karvatsky, S.B.Frantsuzova.**

#### **THE IMPACT OF PHARMACOLOGICAL ACTIVATION OF ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS ON THE PARAMETERS OF SPONTANEOUS ACTIVITY OF ISOLATED NEONATAL RAT CARDIOMYOCYTES**

We investigated spontaneous contractile activity of isolated cultured neonatal cardiomyocytes. It was shown that contractile activity of isolated cardiomyocytes depends on the duration of culture. Culture from 48 to 72 or 96 hours the amplitude of contraction grows (from  $1,96 \pm 0,362$  to  $2,55 \pm 0,28$  micrometers), frequency (from  $59,4 \pm 6,59$  to  $84 \pm 5,92$  contractions by minute) contraction speed (from  $10,39 \pm 1,92$  to  $16,36 \pm 2,17$  micrometers per second) and relaxation (from  $7,16 \pm 1,89$  to  $10,95 \pm 0,82$  micrometers per second). Comparative study of the effect of diazoxide and its fluorine analog has shown that the activators of ATP-sensitive potassium channels influence the contractile function of isolated cardiomyocytes in different degrees: diazoxide causes its full termination, but its fluorine analog evokes only minor changes: a peak-reaching time decreases (from  $0,16 \pm 0,02$  to  $0,15 \pm 0,15$  seconds), contraction amplitude decreases (from  $1,91 \pm 0,39$  to  $1,47 \pm 0,28$  micrometers), relaxation speed decreases (from  $9,53 \pm 1,62$  to  $7,82 \pm 1,1$  micrometers per second) with constant frequency and contraction speed. A minor inhibitory effect of fluorine analog of diazoxide on the contractile activity of neonatal cardiomyocytes is an advantage of this agent compared with its prototype diazoxide.

Key words: isolated neonatal cardiomyocytes, the parameters of the spontaneous contractile activity, activators of the  $K_{ATP}$  channels.

*Bogomoletz National University, Kyiv*

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

#### **REFERENCES**

1. Belostotskaya GB, Darashina IV, Golovanova TA, Khrustaleva RS, Tsyrlin VA. Assessment of the functional state of freshly isolated and cultured cardiomyocytes of rats under conditions of oxidative stress. Regional haemodyn.



- microcircul. 2008;7(2):85-92.
2. Xia Y, Rajapurohitam V, Cook MA, Karmazyn M. Inhibition of phenylephrine induced hypertrophy in rat neonatal cardiomyocytes by the mitochondrial KATP channel opener diazoxide. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37(5):1063-67.
  3. Maffit SK, Sellitto AD, Al-Dadah AS, Schuessler RB, Damiano RJ, Lawton JS. Diazoxide maintains human myocyte volume homeostasis during stress. *Jam Heart Assoc.* 2012; 1(2):1-8.
  4. Al-Dadah AS, Voeller R K, Schuessler RB, Damiano RJ, Lawton JS. Maintenance of myocyte volume homeostasis during stress by diazoxide is cardioprotective. *Ann Thorac Surg.* 2007; 84(3):857-62.
  5. Tarasova KV, Shevchuk VG, Grygoruk OV, Frantsuzova SB, Lisova GO. Research of structural changes of a myocardium of rats under long influence of potassium channels activators (diazoxide and it fluorine containing analogues). *JVinn Med Univs.* 2007; 11(2/1):538-41.
  6. KV Tarasova, LL Arshinnikova, LI Antonenko, SB Frantsuzova, VG Shevchuk. Effect of long administration of activators of KATP channels on the energy supplying of myocardium and the permeability of cell membranes. *Pharmacology and Drug Toxicology.* 2011;4:51-56.
  7. Tarasova EV, Shevchuk VG Influence of KATP activators (diazoxid and its fluorinated analogues) on contractile activity of isolated papillary muscle of heart of old rats. *Ukrainian Medical Almanac.*2009; 12 (2):245-48.
  8. Kicinska A, Szewczyk A. Protective effects of the potassium channel opener-diazoxide against injury in neonatal rat ventricular myocytes. *Gen Physiol Biophys.*2003; 22:383-395.
  9. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation.* 1999;100:193-202.
  10. Dosenko VE, Nagibin VS, Tumanovskaya LV, Moibenko AA, Vaage J. Postconditioning prevents apoptotic, necrotic and autophagic cardiomyocyte cell death in culture. *Fiziol Zh.*2005; 51:12-17.
  11. Webster DR, Patrick DL. Beating rate of isolated neonatal cardiomyocytes is regulated by the stable microtubule subset. *AJP Heart.* 2000; 278 (5):H1653-H1661.
  12. Lalevee N, Rebsamen MC, Barre`re-Lemaire S, Perriera E, Nargeot J, Benitah J-P, Rossier MF. Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.*2005; 67:216-224.
  13. Lancaster JJ, Johnson NM, Juneman E, Thai HM, Bahl J, Goldman S. Construction of a spontaneously contracting biologically active cardiomyocyte scaffold. *J Cardiac failure.* 2009; 15(6):4-5.
  14. Er F, Larbig R, Ludwig A, Biel M, Hofmann F, Beuckelmann DJ, Hoppe UC. Dominant-negative suppression of HCN channels markedly reduces the native pacemaker current *I*<sub>f</sub> and undermines spontaneous beating of neonatal cardiomyocytes. *Circulation.* 2003; 107:485-89.
  15. Lorenzen-Schmidt I, Schmid-Schönbein GW, Giles WR, McCulloch AD, Chien S, Omens JH. Chronotropic response of cultured neonatal rat ventricular myocytes to short-term fluid shear. *Cell. Biochem. Biophys.* 2006; 46 (2):113-22.
  16. Jung AS, Kubo H, Wilson R, Houser SR, Margulies KB. Modulation of contractility by myocyte-derived arginase in normal and hypertrophied feline myocardium. *Am J Physiol.* 2006; 290 (5):H1756-H1762.
  17. Kocić I, Gruchała M, Petrusiewicz J. Gender differences in effects of pinacidil but not diazoxide on heart automatism in the isolated guinea pig right atria. *Pol J Pharmacol.* 2003; 55(3):419-24.
  18. De Giusti VC, Correa MV, Beltrano C, Yeves AM, Villa-Abrille MC, Chiappe de Cingolani GE, Cingolani HE, Aiello AE. The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species. *Life Sciences.*2008; 83:264-71.
  19. Deja MA, Golba KS, Kolowca M, Widenka K, Biernat J, Wos S. Diazoxide provides protection to human myocardium in vitro that is concentration dependent. *Ann Thorac Surg.*2004; 77: 226-32.

*Матеріал надійшов до редакції 24.06.2014*

А.В. Басанець, Л.В. Долінчук, Т.А. Андрущенко

## Зв'язок поліморфізму С<sup>-1562</sup>→Т промотору гена матриксної металопротеїнази-9 з ризиком розвитку хронічного обструктивного захворювання легень у шахтарів

ДУ «Ін-т медицини праці НАМН України», Київ; E-mail: DolinchukL@gmail.com

*Проаналізовано генетичні маркери спадкової схильності, які зумовлюють розвиток хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) професійної етіології. За допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) визначали поліморфізм С<sup>-1562</sup>→Т (rs3918242) промотору гена матриксної металопротеїнази-9 (ММР-9) з наступним аналізом рестрикційних фрагментів. До дослідної групи ввійшли шахтарі, хворі на ХОЗЛ, до контрольної – без патології органів дихання. Частота розподілу генотипів за поліморфізмом С<sup>-1562</sup>→Т промотору гена ММР-9 була близькою до європеїдів. За допомогою методу відношення шансів (ВШ) встановлений зв'язок між мінорним Т-алелем (ВШ=1,89; 95 % довірчий інтервал – ДІ: 0,98–3,66) і генотипами ТТ (ВШ=2,18; 95 % ДІ: 1,83–2,60) та СТ (ВШ=1,21; 95 % ДІ: 0,56–2,66) гена ММР-9 з ризиком розвитку ХОЗЛ у шахтарів основних підземних професій. Наявність у геномі домінантного С-алеля (ВШ=0,53; 95 % ДІ: 0,27–1,02) та генотипу СС (ВШ=0,60; 95 % ДІ: 0,28–1,28) цього гена зумовлюють відносну протекторну роль щодо ризику розвитку ХОЗЛ серед груп дослідження. Отримані результати відкривають перспективи для удосконалення заходів первинної профілактики ХОЗЛ з урахуванням визначення генетичної схильності його розвитку.*

*Ключові слова: хронічне обструктивне захворювання легень, генетична схильність, шахтарі основних підземних професій.*

### ВСТУП

Хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) характеризується не повністю зворотним обмеженням прохідності дихальних шляхів. Зазвичай прогресує і асоціюється з незвичною запальною відповіддю легень на шкідливі частки або гази. Сьогодні ХОЗЛ розглядають як одну з найпоширеніших і обтяжливих патологій, що призводить до непрацездатності, інвалідності, смертності та значних соціально-економічних витрат як в Україні, так і у світі [1–5]. За прогнозами експертів ВООЗ до 2030 р. ХОЗЛ стане третьою провідною причиною смерті в усьому світі [2]. ХОЗЛ відноситься до мультифакторних

захворювань з полігенним типом успадкування, що виникають у результаті комплексної дії генетичних та екзогенних чинників. Нині існують суперечливі дані щодо генетичної схильності та ризику його розвитку.

Відомо, що білковий продукт гена матриксної металопротеїнази (ММР-9) належить до родини ферментів, які відіграють важливу роль у процесах ремоделювання та репарації легеневої тканини при запальних реакціях [6]. Підвищена експресія цього гена спостерігається у курців та осіб, хворих на ХОЗЛ [7], у зв'язку з чим можна зробити припущення, що надлишкова секреція протеолітичного ферменту ММР-9 призводить до розвитку обструктивних змін у легенях.

© А.В. Басанець, Л.В. Долінчук, Т.А. Андрущенко

Ген, що кодує профермент ММР-9 з молекулярною масою 92 кДа, локалізується на довгому плечі хромосоми у позиції 20q11.1-13.1. Аналіз послідовності промотору та 13 екзонів (сумарно – 3,3 Кб) гена ММР-9 встановив 10 варіабельних сайтів, 4 з яких знаходяться в ділянці промотору, 5 у кодуючому регіоні (3 з яких змінюють кодування амінокислот), і 1 в 3' – регіоні, що не транскрибується. Встановлено, що деякі поліморфні варіанти гена ММР-9 можуть викликати функціональний вплив на рівень його експресії або ферментативну активність білкового продукту [8].

У зв'язку з наведеним вище, пріоритетним завданням щодо збереження здоров'я працездатного населення є вдосконалення ранньої діагностики захворювання, а саме визначення генетичних маркерів ризику розвитку ХОЗЛ, для своєчасного формування реабілітаційних програм, трудових рекомендацій та запобігання прогресування патології, розвитку ускладнень, інвалідизації та передчасної смерті.

Мета нашої роботи – встановити зв'язок поліморфізму С<sup>-1562</sup>→Т промотору гена ММР-9 з ризиком розвитку ХОЗЛ у шахтарів.

## МЕТОДИКА

Обстежено 151 шахтаря чоловічої статі основних підземних професій, які знаходилися на стаціонарному лікуванні в клініці професійних захворювань ДУ «Інститут медицини праці НАМН України». Дослідну групу склали гірники з діагнозом ХОЗЛ (згідно з критеріями GOLD [9]), – 72 особи віком  $53,7 \pm 4,7$  роки, середній стаж роботи в підземних умовах  $21,8 \pm 6,2$  роки; до контрольної групи ввійшли 79 шахтарів, які не мають патології бронхолегеневої системи, віком  $48,2 \pm 9,3$  роки, підземний стаж  $20,2 \pm 6,1$  роки.

ДНК для молекулярно-генетичних досліджень виділяли з лейкоцитів периферичної крові стандартним методом за допомогою

комерційної тест-системи «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Росія).

Визначення поліморфізму С<sup>-1562</sup>→Т (rs 3918242) промотору гена ММР-9 проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом рестрикційних фрагментів [10]. Для цього ампліфікували промотор вказаного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямий (sense) – (5'-СААСGТАGТGAAАССССАТСТСТ-3') і зворотний (antisense) – (5'-ТССАGСССAAТТАТСАСАСТТАТ-3'). ПЛР проводили з використанням реагентів фірми «Fermentas» (Латвія). Для ампліфікації використовували 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 2,5 мкл 10-кратного Tag-буфера з (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 мкл 25 · 10<sup>-3</sup> моль/л розчину MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл 2 · 10<sup>-3</sup> моль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль/л прямого та зворотного праймерів і 0,5 МО Таq ДНК-полімерази, об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в багатоканальному ампліфікаторі «Parker Elmer 2700» (США). Ампліфікація гена ММР-9 складалася з 30 циклів: денатурація – 94 °С (1 хв), гібридизація праймерів – 59 °С (45 с) та елонгація – 72 °С (1 хв).

На наступному етапі 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°С протягом 18 год із 1,5 МО рестриктази PaeI («Fermentas», Латвія). Ампліфікати фрагменту промотору гена ММР-9 після рестрикції розділяли в 2,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидид. Наявність в -1562 положенні промотору гена ММР-9 цитозину перешкоджає рестрикції (фрагмент 379 пар основ), а при заміні його на тимідин ендонуклеаза PaeI розщеплює ампліфіковану ділянку промотору (розмір фрагмента 320 пар основ). Візуалізацію ДНК після горизонтального електрофорезу (180 В протягом 20 хв) проводили за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія) та відео-системи ViTran (рис. 1).

При статистичному аналізі отриманих результатів використовували стандартний метод  $\chi^2$  і відношення шансів (ВШ). Відпо-

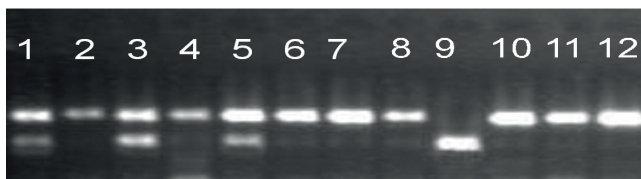


Рис. 1. Результати електрофорезу фрагмента поліморфізму C<sup>-1562</sup>→Т промотору гена MMP-9 після рестрикції з використанням ферменту PaeI: смужки 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12 відповідають генотипу CC; 1, 3, 5 – генотипу CT; 9 –генотипу TT

відність розподілу генотипів оцінювали згідно з законом Харді–Вайнберга. Визначення достовірності відмінностей у розподілі генотипів проводили за допомогою статистичної програми Statistica 8.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз розповсюдженості алельних варіантів поліморфізму C<sup>-1562</sup>→Т гена MMP-9 показав, що частота розподілення Т-алеля у шахтарів дослідної групи становила – 21,5 %, контрольної – 12,7 % (табл. 1). При статистичній обробці отриманих результатів було визначено значення ВШ мінорного Т-алеля для шахтарів дослідної групи відносно контролю (ВШ=1,89; 95 % довірчий інтервал – ДІ: 0,98–3,66), що вказує на його зв'язок з ризиком розвитку ХОЗЛ.

С-алель поліморфізму C<sup>-1562</sup>→Т гена MMP-9 був виявлений у 78,5 % шахтарів дослідної групи і 87,3 % – контрольної. Було встановлено значення ВШ для С-алеля (ВШ=0,53; 95% ДІ: 0,27–1,02), що свідчить про його протекторну роль щодо ризику розвитку ХОЗЛ.

При обчисленні результатів за допомогою методу  $\chi^2$  було знайдено статистично досто-

вірну різницю частот доміантного С- та мінорного Т-алелів поліморфізму C<sup>-1562</sup>→Т гена MMP-9 між обстеженими дослідної та контрольної груп ( $\chi^2=3,61$ ;  $P<0,05$ ).

Частотний розподіл генотипів за геном MMP-9 в дослідній і контрольній групах представлений на рис. 2. Для встановлення зв'язку генотипів за поліморфізмом C<sup>-1562</sup>→Т гена MMP-9 з ризиком розвитку ХОЗЛ були визначені їх частоти у шахтарів обох груп. Слід відзначити, що отримані значення частот генотипів та алелів гена MMP-9 за цим поліморфізмом були близькими до популяційних частот європеоїдів, що за даними літератури сягає: доміантні гомозиготи CC – 64,7 %; гетерозиготи CT – 32,4 %, мінорні гомозиготи TT – 2,9 % [11].

За результатами проведеного дослідження частота розповсюдженості TT-генотипу в групі хворих становила 6,9 %. У контрольній групі респонденти з таким генотипом відсутні (табл. 2). Відповідність розподілу генотипів до закону Харді–Вайнберга у контрольній групі була перевірена за допомогою тесту  $\chi^2$  із 1 ступенем свободи, з використанням корекції Йетса. Розподіл генотипів у контрольній групі відповідає закону Харді- Вайнберга ( $P>0,05$ ).

Таблиця 1. Розповсюдженість (%) алелів С і Т поліморфізму C<sup>-1562</sup>→Т гена MMP-9 у популяції шахтарів

Групи обстежених	С	Т
Контрольна (n=158)	87,3 (n=138)	12,7 (n=20)
Дослідна (n=144)	78,5 (n=113)*	21,5 (n=31)*
ВШ; 95% ДІ	0,53; 0,27-1,02	1,89; 0,98-3,66

Примітка. Тут і в табл. 2 ВШ – відношення шансів, ДІ – довірчий інтервал. \* $P<0,05$  –статистична вірогідність у розподілі алелей у порівнянні з контрольною групою.

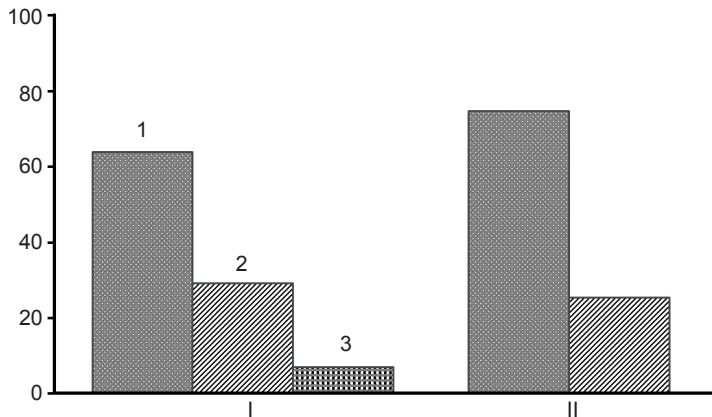


Рис. 2. Розподіл частот генотипів поліморфізму C<sup>-1562</sup>→T промотору гена MMP-9 у популяції шахтарів: I – контрольна група, II – дослідна група; 1 – СС-генотип, 2 – СТ-генотип, 3 – ТТ-генотип

При аналізі результатів дослідження за допомогою методу  $\chi^2$  вдалося знайти статистично значущі відмінності у розподілі генотипів в групі хворих на ХОЗЛ та в контролі ( $P < 0,05$ ).

Встановлено статистично достовірну різницю частот ТТ-генотипу поліморфізму C<sup>-1562</sup>→T гена MMP-9 між шахтарями дослідної і контрольної груп ( $\chi^2=5,64$ ;  $P < 0,01$ ). Крім того, було визначено асоціацію між генотипами ТТ і СТ і підвищеним ризиком розвитку ХОЗЛ у дослідній групі відносно контролю (ВШ=2,18; 95 % ДІ: 1,83–2,60; ВШ=1,21; 95 % ДІ: 0,56–2,66). Отже, була знайдена асоціація між мінорним Т-алелем і генотипами ТТ та СТ поліморфізму C<sup>-1562</sup>→T промотору гена MMP-9 з ризиком розвитку ХОЗЛ у шахтарів основних підземних професій.

За даними наукових досліджень внаслідок точкової мутації гена MMP-9 у позиції 1562 замінюється цитозин на тимідин. У результаті чого значно знижується рівень зв'язування Т-алеля з супресором, який контролює рівень швидкості транскрипції [12]. Таким чином,

збільшується секреція білкового продукту гена, що може бути причиною розвитку патологічного процесу в легенях. Підтвердження цього припущення є відомості, у яких показано зв'язок ХОЗЛ з наявністю в генотипі мінорного Т-алеля або ТТ-генотипу гена MMP-9 [13]. Проте відомі і протилежні дані, що вказують на відсутність кореляції цього поліморфізму з розвитком ХОЗЛ [14]. Можливою причиною таких суперечливих результатів є різні популяційні вибірки досліджень. Слід зазначити, що вивчення поліморфізму C<sup>-1562</sup>→T промотору гена MMP-9 у популяції шахтарів України раніше не проводилося.

Також під час дослідження було визначене значення ВШ для носіїв генотипу СС гена MMP-9 (ВШ=0,60; 95 % ДІ: 0,28–1,28), що свідчить про протекторну роль такого генотипу відносно ризику розвитку ХОЗЛ у зазначеній групі обстежених. Це пояснюється менш інтенсивним синтезом протеолітичного ферменту, матриксної металопротеїнизи-9, у осіб, в генотипі яких наявний домінуючий алель С, що має важливе значення у патогенезі ХОЗЛ.

Таблиця 2. Розповсюдженість генотипів (%) поліморфізму C<sup>-1562</sup>→T гена MMP-9 у популяції шахтарів

Групи обстежених	СС	СТ	ТТ	P, $\chi^2$
Контрольна (n=79)	74,7 (n=59)	25,3 (n=20)	0 (n=0)	P≤0,04
Дослідна (n=72)	63,9 (n=46)	29,2 (n=21)	6,9 (n=5)*	
ВШ; 95% ДІ	0,60; 0,28-1,28	1,21; 0,56-2,65	2,18; 1,83-2,60	



## ВИСНОВКИ

1. У результаті проведеного дослідження була встановлена асоціація між мінорним Т-алелем ( $\chi^2=3,61$ ;  $P<0,05$ ) і генотипом ТТ ( $\chi^2=5,64$ ,  $P<0,01$ ) поліморфізму C<sup>-1562</sup>→Т промотору гена MMP-9 з ризиком розвитку ХОЗЛ у шахтарів України.

2. При розрахунку співвідношення шансів показано протекторне значення С-алеля та СС-генотипу поліморфізму C<sup>-1562</sup>→Т промотору гена MMP-9 відносно до ризику розвитку ХОЗЛ у шахтарів дослідної та контрольної груп.

3. Отримані результати досліджень дають змогу удосконалити заходи первинної профілактики за допомогою включення визначення поліморфізму C<sup>-1562</sup>→Т промотору гена MMP-9 як біомаркера схильності до розвитку ХОЗЛ.

**А.В. Басанец, Л.В. Долинчук, Т.А. Андрущенко**

### СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА C<sup>-1562</sup>→Т ПРОМОТОРА ГЕНА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ У ШАХТЕРОВ

Проанализированы генетические маркеры наследственной предрасположенности, которые обуславливают развитие хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) профессиональной этиологии. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) определяли полиморфизм C<sup>-1562</sup>→Т (rs3918242) промотора гена матричной металлопротеиназы-9 (MMP-9) с последующим анализом рестрикционных фрагментов. Группу исследования составили шахтеры, больные ХОБЛ, контрольную – без патологии органов дыхания. Частота распределения генотипов за полиморфизмом C<sup>-1562</sup>→Т гена MMP-9 была близкой к европеоидной популяции. С помощью метода отношения шансов (ОШ) установлена связь между мінорным Т-алелем (ОШ = 1,89, 95 % доверительный интервал – ДИ: 0,98–3,66) и генотипами ТТ (ОШ = 2,18, 95% ДИ : 1,83–2,60) и СТ (ОШ = 1,21, 95 % ДИ: 0,56–2,66) гена MMP-9 с риском развития ХОБЛ у шахтеров основных подземных профессий. Наличие в геноме доминантного С-аллеля (ОШ = 0,53, 95 % ДИ: 0,27–1,02) и генотипа СС (ОШ = 0,60, 95 % ДИ: 0,28–1,28) данного гена обуславливают относительную протективную роль по отношению к риску развития ХОБЛ среди групп исследования. Полученные результаты открывают перспективы для усовершенствования мероприятий пер-

вичной профилактики ХОБЛ на основании определения генетической предрасположенности к ее развитию.  
Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, генетическая предрасположенность, шахтеры основных подземных профессий.

**A.V. Basanets, L.V. Dolinchuk,**

**T.A. Andrushchenko**

### THE ASSOCIATION OF PROMOTER GENE MATRIX METALLOPROTEINASE-9 POLYMORPHISM C<sup>-1562</sup>→T WITH THE RISK OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE IN MINERS

We analyzed genetic markers of genetic susceptibility that lead to development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) of occupational etiology. Polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism analysis were performed to detect a point mutation at the promoter of C<sup>-1562</sup>→Т (rs3918242) of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene. The study comprised 72 miners with COPD, and 79 miners without respiratory system pathology. The frequency of allocation for genotypes MMP-9 gene polymorphism C<sup>-1562</sup>→Т was similar to Caucasian population. The study established the association between the minor T-allele (Odds Ratio (OR) = 1.89; 95% confidence interval (CI): 0.98-3.66) and TT (OR = 2.18; 95% CI: 1.83-2.60) and CT (OR = 1.21; 95% CI: 0.56-2.66) genotypes with the risk of COPD in miners of main underground occupations. Presence in the genome dominant C-allele (OR = 0.53; 95% CI: 1.02-0.27) and CC genotype (OR = 0.60; 95% CI: 0.28 - 1.28) determine the relative protective role in risk to COPD among respondents of the studied group. The results of research opens new perspectives for improving measures of primary prevention of COPD based on determining genetic predisposition to COPD development.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, genetic predisposition, miners of major underground occupations.

*SI "Institute of Occupational Health of NAMS of Ukraine", Kyiv*

## REFERENCES

1. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J.* 2006;27:397-412.
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442.
3. Trupin L, Earnest G, San Pedro M, Balmes JR, Eisner MD, Yelin E, et al. The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2003.22(3).462–69.
4. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Bur-



- ney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a populationbased prevalence study. *Lancet*. 2007;370:74150.
5. Kundiev YI, Nahorna AM, Basanets AV. Occupational diseases that arise due to dust. In: Kundiev YI, editors. *Professional health in Ukraine*. Kyiv: Avicena;2006. p. 99-124.
  6. Elkington PTG, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax*. 2006.61.259–66.
  7. Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Konttinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest*. 1998.78.1077–87.
  8. Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet*. 1999a.105.418–23.
  9. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. *Global Strategy or the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic ObstructiveLung Disease*. NHLBI/WHO workshop report. Last update 2011. Available from: <http://www.goldcopd.com>.
  10. Jones GT, Phillips VL, Harris EL, Rossaak JI, van Rij AM. Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2003. 38(6):1363-7.
  11. National Center for Biotechnology Information Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.
  12. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999b.99.1788–94.
  13. Minematsu N, Nakamura H, Tateno H, Nakajima T, Yamaguchi K. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001.289(1).116-9.
  14. Joos L, He JQ, Shepherdson MB, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet*. 2003.12.803–4.

*Матеріал надійшов  
до редакції 01.07.2014*

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

## Кардіогемодинаміка та ефективність механізму Франка–Старлінга у щурів за умов старіння

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

*У дослідженні на старих і дорослих щурах лінії Вістар вивчали кардіогемодинаміку та механізм Франка–Старлінга. Значення тиску й об'єму лівого шлуночка з візуалізацією кривих їх залежності протягом серцевого циклу реєстрували за допомогою ультрамініатюрного катетера 2F. Виявлено діастолічну дисфункцію лівого шлуночка та порушення релаксації серця у старих щурів, на що вказує зменшення максимальної швидкості зниження тиску при збільшенні кінцево-діастолічної жорсткості міокарда та константи активного розслаблення. Встановлена тенденція до зниження ефективності механізму Франка–Старлінга (відношення зміни ударного об'єму до зміни кінцево-діастолічного об'єму, ДУО/ДКДО) у старих щурів, оскільки вона була на 12 % нижче, ніж у контролі. Водночас нами показано, що у старих щурів на 70 % зростає споживання кисню та в 1,7 рази збільшується ударна робота серця. Тобто їх серце при однаковому ударному об'ємі виконувало більшу ударну роботу, з більшим споживанням кисню, що вказує на менш ефективну діяльність серця. Ключові слова: старіння, серце, кардіогемодинаміка, механізм Франка–Старлінга.*

### ВСТУП

Однією з найбільш значних соціальних тенденцій ХХІ сторіччя є старіння населення. За даними ВООЗ (2000–2050 рр.) частка населення світу віком понад 60 років збільшиться вдвічі (приблизно з 11 до 22 %). Очікується, що абсолютна кількість таких людей зросте з 605 млн до 2 млрд. Головним фактором, що погіршує якість життя людей похилого віку є збільшення ризику захворювань серцево-судинної системи при старінні та ймовірності смерті в результаті стресу. Проте дані клінічних і експериментальних досліджень функціонального стану серця відрізняються залежно від методів досліджень. Так, деякі автори не відмічають порушень насосної функції серця і скоротливої активності міокарда при старінні [1–4], тоді, як інші вказують на зменшення показників насосної функції серця [5–7]. Крім того, залишається невивченим питання про зміну ефективності механізму Франка–Старлінга,

хоча це дуже позначається на енергоспоживанні міокарда. Відомо, що енергетично механізм Франка–Старлінга економніше гомеометричної регуляції скоротливої функції серця, оскільки більшою мірою на енергоспоживання міокарда впливає зміна опору викиду крові з лівого шлуночка (ЛШ), ніж зміна кровонаповнення шлуночків у діастолу. Відомо, що збільшення роботи ЛШ на 78 % внаслідок підвищення тиску в аорті посилювало поглинання кисню міокардом на 75 %, а збільшення зовнішньої роботи серця в 7 разів через підвищення діастолічного наповнення шлуночків – лише на 53 % [8]. В основі цього явища, очевидно, лежать більш енергозатратні механізми гомеометричної регуляції скоротливої функції серця [9].

Метою нашої роботи було виявлення зміни кардіогемодинаміки та ефективності механізму Франка–Старлінга у щурів за умов фізіологічного старіння.

© Н.О. Дорофєєва, К.О. Драчук, В.Ф. Сагач

## МЕТОДИКА

Дослідження *in vivo* проведено на 24 білих щурах-самцях різного віку. До контрольної групи ввійшли 16 дорослих щурів віком 6–9 міс, до дослідної – 8 старих щурів віком 20–24 міс. Всі експериментальні процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС). Щурів наркотизували за допомогою уретану (1,25 г/кг, внутрішньоочеревинно). Тиск і об'єм ЛШ під час серцевого циклу визначали за допомогою ультрамініатюрного катетера 2F («Millar Instruments», США). Його вводили через сонну артерію ретроградно у ЛШ, що давало змогу одночасно реєструвати сигнали тиску й об'єму з візуалізацією кривих залежності цих величин протягом серцевого циклу [10, 11]. Вивчали показники кардіогемодинаміки: кінцево-сistolічний тиск, кінцево-діастолічний тиск, максимальну швидкість наростання ( $dP/dt_{max}$ ) та зниження тиску ( $dP/dt_{min}$ ), кінцево-сistolічний об'єм (КСО), кінцево-діастолічний об'єм (КДО), ударний об'єм (УО), фракцію викиду, частоту серцевих скорочень (ЧСС), хвилинний об'єм крові. Розраховували споживання кисню міокардом як відношення ударної роботи та ефективності роботи серця [12]. Для оцінки скоротливої здатності міокарда – кінцево-сistolічної та максимальної жорсткості міокарда і його здатності до розтягнення – кінцево-діастолічної жорсткості міокарда

– визначали показники під час оклюзії черевної порожнистої вени в умовах зниженого притоку крові до серця [10, 11]. Ефективність механізму Франка–Старлінга розраховували як  $\Delta UO / \Delta KDO$  при навантаженні об'ємом.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При вивченні показників кардіогемодинаміки у групі дорослих і старих щурів виявлено відмінності (таблиця).

Показано, що кінцево-сistolічний тиск у старих щурів був на 11,6 % (на 11,8 мм рт.ст) більше, а кінцево-діастолічний тиск – в 2 рази більше (на 3,58 мм рт.ст.), ніж у контрольній групі. ЧСС в у старих щурів була достовірно нижче, ніж у дорослих.

При вивченні насосної функції серця з'ясовано, що КДО, КСО, УО, хвилинний об'єм крові у старих щурів достовірно не відрізнялися від значень у дорослих (див. таблицю). Водночас нами виявлено, що споживання кисню міокардом на одиницю УО у старих щурів становило  $6,64 \pm 0,8$  мл/хв, а в контрольній групі цей показник був  $3,9 \pm 0,48$  мл/хв (рис. 1;  $P < 0,01$ ), тобто на 70 % більше порівняно з контролем. Це може вказувати на більш енерговитратну роботу серця старих щурів.

Ударна робота серця старих щурів була в 1,7 рази більше, ніж у щурів контрольної групи (рис. 2). Тобто серце старих щурів при однаковому УО виконувало більшу роботу з

Основні показники кардіогемодинаміки у старих щурів *in vivo*

Показники	Дорослі щури (контроль); (n=16)	Старі щури (n=8)
Кінцево-сistolічний тиск, мм рт.ст.	101,4 $\pm$ 1,73	113,2 $\pm$ 3,75*
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт.ст.	3,45 $\pm$ 0,37	7,03 $\pm$ 0,46*
Ударний об'єм, мкл	67,09 $\pm$ 4,01	58,9 $\pm$ 4,05
Фракція викиду, %	21,15 $\pm$ 0,55	21 $\pm$ 1,43
Хвилинний об'єм крові, мл/хв	23,0 $\pm$ 1,22	20,0 $\pm$ 1,32
Частота серцевих скорочень, хв <sup>-1</sup>	356,5 $\pm$ 2,91	340,3 $\pm$ 6,38*

\*  $P < 0,05$

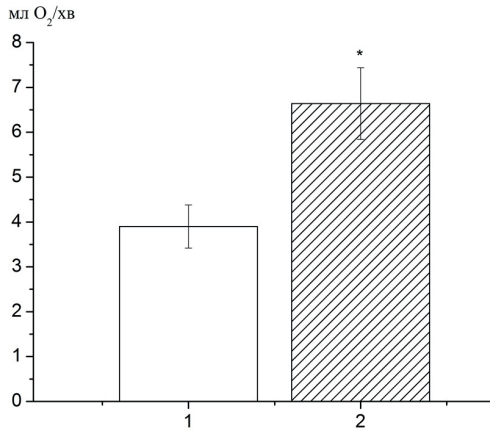


Рис. 1. Споживання кисню серцем у дорослих (1) і старих (2) щурів. \*P<0,01

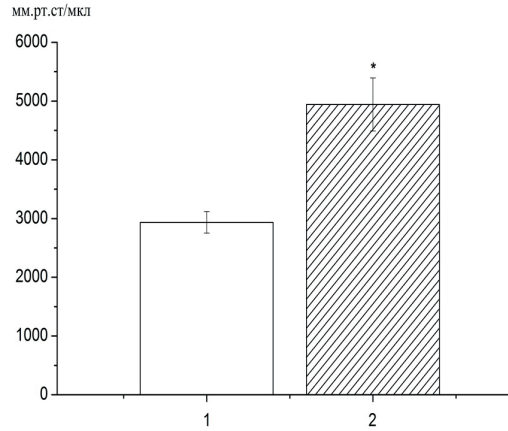


Рис. 2. Ударна робота серця у дорослих (1) і старих (2) щурів. \*P<0,01

більшим споживанням кисню. Це теж підтверджує, що серце цих тварин працювало менш ефективно з більшим споживанням кисню. Можливо, менш ефективна робота серця пов'язана з порушенням функції розслаблення ЛШ у старих щурів.

Дослідженням діастолічної функції ЛШ встановлено зменшення на 27,4 % максимальної швидкості зниження тиску, яка становила  $-5903 \text{ мм рт. ст./с} \pm 227 \text{ мм рт. ст./с}$  порівняно з  $-8131 \text{ мм рт. ст./с} \pm 308 \text{ мм рт. ст./с}$  у контрольній групі (рис. 3). При цьому відмічалось збільшення жорсткості камери ЛШ, яка визначає його наповнення в період пізньої діастолі (рис. 4). Так, кінцево-діастолічна жорсткість міокарда у старих щурів була достовірно вище і становила  $0,23 \pm 0,005$

мм рт.ст./мкл, а у щурів контрольної групи –  $0,108 \pm 0,03 \text{ мм рт.ст./мкл}$  ( $P < 0,001$ ). Збільшення кінцево-діастолічної жорсткості міокарда у старих щурів в 2,1 рази може вказувати на порушення процесів розслаблення серця.

Крім того, ми показали, що константа активного розслаблення у старих щурів була в 2 рази більше, ніж у контрольній групі, що також указує на порушення релаксації серця. Так, цей показник у дорослих щурів становив  $11 \pm 0,2 \text{ мс}$ , а у старих щурів –  $17,6 \pm 0,13 \text{ мс}$  ( $P < 0,05$ ).

Отже, зменшення максимальної швидкості зниження тиску при збільшенні кінцево-діастолічної жорсткості міокарда та константи активного розслаблення вказує на діастолічну дисфункцію ЛШ і порушення

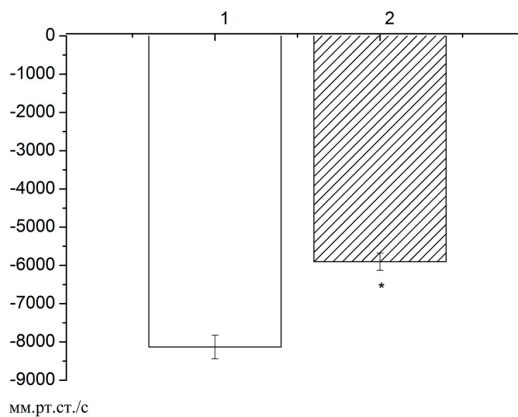


Рис. 3. Максимальна швидкість зниження тиску серця у дорослих (1) і старих (2) щурів. \*P<0,05

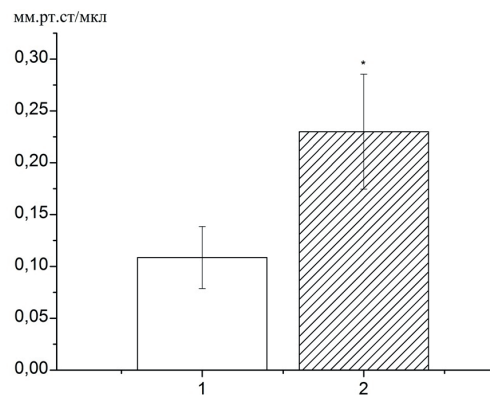


Рис. 4. Кінцево-діастолічна жорсткість міокарда у дорослих (1) і старих (2) щурів. \*P<0,05

розслаблення серця у старих щурів.

У показниках скоротливої активності міокарда достовірних змін у старих щурів не відмічалось. Значення  $dP/dt_{\max}$  у них становило  $10495 \pm 338$  мм рт.ст./с, а у щурів контрольної групи –  $10989 \pm 517$  мм рт.ст./с. Індeksi скоротливості, максимальна кінцево-систолична жорсткість міокарда у старих щурів вірогідно не відрізнялися від показників контролю.

Для оцінки функціональних резервів серця використовували тест на навантаження об'ємом і будували криву Франка–Старлінга. У старих щурів функціональні резерви серця знижувались, оскільки приріст показників насосної функції і скоротливої активності міокарда був менше, ніж у контрольних тварин. Встановлено тенденцію до зменшення ефективності механізму Франка–Старлінга ( $\Delta UO/\Delta KDO$ ) у старих щурів, бо цей показник був на 12 % нижче, ніж у контрольній групі.

Таким чином, у старих щурів серце працювало менш ефективно з більшим споживанням кисню на 70 %. Це може бути пов'язано з порушенням функціонування дихального ланцюга мітохондрій і посиленням утворення активних форм кисню. Так, у раніше проведених дослідженнях було виявлено мітохондріальну дисфункцію у старих щурів, яка проявлялась у зменшенні величини мембранного потенціалу мітохондрій, що негативно впливає на синтез аденозинтрифосфату, а також у зменшенні порога відкривання мітохондріальної пори при старінні та збільшенні її чутливості до природного індуктора  $Ca^{2+}$  [13]. А це сприяє надлишковій генерації активних форм кисню й азоту, що відмічається при старінні [14–16]. За мітохондріальної та вільно-радикальної теорій старіння дисбаланс між про- та антиоксидантами є причиною окисного стресу, в результаті якого розвивається глибоке порушення метаболізму клітин, фізико-хімічних і функціональних властивостей їх мембран. Зокрема, погіршується ефективність окисного фосфорилування та здатність синтезу аденозинтрифосфату мітохондріями [17, 18].

А зменшення його вмісту сприяє розвитку виявленої нами діастолічної дисфункції серця старих щурів і зниженню релаксації та розтяжності міокарда, викликає обмеження функціональних резервів і адаптаційних можливостей серця.

## ВИСНОВКИ

1. Виявлено діастолічну дисфункцію ЛШ і порушення релаксації серця у старих щурів, на що вказує зниження максимальної швидкості зниження тиску, при збільшенні кінцево-діастолічної жорсткості міокарда та константи активного розслаблення.

2. При старінні встановлено значне збільшення споживання кисню міокардом (на 70 %) і ударної роботи серця, що свідчить про зниження ефективності і посилення енергозатрат серцевої діяльності.

**Н.О. Дорофеева, К.О. Драчук, В.Ф. Сагач**

## **КАРДИОГЕМОДИНАМИКА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕХАНИЗМА ФРАНКА–СТАРЛИНГА У КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ**

В исследовании на старых и взрослых крысах линии Вистар изучали кардиогемодинамику и механизм Франка–Старлинга. Значения давления и объема левого желудочка с визуализацией кривых их зависимости в течение сердечного цикла регистрировали с помощью ультраминиатюрного катетера 2F («Millar Instruments», США). Выявлено диастолическую дисфункцию левого желудочка и нарушение релаксации сердца у старых крыс, на что указывает уменьшение максимальной скорости снижения давления при увеличении конечно-диастолической жесткости миокарда и константы активного расслабления. Установлена тенденция к снижению эффективности механизма Франка–Старлинга (отношение изменения ударного объема к изменению конечно-диастолического объема,  $\Delta UO/\Delta KDO$ ) у старых крыс, т.к. она была на 12 % ниже по отношению к контролю. В то же время нами показано, что у старых животных на 70 % возрастает потребление кислорода и в 1,7 раза увеличивается ударная работа сердца. Таким образом, сердце старых крыс при одинаковом ударном объеме выполняло большую работу, с большим потреблением кислорода, что указывает на менее эффективную деятельность сердца.

Ключевые слова: старение, сердце, кардиогемодинамика, механизм Франка–Старлинга.



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

### **CARDIOHEMODYNAMICS AND EFFICIENCY OF FRANK–STARLING MECHANISM DURING AGING**

We studied cardiohemodynamics and the efficiency of Frank–Starling mechanism in aged and adult Wistar rats, using pressure-volume (PV) conductance catheter system (Millar Instruments, USA) in order to evaluate systolic and diastolic function in vivo. We found left ventricular diastolic dysfunction and impaired relaxation of the heart in aged rats, which is indicated by the reduction in the maximum rate of pressure drop with an increase in end-diastolic stiffness and active relaxation constant. Our results showed a decreased efficiency of Frank–Starling mechanism ( $\Delta SV/\Delta EDV$ ) in aged rats. However, we have shown a 70 % increases in oxygen consumption and 1.7 times increased stroke work of the hearts of old rats. Our results suggest that heart of old rats with the same stroke volume perform most stroke work, with greater oxygen consumption. This indicates that the heart of old rats worked less effectively, with greater oxygen consumption. Key words: aging, heart, cardiohemodynamics, Frank–Starling mechanism.

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

#### **REFERENCES**

1. Fleg JL, O'Connor F, Gerstenblith G, Becker LC, Clulow J, Schulman SP, et al. Impact of age on the cardiovascular response to dynamic upright exercise in healthy men and women. *J Appl Physiol.* 1995;78(3):890-900.
2. Lakatta EG, Levy D. Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises. Part II: The Aging Heart in Health: Links to Heart Disease. *Circ.* 2003;107(2):346-54.
3. Schmidt U, Zhu X, Lebeche D, Huq F, Guerrero JL, Hajjar RJ. In vivo gene transfer of parvalbumin improves diastolic function in aged rat hearts. *Cardiovasc Res.* 2004;66(2):318-23.
4. Goshovska YV, Lisovyi II, Shimanskaya TV, Sagach VF. UCP2 and UCP3 genes expression, heart function and oxygen cost of myocardial work changes during aging and ischemia-reperfusion. *Fiziol Zh.* 2009;55(3):26-36.
5. Frolkis VV, Bezrukov VV, Shevchuk VG. Circulation and aging. Leningrad: Nauka; 1984.
6. Korkushko OV, Dolot IV. Age-related changes in morpho-functional state of the heart. *Fiziol Zh.* 2001;47(1):26-33.
7. Moslehi J, DePinho RA, Sahin E. Telomeres and Mitochondria in the Aging Heart. *Circ Res.* 2012;110(9):1226-37.
8. Shumakov VI, Tolpekin VE. Assisted circulation. Moscow; 1980.
9. Cingolani HE, Pérez NG, Cingolani OH, Ennis IL. The Anrep effect: 100 years later. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304(2):175-82.
10. Burkhoff D, Mirsky I, Suga H. Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(2):501-12.
11. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc.* 2008;9:1422-34.
12. Suga H. Ventricular energetics. *Physiol Rev.* 1990;70(2):247-77.
13. Sagach VF, Vavilova GL, Strutynska NA, Rudyk OV. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening to inductors in rat heart. *Fiziol Zh.* 2004;50(2):49-63.
14. Tkachenko MN, Sagach VF, Kotsjuruba AV, Baziljuk OV, Buchanevich AM, Meged EF, et al. Endothelium-dependent contractile reactions of vascular smooth muscles and content of free radicals of oxygen of rats in aging. *Fiziol Zh.* 2002;48(4):3-13.
15. Kuka S, Tatarkova Z, Racay P, Lehotsky J, Dobrota D, Kaplan P. Effect of aging on formation of reactive oxygen species by mitochondria of rat heart. *Gen Physiol Biophys.* 2013;32(3):415-20.
16. Stojkovski V, Hadzi-Petrushev N, Ilieski V, Sopi R, Gjorgoski I, Mitrov D et al. Age and heat exposure-dependent changes in antioxidant enzymes activities in rat's liver and brain mitochondria: role of alpha-tocopherol. *Physiol Res.* 2013;65(2):503-10.
17. Preston CC, Oberlin AS, Holmuhamedov EL, Gupta A, Sagar S, Syed RH, et al. Aging-induced alterations in gene transcripts and functional activity of mitochondrial oxidative phosphorylation complexes in the heart. *Mech Ageing Dev.* 2008;129(6):304-12.
18. Desler C, Hansen TL, Frederiksen JB, Marcker ML, Singh KK, Juel Rasmussen L. Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging? *J Aging Res.* 2012.

*Матеріал надійшов до редакції 04.06.2014*



С.В. Чорна, Н.А. Струтинська, О.М. Семенихіна, С.А. Таланов, А.В. Коцюрuba, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

## Тривалі фізичні навантаження покращують скоротливу функцію серця у старих щурів за допомогою NO-залежного зменшення чутливості мітохондріальної пори до кальцію

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: snizhana-chorna@inbox.ru*

Досліджували вплив тривалих фізичних навантажень на показники функціонального стану ізолюваного за Лангендорфом серця старих щурів в умовах ішемії-реперфузії, чутливість кальційіндукованої мітохондріальної пори (МП), а також роль NO-залежних механізмів регуляції пороутворення. Так, реперфузійні порушення скоротливої функції міокарда і його кисневого обміну були менш виражені у старих щурів, адаптованих до фізичних навантажень, що свідчить про їх позитивний вплив. Показано зменшення чутливості МП до дії  $Ca^{2+}$  в серці старих тренуваних щурів внаслідок збільшення на 1,5–2 порядки порогової концентрації іона, яка індукувала набухання органел, порівняно з нетренованими тваринами. Разом з цим у мітохондріях серця тренуваних дорослих щурів спостерігали підвищення майже вдвічі активності конститутивної NO-синтази (eNOS) відносно контролю ( $6,02 \pm 0,08$  і  $3,64 \pm 0,27$  пмоль/хв · мг білка відповідно;  $P \leq 0,05$ ) та незначне зростання активності індукційної NOS (iNOS). У старих тренуваних тварин регуляція пороутворення здійснювалася за рахунок достовірного зниження активності iNOS відносно контролю старих щурів ( $12,29 \pm 3,11$  і  $9,25 \pm 1,24$  пмоль/хв · мг білка відповідно;  $P \leq 0,05$ ) на тлі незначного зростання активності cNOS. В умовах зменшення продукції NO в мітохондріях шляхом одноразового введення тренуваним тваринам різного віку блокатора активності NOS L-NAME (10 мг/кг) було показано зростання чутливості МП до дії  $Ca^{2+}$  в серці, що вказує на роль оксиду азоту як інгібітора пороутворення при тренуваннях. За допомогою методу полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі встановлено, що рівень експресії мРНК гена eNOS у серці суттєво перевищує такий nNOS та iNOS. При цьому в серці дорослих тренуваних щурів рівень експресії мРНК nNOS підвищувався в 5 разів, мРНК iNOS – у 24 рази ( $P < 0,05$ ), а рівень експресії eNOS знижувався у 3,5 раза порівняно з нетренованими. У серці старих тренуваних щурів рівень експресії мРНК nNOS знижувався в 4 рази ( $P < 0,05$ ) та iNOS – 2 рази порівняно зі старими нетренованими тваринами. За умов тренування спостерігали відновлення рівня експресії мРНК eNOS до такого контрольних дорослих тварин. Таким чином, тривалі фізичні навантаження сприяли поліпшенню функціонального стану серця при старінні, а саме, його скорочувальної функції, а також підвищенню резистентності органа до оксидативного стресу за умов реперфузійних ушкоджень, що зумовлено зниженням чутливості МП до дії іонів кальцію в серці на тлі підвищення активності мітохондріальної cNOS та відновлення рівня експресії мРНК eNOS, які забезпечують синтез оксиду азоту – ендогенного інгібітора пороутворення.

*Ключові слова: тренування фізичними навантаженнями, серце, ішемія-реперфузія, мітохондріальна пори, оксид азоту, експресія гена, старі щури.*

### ВСТУП

Відомо, що старіння супроводжується розладом фізіологічних функцій організму та

зменшенням його адаптивних можливостей до виживання. Відновити до деякої міри ці процеси можуть коригуючі довготривалі

© С.В. Чорна, Н.А. Струтинська, О.М. Семенихіна, С.А. Таланов, А.В. Коцюрuba, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

впливи, наприклад фізичні навантаження, які успішно використовуються в комплексній перебудові організму для поліпшення стану, зокрема, серцево-судинної системи [1–4]. Встановлено, що помірні фізичні навантаження впливають на систему антиоксидантного захисту через підвищення ферментної активності каталази та Mn-залежної супероксиддисмутази (MnСОД), а також супроводжуються зростанням експресії мРНК MnСОД і білків-шаперонів Hsp70, які беруть участь у ренатурації білків, ушкоджених внаслідок стресу і можуть бути одним із складників важливого механізму антистресорного захисту [5, 6]. Останнім часом з'являються окремі повідомлення, отримані в експериментах на ізольованому серці, щодо ролі мітохондріальної пори (МП) у механізмі позитивного впливу на організм короткотривалих фізичних навантажень [7]. Нині відсутні дані відносно чутливості МП до індукторів її відкриття у серці при старінні за дії саме тривалих фізичних навантажень.

Серед ендогенних регуляторів МП особливої уваги заслуговує оксид азоту (NO) [8], який відіграє важливу роль у механізмах регуляції скоротливої активності міокарда та судин. В організмі NO синтезується з амінокислоти L-аргініну за участі трьох основних ізоформ NO-синтаз (NOS): конститутивних – нейрональної (nNOS) та ендотеліальної (eNOS), а також індукційної (iNOS). Крім того, в мітохондріях кардіоміоцитів експресується мітохондріальна NOS (mitoNOS), яку за ознакою подібності амінокислотної послідовності відносять до nNOS [9, 10]. Конститутивні ізоформи (cNOS) є кальцій-залежними та синтезують NO в порівняно невеликих кількостях [11], у той час як активність iNOS не залежить від вмісту  $Ca^{2+}$  і за патологічних станів останній фермент продукує надлишок NO [11].

Наразі недостатньо дослідженими залишаються молекулярні механізми, які лежать в основі дії тривалих фізичних навантажень на функціональний стан серця, та регуляція

зміни чутливості МП при дії її модуляторів – внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  та ендогенного NO.

Метою нашої роботи було дослідити функцію серця та участь NO у регуляції чутливості МП до  $Ca^{2+}$  при дії тривалих фізичних навантажень у дорослих і старих щурів.

## МЕТОДИКА

В експериментах використовували дорослих віком 6–7 міс і масою 180 г та старих щурів-самців лінії Вістар віком 22–24 міс і масою 350–500 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Дослідження проведені з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Тварин було поділено на 4 групи: 1-ша – контрольні дорослі; 2-га – дорослі треновані; 3-тя – контрольні старі; 4-та – старі треновані. Фізичні тренування дорослих і старих щурів здійснювали 5 днів на тиждень примусовим плаванням тварин у ванні з водою (32–34 °С) впродовж шести та чотирьох тижнів відповідно: дорослі – починаючи з 2 хв на початку та 75 хв – в кінці, старі – починаючи з 2 хв на початку та 30 хв в кінці. Скоротливу функцію серця досліджували на ізольованих за методом Лангендофа серцях, як описано раніше [12]. Видалені серця промивали охолодженим 0,9 %-м розчином KCl. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування в нашій модифікації [13]. Дослідження відкриття МП проводили за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього їх поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25,  $KH_2PO_4$  – 3; pH 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини при  $\lambda=520$  нм за 3 хв до і через 15 хв після набухання за наявності індуктора кальцію в інкубаційному середови-

щі. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора досліджували протягом 15 хв. В ізольованих мітохондріях серця визначали активність cNOS та iNOS за допомогою кількості новоутвореного цитруліну, як описано раніше [14]. Експресію генів NOS визначила за допомогою методу полімеразаної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. РНК виділяли з міокарда щурів після тривалих фізичних навантажень із використанням набору «Trizol RNA-prep» (Isogen, Росія). Зворотну транскрипцію проводили, застосовуючи набір реагентів «First Stand cDNA Synthesis Kit» («Fermentas», Литва), 1,2–1,5 мкг загальної РНК і гексамерного праймера. Отриману внаслідок зворотної транскрипції комплементарну ДНК (кДНК) піддавали генспецифічній ПЛР-ампліфікації. Для кількісної оцінки експресії генів nNOS, iNOS та eNOS використовували ПЛР у реальному часі із застосуванням «TaqMan Gene Expression Assay» (Applied Biosystems, гн 00583793-m1, гн 00561646-m1 та гн 0213263-s1). TaqMan-проби для відповідних генів було розроблено на основі послідовностей мРНК щура компанією «Applied Biosystems» (США). Експресія генів була нормалізована відносно гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH) як ендогенного контролю, використовуючи реактив «TaqMan Rodent GAPDH Control» (VIC<sup>TM</sup>Probe). ПЛР-ампліфікація для генів складалася з 45 циклів: початкова денатурація при 95°C впродовж 20 с, з наступною обробкою при 95°C протягом 3 с, приєднання праймерів та елонгація – 60°C, 30 с. Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програми 7500 Fast Real-time PCR Software.

Отримані результати оброблені з використанням програми Origin 6.0 (Microcall Inc, США). Статистичну їх обробку проводили методом різниць за допомогою критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Раніше нами було показано позитивний вплив фізичних навантажень на функціональний стан серця, а саме його скоротливу функцію, у дорослих щурів [12]. Використання моделі помірних фізичних навантажень у дослідах на ізольованому серці старих щурів, подібно до дорослих, також сприяло підвищенню ефективності роботи серця та його коронарного потоку (КП) під час реперфузії після 30-хвилинної ішемії. У таких тварин через 5 хв реперфузії тиск, що розвивав лівий шлуночок (ТЛШ), становив  $35 \pm 4,6$  мм рт.ст., в той час як у старих нетренованих тварин –  $24 \pm 3$  мм рт.ст. ( $P < 0,05$ ). На 40-й хвилині реперфузії цей показник відновлювався до  $54 \pm 3,6$  мм рт.ст. і лише до  $40 \pm 5$  мм рт.ст. у контрольних старих тварин відносно вихідного рівня ( $P < 0,05$ ; рис. 1,а). Для старих тренуваних тварин кінцевий діастолічний тиск (КДТ) на 5-й хвилині реперфузії після ішемії серця становив  $25 \pm 1,3$  мм рт.ст., а для нетренованих тварин –  $34 \pm 5$  мм рт.ст. Після 40-ї хвилини реперфузії спостерігали тенденцію зниження його у тренуваних тварин до  $11 \pm 3,2$  мм рт.ст., а у нетренованих тварин – до  $21 \pm 2$  мм рт.ст. (див. рис. 1,б).

Швидкість КП у тренуваних старих тварин до ішемії становила  $13 \pm 0,91$  мл/хв, а у контрольних старих –  $10 \pm 1,2$  мл/хв (див. рис. 1,в). Протягом усіх часових проміжків реперфузії значення у тренуваних тварин перевищувало таке у нетренованих. Киснева вартість роботи серця до ішемії у старих тренуваних була меншою на 12,5 % порівняно з нетренованими тваринами ( $87,5 \pm 15$  і  $100 \pm 13$  % відповідно). У старих нетренованих та тренуваних тварин на 40-й хвилині реперфузії серця різниця між значеннями цього показника становила 29 % ( $158 \pm 17$  і  $129 \pm 10$  % відповідно).

Отримані результати вказують на позитивний вплив фізичних навантажень на функціональний стан серця старих тварин через покращення його скоротливої функції

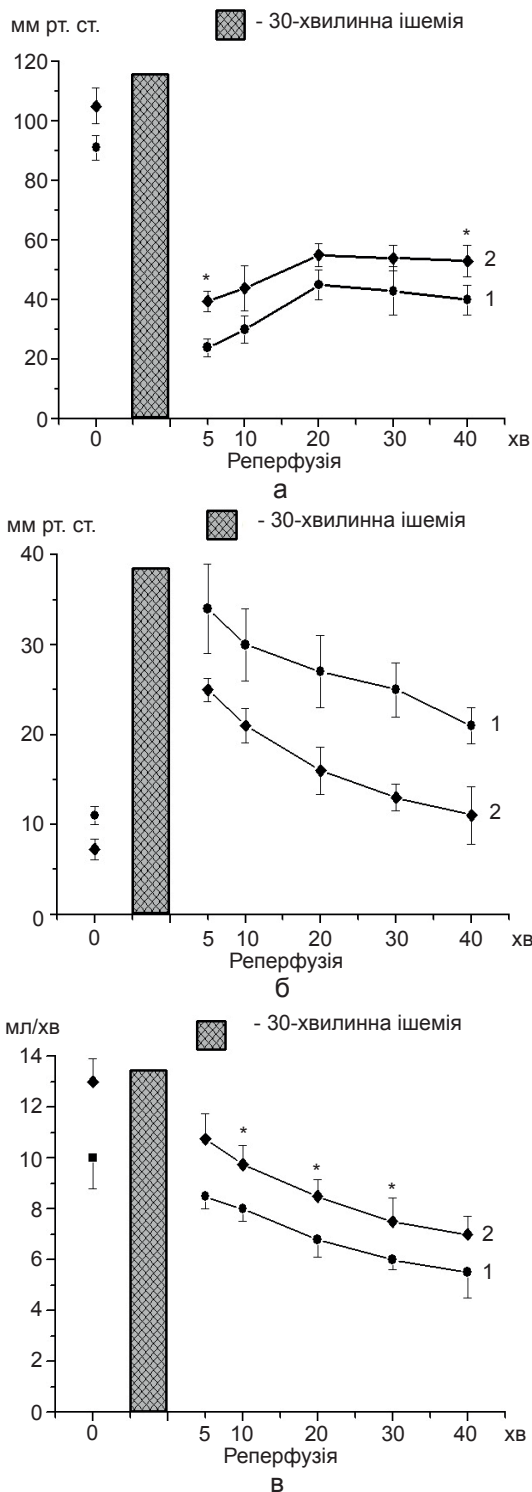


Рис. 1. Зміни тиску, що розвивався лівим шлуночком (а), кінцевого діастолічного тиску серця (б) та коронарного потоку (в) контрольних (1; n=7) та тренуваних (2; n=4) старих щурів при реперфузії ішемізованого серця \* P<0,05 різниця достовірна порівняно з контролем

та збільшення стійкості серця до ішемічно-реперфузійних ушкоджень.

Реакція на ішемію-реперфузію значною мірою зумовлена відкриттям МП. Тому для пояснення отриманих позитивних ефектів від помірних фізичних навантажень на скоротливу функцію серця, доцільно було дослідити проникність мітохондріальних мембран, що пов'язана саме з формуванням і відкриттям МП, у тренуваних тварин різних вікових груп. У попередніх наших дослідженнях було показано зменшення чутливості МП до дії індуктора  $Ca^{2+}$  в серці тренуваних дорослих щурів у порівнянні з контрольними [12].

Наразі ми показали, що величина набухання мітохондрій серця старих тренуваних щурів мала тенденцію до зменшення у порівнянні зі значеннями старих щурів (рис. 2 а, криві 2, 3). За умов дії природного індуктора МП іонів кальцію у концентрації  $10^{-4}$  моль/л спостерігали також зменшення на 26 % величини набухання мітохондрій серця старих тренуваних тварин порівняно з нетренованими (рис. 2 а, криві 4 і 5).

У дослідях *in vitro* спостерігали зниження чутливості МП до індуктора  $Ca^{2+}$  в діапазоні концентрацій  $10^{-7}$ – $10^{-4}$  у серці старих щурів після їх адаптації до фізичних навантажень внаслідок збільшення на 1,5–2 порядки порогової концентрації іона, яка індукувала набухання органел, порівняно з нетренованими (див. рис. 2,б). Таким чином, результати досліджень свідчать про протекторний вплив помірних фізичних навантажень у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, що може бути важливим регуляторним фактором у розвитку серцево-судинних захворювань при старінні.

Відомо, що NO та його метаболіти є важливими кардіопротекторними та вазодилататорними сполуками, необхідними для функціонування як серця, так і судин. Їх протекторна роль особливо набуває значення за патофізіологічних умов. Вважається, що основним шляхом синтезу NO в серцево-судинній системі є конститутивний за дії  $Ca^{2+}$ -



залежної eNOS, у той час як за умов патології — індукбельний синтез NO  $Ca^{2+}$ -незалежною iNOS. Відкриття МП, як показано за останні роки, пов'язано з активністю цих NOS і вмістом оксиду азоту. В мітохондріях серця дорослих тренуваних щурів було показано достовірне підвищення майже вдвічі активності cNOS відносно контролю ( $6,02 \pm 0,08$  і  $3,64 \pm 0,27$  пмоль/хв · мг білка відповідно;  $P \leq 0,05$ ). Тоді як у старих тренуваних щурів підвищення було незначне відносно нетренованих ( $2,05 \pm 0,691$  і  $1,84 \pm 0,26$  пмоль/хв · мг білка відповідно).

Разом з цим після тривалих фізичних навантажень достовірно незначно підвищу-

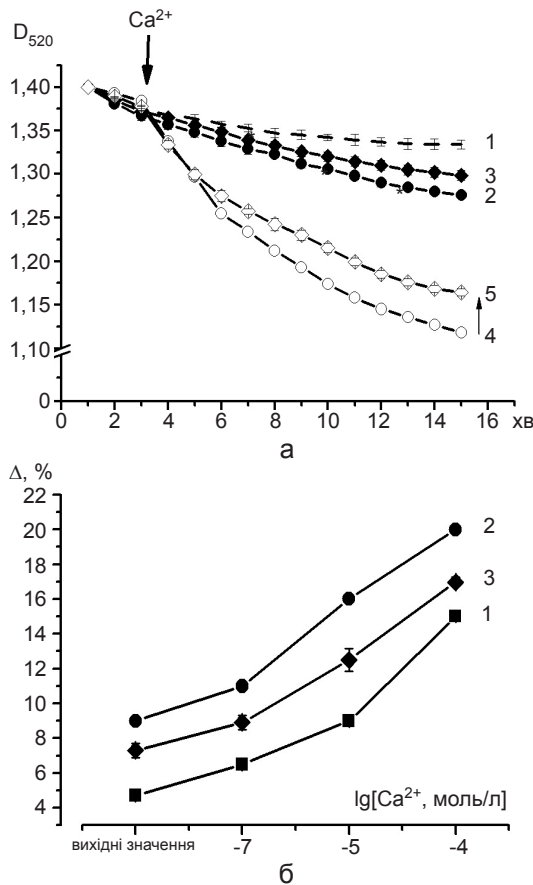


Рис. 2. Ефекти тривалих фізичних навантажень на кальційіндуковану мітохондріальну пору: а — набуття мітохондрій серця за умов дії індуктора  $Ca^{2+}$  ( $n=6$ ): 1 — дорослі; 2 — старі; 3 — старі тренувані щури; 4 — старі щури і дія  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); 5 — старі тренувані щури і дія  $Ca^{2+}$ ; б — зміни чутливості мітохондріальної пори до кальцію ( $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л): 1 — дорослі; 2 — старі; 3 — старі тренувані щури

валась активність iNOS у дорослих щурів щодо контролю ( $3,07 \pm 0,21$  і  $1,73 \pm 0,24$  пмоль/хв · мг білка відповідно;  $P \leq 0,05$ ). У старих тренуваних щурів спостерігали зниження цього показника у порівнянні з нетренованими ( $12,29 \pm 3,11$  і  $9,25 \pm 1,24$  пмоль/хв · мг білка відповідно;  $P \leq 0,05$ ).

Отже, у дорослих щурів за умов дії помірних фізичних навантажень оксид азоту, синтезований мітохондріальною cNOS, виступає ендogenousним інгібітором відкриття МП. Отримані результати дають можливість припустити, що помірна активація iNOS спричиняє певний регуляторний вплив відносно чутливості кальційіндукованого відкриття МП за умов фізичних навантажень дорослих щурів. Тоді як у старих щурів регуляція пороутворення здійснювалася за рахунок суттєвого зниження активності iNOS на тлі незначного зростання активності cNOS. Таким чином, наші результати вказують на ймовірну участь NO в ендogenousних механізмах попередження пороутворення за умов тривалих фізичних навантажень у мітохондріях серця дорослих і старих щурів.

Роль модуляції синтезу оксиду азоту у зменшенні чутливості МП до  $Ca^{2+}$  в серці дорослих і старих тренуваних щурів досліджували за допомогою зменшення продукції NO в мітохондріях одноразовим введенням тваринам блокатора активності NOS L-NAME (10 мг/кг). Показано збільшення кальційіндукованого набуття мітохондрій серця як дорослих (рис. 3, графіки 1, 2), так і старих тренуваних щурів за умов введення блокатора (рис. 3, графіки 3, 4) також збільшувалася порівняно з тренуваними тваринами, яким його не вводили. Також встановлено, що введення тваринам L-NAME збільшувало чутливість МП до дії індуктора  $Ca^{2+}$  ( $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л) як дорослих, так і старих тренуваних щурів (рис. 4, а, б).

Отже, після дії тривалих фізичних навантажень на дорослих і старих щурів спостерігали зменшення чутливості МП до  $Ca^{2+}$ ,

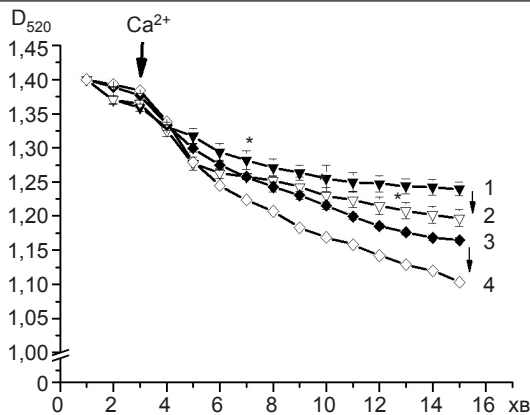


Рис. 3. Набухання мітохондрій серця дорослих (n=4) і старих (n=3) тренуваних щурів за умов інгібування NO-синтази (L-NAME) за наявності індуктора  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л) 1 – дорослі тренувані щури, 2 – дорослі тренувані щури за умов введення L-NAME, 3 – старі тренувані щури, 4 – старі щури за умов введення L-NAME

ймовірно, за рахунок збільшення вироблення NO мітоNOS.

За допомогою ПЛР у реальному часі доведено, що за умов фізичних навантажень відбуваються суттєві зміни в експресії мРНК генів nNOS, iNOS та eNOS у серці (рис. 5) тварин різного віку. Слід відмітити, що рівень експресії мРНК eNOS значно перевищував такий nNOS та iNOS.

Показано, що в серці старих щурів рівень експресії мРНК nNOS підвищений в 1,7 раза,

мРНК iNOS – в 24 рази ( $P < 0,05$ ), тоді як eNOS знижений у 2,4 раза порівняно з дорослими тваринами. У останніх за умов фізичного навантаження рівень експресії мРНК nNOS підвищується у 5 разів, та мРНК iNOS – в 24 рази ( $P < 0,05$ ), а eNOS знижується у 3,5 раза порівняно з дорослими нетренованими щурами. В серці старих тренуваних щурів рівень експресії мРНК nNOS знижувався в 4 рази ( $P < 0,05$ ) та iNOS удвічі порівняно зі старими нетренованими тваринами. За цих умов спостерігали підвищення у 3 рази рівня експресії мРНК eNOS відносно контрольної групи старих щурів. Порівнюючи рівень експресії цього гена з таким контрольних дорослих тварин, ми спостерігаємо відновлення рівня експресії мРНК eNOS до базального, що є позитивним ефектом. Отже, встановлено, що за умов фізичних навантажень в тканині серця відбувається перерозподіл експресії NO-синтезувальних ферментів.

Таким чином, тривалі фізичні навантаження сприяють поліпшенню функціонального стану серця при старінні, а саме, його скоротливої функції, а також підвищенню резистентності органу до оксидативного стресу за умов реперфузійних ушкоджень, що зумовлено зниженням чутливості МП до дії іонів кальцію в серці на тлі підвищення активності

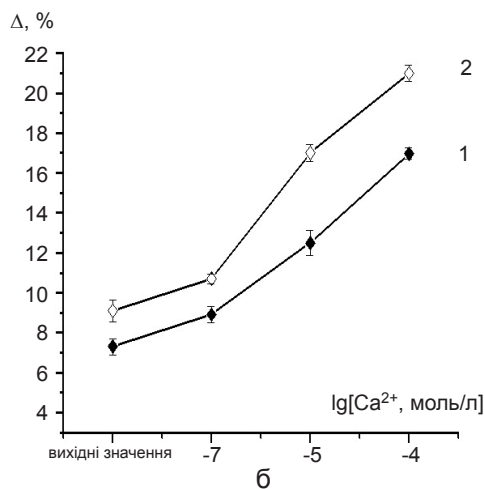
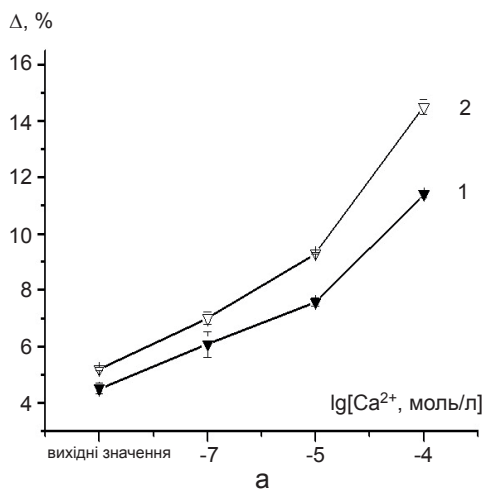


Рис. 4. Концентраційна залежність різниці величини набухання за наявності іонів кальцію мітохондрій серця дорослих (а; n=4) та старих (б; n=3) тренуваних щурів за умов відсутності (1) та наявності (2) інгібування NOS (L-NAME)



мітохондріальної сNOS та відновлення рівня експресії мРНК eNOS, що забезпечує синтез

оксиду азоту, який може відігравати роль ендogenous інгібітора пороутворення.

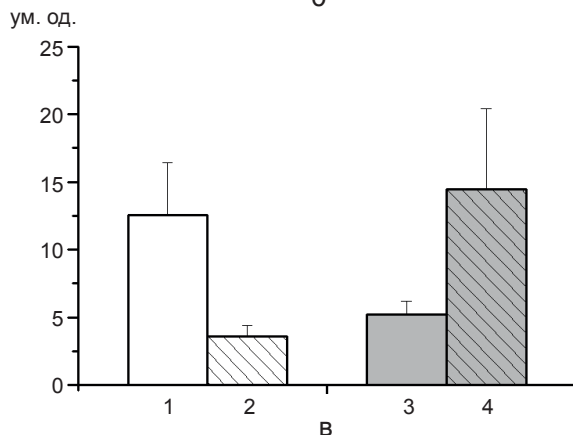
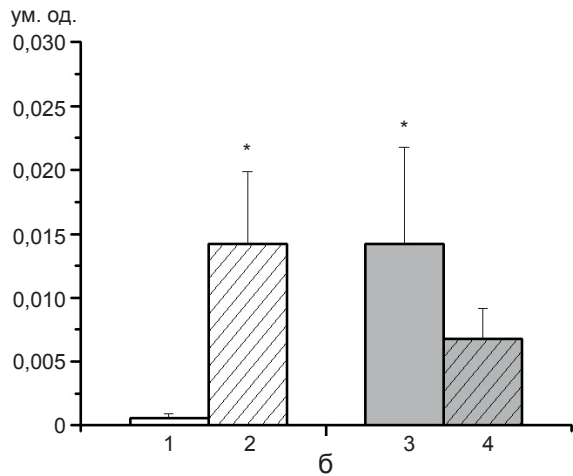
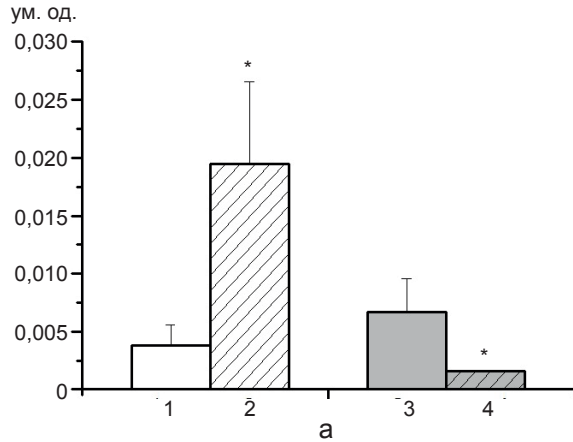


Рис. 5. Експресія мРНК NO-синтази (NOS) в серці дорослих та старих щурів за умов тривалих фізичних навантажень: а – нейрональної, б – індуцибельної, в – ендотеліальної. 1 – дорослі щури; 2 – дорослі треновані щури; 3 – старі щури; 4 – старі треновані щури; \* – різниця достовірна порівняно з дорослими ( $P < 0,05$ )

**С.В. Черная, Н.А. Струтинская, Е.Н. Семенихина, С.А. Таланов, В.Е. Досенко, А.В. Коцюруба, Г.Л. Вавилова, В.Ф. Сагач**

### ДЛИТЕЛЬНЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ НАГРУЗКИ УЛУЧШАЮТ СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ СЕРДЦА У СТАРЫХ КРЫС ПУТЕМ NO-ЗАВИСИМОГО УМЕНЬШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ К КАЛЬЦИЮ

Исследовали влияние длительных физических нагрузок на показатели функционального состояния изолированного по Лангендорфу сердца старых крыс в условиях ишемии-реперфузии, чувствительность кальцийиндуцированной митохондриальной поры (МП), а также роль NO-зависимых механизмов регуляции порообразования. Так, реперфузионные нарушения сократительной функции миокарда и его кислородного обмена были менее выражены у старых крыс, адаптированных к физическим нагрузкам, что свидетельствует об их положительном влиянии. Показано уменьшение чувствительности МП к действию  $Ca^{2+}$  в сердце старых тренированных крыс вследствие увеличения на 1,5–2 порядка пороговой концентрации иона, которая индуцировала набухание органелл по сравнению с нетренированными животными. Вместе с этим в митохондриях сердца тренированных взрослых крыс наблюдали повышение почти вдвое активности конститутивной NO-синтазы (сNOS) относительно контроля ( $6,02 \pm 0,08$  и  $3,64 \pm 0,27$  пмоль / мин · мг белка соответственно;  $P \leq 0,05$ ) и незначительный рост активности индуцибельной NOS (iNOS). В старых тренированных животных регуляция порообразования осуществлялась за счет достоверного снижения активности iNOS относительно контроля старых крыс ( $12,29 \pm 3,11$  и  $9,25 \pm 1,24$  пмоль / мин · мг белка соответственно;  $P \leq 0,05$ ) на фоне незначительного роста активности сNOS. В условиях снижения продукции NO в митохондриях путем однократного введения тренированным животным разного возраста блокатора активности NO-синтазы L-NAME (10 мг/кг) было показано повышение чувствительности МП к действию  $Ca^{2+}$  в сердце, что указывает на роль оксида азота как ингибитора порообразования при тренировках. С помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени установлено, что уровень экспрессии мРНК гена eNOS в сердце существенно превышает таковой nNOS и iNOS. При этом, в сердце взрослых тренированных крыс уровень экспрессии мРНК nNOS повышался в 5 раз, мРНК iNOS - в 24 раза ( $P < 0,05$ ), а уровень экспрессии eNOS снижался в 3,5 раза по сравнению с нетренированными. В сердце старых тренированных крыс уровень экспрессии мРНК nNOS снижался в 4 раза ( $P < 0,05$ ) и iNOS – 2 раза по сравнению

со старыми нетренированными животными. В условиях тренировки наблюдали восстановление уровня экспрессии мРНК eNOS к такому контрольных взрослых животных. Таким образом, длительные физические нагрузки способствовали улучшению функционального состояния сердца при старении, а именно, его сократительной функции, а также повышению резистентности органа к оксидативного стресса в условиях реперфузионных повреждений, что обусловлено снижением чувствительности МП к действию ионов кальция в сердце на фоне повышения активности митохондриальной cNOS и восстановления уровня экспрессии мРНК eNOS, которые обеспечивают синтез оксида азота – эндогенного ингибитора порообразования.

Ключевые слова: тренировки физическими нагрузками, сердце, ишемия-реперфузия, митохондриальная пара, оксид азота, экспрессия гена, старые крысы.

**S.V. Chorna, N.A. Strutynska, O.M. Semenykhina, S.O.Talanov, Dosenko V.E., A.V.Kotsuruba, G.L. Vavilova, V.F. Sagach**

### **LONG EXERCISE TRAINING IMPROVES HEART FUNCTION IN AGED RATS BY NO-DEPENDENT DECREASE IN MITOCHONDRIAL PORE SENSITIVITY TO CALCIUM**

The effect of long exercise training on the indexes of the functional state isolated by Lanhendorf heart of old rats during ischemia-reperfusion, the sensitivity of calcium-induced mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening and the role of NO-dependent mechanisms of pore-formation regulatory were investigated. Thus, reperfusion injury of the heart contractile function and its myocardial oxygen metabolism were less pronounced in old rats adapted to exercise long training pointing for its positive effect. It is shown a decreased sensitivity of MPTP to its inductor  $Ca^{2+}$  in the heart of old trained rats due to an increase by 1.5-2 orders in threshold  $Ca^{2+}$  concentration, which induces swelling of organelles. At the same time, in heart mitochondria of trained adult rats we observed almost doubled activity of constitutive NO-synthase (cNOS) compared with control ( $6,02 \pm 0,08$  and  $3,64 \pm 0,27$  pmol / min \* mg protein, respectively ( $P \leq 0,05$ )) and a slight increase in the activity of inducible NO-synthase (iNOS). Regulation of pore formation in older animals trained was performed by a significant decreased iNOS activity compared with control aged rats ( $12,29 \pm 3,11$  and  $9,25 \pm 1,24$  pmol/min\*mg protein, respectively ( $P \leq 0,05$ )) on the background slight increased in cNOS activity. We hypothesized that a decrease in sensitivity of the MPTP-opening occurred due to an increased production of NO pointing to its role as an inhibitor of pore formation during exercise. It has been shown to increase the sensitivity of MPTP to  $Ca^{2+}$  in the heart under the conditions of reduce the NO production by a single injection of NO synthase inhibitor N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in dose of 10 mg/kg to

trained animals of all ages. Using *real-time polymerase chain reaction* we showed that the gene expression of eNOS in the heart was significantly greater than that of nNOS and iNOS. Thus, in the heart of adult trained rats the expression of mRNA nNOS were increased 5 times, mRNA iNOS - 24 times ( $P < 0,05$ ), and the gene expression of eNOS decreased 3.5 times compared with untrained rats. In the heart of old trained rats the expression of nNOS mRNA decreased 4 times ( $P < 0,05$ ) and iNOS mRNA - 2 times compared with the old untrained animals. In heart of old trained rats we observed a workout recovery of eNOS mRNA expression to the values of control adult animals. Taken together, our data suggest that a long-term exercise training improves functional state of the heart during aging and increases the resistance of body to oxidative stress under reperfusion injury due to a decreased sensitivity of MPTP to  $Ca^{2+}$  and increased activity of mitochondrial cNOS. Key words: exercise training, heart, ischemia-reperfusion, mitochondrial permeability transition pore, nitric oxide, gene expression, aging rats.

*Bogomoletz Institute of physiology NAS of Ukraine, Kyiv*

### **REFERENCES**

1. Hull SS, Vanoli E, Adamson PB, Verrier RL, Foreman RD, Schwartz PJ. Exercise training confers anticipatory protection from sudden death during acute myocardial ischemia. *Circulation*. 1994; 89: 548-552.
2. Powers, SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely AR, Jessup J. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol*. 1998; 275: 1468-1477.
3. Campos JC, Gomes K MS, Ferreira JCB. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. *Food and Chem Toxicol*. 2013; 62: 107-119.
4. Williams MA, Fleg JL, Ades PA, Chaitman BR, Miller NH, Mohiuddin SM, Ockene IS, Taylor CB, Wenger NK. Secondary prevention of coronary heart disease in the elderly (with emphasis on patients  $\geq 75$  years of age): An American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology Subcommittee on Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention. *Circulation*. 2002; 105(14): 1735-1743.
5. Lennon SL, Quindry JC, French JP, Kim S, Mehta JL, Powers SK. Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand*. 2004; 182: 161-169.
6. Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely R A, Hamilton K, Coombes J, Naito H. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol*. 2001; 91: 2205-2212.
7. Ciminelli M, Ascah A, Bourduas K, Burelle Y. Short term training attenuates opening of the mitochondrial permeability transition pore without affecting myocardial function following ischemia-reperfusion. *Mol Cell Biochem*. 2006; 291: 39-47.
8. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol and Cell Cardiol*. 2014.

9. Brookes PS. Mitochondrial nitric oxide synthase. Mitochondrion. 2004; 3: 187-204.
10. Lacza Z, Pankotai E, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. Front Biosci. 2009; 14: 4436-4443.
11. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J Pathol. 2000; 90: 244-254
12. Chorna SV, Talanov SO, Strutynska NA, Vavilova G.L., Kotsuruba A.V., Gaidai N.M., Sagach V.F. The functional state the rat heart during ischemia-reperfusion, the sensitivity of calcium-induced mitochondrial permeability transition pore opening and the uncoupling protein 3 expression following long exercise training. Fiziol Zh. 2010; 56 (2): 13-21.
13. Sagach VF, Vavilova GL, Rudyk OV, Strutynska NA. Release of unidentified substances of mitochondrial origin--evidence of mitochondrial permeability transition pore opening in the heart mitochondria of rats. Fiziol Zh. 2003; 49 (5): 3-12.
14. Sagach VF, Rudyk OV, Vavilova GL, Kotsiuruba AV, Tkachenko JuP. Melatonin recovers ischemic tolerance and decreases the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening in the heart of aging rats. Fiziol Zh. 2006; 52 (3): 3-14.

*Матеріал надійшов до редакції 30.09.2014*

Л.М. Плотнікова, В.Я. Березовський

## Реакція фібробластоподібних клітин крові на знижений парціальний тиск кисню

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: lidiiianik@i.ua*

*Досліджено вплив зниженого парціального тиску кисню ( $P_{O_2}$ ) на проліферацію та активність лужної фосфатази фібробластоподібних клітин лінії 4BL людини виділених із крові. Інкубування клітин по 8 год протягом 3 діб при рівні  $P_{O_2}$  38 та 76 мм рт. ст. стимулює їх проліферативний потенціал на 27 і 45 % відповідно порівнянно з контролем. Виявлено зменшення активності лужної фосфатази (маркер формування кісткової тканини) на 25 % при зниженні  $P_{O_2}$ . Отримані нами результати дають змогу зробити висновок про гальмування диференціації клітин лінії 4BL в остеогенному напрямку при концентрації кисню у газовому середовищі 5 та 10 % порівняно з контролем (21%  $O_2$ ). Ключові слова: фібробластоподібні клітини, парціальний тиск кисню, проліферація, диференціація.*

### ВСТУП

Мезенхімальні стромальні (стовбурові) клітини (МСК) людини знаходяться в кістковому мозку, жировій тканині, шкірі, тканинах серця, плаценті, пуповинній крові, а також в інших органах і тканинах [1–4]. У культурі МСК мають здатність до активної проліферації. Їхня зупинка завершується спонтанною диференціацією *in vitro* в клітини кісткової (остеогенні клітини), жирової (адипоцити), хрящової (хондроцити), м'язової (міоцити) або сполучної тканини (фібробласти) [5]. Умови культивування (склад культурального середовища, фактори росту, індуктори диференціювання) відіграють важливу роль у реалізації функціональних можливостей клітин. Показано, що парціальний тиск кисню ( $P_{O_2}$ ) в позаклітинному середовищі, який зумовлює внутрішньоклітинну концентрацію кисню, також є одним з істотних факторів, що впливає на проліферацію, життєздатність, диференціювання, а також на морфологічні та імунофенотипічні показники клітин [6–10]. Проте їхні висновки неоднозначні. Це може бути пов'язано з вибором культури клітин,

© Л.М. Плотнікова, В.Я. Березовський

а також умовами проведення експерименту, а саме: використанням різного часового режиму та неоднакової інтенсивності впливу газової суміші.

Мета нашої роботи – дослідження впливу зниженого до 38 і 76 мм рт. ст.  $P_{O_2}$  на проліферацію та активність лужної фосфатази (маркерний показник остеогенного диференціювання) МСК лінії 4BL людини.

### МЕТОДИКА

МСК лінії 4BL – це фібробластоподібні клітини, отримані з периферичної крові здорового донора у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України [11, 12]. Клітини культивували в середовищі DMEM («Sigma», США) з додаванням 10 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби («Sigma», США), 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Контрольну групу культивували в умовах стандартної атмосфери  $CO_2$ -інкубатора (21 %  $O_2$  – 159 мм рт. ст.; 5 %  $CO_2$  і 74%  $N_2$ ) при 37°C. Клітини дослідних груп інкубували

протягом 8 год на добу (3 доби) при двох значеннях  $P_{O_2}$ : 38 (5 %  $O_2$ ) і 76 мм рт. ст. (10 %  $O_2$ ), потім переносили в  $CO_2$ -інкубатор без зміни живильного середовища. Для визначення проліферативної активності культуру досліджуваної лінії розсівали по 50 тис. клітин у скляні чашки Петрі (діаметром 35 мм). Клітини ферментативно знімали за допомогою суміші 0,25%-го розчину трипсину і 0,02 % ЕДТА (рН 7,5; 1:1) на 3-тю й 4-ту добу культивування та підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва [13, 14]. Активність лужної фосфатази (ЛФ) використовували як маркерний показник для підтвердження диференціювання МСК в остеобласти. Біохімічним методом у культуральній рідині з використанням стандартних наборів реактивів (ЛФ, НР016.01, «Філісіт-Діагностика», Україна) вимірювали активність ЛФ.

Цифрові результати обробляли з використанням програми Microsoft Excell 2003 та програми OriginPro 8,0. Для оцінки статистичної вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами результати показали, що при всіх варіантах інкубування проліферативна активність МСК на 3-тю добу вірогідно не

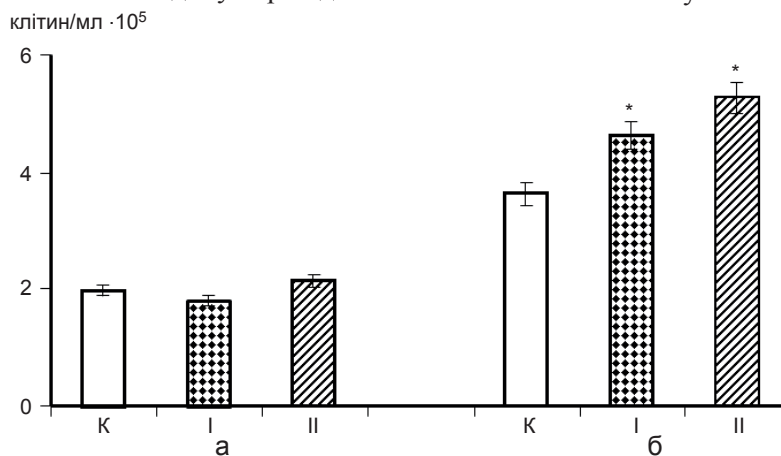


Рис. 1. Проліферативна активність клітин лінії 4BL людини, які культивували в умовах стандартної атмосфери (К – 159 мм рт. ст.) і зниженому парціальному тиску кисню (I – 38, II – 76 мм рт. ст.) на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу. \* $P < 0,05$  – статистична вірогідність порівняно з контролем

відрізнялася від контрольних значень (рис. 1, а). На 4-ту добу культивування після впливу  $P_{O_2}$  38 мм рт. ст. кількість клітин ( $P < 0,05$ ) зростала і становила 462 тис. клітин/мл у порівнянні з контролем (363 тис. клітин/мл). Більш виражене підвищення кількості клітин відбувалося і при рівні  $P_{O_2}$  76 мм рт. ст. – 528 тис. клітин/мл (див. рис. 1, б). Ці результати дають змогу зробити висновок, що зниження концентрації кисню в газовому середовищі інкубації до 5 і 10 % при культивуванні мультипотентних МСК людини лінії 4BL збільшує їх кінцеву проліферативну активність на 27 і 45 % відповідно порівняно з контролем. При цьому максимальний ефект отримано при 10 %  $O_2$ . Можливо це відбувається у зв'язку з тим, що у фізіологічних умовах цілого організму тканинне  $P_{O_2}$  в 2–4 рази нижче, ніж в атмосферному повітрі інкубатора.

Результати проведених біохімічних досліджень показали вірогідне зниження активності ЛФ у культуральній рідині на 33 % порівняно з контролем при рівні  $P_{O_2}$  38 мм рт. ст. на 3-тю добу культивування (рис. 2, а). На 4-ту добу – активність ЛФ зменшилась як при 38 мм рт. ст., так і при 76 мм рт. ст. на 25 % ( $P < 0,05$ ; див. рис. 2, б). Такі зміни дають змогу вважати, що остеогенне диференціювання МСК лінії 4BL людини залежить від рівня  $P_{O_2}$  у газовій фазі середовища. Зниження цього показника гальмує остеогенну диференціа-



цію. З максимальною виразністю цей процес відбувається в умовах атмосферного рівня  $PO_2$  (159 мм рт. ст.).

Отримані результати узгоджуються з літературними даними інших дослідників, які показали, що зниження концентрації кисню в газовому середовищі з 21 до 3 % гальмує остеогенний потенціал культури МСК отриманої з тканин ротової порожнини людини [15] і кісткового мозку миші [16]. Жамбалова та співавт. [17] дослідили здатність мультипотентних МСК кісткового мозку людини до диференціації в умовах зниженого вмісту кисню (1 і 5 %  $O_2$ ). При інкубації клітин у нормоксичних (21 %  $O_2$ ) умовах і при зниженому вмісті кисню виявлена різна ступінь здатності МСК до диференціювання в остеогенному, адипогенному і ендотеліальному напрямках. У середовищі з 5 %  $O_2$  спостерігали незначне зниження здатності МСК до мінералізації позаклітинного матриксу і накопиченню ліпідних крапель у порівнянні з контролем (21 %  $O_2$ ). При концентрації  $O_2$  1 % МСК практично повністю втратили здатність до мінералізації матриксу і не диференціювалися в адипоцитарному напрямку. При культивуванні МСК протягом 3 тиж з 5 та 21 %  $O_2$  вірогідних відмінностей у диференціюванні в ендотеліальному напрямку не виявлено. Характерним морфофункціональним показником ефективності такого диференціювання була здатність

МСК утворювати капіляроподібні структури на екстраклітинному матриксі в культурі з додаванням ендотеліального фактора росту.

Основним регулятором адаптації клітин до умов зниженого  $PO_2$  є фактор індукований гіпоксією (HIF-1), який модулює роботу багатьох генів [18]. Він складається з 2 субодиниць: киснечутливої HIF-1 $\alpha$  та конститутивної HIF-1 $\beta$ . Порівняльний аналіз даних, отриманих Риловою та співавт. [19] при дослідженні експресії генів МСК жирової тканини, показав, що в умовах зниженого до 5 % вмісту кисню відбувалося збільшення рівня експресії генів, які відповідають за вступ клітин у клітинний цикл і позитивно регулюють їх проліферацію. Серед них гени родини Fos (FOSB і FOSL1), що кодуєть білки, які, димеризуючись із білками родини Jun, беруть участь у формуванні білка-активатора 1 (AP1); гени PCNA і CCND2, продукти яких являють собою цикліни (необхідні для переходу клітин з фази  $G_1$  в S-фазу синтезу ДНК), а також ген CKS2, який кодує регуляторну субодиницю циклінзалежної кінази. Крім того, у відповідь на знижений вміст кисню зменшувалась експресія CDKN2C – гена-інгібітора циклінзалежної кінази. Встановлено, що максимальну активність HIF-1 виявляє при концентрації кисню близько 0,5 % [20].

У нашій попередній праці [21] виявлено 2-кратне зниження проліферативної актив-

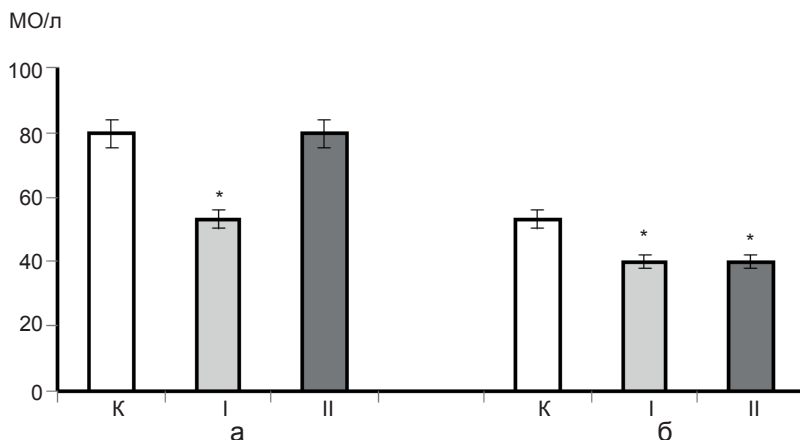


Рис. 2. Активність лужної фосфатази у культуральній рідині мезенхімальних стромальних клітин контрольних (К – 21 %  $O_2$ ) і дослідних (І – 5 %  $O_2$ , ІІ – 10 %  $O_2$ ) зразків на 3-тю (а) та 4-ту (б) добу культивування. \* $P < 0,05$  – статистична вірогідність порівняно з контролем

ності мультипотентних МСК, виділених із периферичної крові людини при рівні  $P_{O_2}$  22–23 мм рт. ст. (3 % кисню). З літературних даних відомо, що низьке напруження  $O_2$  8–23 мм рт. ст. (1 і 3 %) може стабілізувати частку МСК людини у стані спокою [22]. Цим можна пояснити зниження проліферації і диференціації МСК при зазначених концентраціях кисню. У сучасних дослідженнях культивування клітин зазвичай здійснюють при вмісті кисню 21 % – це набагато вище, ніж у тканинах організму. В артеріальній крові концентрація  $O_2$  становить близько 12,5 %, у венозній крові – 5 %, а у кістковому мозку варіює від 1 до 7 % [23, 24]. Буравкова зі співав. [25] показали, що проліферативна активність МСК із ліпоаспірату людини в умовах зниженого  $P_{O_2}$  38 мм рт.ст. була в середньому в 2,9 раза вищою в порівнянні з культивуванням у стандартних умовах (21 %  $O_2$ ). Зменшення вмісту кисню в середовищі культивування не змінювало життєздатність і імунофенотип МСК із ліпоаспірату людини

Таким чином, концентрація кисню у середовищі інкубування здатна впливати не тільки на проліферацію клітин, але і на ефективність їх диференціювання. Отримані нами результати свідчать, що інкубування фібробластоподібних клітин людини лінії 4BL в середовищі зі зниженим вмістом кисню (5 і 10 %) може виявитися корисною модифікацією технології культивування, здатною забезпечити отримання більшої кількості клітин за менший час. Це може бути використано в галузі комбустіології та відновлювальної терапії.

## ВИСНОВКИ

1. Культивування МСК лінії 4BL людини у газовому середовищі з 5 та 10 %  $O_2$  протягом 8 год на добу (3 дні) вірогідно підвищує проліферативну активність фібробластоподібних клітин на 27 і 45 % відповідно порівняно з контролем.

2. Остеогенна диференціація клітин лінії 4BL людини, маркерним показником якої є

активність ЛФ, у разі зниженого парціального тиску кисню (38 і 76 мм рт. ст.) відбувалася на 25 % повільніше, ніж в умовах атмосферного кисню (159 мм рт. ст.).

**Л.Н. Плотникова, В.А. Березовский**

## РЕАКЦИЯ ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК КРОВИ НА ПониЖЕННОЕ ПАРЦИАЛЬНОЕ ДАВЛЕНИЕ КИСЛОРОДА

Исследовано влияние пониженного парциального давления кислорода ( $P_{O_2}$ ) на пролиферацию и активность щелочной фосфатазы фибробластоподобных клеток линии 4BL человека, выделенных из крови. Инкубирование клеток по 8 ч в течение 3 сут при уровне  $P_{O_2}$  38 и 76 мм рт. ст. стимулирует их пролиферативный потенциал на 27 и 45 % соответственно в сравнении с контролем. Выявлено снижение активности щелочной фосфатазы (маркер формирования костной ткани) на 25% при снижении  $P_{O_2}$ . Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о торможении дифференциации клеток линии 4BL в остеогенном направлении при концентрации кислорода в газовой среде 5 и 10 % по сравнению с контролем (21 %  $O_2$ ). Ключевые слова: фибробластоподобные клетки, парциальное давление кислорода, пролиферация, дифференциация.

**L.N. Plotnikova, V.A. Berezovskii**

## REACTION OF FIBROBLAST-LIKE BLOOD CELLS TO A LOW PARTIAL OXYGEN PRESSURE

We investigated the effect of a low partial oxygen pressure ( $P_{O_2}$ ) on the proliferation and alkaline phosphatase activity of human fibroblast-like cells line 4BL, isolated from blood. The cells incubation for 3 days (8 hours daily) at the level of  $P_{O_2}$  38 and 76 mm Hg stimulates the proliferative potential of their by 27 and 45% respectively, compared to the control. It was shown a reduction in the activity of alkaline phosphatase (a marker of bone formation) by 25% while reducing  $P_{O_2}$ . Our data suggest inhibition of osteogenic differentiation of cells line 4BL when the oxygen concentration in the gas atmosphere of 5 and 10%  $O_2$  compared with control (21%  $O_2$ ).

Key words: fibroblast-like cells, oxygen partial pressure, proliferation, differentiation.

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

## REFERENCES

1. Suzdaltsev YG, Burunova VV, Vakhrouchev IV, Yarygin VN, Yarygin KN. Comparison ability to differentiate into mesenchymal tissue of mesodermal cells of human origin isolated from a variety of sources. Cell techniques in biology and medicine. 2007; 1: 3–10.

2. Diaz-Prado S., Muinos-Lopez E., Hermida-Gomez T. et al. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J. Cell Biochem.* 2010; 111 (4): 846–57.
3. Hegyi B., Sagi B., Kovacs J. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int. Immunology.* 2010; 22 (7): 551–59.
4. Maddalena S, Elsa V, Lucia G, Fausto Z, Marco D, Alberto A, Georg S, Ornella P. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007; 1 (4): 296–305.
5. Kiseleva EV, Chermnykh ES, Vorotelyak EA, Volozhin AI, Vasiliev AV, Terskikh VV. Comparison of fibroblasts-like cell differentiation capacities of human bone marrow, adipose tissue, hair papilla and dermal fibroblasts. *Cytology.* 2009; 51 (1): 12–19.
6. Astakhova V, Berezovskii V, Panchenko L, Khasabova I. The stromal cells of human bone-marrow cloning by of low partial oxygen pressure. *Fiziologichnyj Zhurnal.* 2001; 47 (1): 40–44.
7. Astakhova V. Osteogenic cell precursors from human bone marrow. Kiev: Phoenix. 2000: 176 p.
8. Buravkova L, Valyushkina M, Andreeva E, Loginov V. Reparative osteogenesis transplantation multipotent bone marrow stromal cells, culturing at a different oxygen tension. *Morphology.* 2011; 139 (1): 81–85.
9. Valyushkina M, Buravkova L. Effect of O<sub>2</sub> in the medium on multipotent mesenchymal progenitor cells from bone marrow of different ages rats. *Medical Academic Journal.* 2012; 12 (3): 57–59.
10. Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, Jia M, Zhao Q, Cai H, Han ZC, Yang R, Chen G, Zhao RC. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 347: 12–21.
11. Lukash L, Yatsishina A, Kushniruk V, Pidpala O. Reprogramming of somatic cells in the adult human in vitro. *Factors experimental evolution of organisms.* 2011; 11: 493–98.
12. Kushniruk VA, Kochubej TP, Matsevych LL, Ruban TP, Lukash LL. Research karyotype new line of human cells 4BL6 prolonged cultivation in vitro. *Factors experimental evolution of organisms.* 2012; 3: 313–18.
13. Adams R. *Methods of cell culture for biochemists.* Moscow: Mir. 1983: 264 p.
14. Pinaeva G. *Methods of cell culturing.* Collection of Scientific Papers. Leningrad: Nauka. 1988: 287 p.
15. Burnaevsky NS, Vishnyakova KhS, Safenina AV, Rybalko DV, Popov KV, Egorov EE. Effects of oxygen partial pressure on the efficacy of colony formation and differentiation of human mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Cell transplantation and tissue engineering.* 2010; 5 (4): 24–30.
16. Panyuhin NV, Vishnjakova HS, Egorov EE. Influence oxygen partial pressure on the survival, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Biological membranes.* 2008; 25 (5): 352–59.
17. Zhambalova AP, Gershovich YuG, Buravkova LB, Gal'chuk SV, Romanov YuA. Effects of low oxygen levels on differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells of human bone marrow in vitro. *Cell transplantation and tissue engineering.* 2009; 4 (3): 47–51.
18. Semenza G.L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 2000; 14: 1983–91.
19. Rylova YuV, Buravkova LB. Long-term expansion of multipotent mesenchymal stromal cells under reduced oxygen tension. *Cytology.* 2013; 55 (12): 852–60.
20. Plotnikova LN, Berezovsky VA, Ruban TA, Lukash LL, Yanko RV. The proliferation intensity of human multipotent mesenchymal stromal cells in the modified gas medium. *Ukrainian morphological almanac.* 2013; 11 (1): 120–123.
21. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 2006; 91 (5): 807–19.
22. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister S, Handgretinger R, Kerst G, Müller I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biology.* 2010; 11: 1–11.
23. Lin Q, Kim Y, Alarcon R, Yun Z. Oxygen and Cell Fate Decisions. *Gene Regulation and Systems Biology.* 2008; 2: 43–51.
24. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone.* 2006; 39 (3): 513–22.
25. Buravkova LB, Grinakovskaya OS, Andreeva ER, Zhambalova AP, Kozionova MP. Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension. *Cytology.* 2009; 51 (1): 5–11.

*Матеріал надійшов до редакції 14.03.2014*

<sup>1</sup>Ю.О. Федотова, <sup>2</sup>Г.О. Фролова

## Ефекти стимуляції та блокади дофамінових рецепторів на емоційні форми поведінки самиць щурів

<sup>1</sup>Ін-т фізіології ім. І.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Дон. нац. ун-т; E-mail: gljukkk@ukr.net

*Вивчали ефект хронічного введення агоніста квінпіролу (0,1 мг/кг, внутрішньоочеревинно) і антагоніста D2-дофамінових рецепторів сульпіриду (10,0 мг/кг, внутрішньоочеревинно) протягом 14 діб на тривожно-депресивноподібну поведінку у самиць щурів в ключові фази статевого циклу. Виявлено, що введення сульпіриду щурам у фазу дієструсу призводило до продепресивної дії, тоді як у фазі еструсу і проєструсу, навпаки, проявлявся його антидепресивний ефект. Крім того, введення сульпіриду підвищувало рівень тривожності незалежно від фази статевого циклу. На противагу цьому, введення квінпіролу чинило виражену анксиолітичну дію на тривожну поведінку, але не впливало на депресивноподібну поведінку у всіх фазах статевого циклу.*

*Ключові слова:* квінпірол, сульпірид, депресія, тривожність, статевий цикл, естрогени, самиці.

### ВСТУП

На відміну від традиційних уявлень про провідну роль серотоніну та норадреналіну в патофізіологічних механізмах виникнення афективних розладів [1], в останні роки стали з'являтися факти з експериментальних і клінічних досліджень про участь дофамінергічної системи головного мозку в розвитку порушень емоційних форм поведінки [2–5]. Так, є дані про знижену функціональну активність мезокортиколімбічної дофамінергічної системи у хворих із середнім і важким ступенем депресії [2, 4, 6, 7] і про залучення D1/D2-типів дофамінових рецепторів у механізмах дії таких антидепресантів, як міансерин і нефазадон [8]. Разом з тим слід зазначити, що відомості про роль дофаміну в механізмах тривожно-депресивних розладів дуже нечисленні. З іншого боку, відомо, що естрогени мають виражений модулювальний вплив на функціональну активність дофамінергічної системи [8]. Водночас показано, що агоністи дофаміну підвищують зв'язування естрогену в деяких ділянках мозку, а також у передній частці гіпофіза [9]. Механізми, що

© Ю.О. Федотова, Г.О. Фролова

лежать в основі дії дофаміну на модуляцію рецепторного зв'язування естрогенів, ще не дуже зрозумілі. Це може відбуватися через D1/D2-типи дофамінових рецепторів, цАМФ і цАМФ-залежну протеїнкіназу А внаслідок фосфорилування та активації естрогенових рецепторів [8–10]. Естрогени також залучаються до механізмів розвитку біполярних розладів, тривожності і депресії [10, 11]. Деякі дослідники припускають, що нормально функціонуючий менструальний цикл може впливати або змінювати вираженість симптомів первинних психічних розладів [9, 11, 12]. Відзначається залежне від фази циклу загострення проявів у психічних хворих (з манією або шизофренією), у яких симптоматика наростає за інтенсивністю перед менструацією і слабшає після неї, зокрема збільшення ступеня тяжкості депресії у жінок з уже виявленими тривожно-депресивними розладами [9, 12].

З огляду на тісні взаємодії оваріальної гормональної та дофамінергічної нейромедіаторної систем становить інтерес дослідити роль D2-типу дофамінових рецепторів в емоційній поведінці самиць щурів в умовах



природного коливання вмісту естрогену в ключові фази статевого циклу.

Метою нашої роботи була оцінка впливу хронічного введення агоніста D2-типу дофамінових рецепторів – квінпіролу і антагоніста D2-типу дофамінових рецепторів – сульпіриду на тривожно-депресивноподібну поведінку у самиць щурів в ключові фази статевого циклу.

## МЕТОДИКА

Робота виконана на 120 білих самицях щурів лінії Вістар масою 200–220 г, отриманих з розплідника «Рапполово». Тварини були приручені до рук експериментатора до початку експериментів. Всі дослідження проводили в ранкові години (10.00–13.00). Для виконання кожної методики щурів у фазі дієструсу, еструсу та проєструсу відповідно поділяли на групи по 8–10 особин у кожній. Самиці 1, 2, 3-ї груп отримували фізіологічний розчин (контроль); 4, 5, 6-ї – квінпірол (0,1 мг/кг, внутрішньоочеревинно); 7, 8, 9-ї – сульпірид (10,0 мг/кг, внутрішньоочеревинно).

Для визначення фази статевого циклу протягом 8 послідовних днів до початку експерименту у щурів брали вагінальні мазки з використанням морфологічних ознак [13]. У експерименти відбирали самиць, у яких спостерігався стабільний 4-добовий естральний цикл.

Депресію у щурів моделювали за методикою Порсолта [14]. Рівень тривожності у тварин визначали з використанням тесту піднесеного хрестоподібного лабіринту [15].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням дисперсійного аналізу two-way ANOVA з наступним post-hoc-тестом за допомогою пакета програм SPSS 9.0. Відмінності між значеннями при  $P < 0,05$  вважали статистично вірогідними.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Двофакторний дисперсійний аналіз результатів (таблиця) виявив достовірні ефекти дії препарату і гормонального фактора (фаза

статевого циклу) на тривожну поведінку у самиць щурів, а також їх взаємодію. Post-hoc-аналіз також показав достовірні відмінності між контрольними і експериментальними групами при аналізі результатів тесту піднесений хрестоподібний лабіринт. У контрольній групі самиць як у фазу еструсу, так і проєструсу рівень тривожності підвищувався в порівнянні з фазою дієструсу ( $P < 0,05$ ). Стимуляція D2-типу дофамінових рецепторів (введення квінпіролу) в умовах як середнього (фаза дієструсу), низького (фаза еструсу), так і високого (фаза проєструсу) вмісту ендогенних естрогенів призводила до анксиолітичного ефекту у самиць. Це виражалось у збільшенні часу перебування тварини в відкритих рукавах і кількості заходів при паралельному зниженні часу знаходження їх у закритих рукавах і кількості заходів ( $P < 0,05$ , див. таблицю). Водночас блокада D2-типу дофамінових рецепторів (введення сульпіриду) односпрямовано чинила анксиогенний ефект незалежно від вмісту ендогенних естрогенів у самиць ( $P < 0,05$ , див. таблицю). Тобто реєструвалося зменшення часу знаходження тварини у відкритих рукавах і кількості заходів при одночасному збільшенні часу перебування в закритих рукавах.

Двофакторний дисперсійний аналіз результатів, отриманих в тесті Порсолта, дав змогу встановити достовірні ефекти дії препарату і гормонального фактора (фаза статевого циклу), а також їх взаємодії. Post-hoc-аналіз продемонстрував достовірні відмінності між контрольними і експериментальними групами при аналізі результатів цього тесту ( $P < 0,05$ ). У фазу еструсу та проєструсу рівень депресивності у контрольних самиць був підвищений в порівнянні з фазою дієструсу ( $P < 0,05$ ; рисунок, а,б,в). Стимуляція D2-типу дофамінових рецепторів незалежно від вмісту ендогенних естрогенів не впливала на депресивноподібну поведінку самиць щурів ( $P > 0,05$ ). А їх блокада залежно від вмісту ендогенних естрогенів в організмі модулювала депресивноподібну поведінку



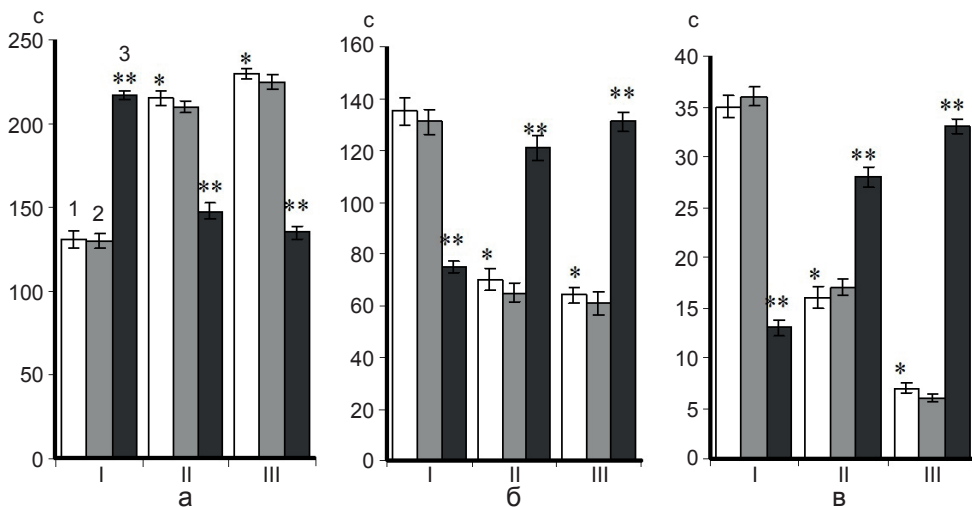
Вплив дофамінотропних речовин на тривожну поведінку самиць щурів ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Фаза циклу	Час у «рукавах», с		Кількість заходів у «рукави»	
	відкритих	закритих	відкриті	закриті
Контроль				
Дієструс	86,4 ± 6,2	213,6 ± 2,4	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,4
Проєструс	36,4 ± 3,4*	263,6 ± 8,6*	0,4 ± 0,1*	4,5 ± 0,2*
Еструс	42,6 ± 4,2*	257,4 ± 2,2*	0,3 ± 0,1*	4,0 ± 0,6*
Введення квінпіролу				
Дієструс	156,4 ± 3,2**	143,6 ± 4,2**	4,9 ± 0,4**	0,7 ± 0,2**
Проєструс	81,6 ± 2,4**	218,4 ± 5,2**	2,7 ± 0,2**#	0,8 ± 0,2**
Еструс	92,0 ± 3,4**	208,0 ± 7,2**	3,8 ± 0,2**	1,2 ± 0,4**
Введення сульпіриду				
Дієструс	53,4 ± 3,2**	246,6 ± 2,2**	0,8 ± 0,2**	2,0 ± 0,2
Проєструс	11,8 ± 1,2**	288,2 ± 5,6**	0,1 ± 0,02**	4,0 ± 0,2
Еструс	22,0 ± 1,2**	278,0 ± 3,6**	0,06 ± 0,02**	4,0 ± 0,2

\* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями у самиць у фазі дієструсу, \*\* $P < 0,05$  порівняно з контролем у відповідних фазах циклу.

(див. рисунок, а,б,в). У фазу дієструсу (фаза спокою) на фоні введення сульпіриду у самиць підвищувалася депресивна поведінка, що виражалось в достовірному зменшенні часу активного плавання і збільшенні пасивного,

а також нерухомості ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. У фази еструсу і проєструсу, навпаки, проявлявся антидепресивний ефект, що характеризувалося збільшенням часу активного плавання і зменшенням пасивного,



Вплив квінпіролу і сульпіриду на депресивноподібну поведінку самиць щурів протягом статевого циклу: а – час нерухомості, б – час активного плавання, в – час пасивного плавання; 1 – контроль, 2 – введення квінпіролу, 3 – введення сульпіриду. I – дієструс, II – еструс, III – проєструс. \* $P < 0,05$  у порівнянні з контрольними самицями у фазі дієструсу, \*\* $P < 0,05$  у порівнянні з контрольними самицями у відповідних фазах статевого циклу

а також нерухомості порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ; див. рисунок, а, б, в).

Слід відмітити, що стимуляція або блокада D2-типу дофамінових рецепторів в умовах низького або високого вмісту ендогенних естрогенів має різноспрямований вплив на тривожно-депресивноподібну поведінку. На фоні введення сульпіриду була виявлена чітка модуляція депресивноподібної поведінки залежно від фази статевого циклу: при середньому вмісті естрогенів проявляється продепресивний ефект, тоді як у фазу при низькому або високому вмісті – антидепресивний. Водночас негативна (анксіогенний ефект) дія сульпіриду на тривожну поведінку спостерігалася незалежно від фази статевого циклу у самиць щурів. Можна говорити про те, що він в цілому негативно впливає на вираженість тривожно-депресивноподібної поведінки у самиць, за винятком його антидепресивної дії при низькому або високому вмісті ендогенних естрогенів в організмі, тобто саме в ті ключові фази циклу, коли найбільш висока ступінь депресивності. Мабуть, сульпірид відіграє роль модулятора депресивної поведінки у самиць, з проявами його позитивної дії тільки при відхиленні естрогенового фону від нормального стану, тобто саме в тих умовах, коли слід зменшити ступінь депресивності. Це свідчить про різний ступінь значимості блокади D2-типу дофамінових рецепторів для реалізації спрямованості тривожно-депресивної поведінки при змінах гормонального фону протягом статевого циклу. В умовах введення квінпіролу відзначали позитивну дію на тривожну поведінку і відсутність будь-якого ефекту на депресивноподібну поведінку незалежно від гормонального статусу самиць протягом статевого циклу, що вказує на відсутність детермінованості цього впливу від фази циклу. Можна говорити про те, що стимуляція D2-типу дофамінових рецепторів має виражене значення тільки для механізмів тривожної поведінки у самиць щурів протягом статевого циклу.

Протилежно спрямований вплив агоніста і антагоніста D2-типу дофамінових рецеп-

торів на депресивноподібну поведінку у самиць ймовірно пов'язаний зі зміненим метаболізмом дофаміну і характером експресії D2-типу дофамінових рецепторів, а також зі зміненою експресією  $\beta$ -форми естрогенових рецепторів і їх зв'язуочної здатності в структурах головного мозку, що мають безпосереднє відношення до механізмів емоційних форм поведінки [9, 12, 16]. Крім того, можна вважати, що виражена антидепресивна дія сульпіриду і анксіолітичний ефект квінпіролу в ключові фази статевого циклу пов'язані не тільки з їх впливом на гормональний фон, а й на D2-тип дофамінових рецепторів, а також з адекватною нормалізацією обміну моноамінів у лімбічній системі.

Таким чином, результати цього дослідження свідчать про істотну роль D2-типу дофамінових рецепторів у афективній поведінці у самиць у різні фази статевого циклу.

## ВИСНОВКИ

1. Стимуляція D2-типу дофамінових рецепторів має анксіолітичний ефект незалежно від фази статевого циклу у самиць щурів і не впливає на депресивноподібну поведінку протягом статевого циклу.

2. Блокада D2-типу дофамінових рецепторів спричиняє анксіогенний ефект незалежно від фази статевого циклу у самиць щурів і призводить до продепресивного ефекту в фазу дієструса, тоді як у фазу еструсу і проеструсу – до антидепресивного ефекту.

**Ю.О. Федотова, Г.О. Фролова**

## ЭФФЕКТЫ СТИМУЛЯЦИИ И БЛОКАДЫ ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ЭМОЦИОНАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ПОВЕДЕНИЯ САМОК КРЫС

Изучали эффект хронического введения агониста квинпи-рола (0,1 мг/кг, внутривбрюшинно) и антагониста D<sub>2</sub>-типа дофаминовых рецепторов сульпирида (10,0 мг/кг, внутривбрюшинно) в течение 14 сут на тревожно-депрессивно-подобное поведение у самок крыс в ключевые фазы полового цикла. Выявлено, что введение сульпирида крысам в фазу диэструса приводило к продепрессивному действию, тогда

как в фазы эструса и проэструса, напротив, проявлялся его антидепрессивный эффект. Кроме того, повышался уровень тревожности независимо от фазы полового цикла. В противоположность этому, введение квинпиrolа оказывало выраженное анксиолитическое действие на тревожное поведение, но не влияло на депрессивноподобное поведение во всех фазах полового цикла.

Ключевые слова: квинпиrol, сульпириd, депрессия, тревожность, половой цикл, эстрогены, самки.

**Yu.O. Fedotova, G.O. Frolova**

## **EFFECTS AND QUINPEROLE AND SULPIRIDE ON EMOTIONAL BEHAVIORS IN FEMALE RATS**

The present work was devoted to the comparative analysis of influence of chronic administration of D<sub>2</sub>-receptors agonist – quinperole (0,1 mg/kg, i.p.) and D<sub>2</sub>-receptors antagonist – sulphiride (10,0 mg/kg, i.p.) for 14 days on anxiety and depressive-like behavior in the adult female rats. Model of depression in rats was carried out in Porsolt test. Anxiety level was assessed in the elevated plus maze. It was established that chronic quinperole administration rendered an anxiolytic action in females during diestrous, estrous and proestrous phases, but failed to modify depression-like behavior during ovary cycle. Sulpiride administration resulted in anxiogenic effect in all phases of ovary cycle in females. Also, it was noted definite modulation of depression-like behavior in connection of ovary cycle phases in rats treated with sulphiride: at moderate level of estrogens was prodepressive action while at reduced/enhanced levels of estrogen – antidepressant effect. It is suggested different extent of D<sub>2</sub>-receptors involvement in the mechanisms of anxiety-depressive-like behavior at alterations of hormonal balance during ovary cycle. The data obtained indicate in a close interaction between ovary hormonal and dopaminergic systems of the brain in mechanisms of anxiety and depression. Key words: quinperole, sulphiride, anxiety, depression, ovary cycle, female rats.

*Donetsk National University*

## **REFERENCES**

- Olie JP, Costa E Silva J, Macher JP. Neuroplasticity: a new approach to the pathophysiology of depression. Science Press, London UK; 2004.
- Dunlop BW, Nemeroff CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. Arch Gen Psychiatry. 2007; 64: 327-337.
- Nestler EJ, Carlezon WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. Biol Psychiatry. 2006; 59:1151-1159.
- Nutt DJ. Brain mechanisms of social anxiety disorder. J Clin Psychiatry. 2006; 67: 3-8.
- Eisenegger C, Naef M, Linssen A, Clark L, Gandamaneni PK, Müller U, Robbins TW. Role of Dopamine D2 Receptors in Human Reinforcement Learning. Neuropsychopharmacology. 2014; 9: 1-10.
- Dhir A, Kulkarni SK. Involvement of dopamine (DA)/serotonin (5-HT)/sigma (sigma) receptor modulation in mediating the antidepressant action of ropinirole hydrochloride, a D2/D3 dopamine receptor agonist. Brain Res Bull. 2007; 74:58-65.
- Pedroni A, Eisenegger C, Hartmann MN, Fischbacher U, Knoch D. Dopaminergic stimulation increases selfish behavior in the absence of punishment threat. Psychoneuroendocrinology. 2013; 38:171-178.
- Lammers CH, De Souza U, Qin ZH, Lee SH, Yajima S, Mouradian MM. Regulation of striatal dopamine receptors by estrogen. Synapse. 1999; 34: 222-227.
- Sapronov NS, Fedotova YuO. Hormones of the hypothalamic-pituitary-ovarian system and brain. SPb; 2009.
- Rapkin AJ, Winer SA. The pharmacologic management of premenstrual dysphoric disorder. Expert Opin Pharmacol. 2008; 9: 429-445.
- Clayton AH. Symptoms related to the menstrual cycle: diagnosis, prevalence, and treatment. J Psychiatr Pract. 2008; 14: 13-21.
- Solomon MB, Herman JP. Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. Physiol Behav. 2009; 97: 250-258.
- Kirshenblat YaD. Workshop on Endocrinology. Moscow; 1969.
- Porsolt RDG, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. Eur J Pharmacol. 1978; 47: 379-391.
- Voronina TA, Seredenin SB. Methodological guidance on the study tranquilizing (anxiolytic) action of pharmacological substances. In the book.: Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Moscow; 2000.
- Fedotova YO, Sapronov NS. Effects of SCH-23390 and Sulpiride on Active Avoidance in Ovariectomized Rats Treated with a Low Dose of 17β-Estradiol. Bull Exp Biol Med. 2014; 156 (5): 612-619.

*Матеріал надійшов до редакції 15.05.2014*

В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельська, В.О. Коптелов, В.А. Бондаренко

## Властивості еритроцитів з невисоким ступенем збереження після заморожування в середовищі з непронижними та проникними кріопротекторами

*In-m проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків; E-mail: ramazanov.viktor@mail.ru*

*Досліджували осмотичні, антиоксидантні та морфологічні характеристики еритроцитів, заморожених у рідкому азоті (-196°C) у середовищі, що містить цукрозу, декстран і диметилсульфоксид. При заморожуванні у середовищі, з цукрозою або цукрозою та декстраном порушуються осмотичні та морфологічні властивості клітин, що залишилися після відмивання кріоконсерванта, але не виявлено вірогідної зміни концентрації малонного діальдегіду й активності глутатіонзалежних ферментів (глутатіонредуктази і глутатіонпероксидази). Додавання диметилсульфоксиду знижує ступінь пошкодження еритроцитів при заморожуванні та зберігає осмотичні, антиоксидантні та морфологічні характеристики клітин, що залишилися, незалежно від ступеня їх збереження після відмивання кріоконсерванта. Показано, що для збереження властивостей еритроцитів при заморожуванні кріоконсервант повинен включати комбінацію непронижного і проникного кріопротекторів. Ключові слова: еритроцити, осмотичні, антиоксидантні та морфологічні властивості, заморожування, комбінований кріоконсервант.*

### ВСТУП

Заморожування еритроцитів у фізіологічному розчині NaCl значно пошкоджує та трансформує клітини в мієліноподібні структури, від яких відділяються везикули. Включення у середовище заморожування декстрану запобігає везикуляції та значному гемолізу еритроцитів. Клітини, що при цьому залишилися, морфологічно представлені в основному дискоцитами (нормоцитами) з невисоким вмістом ехіноцитів [1]. Такі морфологічні показники характерні для клітин, що не відмивалися від декстрану після заморожування. Еритроцити, які заморожували у середовищі з декстраном (30 %) і відмивали від кріоконсерванта фізіологічним розчином NaCl (0,9 %), морфологічно представлені сфероцитами і є осмотично крихкими [1]. Кріоконсервування еритроцитів з полімерними кріопротекторами може виключати процедуру їх відмивання, але трансфузія клітин з полімерами призводить

© В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельська, В.О. Коптелов, В.А. Бондаренко

до лейкоцитозу, підвищення концентрації гемоглобіну та білірубину у плазмі, а також затримується виведення цих кріопротекторів з організму [2]. Для усунення згаданих проблем слід відмивати кріопротектори перед трансфузією [3], але це порушить осмотичну стійкість еритроцитів [1, 2].

Раніше нами було показано, що використання комбінованого середовища з непронижними та проникними кріопротекторами дає змогу відмивати заморожені еритроцити фізіологічним розчином NaCl з отриманням високого ступеня збереження й осмотичної стійкості відмитих клітин з їх нормальними морфологічними й антиоксидантними характеристиками [4]. Відомо, що в циклі заморожування–відігрівання на пошкодження клітин впливає гіпертонічний (при заморожуванні) і післягіпертонічний стрес (при відігріванні) [5–7]. При заморожуванні еритроцитів у цукрозному середовищі

(0,3 % NaCl та 6,85 % цукрози) на гемоліз значно діє післягіпертонічний стрес. Додавання в указане середовище 5 % диметилсульфоксиду (ДМСО) в циклі заморожування–відігрівання знижувало гемоліз еритроцитів і послабляло дію післягіпертонічного стресу до 35 % [8]. Відмивання відігрітих клітин може призвести до гемолізу залишку пошкоджених еритроцитів. У результаті отримуємо фракцію клітин найбільш стійких до ушкоджувальних чинників заморожування–відігрівання, які зберігатимуть свої властивості після відмивання кріоконсерванта.

Транспорт сульфату в еритроцити у сульфатному середовищі пов'язаний з переміщенням  $H^+$  [9]. Можна припустити, що у разі пошкодження мембран аніони  $SO_4^{2-}$  і, відповідно, іони водню проникатимуть в еритроцити додатковим неспецифічним шляхом. При цьому обчислювані швидкості транспорту іонів можуть перевищувати відповідні показники для інтактних клітин. Отже, дослідження транспорту  $H^+$  і  $SO_4^{2-}$  допоможе оцінити бар'єрну функцію мембран еритроцитів при заморожуванні. За таких умов у них виникають пошкодження, які при відмиванні кріоконсерванта утворюють гемолітичні пори, проникні для гемоглобіну. Проте в клітинах, що залишилися, вказані пошкодження можуть утворювати пори меншого розміру, непроникні для гемоглобіну (молекулярна маса 64500), але проникні для таких молекул менших розмірів, як глутатіон (молекулярна маса 307). Тому ці клітини можуть втрачати бар'єрну функцію мембран для глутатіону.

Мета роботи – визначити осмотичні, антиоксидантні та морфологічні характеристики заморожених еритроцитів, що мають невисокий ступінь збереження після відмивання кріоконсерванта.

## МЕТОДИКА

У дослідах використовували NaCl (х.ч.), цукрозу (х.ч.), ДМСО («Sigma», США), декстран з молекулярною масою 35000 («Serva»,

Німеччина). Середовища заморожування містили (у відсотках): NaCl – 0,3; цукрози – 6,85; ДМСО – 5; декстрану – 10–20.

Еритроцити отримували з крові 2-ї групи донорів чоловічої статі після чотирикратного відмивання їх ізотонічним розчином NaCl. Металеві контейнери об'ємом 1 мл зі зразками еритроцитів у середовищах заморожування з 40%-м гематокритом інкубували 30 хв при 25 °С, потім занурювали в рідкий азот (-196 °С) на 30 хв. Зразки еритроцитів розморожували на водяній бані при 40 °С протягом 2 хв. Потім до 1 мл клітинної суспензії при перемішуванні повільно додавали 9 мл теплового (37 °С) ізотонічного розчину NaCl (швидкість додавання – не більше 0,3 мл/с). Суспензію центрифугували при 3000 хв<sup>-1</sup> протягом 5 хв і видаляли надосадову рідину. Процедуру розведення та центрифугування повторювали ще один раз. Після цього еритроцити тричі відмивали теплим (37 °С) ізотонічним розчином NaCl, при цьому швидкість розведення осаду еритроцитів не враховували.

Осмотичний гемоліз еритроцитів досліджували у середовищі, що містить 10 ммоль/л тріс-буфера (рН 7,4) і NaCl з різною концентрацією (0,09–0,9 %). Клітини у середовищі об'ємом 1 мл з 0,6%-м гематокритом інкубували 15 хв при 25 °С, далі центрифугували при 3000 хв<sup>-1</sup> протягом 3 хв з подальшим вимірюванням ступеня гемолізу в надосадовій рідині.

Гемоліз еритроцитів обчислювали після спектрофотометричного визначення кількості гемоглобіну, вимірюючи поглинання у супернатанті зразків при довжині хвилі 543 нм:

$$\text{ступінь гемолізу (у відсотках)} = [A1/A2] \cdot 100 \%,$$

де A1 – поглинання супернатанту експериментального зразка; A2 – поглинання при повному гемолізі контрольного зразка.

Транспорт іонів водню в еритроцитах у сульфатному середовищі без буфера досліджували в термостатованій (37 °С) посудині з рН-електродом, постійно перемішуючи клітинну суспензію [9]. При внесенні еритро-



цитів до ізотонічного розчину  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , що не містить буферних компонентів, відбувається двофазна зміна рН зовнішнього середовища – закиснення з подальшим залуженням. Така зміна пов'язана з обміном внутрішньоклітинного аніона  $\text{Cl}^-$  на позаклітинний  $\text{SO}_4^{2-}$ . При цьому вихід  $\text{H}^+$  з клітини визначається функціонуванням циклу Якобса–Стюарта, тоді як вхід пов'язаний безпосередньо з транспортом  $\text{SO}_4^{2-}$  в клітину [9].

Для оцінки транспорту  $\text{SO}_4^{2-}$  використовували величину потоку іонів  $\text{H}^+$ , яку обчислювали за формулою:

$$J = k \cdot (V/A) \cdot \Delta H, \quad (\text{моль} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}),$$

де  $\Delta H$  – зміна концентрації  $\text{H}^+$  у зовнішньому середовищі по ходу обміну  $\text{Cl}^-$  на  $\text{SO}_4^{2-}$  [10];  $k$  – константа швидкості входу  $\text{H}^+$  ( $\text{с}^{-1}$ ), яку обраховували за методом Рамазанова та співавт. [10];  $V/A$  – відношення об'єму внутрішньоклітинної води до площі поверхні мембрани. У ізотонічних умовах для еритроцитів  $V/A = 6,3 \cdot 10^{-5} \text{ см}$  [11].

Вміст глутатіону в еритроцитах визначали спектрофотометрично з використанням дитіобіснітробензойної кислоти при довжині хвилі 412 нм [12], малоновий діальдегід (МДА) – колориметрично при довжині хвилі 535 нм, використовуючи тіобарбітурову кислоту [13]. Активність глутатіонпероксидази оцінювали за методом Разиграєва та співавт. [14] з використанням дитіобіснітробензойної кислоти, активність глутатіонредуктази – із застосуванням методу Юсупова [15].

Морфологію еритроцитів до та після заморожування вивчали за допомогою світлового мікроскопа. У суспензію еритроцитів з 2%-м гематокритом вносили альбумін у концентрації 1 %, перемішували та тестували зміну морфології клітин.

Статистичні розрахунки проводили на основі результатів, отриманих на еритроцитах від семи донорів. Результати представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна помилка. Для визначення статистичної вірогідності результатів використовували непараметричний метод Манна–Уїтні при  $P < 0,05$  [16].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Заморожування еритроцитів у цукрозному середовищі (0,3 %  $\text{NaCl}$  + 6,85 % цукрози) значно пошкоджує клітини (84,5 %), при відмиванні кріоконсерванта зменшується концентрація глутатіону у клітинах, що залишилися. Крім того, підвищується потік іонів  $\text{H}^+$  (відповідно, і аніонів  $\text{SO}_4^{2-}$ ) у негемолізованих еритроцитах в сульфатному середовищі порівняно з інтактними клітинами. Включення у середовище заморожування декстрану (10–20 %) знижує ступінь пошкодження еритроцитів, проте відмивання кріоконсерванта не відмінє зменшення концентрації глутатіону у негемолізованих клітинах і збільшення показника потоку  $\text{H}^+$  у залишку клітин порівняно з інтактними еритроцитами (табл. 1). Результати указують на те, що зменшення концентрації глутатіону у клітинах пов'язане з втратою бар'єрної функції мембран при відмиванні кріоконсерванта.

Додавання 5 % ДМСО у середовище заморожування з цукрозою або сумішшю цукрози та декстрану знижує пошкодження еритроцитів, при цьому відмивання кріоконсерванта не викликає вірогідної зміни концентрації глутатіону в негемолізованих клітинах, потік іонів водню у залишку клітин вірогідно не відрізняється від такого для інтактних еритроцитів (див. табл. 1).

На рис. 1 показано зниження осмотичної стійкості еритроцитів, заморожених у середовищі з цукрозою; при поєднанні цукрози та ДМСО крива осмотичного гемолізу еритроцитів неістотно відрізняється від такої для інтактних клітин, що свідчить про збереження осмотичної стійкості еритроцитів, які заморожували у комбінованому середовищі (див. рис. 1,а). Після заморожування еритроцитів у середовищі з цукрозою та декстраном визначається двояка зміна їх осмотичної стійкості. У середовищі при концентрації  $\text{NaCl}$  0,45–0,9 % знижується осмотична стійкість еритроцитів, тоді як в інтервалі концентрації солі 0,09–0,4 % вона, навпаки, підвищується

Таблиця 1. Осмотичні показники еритроцитів, відмитих після заморожування в різних захисних середовищах

Зразки клітин	Гемоліз, %	Глутатіон, мкмоль/г гемоглобіну	Потік іонів водню у сульфатному середовищі ( $J_{in} \cdot 10^6$ ), моль $\cdot$ см <sup>-2</sup> $\cdot$ с <sup>-1</sup>
Інтактні	0,0±0,0	10,5±1,6	0,91±0,13
Заморожені в середовищі			
цукроза	84,5±3,0	<sup>1</sup> 9,8±1,4 <sup>2</sup> 4,2±0,7**	1,55±0,22*
цукроза та декстрин (10 %)	65,0±3,5	<sup>1</sup> 9,9±1,6 <sup>2</sup> 4,5±0,6**	1,53±0,23*
цукроза та декстран (20 %)	37,0±3,5	<sup>1</sup> 9,7±1,5 <sup>2</sup> 4,3±0,7**	1,56±0,24*
цукроза та диметилсульфоксид	63,0±2,5	<sup>1</sup> 9,5±1,7 <sup>2</sup> 8,2±1,3	1,15±0,17
цукроза, декстран (20 %) та диметилсульфоксид	16,0±4,0	<sup>1</sup> 9,6±1,7 <sup>2</sup> 8,5±1,5	1,14±0,17

<sup>1</sup> – до відмивання, <sup>2</sup> – після відмивання. \*P<0,05 порівняно з інтактними еритроцитами ; \*\*P<0,05 порівняно з невідмитими еритроцитами.

порівняно з інтактними клітинами (див. рис. 1,б). При поєднанні цукрози, декстрану та ДМСО, крива осмотичного гемолізу заморожених еритроцитів практично не відрізняється від інтактних клітин (див. рис. 1,в).

Раніше припускали, що підвищення осмотичної стійкості заморожених еритроцитів в інтервалі концентрації NaCl 0,09–0,4 % пов'язане зі зростанням градієнта концентрації декстрану на мембранах клітин при охолодженні. При цьому включення у середовище заморожування ДМСО і надходження його в клітини послаблює ефект, пов'язаний з концентруванням декстрану [17].

Після заморожування еритроцитів і відмивання їх від кріоконсерванта (незалежно від складу) вміст МДА не підвищується і активність глутатіонзалежних ферментів не змінюється (табл. 2).

На рис. 2 показано мікрофотографії еритроцитів, відмитих ізотонічним розчином NaCl. Інтактні клітини представлені стомаатоцитами (70–80 %) і ехіноцитами (20–30 %) – фото 1,а за наявності альбуміну еритроцити перетворюються у дискоцити (нормоцити) – фото 4. Еритроцити, відмиті після заморожування у середовищі із цукрозою або сумішшю цукрози та декстрану, є сфероцитами (фото

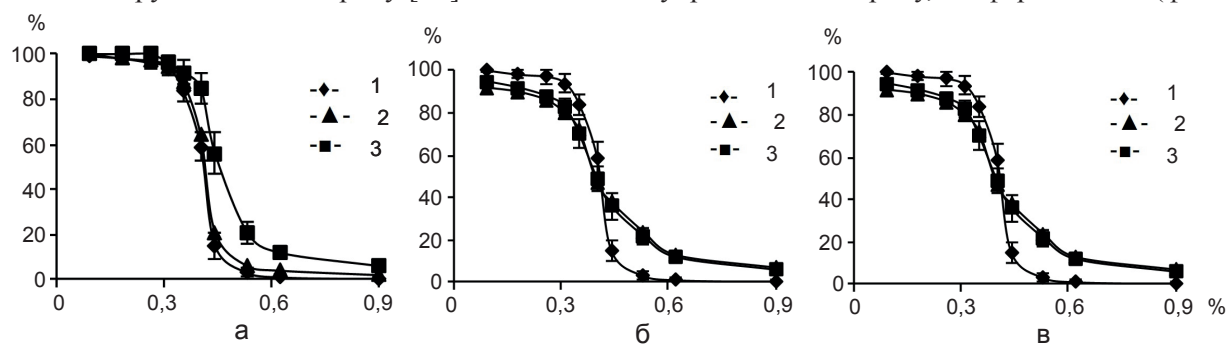


Рис. 1. Залежність гемолізу від концентрації NaCl для еритроцитів, відмитих після заморожування в різних середовищах з цукрозою, на а: 1 – інтактні клітини; 2 – цукроза та диметилсульфоксид (ДМСО); 3 – цукроза, на б: 1 – інтактні клітини; 2 – цукроза та декстран (10 %); 3 – цукроза та декстран (20 %), на в: 1 – інтактні клітини; 2 – цукроза, декстран (20 %) та ДМСО

Таблиця 2. Антиоксидантні показники еритроцитів, відмитих після заморожування в різних захисних середовищах

Зразки клітин	Малоновий діальдегід, мкмоль/г Hb	Глутатіон-пероксида- за, мкмоль/(хв · Hb)	Глутатіонредуктаза, мкмоль/(хв · г Hb)
Інтактні	0,98±0,13	155,8±22,4	14,6±2,3
Заморожені в середовищі цукроза	1,23±0,19	140,0±21,0	12,5±2,1
цукроза та декстрин (10 %)	1,20±0,17	145,5±24,0	12,6±2,0
цукроза та декстран (20 %)	1,21±0,18	142,8±22,5	12,0±2,0
цукроза та диметилсуль- фоксид	1,19±0,18	146,5±22,5	12,8±2,2
цукроза, декстран (20 %) та диметилсульфоксид	1,21±0,20	148,5±20,0	13,0±2,1

2,3,7), дія альбуміну змінює форму клітин, і вони стають сфероехіноцитами та ехіноцитами (фото 5,6,10). Після заморожування у середовищах із сумішшю цукрози та ДМСО або цукрози, декстрану та ДМСО, еритроцити представлені ехіноцитами і сфероехіноцитами (фото 8,9), водночас дія альбуміну змінює форму клітин, і вони стають в основному дискоцитами (65–70 %) з домішками стоматоцитів (10–20 %) та ехіноцитів (10–20 %) (фото 11,12).

Результати нашої роботи вказують на те, що порушення осмотичних властивостей заморожених еритроцитів визначається пошкодженнями безпосередньо при заморожуванні–відігріванні. Включення у середовище заморожування ДМСО забезпечує збереження осмотичних і морфологічних властивостей еритроцитів, до того ж, ці показники подібні до зразків еритроцитів як з більшим (63,0 %) так і з меншим (16,0 %) ступенем пошкодження (див. табл. 1, рис. 1, рис. 2). Механізм збереження властивостей еритроцитів при заморожуванні визначається поєднанням у середовищі сахарози і ДМСО, а ступінь збереження – концентрацією декстрану в кріоконсерванті.

Очевидно, залишок клітин після заморожування у середовищі з цукрозою і ДМСО (див. табл. 1) є найбільш стійким до ушкоджувальних чинників заморожування–відігрівання і, ймовірно, являє собою певні вікові фракції еритроцитів.

У зв'язку з цим слід зазначити, що фракції «молодих» і «старих» еритроцитів мають меншу деформованість, ніж клітини середнього віку [18]. При заморожуванні клітинної суспензії і вимерзанні води в каналах між кристалами льоду клітини піддаються механічним зрушувальним діям, що їх деформує та пошкоджує [6]. При розморожуванні і таненні льоду висока концентрація клітин створює умови, які перешкоджають рівномірному розведенню концентрованого розчину водою, і клітини в різних ділянках піддаватимуться гіпертонічній або гіпотонічній дії [7]. Раніше показано, що при заморожуванні–відігріванні еритроцитів поєднання у кріоконсерванті цукрози з ДМСО забезпечує послаблення післягіпертонічного (осмотичного) стресу [8], тому кріопротекторна ефективність комбінованого середовища визначається її властивістю послабляти післягіпертонічну дію на клітини при відігріванні.

Дані літератури дають змогу припустити, що при значному ступені пошкодження (63,0 %, див. табл. 1) частина еритроцитів, що залишилася після заморожування, включає клітини, які до заморожування були найбільш деформовані та стійкі до осмотичної дії, можливо, це еритроцити середньої фізіологічної



зрілості. Проте еритроцити, що збереглися, ймовірно, будуть модифіковані за реологічними характеристиками, оскільки ці клітини морфологічно представлені ехіноцитами та сфероехіноцитами (див. рис. 2, фото 8). Разом з тим у еритроцитах, що залишилися після заморожування в комбінованому середовищі з цукрозою і ДМСО, не виявлено вірогідних змін антиоксидантних показників (див. табл. 1, табл. 2). У зв'язку з цим слід зазначити, що

при «старінні» еритроцитів вміст глутатіону, а також активність ферментів глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази знижується, а концентрація МДА підвищується [19]. Це свідчить, що еритроцити з невисоким ступенем збереження після заморожування у середовищі з цукрозою і ДМСО (див. табл. 1, табл. 2) включають фракцію клітин, яка приблизно однорідна за фізіологічною зрілістю. Водночас не виявлено вірогідних від-

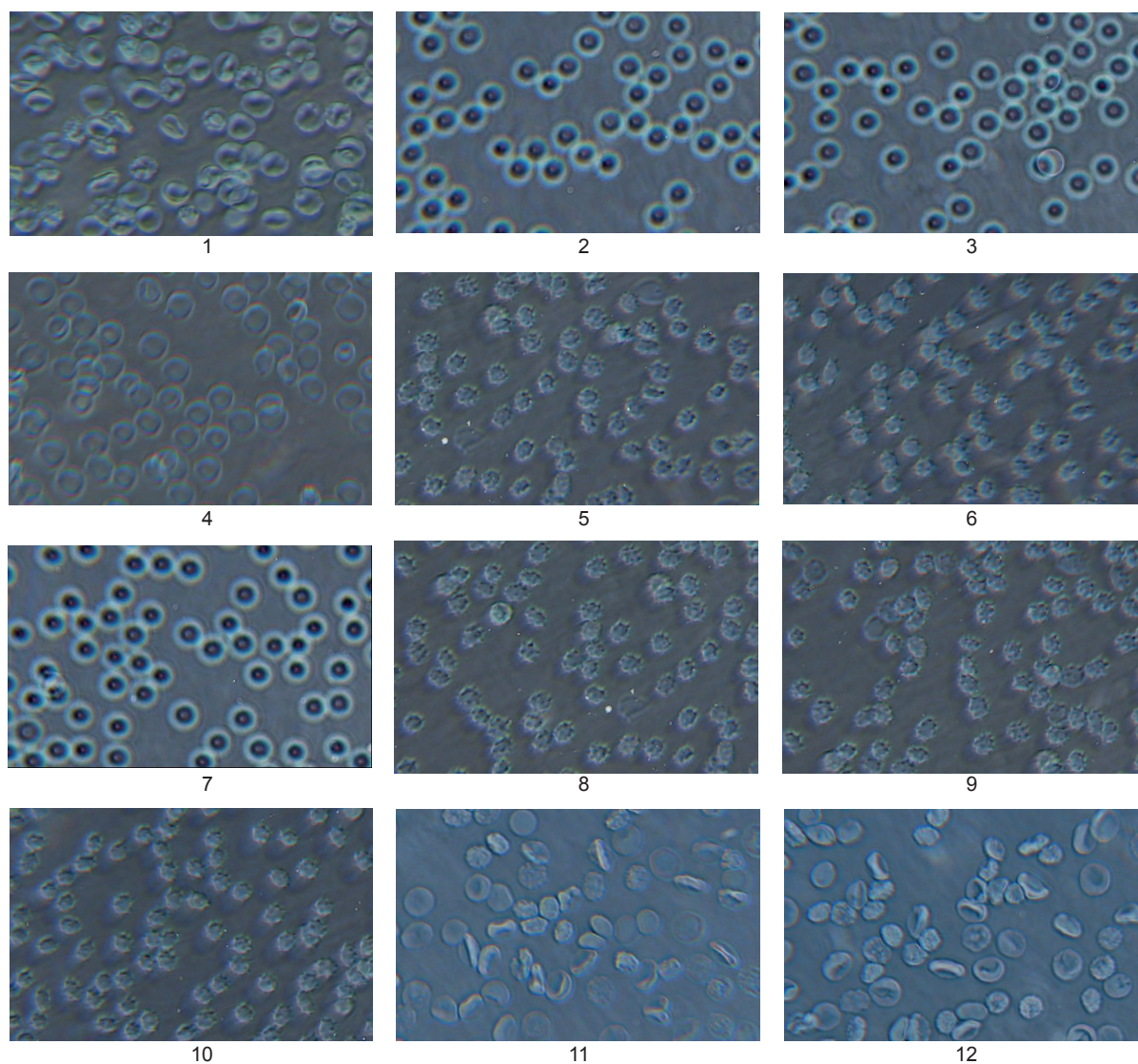


Рис. 2. Морфологія еритроцитів, які заморожували у цукрозному середовищі з декстраном та диметилсульфоксидом (ДМСО): 1,4 – інтактні клітини; 2,5 – цукроза; 3,6 – цукроза та декстран (10 %); 7,10 – цукроза та декстран (20 %); 8,11 – цукроза та ДМСО; 9,12 – цукроза, декстран (20 %) та ДМСО. 1,2,3,7,8,9 – без альбуміну; 4,5,6,10,11,12 – з альбуміном (1 %)

мінностей в антиоксидантних показниках між залишками еритроцитів з різним ступенем збереження (див. табл. 1, табл. 2). Ймовірно, це пов'язано з тим, що при «старінні» еритроцитів людини антиоксидантні показники змінюються несуттєво (приблизно 30 %) [19].

Таким чином, при заморожуванні еритроцитів у середовищі з цукрозою або з сумішшю цукрози та декстрану значно пошкоджуються клітини та змінюються осмотичні і морфологічні властивості частини еритроцитів, що залишилися після відмивання криоконсерванта. Водночас концентрація МДА й активність глутатіонзалежних ферментів не змінюється. Включення у криоконсервант ДМСО забезпечує ефективну криозахисну дію комбінованого складу, яка протидіє ушкоджувальним чинникам при заморожуванні–відігріванні і дає змогу отримати відмиті еритроцити із задовільними осмотичними, антиоксидантними і морфологічними показниками. Разом з тим залишок еритроцитів, при значному пошкодженні клітин, які були заморожені у середовищі з цукрозою та ДМСО, також має задовільні властивості і, можливо, включає популяцію еритроцитів середньої фізіологічної зрілості. Отримані результати вказують на те, що криоконсервант повинен включати комбінацію непроникного і проникного криопротекторів для збереження осмотичних і морфологічних властивостей заморожених еритроцитів, незалежно від ступеня їх пошкодження.

## ВИСНОВКИ

1. Заморожування еритроцитів у середовищі, що містить цукрозу або суміш цукрози та декстрану, призводить до втрати бар'єрної функції мембран для сульфату і глутатіону в частині клітин, що залишилися. При цьому еритроцити є осмотично нестабільними та морфологічно представлені сфероцитами.

2. Заморожування еритроцитів у середовищі, що містить суміш цукрози і ДМСО або цукрози, декстрану і ДМСО забезпечує

збереження бар'єрної функції мембран для сульфату і глутатіону в частині клітин, що залишилися. При цьому еритроцити представлені ехіноцитами, проте за наявності альбуміну основна їх частина трансформувалася у дискоцити (нормоцити).

**В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельская,  
В.А. Коптелов, В.А. Бондаренко**

## СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ С НЕВЫСОКОЙ СТЕПЕНЬЮ СОХРАННОСТИ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ В СРЕДЕ С НЕПРОНИКАЮЩИМ И ПРОНИКАЮЩИМ КРИОПРОТЕКТОРАМИ

Исследовали осмотические, антиоксидантные и морфологические характеристики эритроцитов, замороженных в жидком азоте (-196°C) в среде, содержащей сахарозу, декстран и диметилсульфоксид. При замораживании в среде, содержащей сахарозу или сахарозу и декстран нарушаются осмотические и морфологические характеристики в оставшейся части клеток после отмывания криоконсерванта. Не выявлено достоверного изменения концентрации малонового диальдегида и показателей активности глутатионзависимых ферментов (глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы). Включение в указанные среды диметилсульфоксида приводит к снижению степени повреждения эритроцитов при замораживании и сохранению осмотических, антиоксидантных и морфологических свойств оставшейся части клеток независимо от степени их сохранности после отмывания криоконсерванта. Полученные результаты указывают на то, что для сохранения свойств эритроцитов при замораживании криоконсервант должен включать комбинацию непроникающего и проникающего криопротекторов.

Ключевые слова: эритроциты, осмотические, антиоксидантные и морфологические свойства, замораживание, комбинированный криоконсервант.

**V.V. Ramazanov, E.L. Volovelskaya, V.A. Koptelov,  
V.A. Bondarenko**

## PROPERTIES OF ERYTHROCYTES WITH LOW DEGREE OF INTEGRITY AFTER FREEZING WITH NON-PENETRATING AND PENETRATING CRYOPROTECTANTS

Osmotic, antioxidant and morphological characteristics of erythrocytes frozen in liquid nitrogen (-196°C) in the medium containing sucrose, dextran and DMSO were studied. During freezing in the medium containing sucrose and sucrose and dextran there is noted the disorder in osmotic and morphological characteristics of the rest of cells after washing-out from



cryopreservative. We have not revealed a significant change in concentration of malondialdehyde and the indices of activity of glutathione-dependent enzymes (glutathione reductase and glutathione peroxidase). Inclusion of DMSO into the mentioned media results in the decreased degree of erythrocytes damage during freezing and preservation of osmotic, antioxidant and morphological indices of the rest of cells independent of the degree of their integrity after washing-out from cryopreservative. The obtained results indicate that in order to preserve the properties of erythrocytes during freezing the cryopreservative should include the combination of non-penetrating and penetrating cryoprotectants.

Key words: erythrocytes, osmotic, antioxidant and morphological properties, freezing, combined cryopreservative.

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

## REFERENCES

- Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M., et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 1997; 35(2): 173–86.
- Sputtek A., Singbartl G., Langer R., et al. Cryopreservation of erythrocytes using hydroxyethyl starch: in vivo results of an autologous retransfusion model in humans. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed*. 1994; 32: 44–7.
- Wagner C.T., Martowicz M.L., Livesey S.A., Connor J. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. *Cryobiology*. 2002; 45(2): 153–66.
- Ramazanov V.V., Dejneko T.I., Volovelskaya E.L., et al. Properties of erythrocytes frozen in combined medium with polyethylene glycol and dimethylsulfoxide. *Biotechnology*. 2012; 5(2): 106–14 [Ukrainian].
- Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues. Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*. 2009; 5(3): 119–26.
- Mazur P., Cole K.W. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology*. 1989; 26(1): 1–29.
- Pegg D.E. The effect of cell concentration on the recovery of human erythrocytes after freezing and thawing in the presence of glycerol. *Cryobiology*. 1981; 18(3): 221–8.
- Ramazanov V.V. Effect of combined media on damage of erythrocytes frozen with different hematocrit values. *Problems of Cryobiology*. 2006; 16 (2): 155–163 [Ukrainian].
- Romano L., Passow H. Characterization of anion transport system in trout red blood cell. *Am. J. Physiol*. 1984; 246(3): 330–8.
- Ramazanov V.V., Zabrodskiy R.F., Nayduk Ya.Yu., Bondarenko V.A. H<sup>+</sup> ion transport system functioning upon erythrocyte membrane modifications under conditions modeling freezing conditions. *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny*. 2010; Iss 3: 186–192 [Ukrainian].
- Wieth J.O., Bjerrum P.J., Borders C.L. Irreversible inactivation of red cell chloride exchange with phenylglyoxal, and arginine-specific reagent. *J Gen. Physiol*. 1982; 79(2): 283–312.
- Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. New York: Grune&Stratton; 1975. 160 p.
- Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. Lipid peroxidation and biological membranes. Moscow: Nauka; 1972. 270 p. [Russian].
- Razygraev A.V., Arutunyan A.V. Determination of glutathione peroxidase activity in human blood serum using hydrogen peroxide and 5,5'-dithiobis (nitrobenzoic acid). *Klin Lab Diagnostika*. 2006; (6): 13–6 [Russian].
- Yusupova L.B. On increasing the accuracy of determination of glutathione reductase activity in erythrocytes. *Lab Delo*. 1989; (4): 19–21 [Russian].
- Ashmarin I.P., Vasiliev I.P., Ambrosov V.A. Quick methods for statistical processing and experiment designing. Leningrad; 1975. 76 p. [Russian].
- Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Osmotic properties of erythrocytes frozen in media containing non-penetrating and penetrating cryoprotectants. *Problems of Cryobiology*. 2010; 20(1): 47–58 [Ukrainian].
- Bartosz G., Niewiarowska J., Judkiewicz L. Decreased deformability in aging erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1982; 693(1): 262–4.
- Imanishi H, Nakai T, Abe T, Takino T. Glutathione-linked enzyme activities in red cell aging. *Clin Chim Acta*. 1986; 159(1): 73–6.

*Матеріал надійшов  
до редакції 10.04.2013*

Н.В. Григорова

## Вплив адаптивних гормонів на секреторну активність інсулярного апарату та вміст цинку в ньому і клітинах гіпокампа, шишкоподібної і вилочкової залоз щурів з алоксановим діабетом

Запорізьк. нац. ун-т; E-mail: alex\_camelotzp@qip.ru

*У досліджах на щурах з алоксановим діабетом вивчали вплив адаптивних гормонів (інсуліну, адреналіну та преднізолону) на функціональний стан панкреатичних ostrivciv, який оцінювали за концентрацією глюкози в крові, інсуліну та цинку в клітинах В. Наявність у нейронах гіпокампа, пінеалоцитах і тимусних епітеліальних клітинах (ТЕК) цинку, що визначається цитохімічно, дала змогу провести порівняльні дослідження змін вмісту цього металу в гіпокампі, шишкоподібній, вилочкової та підшлунковій залозах. Для визначення вмісту цинку в клітинах використовували високоселективну цитохімічну реакцію з 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліном. Встановлено, що введення алоксану щурам викликає не тільки суттєве підвищення глікемії (у 2,5 рази), розвиток інсулінової недостатності в панкреатичних клітинах В (87%), але й дефіциту цинку в межах 48–59% у клітинах гіпокампа, епіфіза, тимуса та панкреатичних ostrivciv. Протилежні зміни в крові та клітинах спостерігалися після ін'єкції інсуліну, що можна пояснити пригніченням секреторних процесів. Уведення адреналіну та преднізолону також викликало достовірне зростання в панкреатичних ostrivciv вмісту цинку та інсуліну на 25–33%, цинку в гіпокампі (27–32%), шишкоподібній (27–35%) і вилочкової (25–33%) залозах, але на тлі практично вдвічі підвищеної концентрації глюкози в крові. У разі призначення адаптивних гормонів тваринам з діабетом був менше виражений дефіцит інсуліну (56–81%) в ostrivciv клітинах В, а також цинку в гіпокампальних нейронах (5–25%), пінеалоцитах (19–38%), ТЕК (32–42%) і В-інсулоцитах (24–41%). При цьому вміст глюкози в крові знижувався після введення інсуліну та підвищувався після ін'єкції гормонів надниркових залоз. Проведений кореляційний аналіз змін вмісту цинку в клітинах дослідних тварин виявив позитивний зв'язок між нейронами гіпокампа та клітинами шишкоподібної і вилочкової залоз, В-інсулоцитами, що свідчить на користь існування гіпокампо-епіфізарно-тимічної системи регуляції функції інсулярного апарату.*

*Ключові слова:* адаптивні гормони, гіпокамп, панкреатичні ostrivciv, тимус, епіфіз, цинк.

### ВСТУП

При цукровому діабеті, як відомо, вміст у крові алоксану, уреїду мезоксалевої кислоти, підвищений [1]. У зв'язку з цим викликають інтерес моделі діабету, що отримують введенням тваринам алоксану [1–4]. Вперше діабет за допомогою цього агента був змодельований понад 60 років тому [5]. Незважаючи на багаторічну історію й численні праці [1–4, 6], деякі аспекти патогенезу алоксано-

вого діабету залишаються не з'ясованими. Особливо актуальними є питання про роль порушень обміну цинку в механізмі розвитку інсулінової недостатності, а також розробка шляхів корекції цих патологічних змін. Відомо, що два іони цинку здатні зв'язувати шість молекул інсуліну [6–8]. Висунуто припущення, що цинк у В-клітинах перебуває у вигляді комплексу з гормоном інсуліном, відіграючи роль його „депо-форми”. Під впливом глю-

кози, специфічного стимулятора секреції інсуліну, цей комплекс розщеплюється й легко залишає клітини В. Так відбувається секреція гормону інсуліну в кров [9]. Його накопичення спостерігали при електричному подразненні гіпокампа, введенні гормонів вилочкової залози та епіфіза [10–13].

У зв'язку з викладеним вище, ми сформулювали ідею про гіпокампо-епіфізарно-тимічну систему регуляції функції інсулярного апарату. Для її обґрунтування були проведені порівняльні дослідження змін вмісту цинку в нейронах гіпокампа, клітинах шишкоподібної, вилочкової і підшлункової залоз шурів з алоксановим діабетом при введенні адаптивних гормонів (інсуліну, адреналіну та преднізолону). Попередньо на прикладі В-інсулоцитів було показано, що вміст цинку в цих клітинах може бути показником їх функціонального стану [9]. Секреторну активність острівцевих клітин В оцінювали за вмістом інсуліну в них та глюкози в крові.

Мета нашої роботи – вивчити вплив адаптивних гормонів на секреторну активність інсулярного апарату та вміст цинку в ньому і клітинах гіпокампа, шишкоподібної і вилочкової залоз шурів з алоксановим діабетом.

## МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 90 статевозрілих шурах віком 5–6 міс, масою 230–250 г. Для моделювання діабету тваринам робили підшкірно ін'єкції алоксану в дозі 400 мг/кг у вигляді 5%-го водного розчину. Підшкірно вводили інсулін у дозі 20 ОД/кг, адреналіну гідрохлорид – 0,05 мг/кг у вигляді 0,01%-го розчину, а преднізолон – внутрішньом'язово в дозі 5–10 мг/кг у вигляді 1%-го розчину. В окремій серії експериментів тваринам з алоксановим діабетом призначали адаптивні гормони (інсулін, адреналін і преднізолон). Першу ін'єкцію гормонів робили через добу після введення алоксану, наступні – щоденно впродовж 4 діб.

У дослідних шурів через 2 год після ін'єкції інсуліну, адреналіну, преднізолону,

5 діб – алоксану, 5 діб та ще 2 год пізніше – алоксану та адаптивних гормонів прижиттєво брали кров з хвоста для визначення вмісту глюкози модифікованим методом Хаггедорна-Йенсена, а після декапітації вилучали шматочки гіпокампа, шишкоподібної, вилочкової і підшлункової залоз. При цьому дотримувалися вимоги статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції (Страсбург, 1986).

Для цитохімічного визначення вмісту інсуліну в панкреатичних клітинах В шматочки підшлункової залози фіксували в рідині Буена протягом 24 год. Потім їх проводили через спирти зростаючої міцності (70, 80, 90, 96, 100° – по 4 год у кожному), два ксилоли (по 15 хв у кожному), суміш 50%-го ксилолу та 50%-го парафіну (по 30 хв при 40 °С), два рідкі парафіни (по 1,5 год у кожному при 56 °С) і заливали в парафін. Зрізи депарафінували за допомогою послідовного витримання в двох ксилолах (по 3 хв у кожному), спиртах (100, 96, 90, 80, 70° – по 3 хв у кожному), дистильованій воді (5 хв).

Для парафінових зрізів (товщина 5 мкм) проводили процедури окиснення – відновлення, після чого їх промивали дистильованою водою 5 хв і фарбували протягом 6 хв 0,25%-м спиртовим розчином альдегідфуксину. На препаратах у цитоплазмі В-клітин острівців виявлялася синьо-фіолетова зернистість. Її кількість була показником вмісту в клітинах інсуліну.

Інтенсивність цитохімічної реакції альдегідфуксину оцінювали за трибальною системою, запропонованою Соколовським [14], а також Хейхоу і Квагліно [15].

Для визначення вмісту цинку в клітинах використовували високоселективну цитохімічну реакцію з 8 – (п-толуолсульфоніламіно) – хіноліном (8-ТСХ). Шматочки гіпокампа, епіфіза, тимуса, підшлункової залози фіксували в 70°-му холодному (4 °С) спирті, насиченому сірководнем. А потім їх доводили до парафіну, як описано вище, та заливали в нього.

Парафінові зрізи товщиною 5 мкм обробляли протягом 3 хв послідовно в двох ксилолах і спиртах, 5 хв – 0,1%-м спиртовим розчином 8-ТСХ, промивали протягом 1 хв у гарячому (70 °С) 0,1Н розчині гідроксиду натрію, підсушували на повітрі, замикали в гліцерин і розглядали під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1, ЖС-18). На препаратах жовто-зелена люмінесценція виявлялась у клітинах зубчастої фасції, полях СА4-СА2 амонового рогу гіпокампа, клітинах епіфіза, тимусних епітеліальних клітинах (ТЕК), В-інсулоцитах.

Вивчення флуоресценції проводили на 50–100 клітинах за допомогою мікрофлюориметра. Програму Statistica 6.0 використовували для математичної обробки результатів. Застосовували критерій Колмогорова-Смірнова, що дало змогу визначити нормальний їх розподіл. Результати порівнювали за критерієм t Стьюдента. Обчислювали коефіцієнт кореляції Пірсона (r) для оцінки ступеня зв'язку між змінами досліджених показників.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У табл. 1 наведено результати досліджень стану панкреатичних острівців у щурів, які отримали ін'єкції алоксану, інсуліну, адреналіну та преднізолону. Слід відмітити, що вміст глюкози в крові тварин знижувався на 47 % після ін'єкції інсуліну, навпаки, збільшувався на 96–109 % після введення адреналіну та преднізолону, в 2,5 раза ( $P < 0,001$ ) – алоксану. У порівнянні з щурами контрольної групи глікемія достовірно зростала на 61 % у тварин з діабетом, яким робили ін'єкцію інсуліну, 154–179 % – гормони надниркових залоз, 75–77 % – інсулін з катехоламіном або глюкокортикоїдом. Відносно щурів з діабетом вміст глюкози в крові достовірно був вищим на 11 % після ін'єкції адреналіну, але нижче на 69 % у разі призначення інсуліну, 29–30 % – інсуліну та гормонів надниркових залоз. Отримані результати підтверджуються даними літератури, в яких показано, що через

24–48 год після введення алоксану розвивається вторинна гіперглікемія, що переходить у перманентний діабет [5]. Розвиток вторинної гіперглікемії та діабету зумовлений різким скороченням інсуліногенних резервів у підшлунковій залозі [1, 2]. Попередні наші дослідження також засвідчують гіперглікемізуючий ефект від уведення алоксану, адреналіну та преднізолону [9]. Призначення інсуліну тваринам при діабеті сприяє нормалізації високого вмісту глюкози в крові [1, 2, 6]. Це узгоджується з нашими результатами, які вказують і на те, що ін'єкції адреналіну та преднізолону тваринам з алоксановим діабетом призводять до розвитку більш вираженої гіперглікемії, а в поєднанні з інсуліном викликають, навпаки, менш виражені зміни цього показника.

У В-клітинах панкреатичних острівців щурів вміст цинку та інсуліну достовірно підвищувався на 18–35 і 25–31 % під впливом адаптивних гормонів, а знижувався на 59 і 87 % відповідно після дії діабетогенного агента. Порівняно з контролем ці показники були достовірно нижчими в тварин з алоксановим діабетом, яким вводили адреналін і преднізолон, на 41 і 69–81 %, гормони надниркових залоз у поєднанні з інсуліном – на 24 і 56–62 % відповідно. У порівнянні зі щурами з діабетом значення були достовірно вищими на 43 і 50–150 %, 86 % і 3–3,5 раза.

Морфологічні зміни в підшлунковій залозі тварин з алоксановим діабетом, які спостерігалися нами під час дослідження, описані також у літературі [1]. Вони характеризуються некрозом В-клітин острівців, що призводить до різкого скорочення інсуліногенних резервів підшлункової залози, зниження функціонального індексу. В уцілених від первинного пошкодження клітинах В виявляється дегрануляція цитоплазми та її гідропічна дегенерація. Відзначається також гіпертрофія та гіперплазія клітин А. При алоксановому діабеті знижений вміст інсуліну та цинку в підшлунковій залозі [2, 9, 16, 17]. Згідно з цинковою теорією діабете-

тогенної дії алоксану, ця речовина вибірково накопичується в В-інсулоцитах внаслідок її взаємодії з цинком і викликає пошкодження інсулінпродукуючих клітин [1, 2].

Результати проведення цих і попередніх наших досліджень вказують на накопичення цинку та інсуліну в острівцевих В-клітинах тварин після ін'єкції адреналіну або преднізолону [16–18]. При цьому суттєвих морфологічних змін у структурі панкреатичних острівців не виявлено. Аналіз результатів табл. 1 засвідчує наявність корегуючого впливу адаптивних гормонів на цинкову та інсулінову недостатність у панкреатичних клітинах В щурів з діабетом.

Таким чином, у щурів після ін'єкції діабетогенного агента алоксану розвивалися

гіперглікемія, дефіцит цинку та інсуліну в панкреатичних клітинах В. Протилежні зміни досліджених показників встановлені у тварин при дії інсуліну. Призначення гормонів надниркових залоз викликало у тварин збільшення вмісту глюкози в крові, а також металу та гормону в В-інсулоцитах. У разі введення адаптивних гормонів щурам з алоксановим діабетом спостерігалася часткова корекція цинкової та інсулінової недостатності в острівцевих В-клітинах. Підвищення вмісту цинку та інсуліну в клітинах В можна пояснити пригніченням їх секреторної активності, в результаті чого цей метал накопичується в них у комплексі з інсуліном (“депо-форма” гормону). Однак повного відновлення в пошкоджених алоксаном клітинах не вста-

**Таблиця 1.** Глікемія, вміст цинку та інсуліну в В-інсулоцитах ( $M \pm m$ ) та їх взаємозв'язок ( $r$ ) у щурів при введенні алоксану, інсуліну, адреналіну, преднізолону

Група тварин	Глюкоза в крові, ммоль/л	Цинк, мкг/мл	Інсулін, ум.од.	$r_1$
Контроль (n=16)	5,7±0,18	17±0,9	1,6±0,12	0,43*
Алоксан (n=14)	14,3±0,51***	7±0,6***	0,2±0,04***	0,78**
Інсулін (n=10)	3,0±0,16***	20±1,0*	2,0±0,14*	0,51*
Адреналін (n=10)	11,8±0,41***	23±2,7**	2,1±0,13**	0,47*
Преднізолон (n=10)	11,2±0,43***	20±0,9*	2,0±0,12*	0,42*
Алоксан і інсулін (n=10)	9,2±0,24***,###	13±0,7***,###	0,5±0,04***,###	0,74**
Алоксан і адреналін (n=10)	15,9±0,52***,#	10±0,7***,##	0,3±0,01***,#	0,78**
Алоксан і преднізолон (n=10)	14,5±0,49***	10±0,9***,#	0,4±0,03***,###	0,77**
Алоксан, інсулін і адреналін (n=10)	10,1±0,22***,###	13±0,9**,*###	0,6±0,05***,###	0,75**
Алоксан, інсулін і преднізолон (n=10)	10,0±0,25***,###	13±0,7**,*###	0,7±0,04***,###	0,76**

Примітка. Тут і в табл.2. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  порівняно з контролем; # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,01$ ; ### $P < 0,001$  порівняно з щурами, яким вводили алоксан;  $r_1$  – коефіцієнт кореляції змін вмісту цинку та інсуліну в В-інсулоцитах;  $r_2$  – коефіцієнт кореляції змін вмісту цинку в нейронах гіпокампа та пінеалоцитах;  $r_3$  – коефіцієнт кореляції змін вмісту цинку в нейронах гіпокампа та ТЕК;  $r_4$  – коефіцієнт кореляції змін вмісту цинку в нейронах гіпокампа та В-інсулоцитах.



новлено. Клітини, що сильно пошкоджені, практично не відновлюються. Значне накопичення інсуліну та цинку було можливим лише в слабо альтерованих клітинах. Встановлена позитивна кореляція змін вмісту в інсулін-продуруючих клітинах В металу та гормону вказує на зв'язок цих компонентів.

Про вплив адаптивних гормонів на вміст цинку в гіпокампі, епіфізі, тимусі та панкреатичних острівцях у щурів з алоксановим діабетом можна робити висновки на підставі результатів табл. 2. Ін'єкція алоксану призвела до зниження вмісту цинку в клітинах досліджених органів на 48–59 % ( $P < 0,001$ ). Призначення адреналіну, преднізолону та

інсуліну викликало достовірне підвищення вмісту цинку на 18–35 %. Порівняно з контролем в нейронах гіпокампа тварин з діабетом цей показник був нижчим на 16 % ( $P > 0,05$ ) після введення інсуліну, 21 і 25 % ( $P < 0,05$ ) – катехоламіну та глюкокортикоїда. У клітинах шишкоподібної, вилочкової і підшлункової залоз вміст цинку був достовірно нижчим на 27–42 %. Відносно щурів, яким вводили алоксан, значення були вищими на 35–86 % ( $P < 0,001$ ). У разі комплексного введення гормонів надниркових залоз з інсуліном в порівнянні з тваринами контрольної групи вміст цинку суттєво не змінювався в гіпокампі, достовірно був нижче на 19–32 % у тимусі, епі-

**Таблиця 2. Вміст цинку ( $M \pm m$ ) у нейронах гіпокампа, пінеалоцитах, тимусних епітеліальних клітинах (ТЕК) і В-інсулоцитах та їх взаємозв'язок ( $r$ ) у щурів при введенні алоксану, інсуліну, адреналіну, преднізолону**

Група тварин	Вміст цинку, мкг/мл				$r_2$	$r_4$
	Нейрони гіпокампа	Пінеалоцити	ТЕК	В-інсулоцити	$r_3$	
Контроль (n=16)	63±5,3	37±2,7	40±3,0	17±0,9	$\frac{0,54^*}{0,55^*}$	0,44*
Алоксан (n=14)	33±2,7***	17±0,9***	17±1,3***	7±0,7***	$\frac{0,58^*}{0,59^*}$	0,40*
Інсулін (n=10)	83±4,7**	47±3,3*	50±3,7*	20±1,0*	$\frac{0,51^*}{0,52^*}$	0,41*
Адреналін (n=10)	80±5,3*	50±4,0***	53±4,0**	23±2,7**	$\frac{0,51^*}{0,55^*}$	0,48*
Преднізолон (n=10)	83±6,0*	47±3,7*	50±3,3*	20±0,9*	$\frac{0,50^*}{0,51^*}$	0,46*
Алоксан і інсулін (n=10)	53±4,3###	23±1,7**, ##	27±2,3**, ##	13±0,7**, ###	$\frac{0,52^*}{0,53^*}$	0,45*
Алоксан і адреналін (n=10)	50±2,7*, ###	27±2,3**, ###	23±1,3***, ##	10±0,7***, ##	$\frac{0,54^*}{0,52^*}$	0,36*
Алоксан і преднізолон (n=10)	47±3,7*, ###	27±2,0**, ###	23±1,7***, ##	10±0,9***, #	$\frac{0,56^*}{0,55^*}$	0,36*
Алоксан, інсулін і адреналін (n=10)	60±5,0###	30±1,7*, ###	27±2,0**, ###	13±1,0**, ###	$\frac{0,50^*}{0,49^*}$	0,40*
Алоксан, інсулін і преднізолон (n=10)	57±4,3###	30±2,0*, ###	27±1,7***, ###	13±0,7**, ###	$\frac{0,51^*}{0,47^*}$	0,41*

фізі та панкреатичних острівцях, а порівняно зі щурами з діабетом – вище на 59–86 % ( $P < 0,001$ ).

Результати попередніх визначень нами вмісту цинку в нейронах гіпокампа та панкреатичних клітинах В при введенні адреналіну, преднізолону та алоксану, а також проведений на їх підставі кореляційний аналіз змін вмісту металу в цих клітинах підтверджують дані опублікованої праці Seto et al. про регулюючий вплив гіпокампа на стан інсулярного апарату [13, 16]. Відомості літературних джерел також засвідчують наявність функціонального зв'язку гіпокампа з епіфізом, панкреатичних острівців з вилочковою та шишкоподібною залозами, а останніх між собою [10–13]. Розробка цитохімічної реакції з 8-ТСХ на цинк у пінеалоцитах і ТЕК забезпечила проведення порівняльних досліджень у клітинах гіпокампа, епіфіза, тимуса та підшлункової залози, а встановлені позитивні коефіцієнти кореляції змін вмісту цього металу в клітинах дослідних щурів вказують на можливість регуляції функції інсулярного апарату за допомогою гіпокампо-епіфізарно-тимічної системи.

Отже, адаптивні гормони (адреналін, преднізолон та інсулін) викликали часткову корекцію дефіциту цинку в нейронах гіпокампа, пінеалоцитах, ТЕК і панкреатичних клітинах В у щурів, які отримали алоксан. У всіх випадках спостерігалась позитивна кореляція змін вмісту цинку в досліджених клітинах, що вказує на наявність між ними функціонального зв'язку.

## ВИСНОВКИ

1. Введення щурам діабетогенного агента алоксану призводило до розвитку гіперглікемії, інсулінової недостатності в панкреатичних острівцях, дефіциту цинку в нейронах гіпокампа, пінеалоцитах, ТЕК і В-інсулоцитах.

2. Після ін'єкції інсуліну встановлено зниження вмісту глюкози в крові, накопичення інсуліну та цинку в острівцевих В-клітинах,

цинку в клітинах гіпокампа, епіфіза та тимуса тварин. У щурів, яким вводили адреналін і преднізолон, при порівнянні з тваринами, що отримували інсулін, зміни в крові мали протилежний, а в клітинах – однотипний характер.

3. Призначення адаптивних гормонів щурам з алоксановим діабетом частково корегувало інсулінову недостатність в панкреатичних острівцях, дефіцит цинку в нейронах гіпокампа, клітинах шишкоподібної, вилочкової і підшлункової залоз на фоні суттєвого зниження гіперглікемії під впливом інсуліну та, навпаки, підвищення при дії адреналіну та преднізолону.

4. Отримані результати підкріплюють ідею про наявність гіпокампо-епіфізарно-тимічної системи регуляції функції інсулярного апарату.

**Н.В. Григорова**

### **ВЛИЯНИЕ АДАПТИВНЫХ ГОРМОНОВ НА СЕКРЕТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ ИНСУЛЯРНОГО АППАРАТА И СОДЕРЖАНИЕ ЦИНКА В НЕМ И КЛЕТКАХ ГИПОКАМПА, ШИШКОВИДНОЙ И ВИЛОЧКОВОЙ ЖЕЛЕЗ КРЫС С АЛЛОКСАНОВИМ ДИАБЕТОМ**

В опытах на крысах с аллоксановым диабетом изучали влияние адаптивных гормонов (инсулина, адреналина и преднизолон) на функциональное состояние панкреатических островков, которое оценивалось по концентрации глюкозы в крови, инсулина и цинка в клетках В. Наличие цитохимически определяемого цинка в нейронах гиппокампа, пинеалоцитах и тимусных эпителиальных клетках (ТЭК) позволило провести сравнительные исследования изменений содержания этого металла в гиппокампе, шишковидной, вилочковой и поджелудочной железах. Для определения содержания цинка в клетках использовали высокоселективную цитохимическую реакцию с 8-(п-толуолсульфониламино)-хинолином. Установлено, что введение аллоксана крысам вызывает не только существенное повышение гликемии (в 2,5 раза), развитие инсулиновой недостаточности в панкреатических клетках В (87 %), но и дефицит цинка в пределах 48–59 % в клетках гиппокампа, эпифиза, тимуса и панкреатических островков. Противоположные изменения в крови и клетках отмечались после инъекции инсулина, что можно объяснить угнетением секреторных процессов. Введение адреналина и преднизолон также вызывало достоверное

повышение в панкреатических островках содержания цинка и инсулина на 18–35 %, цинка в гиппокампе (27–32 %), шишковидной (18–35 %) и вилочковой (25–33 %) железах, но на фоне практически в 2 раза повышенной концентрации глюкозы в крови. В случае назначения адаптивных гормонов животным с диабетом был менее выраженный дефицит инсулина (56–81 %) в островковых клетках В, а также дефицит цинка в гиппокампальных нейронах (5–25 %), пинеалоцитах (19–38 %), ТЭК (32–42 %) и В-инсулоцитах (24–41 %). При этом концентрация глюкозы в крови снижалась после введения инсулина и повышалась после инъекций гормонов надпочечников. Проведенный корреляционный анализ изменений содержания цинка в исследуемых клетках подопытных животных выявил положительную связь между нейронами гиппокампа и клетками шишковидной и вилочковой желез, В-инсулоцитами, что свидетельствует в пользу существования гиппокампо-эпифизарно-тимической системы регуляции функции инсулярного аппарата.

Ключевые слова: адаптивные гормоны, гиппокамп, панкреатические островки, тимус, эпифиз, цинк.

**N.V. Grigorova**

#### **THE EFFECT OF ADAPTIVE HORMONES ON THE SECRETORY ACTIVITY OF INSULAR APPARATUS AND THE ZINC CONTENT IN IT AND IN THE CELLS OF HIPPOCAMPUS, PINEAL AND THYMUS GLANDS IN RATS WITH ALLOXAN-INDUCED DIABETES**

The influence of adaptive hormones (insulin, adrenaline and prednisolone) on the pancreatic islets functional state was studied in experiments on rats with alloxan-induced diabetes. It was estimated by the concentration of glucose in the blood, insulin and zinc in B-cells. The presence of cytochemically determined zinc in the hippocampus neurons, pinealocytes and thymic epithelial cells (TEC) has allowed a comparative research of changes of this metal content in the hippocampus, pineal, thymus and pancreas glands. For determination of zinc content in the cells, a highly selective cytochemical reaction of 8-(p-toluenesulfonylamino)-quinoline was used. It has been found that alloxan not only caused the increase of glycemia, insulin deficiency in the pancreatic B cells (87%) but also a development the zinc deficit (48-59% ) in hippocampus, epiphysis, thymus and pancreatic islets. The opposite changes in blood and cells were observed after insulin injection. It can be explained by inhibition of secretory processes. Adrenaline and prednisolone introduction also induced an increase in zinc content in pancreatic islets, hippocampus (27-32%), epiphysis (27-35%), thymus (25-33%), accompanied by a doubled glucose concentration in blood. The insulin deficit in B-cell (56-81%) as well as a zinc deficit in the hippocampal neurons (5-25%), pinealocytes (19-38%), TEC (32-42%) and B-insulocytes (24-41%) were less marked in case of the

adaptive hormones prescription to the animals with diabetes. The correlation analysis of changes in zinc content showed a link between the hippocampus neurons, the cells of pineal and the thymus glands, B-insulocytes, suggesting the existence of hippocampal-epiphyseal-thymic system of regulation of insular apparatus function.

Key words: alloxan, epiphysis, hippocampus, pancreatic islets, thymus, zinc.

*Zaporizhzhya National University*

#### **REFERENCES**

1. Baranov VG, Sokoloverova IM, Gasparyan EG, Yaroshevskiy YA, Nikitin AI. Experimental diabetes. Role in clinical diabetology. Leningrad: Nauka; 1983 [Russian].
2. Goldberg ED, Eshchenko VA, Bovt VD. Diabetes. Etiological factors. Tomsk: Publishing of Tomsk University; 1993 [Russian].
3. Herrath M, Nepom GT. Animal models of human type 1 diabetes. *Nat Immunol.* 2009; 10: 129-32.
4. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2005; 4: 359-70.
5. Dunn G, McLetchi N, Sheehan H. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet.* 1943; 244 (6242): 486-7.
6. Balabolkin MI. *Diabetology.* Moscow: Medicina; 2000 [Russian].
7. Chausmer AB. Zinc, insulin and diabetes. *J Am Coll Nutr.* 1998; 17 (2): 109-15.
8. Rosenfeld L. Insulin discovery and controversy. *Clin Chem.* 2002; 48 (12): 2270-88.
9. Beregova TV, Grigorova NV, Eshchenko JV, Bovt VD, Eshchenko VA. Zinc and insulin content determination in islet cells with different functional state of insular apparatus. *Fiziol Zh.* 2007; 53(4): 100-4 [Ukrainian].
10. Palcev MA, Kvetnoy IM. *Guide of neuroimmunoendocrinology.* Moscow: Triada M; 2006 [Russian].
11. Geenen V, Brilot F, Louis C, Hansenne I, Renard Ch, Martens H. Importance of thymus dysfunction in the pathophysiology of type I diabetes. *Rev Med Liege.* 2005; 60(5-6): 291-6.
12. Javuz O, Cam M, Bukan M. Protective effect of melatonin on beta-cell damage in streptozotocin – induced diabetes in rats. *Acta Histochem.* 2003; 105(3): 261-6.
13. Seto K, Otsuka H, Kawakami M. Influence of electrical stimulation of the limbic structure on insulin level in rabbits plasma. *Exp Clin Endocrinol.* 1983; 81(3): 347-9.
14. Sokolovskiy VV. *Histochemical investigations in toxicology.* Leningrad: Medicina; 1971 [Russian].
15. Hayhoe F, Quaglino D. *Haematological cytochemistry.* Moscow: Medicina; 1983 [Russian].
16. Beregova TV, Grigorova NV, Eshchenko YV, Bovt VD, Eshchenko VA. Functional connection between hippocampus and pancreas insular apparatus. *Report NAU.* 2008; 8: 149-52 [Ukrainian].
17. Grigorova NV, Eshchenko VA Role of zinc in neuro-

- 
- humoral mechanisms of the insular apparatus function regulation. Exp and Clin Physiol and Biochem. 2013; 61(1): 79-84 [Ukrainian].
18. Grigorova NV, Eshchenko VA, Kuzmina MA. Regulation mechanisms of chelated metals content in the cells. Exp and Clin Physiol and Biochem. 2013; 64(4): 7-12 [Ukrainian].

*Матеріал надійшов до  
редакції 22.11.2013*

О.О. Кравченко, І.В. Якубцова, Т.Д. Хілько, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко, В.Ф.Чехун

## Вплив комплексу природних речовин насіння фенугреку на формування аберантних крипт у слизовій оболонці за умов експериментального канцерогенезу товстої кишки у щурів

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка; E-mail: irinamaster@gmail.com

*Аберантні крипти Foci (АКФ) вважаються передраковими ушкодженнями і біомаркерами у скринінгу потенціальних хемопротективних речовин. Терапія колоректального раку викликає токсичні побічні ефекти. Природні біологічно активні речовини все частіше використовуються для протидії неопластичним процесам. Досліджено вплив насіння фенугреку (*Trigonella foenum graecum* L.) на стан слизової оболонки товстої кишки у щурів на моделі експериментального канцерогенезу. Показано можливий гепатопротекторний вплив і зменшення поодиноких АКФ на 40 %, мультикрипт на – 31 % у слизовій оболонці товстої кишки тварин, які отримували дрібнодисперсний порошок разом зі стандартним кормом.*

*Ключові слова: аберантні крипти Foci, слизова оболонка товстої кишки, насіння фенугреку (*Trigonella foenum graecum* L.).*

### ВСТУП

Канцерогенез товстої кишки – це багатоетапний процес, що призводить до послідовних змін клітин колончатого епітелію мета-, пренео-, неопластичними перетвореннями [1]. Аберантні крипти Foci (АКФ) утворюються у кишечнику та можуть стати індикатором виникнення колоректального раку як у людини, так і у тварин. Нині АКФ як пренеопластичні ушкодження колончатого епітелію відіграють роль доступних і надійних біомаркерів у скринінгу потенціальних хемопротективних речовин [2]. У щурів багаторазове введення 1,2 диметилгідразину викликає формування АКФ в основному у дистальній частині кишечника, і з часом вони можуть перетворюватись у злоякісну пухлину [3]. Таким чином їх можна застосовувати для оцінки ефективності засобів, які можуть впливати

© О.О. Кравченко, І.В. Якубцова, Т.Д. Хілько, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко, В.Ф.Чехун

чи блокувати появу колоректального раку у гризунів. Для протидії неопластичним процесам часто використовують природні біологічно активні речовини, які здатні стимулювати внутрішні резерви організму, тому все більшого значення набуває пошук нових протипухлинних агентів рослинного походження.

Цілющі властивості багатьох рослин відомі давно, але їх біологічно активні речовини, що зумовлюють лікувальний ефект, вивчені ще недостатньо глибоко. Актуальним є застосування препаратів рослинного походження при патологіях шлунково-кишкового тракту, які відрізняються впливом на різні системи організму. Фенугрек і його насіння (*Trigonella foenum graecum* L.) містять велику кількість таких біологічно активних речовин, як стероїдні флавоноїди (апигенін, лютеолін, кверцетин, вітексин), алкалоїди (тригонелін, холін,



гентіанін, карпаїн), сапогеніни (діосгенін, протодіосин, ямогенін, гітогенін, тітогенін), ефірні олії, галактоманани, амінокислоти, ліпіди, ненасичені жирні кислоти, полісахариди, стероїдні сапогеніни, алкалоїди, вітаміни, мікроелементи [4–6]. Тому їм притаманні протимікробні, протизапальні, анаболічні і антикоагулянтні якості.

У сучасній літературі є дані щодо протипухлинних властивостей активних компонентів фенугреку відносно різних типів злоякісних пухлин на пухлинних моделях *in vitro*. Вплив екстракту насіння фенугреку оцінювали на моделі карциноми Ерліха на мишах лінії BALB/c, де він гальмував на 70 % ріст клітин пухлини [7]. Hibasami та співавт. [8], передбачають, що пригнічення інгібування клітин HL-60 лейкемії людини зростає за рахунок протодіосину, ізольованого з насіння фенугреку, що призводить до індукції апоптозу. Діосгенін, стероїдний сапогенін з насіння фенугреку, є попередником таких стероїдних гормонів, як прогестерон, та антизапальних стероїдів, таких, як кортизон [9]. Moalic та співавт. [10] показали, що діосгенін інгібує клітинну проліферацію при остеосаркомі клітини лінії 1547 індукцією апоптозу і зупинкою у G<sub>1</sub>-фазі клітинного циклу. Базуючись на вищевикладеному, зрозуміло, що діосгеніну і іншим складовим насіння фенугреку властиві антиканцерогенні можливості, що дає змогу передбачати їх потенціальну роль у запобіганні розвитку колоректального канцерогенезу.

Таким чином, оскільки більшість досліджень було проведено *in vitro* на різних пухлинних клітинних лініях [8, 10], актуальним є вивчення впливу насіння фенугреку на різні моделі канцерогенезу *in vivo*.

Метою нашої роботи було дослідити вплив насіння фенугреку на стан слизової оболонки товстої кишки на створеній моделі канцерогенезу в тварин у динаміці розвитку неопластичних змін.

## МЕТОДИКА

Експерименти проводили на нелінійних білих щурах-самцях з початковою масою 160–180 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Розвиток експериментального канцерогенезу товстої кишки у тварин індукували повною заміною питної води на 1,5%-й розчин декстрансульфату натрієвої солі з подальшими щотижневими ін'єкціями специфічного проканцерогена – 1,2 диметилгідразину у дозі 20 мг/кг, розчиненого у фізіологічному розчині, протягом 2,5 міс [3].

Під легким ефірним наркозом вводили 0,25 мл фізіологічного розчину у кишковий простір, використовуючи катетер (з зовнішнім діаметром 0,3 мм), що розміщувався приблизно в 7 см проксимально до ануса. Перед першим введенням 1,2 диметилгідразину вдувається 0,5 мл повітря. Тварин декапітували на 2, 4, 6, 8-й і 10-й тиждень дії канцерогена, згідно з «Правилами роботи з лабораторними тваринами». Розвиток патологій діагностували за специфічними симптомами та гістологічно за ураженнями слизової оболонки товстої кишки. Метод, що використовувався для візуалізації АКФ, полягає у фарбуванні зафіксованої, нерізанної слизової оболонки метиленовим синім з наступною діафаноскопією внутрішньопорожнинної поверхні при збільшенні у 40 разів. Загальну кількість аберантних крипт визначали у 2-сантиметрових висічках слизової. Пренеопластичні ушкодження товстої кишки чи АКФ були обрані як кінцеві точки дослідження.

Щурів поділяли на 4 групи: 1-ша – інтактні тварини, 2-га – тварини, у яких моделювали експериментальний канцерогенез товстої кишки, 3-тя і 4-та – тварини з канцерогенезом, які щоденно отримували дрібнодисперсний порошок насіння фенугреку у дозі 250 мг/кг маси разом з стандартним кормом протягом 6 і 8 тиж відповідно. Порошок з насіння фенугреку був наданий професором Ш. Макаєм (Університет Західної Угорщини, Інститут

рослинництва, відділення медичних та ароматичних рослин).

За допомогою методів варіаційної статистики обробляли результати з використанням стандартного пакету комп'ютерних програм Excel, OriginLab 8.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що у дослідних тварин через 7 днів канцерогенного впливу слизова оболонка товстої кишки була набрякла, гіперемована, інфільтрована нейтрофілами, епітеліальні клітини збільшені у розмірах, видимі і мали збільшені перекриптичні зони. Для більш пізніх термінів (8–10 тиж) характерним було формування ущільнення та пухлиноподібні утворення у цьому органі. Слизова оболонка товстої кишки щурів інтактної групи відповідала нормі – представлена одношаровим призматичним епітелієм, в якому чітко розрізнялися стовбчасті епітеліоцити, ендокриноцити та келихоподібні клітини.

Через 2 тиж після ін'єкцій 1,2 диметилгідразину у слизовій оболонці товстої кишки спостерігали поодинокі АКФ, які оточені нормальними криптами. Чітко прослідковується збільшення розмірів і щільності поверхневого вистилаючого епітелію аберантних крипт. Через 6–8 тиж відмічали збільшення розміру АКФ, вони мали різну кількість малих і великих крипт. Ушкодження крипт відрізнялися збільшеним розміром, потовщеним поверхневим епітелієм та ширшою перекрипталною зоною (див. рис.1,б). А через 9–10 тиж чітко видно дисплазію, а також клітини, що активно діляться, утворюючи мікроаденоми у вигляді поодиноких чи груп поліпів, що вважається початком кишкового канцерогенезу. Скупчення крипт, що відкриті у просвіт товстої кишки за розміром займають площу в 3–4 більше, ніж нормальні крипти (див. рис. 1,в).

Результати наших досліджень показали, що у тварин з експериментальним канцерогенезом товстої кишки, які щоденно отри-

мували дрібнодисперсний порошок насіння фенугреку разом з стандартним кормом була значно знижена кількість АКФ (рис. 2).

Клітини слизової оболонки товстої кишки, маючи високий регенераторний потенціал забезпечують фізіологічну здатність до її швидкого відновлення. Ця властивість реалізується завдяки балансу між проліферацією, диференціацією, апоптозом та десквамацією епітеліоцитів. Вплив біологічно активних речовин насіння фенугреку, гальмуючи проліферацію та атипічне переродження епітеліальних клітин у слизовій оболонці товстого кишечника, упереджує розвиток канцерогенезу.

Як свідчать наші результати, у тварин з експериментальним канцерогенезом, які отримували дрібнодисперсний порошок насіння фенугреку протягом 2 і 4 тиж кількість мультикрипт слизової оболонки товстої кишки зменшувалась на 15 і 31 % відповідно, а поодиноких АКФ – на 24 і 40 % відповідно в порівнянні з тваринами 2-ї групи.

На рис.3 представлені результати впливу біологічно активних речовин насіння фенугреку на фенотипічно змінені клітини, отримані при підрахунку кількості формування АКФ слизової оболонки товстої кишки (поодиноких і мультикрипт), індукованих 1,2-диметилгідразином.

1,2 диметилгідразин специфічно впливає на периферичну частину кишечника у щурів, а також може викликати ушкодження ДНК. Саме фітоестрогени (ізофлавоноїди), флавоноїди, такі, як кверцетин, індоли тощо, яким притаманні і антиоксидантні властивості, гальмують метаболічну активацію та стимулюють детоксикацію канцерогенів.

Протипухлинна хіміотерапія викликає різноманітні побічні ефекти, зокрема утворення вільних радикалів і інактивування ферментів антиоксидантного захисту. Це є причиною токсичного пошкодження внутрішніх органів і найчастіше призводить до

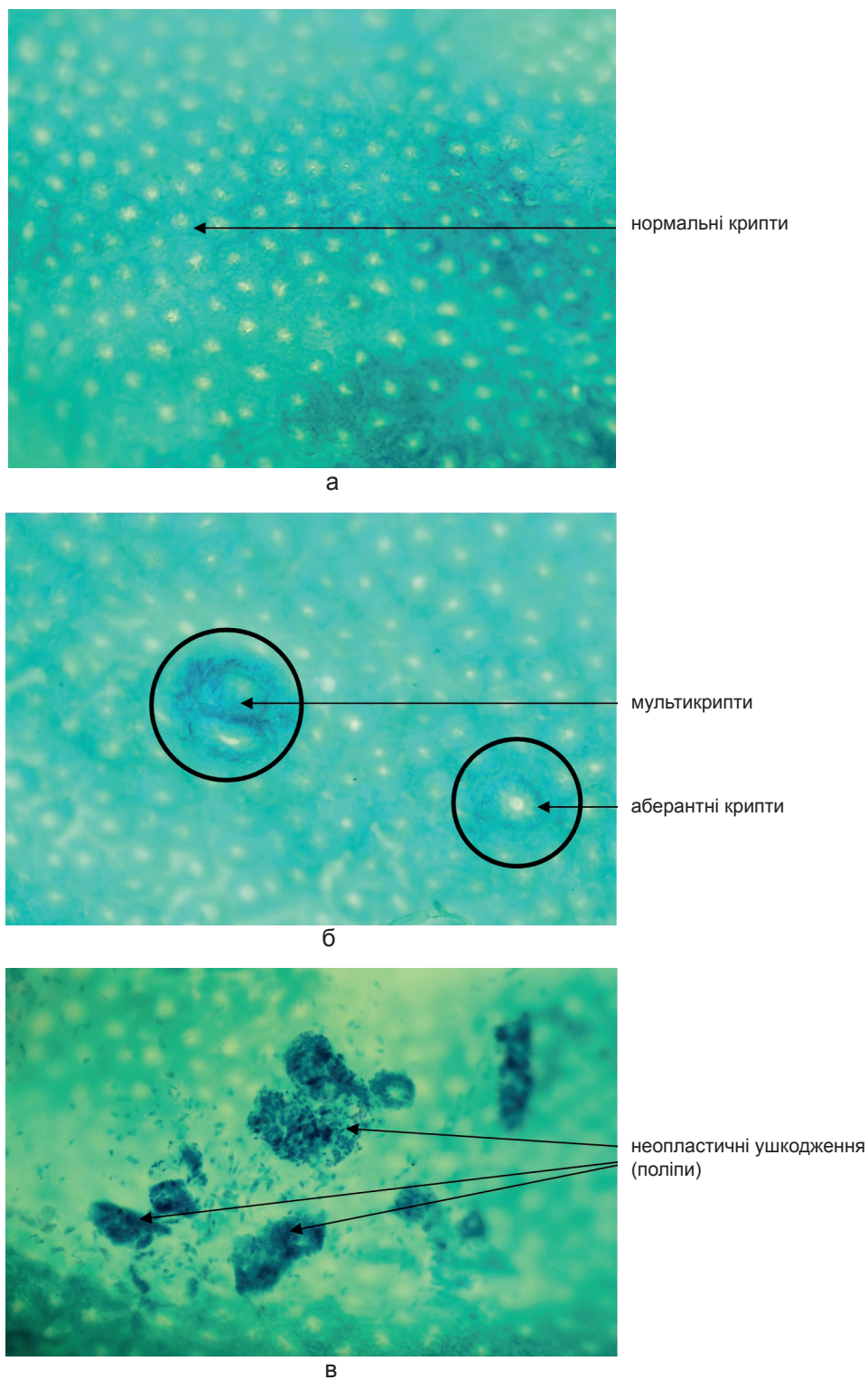


Рис. 1. Топографічний вигляд слизової оболонки товстої кишки щурів (препарати зафіксовані у формаліні та пофарбовані 0,2%-м метиленовим синім): а – у інтактних щурів, б, в – через 6 і 8 тиж від початку щотижневих ін'єкцій 1,2 диметилгідразину відповідно. Збільшення у 40 разів

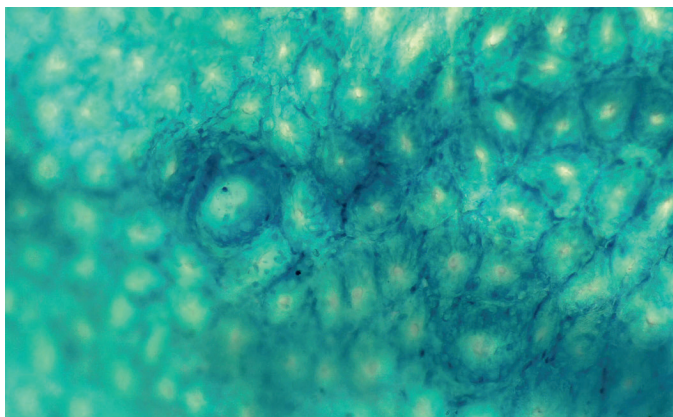
неможливості продовження лікування [11]. Сучасні дослідження свідчать, що рослинні поліфеноли можуть бути використані для зменшення небажаних побічних ефектів [12, 13]. Потенціальні агенти природного походження, що здатні гальмувати розвиток канцерогенезу, повинні підсилювати процеси фізіологічного захисту організму від пренеопластичної клітинної прогресії чи неопластичного клітинного росту.

Використання фіторечовин природного походження може зменшувати ризик, гальмувати розвиток колоректального канцерогенезу. Встановлено, що екстракти насіння фенугреку і деякі з їх сапонінових складових проявляють антиканцерогенний потенціал

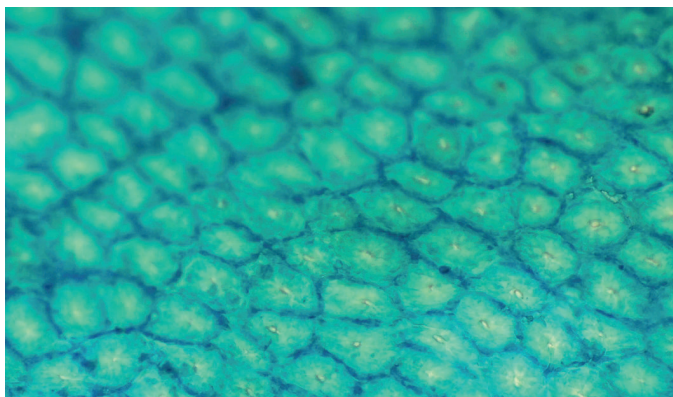
[12, 13]. Серед біоактивних компонентів, ізольованих з насіння фенугреку, є протодіопсин, тригонеозид, діостгенін, ямогенін тощо [4–6]. Ці речовини можуть зв'язувати канцерогенні метаболіти, а також гальмувати ендogenousний синтез канцерогенних нітросполук [13].

Аналізуючи власні та літературні дані, можна передбачати, що використання біологічно активних речовин насіння фенугреку може активно впливати на процеси біотрансформації токсичних хімічних сполук-канцерогенів та їх спрямованої метаболізації [14, 15].

Особливістю біологічно активних речовин в необхідній дозі є їх пролонгуюча дія,



а



б

Рис. 2 Топографічний вигляд слизової оболонки товстої кишки тварин з експериментальним канцерогенезом, які отримували дрібнодисперсний порошок насіння фенугреку разом зі стандартним кормом (препарати зафіксовані у формаліні і пофарбовані метиленовим синім): а – протягом 6 тиж, б – протягом 8 тиж. Збільшення у 40 разів



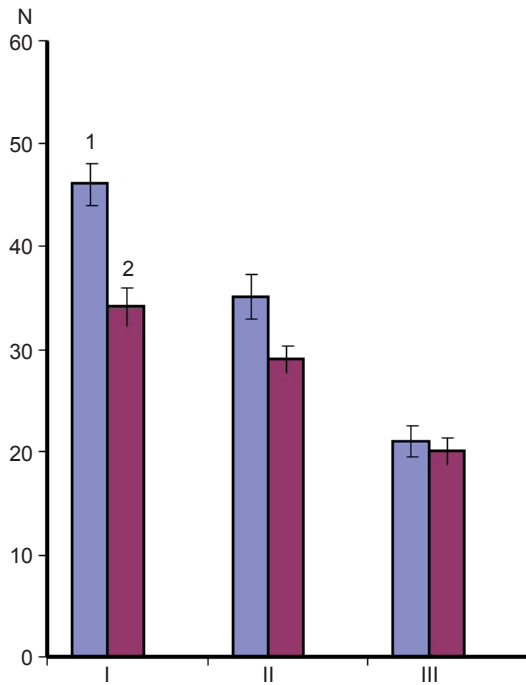


Рис. 3. Вплив біологічно активних речовин насіння фенугреку на формування аберантних крипт слизової оболонки товстої кишки (поодинокі – 1 і мультикрипт – 2), індукованих 1,2-диметилгідразином: I – тварини, у яких моделювали експериментальний канцерогенез товстої кишки, II, III – тварини, у яких моделювали експериментальний канцерогенез товстої кишки та які протягом 4 і 8 тиж отримували порошок насіння фенугреку разом із стандартним кормом відповідно

що дає змогу цілеспрямовано регулювати обмінні процеси в живих системах, що є перспективним для підвищення протипухлинного потенціалу організму.

Це може свідчити про перспективність використання біологічно активних речовин насіння фенугреку як можливих модулаторів побічної дії цитостатиків при лікуванні хворих на онкологічну патологію.

Таким чином, отримані результати за умов моделювання специфічного канцерогенезу при дослідженні дії насіння фенугреку виявили пригнічувальний вплив як на поодинокі аберантні крипти, так і на мультикрипти у товстій кишці, що дає змогу передбачати можливість використання його у комплексному лікуванні злоякісних новоутворень.

**О.А. Кравченко, І.В. Якубцова,  
Т.Д. Хилько, Т.Д. Преображенська,  
Л.І. Остапченко, В.Ф.Чехун**

### **ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ПРИРОДНЫХ ВЕЩЕСТВ СЕМЯН ФЕНУГРЕКА НА ФОРМИРОВАНИЕ АБЕРРАНТНЫХ КРИПТ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ У КРЫС**

Аберрантные крипты Foci (АКФ) считаются предраковыми повреждениями и биомаркерами при скрининге потенциальных хемопротективных веществ. Терапия колоректального рака приводит к токсическим побочным эффектам. Природные биологически активные вещества все чаще используются для противодействия неопластическим процессам. Исследовано влияние семян фенугрека (*Trigonella foenum graecum* L.) на состояние слизистой оболочки толстой кишки на модели экспериментального канцерогенеза толстой кишки у крыс при развитии патологических изменений. Показано возможное гепатопротекторное действие и уменьшение одиночных АКФ на 40 %, мультикрипт – на 31 % в слизистой оболочке толстого кишечника животных, получавших мелкодисперсный порошок вместе со стандартным кормом.

Ключевые слова: аберантне крипти Foci, слизистая оболочка толстого кишечника, семена фенугрека (*Trigonella foenum graecum* L.).

**О.А. Kravchenko, I.V. Yakubtsova, T.D. Khilko,  
T.D. Preobrazhenska, L.I. Ostapchenko,  
V.F. Chekhun**

### **INFLUENCE OF COMPLEX NATURAL SUBSTANCES TRIGONELLA FOENUM GRAECUM L. SEEDS ON FORMING ABERRANT CRYPT FOCI IN THE MUCOSA AT EXPERIMENTAL COLON CANCER IN RATS**

Aberrant crypt Foci are considered preneoplastic colonic lesions and biomarkers for screening potential chemoprotective substances. Colorectal cancer therapy leads to toxic side effects. Natural biologically active substances are increasingly being used to counteract neoplastic processes. The influence of *Trigonella foenum graecum* L. on the state of the colonic mucosa on the model of experimental colon carcinogenesis in rats in the dynamics of pathological changes. It is shown a possible hepatoprotective effect and reduction of single aberrant crypts Foci 40%, multicrypts Foci – 31% in the colonic mucosa of animals treated finely dispersed powder together with the standard feed.

Key words: aberrant crypts Foci, colon mucosa, *Trigonella foenum graecum*

*T. Shevchenko Kyiv National University*



## REFERENCES

1. Nikishaev VI, Patiy AR, Tumak IN, Kolyada IA Endoscopic diagnostics of early colorectal cancer. Ukr J Min Invasive and Endoscopic Surgery. 2012; 16: 35-55.
2. Alrawi SJ, Schiff M, Carols RE, et al., Aberrant Crypt Foci. Anticancer Res. 2006; 26: 107-120.
3. Jian-Guo Wang, Dong-Fei Wang, Bing-Jian Lv, Jian-Min Si. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. World J Gastroenterol. 2004; 10 (20). – P. 2958–2962.
4. Plechyschik ED, Goncharova LV, Spiridovich EV, Reshetnikov VN. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) as a source of a wide variety of biologically active compounds. Proceedings of the Belarusian State University. Ser. "Physiological, Biochemical and Molecular Biology Sciences." 2009; 4 (2): 138-146.
5. Murakami T, Kishi A, Matsuda H, Yoshikawa M. Medicinal foodstuffs. XVII. Fenugreek seed (3): structures of new furostanoltype steroid saponins, trigoneosides Xa, Xb, XIb, XIIa, XIIb, and XIIIa, from the seeds of Egyptian *Trigonella foenum graecum* L. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2000;48:994-1000.
6. Mehrafarin A, Qaderi A, Rezazadeh N., et al. Bioengineering of important secondary metabolites and metabolic pathways in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). J Med Plants. 2010; 9 (35): 1–18.
7. Sur P, Das M, Gomes A, et al. *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent. Phytother Res. 2001;15:257-9.
8. Hibasami H, Moteki H, Ishikawa K, et al. Protodioscin isolated from fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) induces cell death and morphological change indicative of apoptosis in leukemic cell line H-60, but not in gastric cancer cell line KATO III. Int J Mol Med. 2003; 11: 23-6.
9. Norton SA. Useful plants of dermatology. III. Corticosteroids, strophanthus, and dioscorea. J Am Acad Dermatol. 1998; 38:256-9.
10. Moalic S, Liagre B, Corbiere C, et al. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. FEBS Lett. 2001; 506:225-30.
11. Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M., et al. Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. Mol. Interv. 2007; 7 (3): 147–156.
12. Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. Altern. Ther. Health Med. 2007; 13: 22–28.
13. Prasad KN. Multiple dietary antioxidants enhance the efficacy of standard and experimental cancer therapies and decrease their toxicity. Integr. Cancer Ther. 2004; 3: 310–322.
14. Devasena T. Fenugreek affects the activity of  $\beta$ -glucuronidase and mucinase in the colon. Phytother Res. 2003; 17: 1088-1091.
15. Shaban A, Jahanmehr SA, Rezaeian M, et al. Fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum* L.) Seed Extract Induces Cell Death, Growth Inhibition and Morphological Change Indicative of Apoptosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. Res J Biol Sci. 2007; 2 (4): 438-43.

*Матеріал надійшов до редакції 15.05.2014*

Е.Л. Торянік

## Особливості системи коагуляційного гемостазу у вагітних щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією

Нац. фармацевт. ун-т, Харків; E-mail: etoryanik@list.ru

*Дослідження проведено на білих нелінійних щурах і щурах зі спонтанною гіпертензією. Встановлено, що у вагітних щурів зі спонтанною гіпертензією найчастіше спостерігаються коагуляційні зсуви, затримка фібринолізу, гіперфібриногенемія та зміни у двох і більше ланцюгах гемостазу, що вказує на більш високий їх тромбогенний потенціал. На 19–20-ту добу гестації достовірно підвищується агрегація тромбоцитів з аденозиндифосфатом і адреналіном порівняно з вагітними білими нелінійними щурами. Агрегація тромбоцитів з колагеном була підвищена у невагітних щурів з артеріальною гіпертензією порівняно з вагітними. У цей самий період у вагітних щурів зі спонтанною гіпертензією порівняно з тваринами без цієї патології зберігався більш високий вміст фібриногену і розчинних фібрин-мономерних комплексів, а також частота позитивного етанолового тесту, що підтверджувало наростаючий тромбогенний потенціал системи згортання крові у цих щурів. У вагітних щурів з артеріальною гіпертензією в порівнянні з вагітними без артеріальної гіпертензії і контролем достовірно вищими були значення еуглобулінового лізису. Виявлено слабкий кореляційний зв'язок між вмістом фібриногену і показниками, які відображають стан фібринолітичної системи на 19–20-ту добу гестації, що свідчить про відносно незалежне від гіперфібриногенемії уповільнення фібринолізу у вагітних білих нелінійних щурів (контроль).*

*Ключові слова: щури зі спонтанною гіпертензією, вагітність, судинно-тромбоцитарний гемостаз, коагуляційний гемостаз, протизгортальна система.*

### ВСТУП

Останнім часом екстрагенітальні захворювання займають провідне місце у структурі материнської та перинатальної смертності та мають чітку тенденцію до збільшення [1, 6, 9, 10]. Серед них особливо виділяється артеріальна гіпертензія (АГ), яка є центральною проблемою сучасного акушерства. У вагітних жінок з АГ є ризик відшарування плаценти, розвитку гострої ниркової недостатності, церебральних крововиливів, дисемінованого внутрішньосудинного згортання – патологічний синдром, в основі якого лежить активація судинно-тромбоцитарного або коагуляційного гемостазу (зовнішнього або внутрішнього), тяжкого ускладнення вагітності, яке характеризується тріадою симптомів: гемолізом, підвищенням вмісту печінкових ферментів і зниженням кіль-

кості тромбоцитів та еклампсії [4, 5, 7, 12, 14]. Водночас за останні роки сформована концепція, згідно з якою важливою патогенетичною ланкою ускладнень є тромбофілічні стани [12, 13]. Взаємозв'язки АГ та гемостазу у вагітних вивчені недостатньо або кількість цих досліджень розглядається безпосередньо у межах гестозу [2, 7, 11]. У зв'язку з цим актуальним залишається глибоке знання патогенезу АГ та безумовна оцінка тромболітичного ризику у жінок під час вагітності.

Дослідження процесів тромбо- та фібриноутворення, фібринолітичної активності і всієї системи гемостазу у вагітних щурів на тлі АГ не проводилися.

Мета нашої роботи – оцінка динаміки основних показників судинно-тромбоцитарного, коагуляційного гемостазу та протизгортальної системи крові у вагітних щурів з АГ.

© Е.Л. Торянік

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на 4 групах тварин (по 10 щурів у кожній) масою 220–240 г. Нелінійні білі щури ввійшли до 1-ї (невагітні, інтактний контроль); до 2-ї групи (вагітні, фізіологічний контроль). Щури зі спонтанною гіпертензією склали 3-тю (вагітні) і 4-ту (невагітні) групи. Цих щурів отримували з розплідника «Біомодельсервіс» (Київ). У період акліматизації (2 тиж) та протягом дослідження щури знаходилися у віварії при 20–25°C, вологості не більше ніж 50 %, природному світловому режимі «день–ніч», у стандартних пластикових клітках на стандартному харчовому раціоні.

Всі процедури з тваринами, а також виведення їх з експерименту проводили відповідно до національних «Загальних етичних принципів дослідів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Індуковану агрегацію (індуктори агрегації – розчин аденозиндифосфату, колаген) тромбоцитів досліджували використовуючи лазерний агрегометр «Біола LA230-2» (Росія). Метод оснований на реєстрації змін світлопроникності збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП), що дає змогу вивчати не лише агрегацію, але і зміни форми тромбоцитів. Світлопроникність виражали у відсотках, причому ЗТП приймали за 0 %, а бідної тромбоцитами плазми (БТП) за 100 %.

Коагуляційні дослідження виконували за допомогою напівавтоматичного коагулометра DiaMed-CD-4 (Швейцарія), 4-канального фотометра (світлофільтр  $\lambda = 405$  нм), з використанням реактивів фірми «Технологія-Стандарт» (Барнаул).

Вивчали активований час рекальцифікації (АЧР), активований частково тромбопластиновий час (АЧТЧ), вміст фібриногену за стандартними методиками [3].

Кількісну активність антитромбіну III оцінювали фотометричним методом з використанням хромогенного субстрату («Технологія-Стандарт», Барнаул). Для оцінки фібринолізу вивчали час XIIa-залежного еуглобулінового лізису згустка [4]. Як маркер протромбінемії використовували вміст розчинених фібрин-мономерних комплексів (РФМК) – РФМК-тест. Результати досліджень обробляли методом статистики за критерієм t Стьюдента (обчислювали середнє арифметичне та його стандартну похибку) на персональному комп'ютері з використанням програмного пакета «Start Soft». Для одержання статистичних висновків застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA, критерій Крускала–Уолліса), при порівнянні вибірок – методи множинних порівнянь (критерій Ньюмена–Кейлса) і критерій Манна–Уїтні. Для виявлення взаємозв'язку показників у межах групи використовували кореляційний аналіз Спірмена.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що агрегація тромбоцитів з аденозиндифосфатом (АДФ) і адреналіном (табл. 1) була вище у вагітних щурів зі спонтанною гіпертензією в порівнянні з фізіологічним контролем (2-га група), а агрегація з колагеном, що відображає секреторну активність тромбоцитів, була вище тільки у невагітних щурів з АГ (3-тя група) в порівнянні з вагітними (4-та група).

Збереження гіперагрегаційних зсувів у невагітних щурів 3-ї групи можуть бути патогенетичною основою для розвитку ускладнень гестації. Показники коагуляційного ланцюга гемостазу у вагітних щурів 4-ї групи характеризувалися підвищенням вмісту фібриногену і РФМК, а також більшою стривальністю позитивного етанолового тесту в порівнянні зі щурами без АГ і з гіпертензивним контролем, що є ознакою гіперкоагуляційного синдрому, який відіграє важливу роль у формуванні численних ускладнень під час вагітності.

Вже з 1-ї по 6-ту добу гестації (див. табл. 1) у вагітних щурів 4-ї групи в порівнянні зі значеннями у тварин 2-ї і 3-ї груп відмічали достовірне уповільнення фібринолізу. Достовірних відмінностей активності антитромбіну III не було.

Нами також проаналізовано частоту виявлення зсувів у різних ланцюгах гемостазу з 1-ї по 6-ту добу гестації у тварин 4-ї і 2-ї груп (рис. 1). Слід відмітити, що у вагітних щурів 4-ї групи в цей період достовірно частіше виявляються гіперкоагуляційні зсуви за відсутності статистично значущої різниці в частоті виявлення зсувів інших ланцюгів гемостазу. З 13-ї по 19-ту добу гестації прогресували гіперкоагуляційні та гіперагрегаційні зсуви, а також посилювалася депресія протизгортальних механізмів (уповільнення

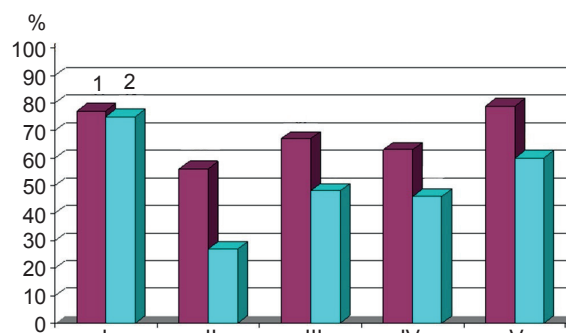


Рис. 1. Частота тромбогенних зсувів в системі гемостазу у вагітних щурів з 1-ї по 6-ту добу гестації: 1 – щури зі спонтанною гіпертензією, 2 – щури з фізіологічним перебігом вагітності; I – гіперагрегація, II – гіперкоагуляція, III – гіпофібриноліз, IV – гіперфібриногенемія, V – зсув у двох і більше ланцюгах. \* $P \leq 0,05$  в порівнянні з вагітними без артеріальної гіпертензії

фібринолізу, зниження активності антитромбіну III; табл. 2).

Таблиця 1. Показники гемостазу у щурів з першої по шосту добу гестації ( $\bar{X} \pm Sx$ ,  $n = 10$ )

Показники	Білі нелінійні щури		Щури зі спонтанною гіпертензією	
	невагітні (інтактний контроль; 1-ша група)	вагітні (фізіологічний контроль; 2-га група)	невагітні (3-тя група)	вагітні (4-та група)
<b>Судинно-тромбоцитарний гемостаз</b>				
Спонтанна агрегація тромбоцитів, %	2,5	2,8	1,9	1,6
Агрегація тромбоцитів, %				
з аденозиндифосфатом	56,2	58,5	66,9	62,3*
з адреналіном	46,8	48,6	53,2	56,2*
з колагеном	66,2	68,4	74,2*	71,3
<b>Коагуляційний гемостаз</b>				
Активованій час рекальцифікації, с	49,6±0,6	52,8±0,6	58,6±0,7*	57,2±0,4*
Активованій частково тромбопластиновий час, с	26,3±0,6	31,4±0,6	32,8±0,2	30,9±0,6
Фібриноген, г/л	3,4±0,2	3,7±0,2	4,0±0,2	4,9±0,4*
Розчинні фібрин-мономерні комплекси, мг/дл	3,8±0,2	4,4±0,3	6,4±0,2*	8,2±0,6*,**
Позитивний етаноловий тест, %	0	0	10,4	16,9
<b>Протизгортальна система</b>				
Еуглобуліновий лізис, хв	138±3,2	146±3,5	152±3,0*,**	174±4,5*,**
ХПа-залежний лізис, хв	8,6±0,2	9,3±0,54	8,0±0,75	9,1±0,45
Активність антитромбіну III, %	96,0	98,0	99,2	102,3

Примітки. Тут і в табл. 2 \*  $P < 0,05$  відносно інтактного і фізіологічного контролю; \*\*  $P < 0,05$  відносно значень у невагітних щурів зі спонтанною гіпертензією.

Таблиця 2. Показники гемостазу у вагітних щурів з 13-ї по 19-ту добу гестації ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ , n=10)

Показники	Білі нелінійні щури		Щури зі спонтанною гіпертензією	
	невагітні (інтактний контроль; 1-ша група)	вагітні (фізіологічний контроль; 2-га група)	невагітні (3-тя група)	вагітні (4-та група)
Судинно-тромбоцитарний гемостаз				
Спонтанна агрегація тромбоцитів, %	2,6	2,9	2,4	1,9
Агрегація тромбоцитів, %				
з аденозиндифосфатом	55,8	58,9	68,2	67,2*
з адреналіном	47,6	54,8	59,4	58,6*
з колагеном	67,2	68,9	76,6	74,2*
Коагуляційний гемостаз				
Активованій час рекальцифікації, с	51,6±0,6	54,2±0,4	53,2±0,8 *	50,5±0,3*
Активованій частково тромбопластиновий час, с	27,2±0,4	31,8±0,6	32,4±0,2	30,9±0,1
Фібриноген, г/л	3,6±0,2	3,9±0,2	4,3±0,2	5,8±0,4*,**
Розчинні фібрин-мономерні комплекси, мг/дл	4,2±0,2	6,0±0,5	8,5±0,4*	10,0±0,5*,**
Позитивний етаноловий тест, %	0	0	16,4	35,2
Протизгортальна система				
Еуглобуліновий лізис, хв	146±4,5	188±5,5	210±5,0	216±8,0*
XIIa-залежний лізис, хв	8,2±0,25	8,4±0,12	8,5±0,16	8,8±0,22
Активність антитромбіну III, %	94,6	96,4	91,8	93,8

На рис. 2 показана частота зсувів різних ланцюгів гемостазу з 13-ї по 19-ту добу гестації у вагітних щурів з АГ та без неї. Слід відмітити збільшення цієї частоти у різних ланцюгах гемостазу у щурів 4-ї групи з 1-ї по 6-ту добу гестації. Так, достовірно частіше зустрічалися не тільки гіперкоагуляційні зсуви (84 щодо 69 %,  $P < 0,05$ ), але і уповільнення фібринолізу (64 щодо 46 %,  $P < 0,05$ ), гіперфібриногенемія (80 щодо 52 %,  $P < 0,05$ ), а також зсуви в двох і більше ланцюгах гемостазу (91 щодо 75 %,  $P < 0,05$ ) в порівнянні з вагітними щурами без АГ.

На 19–20-ту добу гестації у щурів 4-ї групи в порівнянні з 2-ю групою зберігався достовірно більш високий вміст фібриногену і РФМК, а також частота позитивного етанолового тесту, що підтверджувало наростаючий тромбогенний потенціал системи згортання

крові у щурів зі спонтанною гіпертензією. У щурів 4-ї групи в порівнянні з 2-ю і з 3-ю групою достовірно вищими був еуглобулі-

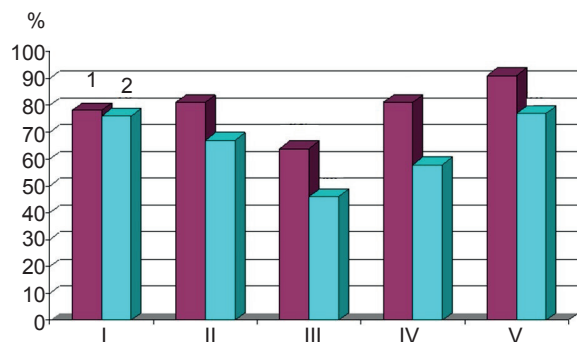


Рис. 2. Частота тромбогенних зсувів у системі гемостазу у щурів з артеріальною гіпертензією і без неї з 13-ї по 19-ту добу вагітності: 1 – щури зі спонтанною гіпертензією, 2 – щури з фізіологічним перебігом вагітності; I – гіперагрегація, II – гіперкоагуляція, III – гіпофібриноліз, IV – гіперфібриногенемія, V – зсув у двох і більше ланцюгах. \* $P \leq 0,05$  в порівнянні з вагітними без артеріальної гіпертензії



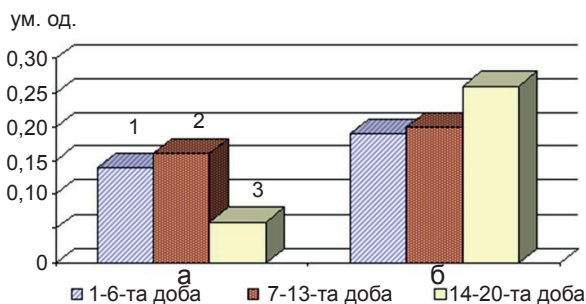


Рис. 3. Еуглобуліновий (а) та XIIIa-залежний лізис (б) у вагітних щурів з артеріальною гіпертензією: 1 – 1–6-та доба, 2 – 7–13-та доба, 3 – 14–20-та доба

новий лізис. Однак статистично значущих відмінностей активності антитромбіну III і XIIIa-залежного лізису ми не отримали. Виявлено слабкий кореляційний зв'язок між вмістом фібриногену і показниками, які відображають стан фібринолітичної системи на 19–20-ту добу гестації (рис. 3), що відображає відносно незалежне від гіперфібриногенемії уповільнення фібринолізу у вагітних білих нелінійних щурів.

## ВИСНОВКИ

1. Зміни в системі гемостазу починають проявлятися з ранніх термінів вагітності та характеризуються зростанням гіперкоагуляційних зсувів на тлі прогресуючої затримки фібринолізу, що є ознакою гіперкоагуляційного синдрому, який відіграє важливу роль у формуванні численних ускладнень під час вагітності.

2. У групі вагітних щурів зі спонтанною гіпертензією найчастіше спостерігаються коагуляційні зсуви, затримка фібринолізу, гіперфібриногенемія і зміни в двох і більше ланцюгах гемостазу, що вказує на більш високий тромбогенний потенціал у цих щурів.

3. Кількісні показники гемостазу на 19–20-ту добу гестації в групі вагітних щурів зі спонтанною гіпертензією свідчать про достовірно більш високі показники агрегації тромбоцитів з аденозиндифосфатом і адреналіном в порівнянні з тваринами з фізіологічним перебігом вагітності. Агрегація

тромбоцитів з колагеном була підвищена у невагітних щурів зі спонтанною гіпертензією у порівнянні з вагітними.

4. Виявлено слабкий кореляційний зв'язок між вмістом фібриногену і показниками, які відображають стан фібринолітичної системи та відносно незалежне від гіперфібриногенемії уповільнення фібринолізу у вагітних груп порівняння.

*Робота виконана за науково-дослідною програмою Національного фармацевтичного університету «Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування у медичній практиці» (№ держ. реєстр. 0103U00909478).*

Э.Л. Торяник

## ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТА ЗА У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Исследования проведены на белых нелинейных крысах и крысах со спонтанной гипертензией. Установлено, что в группе беременных крыс с артериальной гипертензией чаще всего наблюдались коагуляционные сдвиги, задержка фибринолиза, гиперфибриногенемия и изменения в двух и более цепях гемостаза, что отражает более высокий тромбогенный потенциал системы свертывания крови. Количественные показатели гемостаза на 19–20-е сутки гестации свидетельствуют о достоверно высоких показателях агрегации тромбоцитов с аденозиндифосфатом и адреналином в сравнении с животными с физиологической беременностью. Агрегация тромбоцитов с коллагеном была выше у небеременных крыс с артериальной гипертензией в сравнении с беременными с артериальной гипертензией. В этот же период гестации у беременных крыс с артериальной гипертензией сохранялось достоверно более высокое содержание фибриногена и растворимых фибриномономерных комплексов, а также частота позитивного этанолового теста, что подтверждает тромбогенный потенциал системы свертывания крови. У беременных крыс с артериальной гипертензией в сравнении с группой без артериальной гипертензии и контролем достоверно были высокими значения эуглобулинового лизиса. Проведенный корреляционный анализ содержания фибриногена и показателей, которые отображают состояние фибринолитической системы на 19–20-е сутки гестации, выявил слабую связь между ними, что свидетельствует о независимой от гиперфибриногенемии задержки фибринолиза у беременных белых нелинейных крыс (контроль).

Ключевые слова: крысы со спонтанной гипертензией,

беременность сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, коагуляционный гемостаз, противосвертывающая система.

**E.L.Toryanik**

## HEMOSTATIC FEATURES IN HYPERTENSIVE PREGNANT RATS

The paper represents the study results of hemostasis in pregnant SHR rats. It is found that in the group of pregnant SHR rats the coagulation shifts are frequently observed, accompanied by fibrinolysis delay, hyperfibrinohemia and changes in 2- and more hemostasis chains, indicating the higher thrombogenic potential in SHR group. The hemostasis quantitative performance at 19-20 days of gestation in a group of pregnant rats shows higher rates reliability of platelet aggregation with adenosine diphosphate and epinephrine in comparison with animals having physiological pregnancy. Platelet aggregation with collagen is increased in SHR- rats than in pregnant rats with hypertension. In the same period of gestation (19-20 days), higher levels of fibrinogen and soluble fibrin monomer complexes, and the frequency of positive ethanol test were fixed in pregnant SHR rats compared with the group without hypertension. This confirms the growing thrombogenic potential of blood coagulation in SHR rats. The euhlobulin lysis performance was significantly higher in pregnant rats with hypertension than in the group without hypertension and control. Correlative analysis between fibrinogen levels and indicators was conducted. It reflected the fibrinolytic system state at 19-20 days of gestation and revealed a weak relationship between them independently of fibrinolysis slowing hyperfibrinohemia in pregnant group.

Key words: SHR-rats, gestation, vascular-platelet hemostasis, coagulation hemostasis, anticoagulant system, arterial hypertension.

*Kharkiv National pharmaceutical University*

## REFERENCES

1. Dobrokhotova JE, Dzhalbava EM, Stepanyan AV. Actual issues of miscarriage: a collection of clinical lectures. Moscow: Medicina; 2007 [Russian].
2. Alyautdinov OS. Importance of the hemostatic system research in patients with uncomplicated pregnancy

- and predicting thrombohemorrhagic complications. Obstetrics and Gynecology. 1999; (2):18-23 [Russian].
3. Barkagan ZS, Momot AP. Diagnosis and treatment of hemostatic disorders controlled. Moscow: Nyudiamed; 2008 [Russian].
4. Belugina OS. Diagnosis of hemostatic disorders in pregnant women with placental insufficiency and neonatal. Siberian Medical Journal. 2010; 25(4):57-59 [Russian].
5. Vartapetova IV. Hypertension during pregnancy. Preeclampsia. Eclampsia. Moscow: FGBI «Scientific Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology; 2012 [Russian].
6. Krivtsova EV, Vertkin AL. Issues of planned and emergency treatment of extragenital diseases in pregnant women. Moscow: Obstetrics and gynecology. 2010;(4):37-40 [Russian].
7. Repina MA. Preeclampsia as a cause of maternal mortality. Obstetrics and women diseases. 2000; (3):11-18 [Russian].
8. Sernov LN. Statistical methods for assessing the reliability of the results of pharmacological studies. Moscow: Elements of Experimental Pharmacology. 2000;308-15 [Russian].
9. Sidelnikova VM. Haemostasis and pregnancy. Moscow: Triad. 2004 [Russian].
10. Stryuk RI. Pharmacotherapy and analysis of pregnancy and perinatal outcomes in women with hypertension. Cardiology. 2009;12:29-32.
11. Schiffman EM. Pre-eclampsia, eclampsia, HELLP - syndrome. Petrozavodsk. 2002;353-75.
12. Agnieszka, SM. Inherited thrombophilia in women with recurrent miscarriages and pregnancy loss in anamnesis - own experience text. Ginekol Pol. 2008;79(9): 630-34.
13. Bates SM. Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy and pregnancy: American College of Chest Physicians Evidence. Based Clinical Practice Guidelines (8<sup>th</sup> Edition). 2008; 133:844-60.
14. Bellamy L, Casas JP, Hingoroni AD, Williams DJ. Preeclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. BMJ 2007; 974-82.
15. Hawkins TL, Roberts JM. Plasma uric acid remains a marker of poor outcome in hypertensive pregnancy: a retrospective cohort study. BJOG 2012; 119:484-92.

*Матеріал надійшов до редакції 05.06.2014*

**І.М. Маньковська, Т.В. Серебровська**

## Мітохондрії як мішень інтервальної гіпоксії

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; E-mail: sereb@biph.kiev.ua*

*У огляді розглядаються механізми впливу інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ) на структуру та функції мітохондрій порівняно з дією гострої гіпоксії (ГГ). Показано, що ГГ викликає набухання, вакуолізацію органел, дезорганізацію та деструкцію мітохондріальних мембран. При дії ІГТ збільшується загальна кількість мітохондрій і зменшується кількість структурно змінених органел, з'являються енергетично активні мітохондрії з везикулярними кристами, утворюються мікромітохондрії. Одним з ключових механізмів пошкодження клітин при гіпоксії та реоксигенації є надмірне виробництво активних форм кисню (АФК) в мітохондріях, які окиснюють білки, ліпіди і ДНК. З іншого боку, низький рівень продукції АФК є захисним і виступає як тригер для адаптивних реакцій. ІГТ перепрограмує метаболізм мітохондрій, що забезпечує адекватну продукцію АТФ. Активація транспорту калію в мітохондріальній матрикс при ІГТ забезпечує захисний механізм від перевантаження іонами Са, викликаного гострою гіпоксією. Інтенсивність енергопродукції мітохондріальних нейронів безпосередньо пов'язана з регуляцією метаболізму нейротрансмітерів – глутамату та ГАМК, які зокрема задіяні в механізмах формування дихального ритмогенезу. Застосування ІГТ сприяє оптимізації цих процесів. Всі реакції адаптації до нього зумовлені факторами, індукованими гіпоксією: HIF-1, HIF-2, HIF-3, що мають транскрипційну активність. Кожна з HIF-субодиниць відіграє свою роль залежно від режиму гіпоксичного навантаження. Встановлені закономірності можуть мати значення при виборі протоколів ІГТ для профілактики та лікування різних хвороб. Нові дані щодо органоспецифічності функцій HIF дають потенційну можливість фармакологічного регулювання системи HIF як нового терапевтичного підходу до лікування. Ключові слова: мітохондріальна дисфункція, інтервальна гіпоксія, морфологія мітохондрій, вільнорадикальні процеси, глутаматергічна система, фактор, індукований гіпоксією.*

### ВСТУП

Нещодавні відкриття, які продемонстрували ключову роль мітохондрій у фізіології та патології людини і тварин, поставили ці субклітинні складно організовані структури в центр біомедичних досліджень у всьому світі та ініціювали розвиток таких нових напрямів, як мітохондріальна фізіологія [1], мітохондріальна фармакологія [2], мітохондріальна медицина [3, 4], мітохондріальна генетика [5]. Мітохондрії – це «охоронці воріт» (“gate-keepers”) між виживанням і загибеллю клітин, вони регулюють енергетичний обмін, клітинну сигналізацію та диференціацію, редокс-баланс та іонний гомеостаз [6].

© І.М. Маньковська, Т.В. Серебровська

У період еволюції аеробні організми виробили надзвичайно витончену та гармонійну клітинну систему для відповіді на зміни концентрації кисню у позаклітинному середовищі, оскільки молекулярний кисень діє як кінцевий акцептор електронів у мітохондріальному дихальному ланцюзі для продукції енергії в процесі окисного фосфорилування. Дихальний ланцюг мітохондрій реагує на зміни вмісту кисню у позаклітинному середовищі та ініціює каскад функціонально-метаболических внутрішньоклітинних реакцій, які формують сумарну відповідь організму на ці зміни [7, 8]. Наслідком неадекватного постачання тканин киснем є дисфункція мі-

тохондріального апарату, яка в свою чергу слугує провідним базисним молекулярним механізмом у відповіді клітини на дефіцит кисню. Мітохондріальна дисфункція при гіпоксії призводить до акумуляції в цитоплазмі клітин інтермедіатів метаболізму ліпідів і вуглеводів, накопичення іонів кальцію, вивільнення з мітохондрій цитохрому *c* та розвитку апоптозу клітин. За умов гіпоксії дихальний ланцюг мітохондрій є головним внутрішньоклітинним джерелом генерації активних форм кисню (АФК), надмірне утворення яких порушує метаболічні процеси, структуру білків, мітохондріальний геном [9, 10]. Таким чином, АФК виступають як основні медіатори клітинного пошкодження при гіпоксії. Мітохондріальна дисфункція при кисневому голодуванні тканин – обов'язкова складова більшості патологічних процесів в організмі.

З іншого боку, відомо, що адаптація до інтервального гіпоксичного подразнення викликає позитивні зміни в роботі мітохондріального апарату клітин, перебудовує тканинне енергозабезпечення, пов'язане з більш економним використанням кисню, стабілізує мітохондріальні мембрани тощо [7, 10, 11]. Механізми адаптації до інтервальної гіпоксії дають змогу організму не тільки виживати в умовах гострого дефіциту кисню, а й підвищувати його стійкість до емоційного стресу, інтенсивних фізичних навантажень тощо. Інтервальні гіпоксичні тренування (ІГТ) здійснюють свій антигіпоксичний вплив через стимуляцію власних ендогенних механізмів захисту організму на всіх рівнях – від гена до цілого органа чи тканини. Так, відома функція АФК як внутрішньоклітинних месенджерів, що регулюють різноманітні клітинні процеси за допомогою активації факторів транскрипції антиоксидантних ферментів, регуляторних і захисних білків [12, 13]. Саме АФК відіграють роль тригера, який здатен ініціювати каскад внутрішньоклітинної редокс-сигналізації з наступною активацією редокс-чутливих факторів транскрипції та

генів, що регулюють синтез і міграцію в клітині регуляторних компонентів [14]. В останнє десятиріччя були досліджені нові шляхи мітохондріальної сигналізації, які включають вивільнення метаболітів, мітохондріальну динаміку та рухливість, взаємодію з такими органелами, як ендоплазматичний ретикулум [23]. Встановили, що сигналізація, залежна від мітохондрій, має дивергентні фізіологічні та патофізіологічні наслідки.

До недавнього часу дослідження інтервальної гіпоксії в Західній Європі та Північній Америці були в основному зосереджені на негативних наслідках хронічної інтервальної гіпоксії, пов'язаних із синдромом сонного апное. Наприклад, Nanduri та співавт. [16], Prabhakar та Semenza [17] вважають, що інтервальна гіпоксія майже завжди являє собою стимул, який викликає мультиорганну патологію, біохімічні зрушення і зміни патерна експресії генів. Проте протягом останнього десятиліття такий розрив у поглядах між Сходом і Заходом поступово скорочується, і взаєморозуміння в цій сфері стає яснішим [18, 19].

Виникає питання: що є ключовим механізмом, який визначає адаптивну чи дезадаптивну природу різних парадигм інтервальної гіпоксії, які молекулярні шляхи опосередковують патологічну або фізіологічну реакцію на гіпоксію? Нині немає жодних точних свідчень про механізми перемикання з адаптивної на дезадаптивну відповідь на гіпоксичний стимул. Зроблено декілька спроб проаналізувати це питання [7, 20, 21]. Найбільш значний внесок зробили Prabhakar та Semenza [17], які описали транскрипційну регуляцію експресії генів, що опосередкована факторами, індукованими гіпоксією 1 і 2 (HIF-1 і HIF-2). Автори висловлюють основну думку, що HIF-сигналізація не є лінійним процесом, а являє собою складну мережу з, можливо, сотні вхідних стимулів і тисячі потенційних відповідних вихідних, кожен з яких репрезентує різні гени-мішені. Відкриття сімейства HIF дало змогу по-новому



поглянути на молекулярні основи адаптивних і дезадаптивних відповідей на клітинному та системному рівні при дії безперервної та періодичної гіпоксії. Проте поки вони не можуть відповісти на практичне питання: яка доза та режим гіпоксичного подразнення найбільш вигідні для тварин і людей.

У цьому огляді ми розглянемо механізми впливу періодичної гіпоксії на структуру та функції мітохондрій різних тканин і можливості застосування інтервальної гіпоксії для запобігання розвитку мітохондріальної дисфункції при різних гіпоксичних станах, акцентуючи увагу на останніх роботах співробітників відділу з вивчення гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

### **Морфологічні зміни мітохондрій при різних типах гіпоксії**

Треба відмітити, що вплив інтервальної гіпоксії на ультраструктуру мітохондрій досліджений недостатньо. В літературі є лише поодинокі праці, в яких наголошується, що інтервальна гіпоксія (перебування на висоті 5000 м по 6 год на добу протягом 28 діб) запобігає розвитку порушень ультраструктури мітохондрій міокарда та делеції мітоДНК у кардіоміоцитах, які виникають під час ішемії–реперфузії [22].

У циклі експериментальних робіт Розової [23, 24], проведених на щурах, показано, що гостра гіпоксична гіпоксія (дихання газовою сумішшю з 7 % кисню в азоті впродовж 30 хв) викликала в тканинах легень і міокарда набухання мітохондрій різного ступеня вираженості, часткову або повну вакуолізацію органел, порушення регулярності крист з набуханням міжкристних проміжків, дезорганізацію і деструкцію мітохондріальних мембран – частіше внутрішньої, іноді і зовнішньої. У деяких мітохондріях утворювалися дрібні оптично щільні структури, оточені сформованою мембранною оболонкою (мікромітохондрії).

Найбільш виражена мітохондріальна дисфункція спостерігається в тканині легень

при респіраторній гіпоксії, що розвивається при експериментальній пневмонії: розплавлення крист, повна вакуолізація, порушення цілісності мітохондріальних мембран (як внутрішньої, так і зовнішньої). Збільшується загальна кількість лізосом, особливо вторинних, які щільно прилягають до мітохондрій, що є свідченням посилення дегенеративних процесів у них та напруженого, менш економічного їх функціонування.

Значна гетерогенність змін мітохондрій була також у міокарді при дії гострої гіпоксичної гіпоксії. Відбувався виражений поділ мітохондрій на органели в різних конфігураційних енергозалежних станах, що може свідчити про наявність термінових адаптивних змін у серцевому м'язі, спрямованих на підтримання адекватного енергозабезпечення при змінених умовах існування. Крім того, часто спостерігались ознаки прямого ділення мітохондрій, що властиво гострогіпоксичному впливу. Утворювалися також преципітати кальцію на внутрішній мембрані мітохондрій.

На відміну від гострої гіпоксії, при дії ІГТ зміни морфофункціонального стану досліджуваних тканин значною мірою носять компенсаторно-приспосувальний характер [25]. Відносно тканини серця такий висновок базувався на тому, що при менш виражених проявах гіпоксичного набряку зростає загальна кількість мітохондрій та вдвічі зменшується кількість структурно змінених органел, з'являються енергетично активні мітохондрії з везикулярними кристами. У мітохондріях легень і серця зі зміненою ультраструктурою утворюються мікромітохондрії діаметром 10–15 нм. Такий процес спостерігається лише при гіпоксичній гіпоксії.

Одержані результати можна розглядати з позиції того, що ІГТ значно поліпшує контроль якості мітохондрій, який регулюється балансом між їхнім біогенезом та аутофагічною деструкцією. Тобто цей контроль якості досягається встановленням тонкого балансу між елімінацією пошкоджених і дисфункціональних мітохондрій через аутофагію (мі-



тофагію) та генерацією нових і «здорових» мітохондрій завдяки процесам біогенезу, злиття (fusion) та розділу (fission) [26]. Взагалі, встановлення молекулярних та клітинних механізмів мітохондріального біогенезу і ауто/мітофагії наразі є найважливішою темою мітохондріології.

Таким чином, дослідники дійшли висновку, що гостра гіпоксична гіпоксія викликає органоспецифічні деструктивні зміни в ультраструктурі мітохондрій легеневої та серцевої тканин. Найсильніше ушкодженою виявилася тканина легень, а найбільш стійким до різних типів гіпоксії є міокард. При ІГТ найбільш ефективним режимом для позитивних ультраструктурних змін у тканинах організму виявилися 5-хвилинні експозиції газової суміші з 12 %  $O_2$  з 15-хвилинними нормоксичними інтервалами.

### **Роль вільнорадикальних процесів у формуванні мітохондріальної дисфункції та при адаптації до ІГТ**

Як було розглянуто раніше, АФК відіграють ключову роль у важливих регуляторних механізмах клітини та є не тільки ушкоджувальними агентами, але й фізіологічними месенджерерами, що запускають різні сигнальні каскади та є початковою, чутливою до окисно-відновного стану, ланкою редоксигналізації, що забезпечує передачу сигналу від місця генерації АФК до ядра клітини [27]. Дефіцит кисню порушує енергетичний обмін і стимулює вільнорадикальне окиснення, а активація цих процесів, ушкоджуючи мембрани мітохондрій і лізосом, збільшує енергодефіцит, формується „хибне коло”, що насамкінець може викликати незворотні ушкодження й загибель клітин.

З іншого боку, ланка антиоксидантних реакцій у механізмах захисту від негативного впливу АФК є провідною і найбільш потужною, оскільки вона не тільки запобігає розвитку вільнорадикальних реакцій, нагромадженню супероксид-аніонів, перекисів,

але й підтримує високу активність окисно-відновних процесів, забезпечує елімінацію кінцевих кисневих метаболітів із залученням їх в енергетичний обмін, сприяє активності синтетичних процесів [28].

Рівень порушень оксидативних процесів у мітохондріях (інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації білків) за умов гострої гіпоксичної гіпоксії активно вивчали у відділі гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України [25, 29]. Згідно з результатами досліджень, гостра гіпоксична гіпоксія (газова суміш з 7 %  $O_2$ ) викликала у щурів інтенсифікацію процесів ПОЛ, підвищення вмісту окисненого (GSSG) та зниження вмісту відновленого (GSH) глутатіону, збільшення вмісту окисно-модифікованих білків. Було виявлено високий ступінь негативної кореляції між оксидативними змінами у мітохондріях і показниками окисного фосфорилування, а також між інтенсифікацією оксидативних процесів у мітохондріях та активністю антиоксидантних ферментів системи глутатіону, рівнем експресії білка та мРНК марганцевої супероксиддисмутази [30]. Це свідчить про ключову роль АФК як у формуванні мітохондріальної дисфункції при гострій гіпоксії, так і в регуляції відповіді антиоксидантних систем на оксидативний стрес.

При застосуванні ІГТ як в експерименті, так і в клінічній практиці, відмічалися різноманітні зміни прооксидантно-антиоксидантного стану мітохондрій різних тканин. В експерименті після ІГТ було показано значне підвищення активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутаза, каталази, глутатіонредуктази в міокарді, в той час як їх підвищення в мозку та печінці було менш вираженим [31, 32]. ІГТ, застосовані у хворих на ішемічну хворобу серця, а також при лікуванні бронхіальної астми у дітей, викликали зниження концентрації продуктів, що реагують на тіобарбітурову кислоту, підвищення активності супероксиддисмутази, каталази

та глутатіонредуктази відносно вихідних значень [33–35].

Введення в режим тренування гіпероксичної компоненти дало змогу досягти більш швидкого позитивного результату [30]. Інтервальні гіпоксично/гіпероксичні тренування (ІГТ) дають можливість підвищувати рівень АФК-сигналу без посилення негативних наслідків прооксидантного впливу [32].

Показано, що на тлі ІГТ підвищується ефективність процесів окисного фосфорилування, знижується гіперактивація марганцевої супероксиддисмутази у мітохондріях міокарда щурів і посилюється експресія білка цього антиоксидантного ферменту після тестової дії гострої гіпоксії [36].

Підсумовуючи вищезгадане, можна зробити висновок, що використання ІГТ і особливо, ІГТ для попередження оксидативних порушень у мітохондріях виявилось ефективним, зокрема таким, що вагомо підвищувало резистентність клітинних структур до впливу гострої гіпоксичної гіпоксії. Їх застосування значно гальмує вплив гострої гіпоксії на розвиток мітохондріальної дисфункції, знижує рівень оксидативних пошкоджень мітохондрій, підвищує потужність ендогенної антиоксидантної системи.

### **Дихальна функція мітохондрій при мітохондріальній дисфункції та за умов адаптації до ІГТ**

Доведено, що дисфункція мітохондріальних ферментів, насамперед мітохондріального ферментного комплексу I, лежить в основі будь-якої форми гіпоксії і є молекулярним механізмом, який визначає енергетичні порушення в умовах обмеження доставки кисню до клітини [7]. Відновлення електронно-транспортної функції дихального ланцюга при гіпоксії – важливе завдання антигіпоксичного захисту, що зумовлює створення антигіпоксичних засобів енерготропної дії.

Відомо, що на внутрішній мембрані мітохондрій локалізуються ферменти синтезу АТФ, системи транспорту іонів, а також пе-

реносники електронів дихального ланцюга, які безпосередньо беруть участь у продукції енергії, необхідної для функціонування клітин. Порівняно недавно виявлено участь мітохондрій у регуляції кальцієвого гомеостазу клітини та підтримання фізіологічно необхідного вмісту цитозольного кальцію [37, 38]. За фізіологічних умов відкриття нещодавно виявлених мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів відбувається при різкому зниженні внутрішньоклітинної концентрації АТФ, наприклад при ішемії [39]. Доведено, що транспорт іонів калію, активований відкриттям калієвих АТФ-каналів – це сильний модулятор основних мітохондріальних функцій: споживання кисню [39, 40], генерації протонного градієнта та трансмембранного потенціалу [41], синтезу [42] та гідролізу АТФ [43], тобто всіх основних характеристик енергетичного стану мітохондрій.

Крім того, показано, що активація аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів ( $K_{\text{АТФ}}$ -каналів) є захисним механізмом від перевантаження мітохондрій іонами кальцію, яке є однією з причин розвитку мітохондріальної дисфункції [44]. Дослідженню ролі мітохондріального АТФ-залежного калієвого каналу в регуляції функціональних характеристик дихального ланцюга мітохондрій при патологічних станах, що супроводжуються розвитком мітохондріальної дисфункції, присвячений цикл робіт співробітників Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

При розвитку експериментальної мітохондріальної дисфункції, викликаній тривалим іммобілізаційним стресом, введенням ротенону чи дією гострої гіпоксичної гіпоксії, знижується швидкість дихання мітохондрій у різних тканинах (печінка, головний мозок, пародонт), що більш істотно проявляється за умов окиснення НАД-залежного субстрату дихального ланцюга –  $\alpha$ -кетоглутарату, тобто спостерігається тенденція до обмеження ролі НАД-залежних субстратів у загальному окисненні [45–47]. Це ще раз підкреслює

положення Лук'янової [7] про те, що саме зі зниження функціонування мітохондрій на субстратній, а не на термінальній ділянці дихального ланцюга, починається порушення утилізації кисню.

При вивченні дії ІГТ на мітохондріальне дихання із застосуванням різних субстратів окиснення [11, 45–47] було показано, що зміни функціонування мітохондрій печінки пов'язані зі підвищенням значення дихального контролю за Чансом та коефіцієнта АДФ/О, збільшенням швидкості дихання мітохондрій у активному метаболічному стані під дією роз'єднувача дихання з фосфорилуванням, зниженням активності сукцинатдегідрогенази. Позитивні зміни спостерігалися впродовж 2 міс після останнього сеансу ІГТ. Ці дані збігаються з результатами нещодавніх робіт [48–50], в яких показано, що періодична гіпобарична гіпоксія значно підвищує стійкість енергетичного метаболізму мітохондрій міокарду до ішемії–реперфузії, аноксії–реоксигенації чи інтенсивного фізичного навантаження.

Важливим регулятором функціонування дихального ланцюга та кальцій-акумуляуючої системи мітохондрій є транспорт іонів калію. Показано, що між змінами кальцій-транспортних характеристик (початкова швидкість накопичення кальцію,  $V_0$  та кальцієва ємність) і вмістом калію в середовищі інкубації спостерігається зворотна залежність: підвищення концентрації калію різко гальмує захват кальцію мітохондріями [51]. Водночас з підвищенням концентрації калію його вхід із середовища в матрикс посилюється. Можна передбачити, що активація транспорту калію в мітохондріальний матрикс при ІГТ забезпечує захисний механізм від перевантаження іонами Са. Зміна активності мітоАТФ-залежних калієвих каналів є важливою ланкою механізму регуляції функціонального стану мітохондрій і супроводжується зниженням негативних наслідків мітохондріальної дисфункції при гіпоксії.

## **Вплив різних режимів інтервальної гіпоксії на оксигенацію тканин і мітохондріальне дихання**

Поширення методів гіпоксичного тренування/лікування в клініці, спортивній і військовій практиці в останні десятиліття викликало жваву дискусію про найбільш ефективні режими ІГТ. Традиційні нормобаричні протоколи включають чергування періодів дихання гіпоксичними газовими сумішами з диханням навколишнім повітрям або гіпероксичними сумішами (30 %  $O_2$ ). Для реалізації різних видів гіпоксичного тренування були розроблені численні пристрої, в тому числі гіпобаричні камери, кімнати зі зниженим вмістом кисню в повітрі, індивідуальні гіпоксикатори, які виробляють гіпоксичне повітря різними способами [52–54]. Гіпоксичні схеми, які використовуються для вивчення адаптації до ІГТ, варіюють у широких межах: від 3–12 коротких гіпоксичних сесій по 2–10 хв з 2–20-хвилинними нормоксичними інтервалами протягом 7–30 діб, до гіпоксичних впливів тривалістю 1–12 год протягом 2–90 діб поспіль. Щоб визначити, який тип режиму є більш плідним, було виконано багато експериментів на тваринах і обстежень людей [55–62].

Найбільш інформативними показниками гіпоксичного впливу на організм є ступінь оксигенації тканин і тканинне дихання. Метою одного з наших досліджень було порівняти ефекти п'яти найбільш поширених режимів гіпоксичного тренування на  $PO_2$  в литковому м'язі щура і з'ясувати, який з них найкраще впливає на мітохондріальне дихання [47].

Виявилось, що найбільш ефективним є режим з 5-хвилинними періодами дихання газовою сумішшю з 12 %  $O_2$ , що перериваються 5-хвилинними інтервалами дихання кімнатним повітрям, 5–6 разів на добу протягом 2- або 3 тиж залежно від мети тренування/лікування. Такий режим призводить до мінімального зниження м'язового  $PO_2$  в кінці кожного гіпоксичного періоду та швидкого відновлення при диханні повітрям. Двотиж-

невий курс ІГТ в цьому режимі підвищив базальну оксигенацію тканин при нормоксії, а також при гострому гіпоксичному тесті (дихання сумішшю з 7 % O<sub>2</sub> протягом 30 хв). Крім того, адаптація до ІГТ за цих умов викликала реорганізацію роботи енергетичного апарату мітохондрій печінки та серця на користь НАД-залежного окиснення субстратів і підвищення ефективності окисного фосфорилування. Позитивні зміни спостерігалися в тканині печінки після 7 діб ІГТ, а у міокарді – після 21 доби і зберігалися протягом 3 міс після закінчення процедури. Ці експериментальні дослідження можуть бути корисними при розробці режимів гіпоксичного тренування для здорових людей різних категорій і пацієнтів з різними захворюваннями.

### **Особливості функціонування глутаматергічної системи респіраторних структур стовбура мозку при мітохондріальній дисфункції та її корекція за допомогою ІГТ**

Зміни енергетичного статусу мітохондрій нейронів стовбура мозку при мітохондріальних дисфункціях викликають особливий інтерес. Існує ймовірність того, що інтенсивність енергопродукції мітохондрій нейронів довгастого мозку може бути безпосередньо пов'язана з регуляцією метаболізму окремих нейротрансмітерів – глутамату та його біохімічного похідного ГАМК, основних збуджувальних і гальмівних агентів, які задіяні в механізмах формування дихального ритмогенезу [63]. Взаємозв'язок подібного роду визначає той факт, що метаболізм глутамату і ГАМК безпосередньо залежить від вмісту продукції макроергів [64]. Вивченню цього питання присвячений цикл робіт Колеснікової [45, 65].

Автор використала модель, яка базується на здатності токсичного агента ротенону викликати блокаду комплексу I дихального ланцюга мітохондрій внаслідок зв'язування з PPST-субодиницею мультиполіпептидного комплексу НАДН-убіхінон редуктази. Було

показано, що дисфункція мітохондрій нейронів стовбурових структур супроводжується зниженням піку та частоти електроміографічної активності діафрагми, а також рівня енергетичного метаболізму нейронів, зокрема, зменшенням швидкості фосфорилування, що врешті-решт визначає зменшення чутливості мозку до гіпоксичної стимуляції. Помірна гіпоксія, якій піддавалися тварини упродовж 30 хв, справляла парадоксальний стимулювальний ефект на швидкість дихання, а також спряження окиснення та фосфорилування. Блокада глутаматних NMDA-рецепторів нейронів стовбура мозку сприяла підвищенню частоти електроміографічної активності, що розглядається як результат скасування участі цих рецепторів та залучення AMPA-рецепторного апарату в механізми роботи центрального генератора ритму дихання. Результати дослідження свідчать про те, що енергетичний статус мітохондрій нейронів стовбура мозку, мабуть, є одним з потенційних тригерів формування респіраторної активності в центральному генераторі ритму за віссю основних нейротрансмітерів – «Глутамат-ГАМК». Застосування ІГТ сприяло оптимізації спряженості процесів окиснення і фосфорилування та ефективності використання кисню в мітохондріях нейронів стовбура мозку, що усуває дисрегуляцію метаболізму основних нейротрансмітерів, які беруть участь у формуванні дихального ритмогенезу.

### **Участь фактора, індукованого гіпоксією, в адаптації організму до ІГТ**

Реакція клітини на нестачу кисню має особливе значення для розуміння патологічних процесів, що відбуваються в організмі. Кілька років тому стало відомо, що найважливішу роль у цих процесах відіграє киснечутливий протеїновий комплекс з транскрипційною активністю – фактор, індукований гіпоксією (HIF). Численні огляди останніх років свідчать про пильну увагу фізіологів, генетиків і клініцистів до цієї проблеми. Ми сконцен-



труємося на деяких останніх повідомленнях про участь HIF у розвитку мітохондріальної дисфункції і вплив на ці процеси періодичної гіпоксії.

HIF є гетеродимерним транскрипційним комплексом, який складається з киснерегульованих  $\alpha$ -субодиниць [HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  або HIF-3 $\alpha$ ] та кисненезалежної  $\beta$ -субодиниці. Якщо HIF-2 $\alpha$  проявляє функціональну подібність до HIF-1 $\alpha$ , який детально досліджений, то про особливості експресії та функціональну роль HIF-3 $\alpha$  в різних тканинах за нормоксичних і гіпоксичних умов відомо дуже мало. Крім того, в літературі здебільшого зустрічаються дані про активацію білків HIF за умов гіпоксії, а відомостей стосовно експресії мРНК різних субодиниць HIF дуже мало.

Нещодавно було показано, що HIF-1 відіграє критичну роль у регуляції продукції вільних радикалів кисню у мітохондріях завдяки різним механізмам: прямим – регуляція біосинтезу та аутофагії мітохондрій, перебування патерна експресії субодиниць цитохром с-оксидази, а також опосередкованим – регуляція експресії піруват дегідрогенази-кінази-1 (PDK-1), яка фосфорилує та інактивує проліл гідроксилази [17]. При дослідженні регуляції мітохондріального метаболізму за допомогою HIF-1 показано, що при гіпоксії та, відповідно, при збільшенні продукції АФК мітохондріями, підвищується експресія HIF-1 $\alpha$  та його генів-мішеней [20, 66].

Отже, з одного боку, HIF-1 спричиняє розвиток клітинної адаптації до гіпоксії за допомогою активного зниження споживання кисню в мітохондріях через дію PDK-1, що за гіпоксичних умов стимулює гліколітичні процеси у клітині та запускає процес аутофагії через BNIP-3 [67, 68]. З іншого боку, HIF-1 впливає на експресію miR-210, що здатна знижувати вираженість апоптозу та регулювати експресію субодиниці цитохром оксидази COX-4, пов'язаної з продукцією АФК, швидкістю споживання кисню та утворенням АФК у мітохондріях. Очевидно, що порушення функціонування системи HIF при різних стрес-

сорних чинниках може викликати розвиток мітохондріальної дисфункції. Проте механізми подібних впливів тільки починають вивчати.

Зокрема, показано, що супресія мітохондріальних генів доксорубіцином впливає на такі енергочутливі молекули, як АТФ-активована протеїнкіназа (АМРК), HIF-1, нуклеарний респіраторний фактор 1 (NRF-1) та проліфератор-активованій рецептор  $\gamma$ -коактиватор-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) [69, 70]. Протеомний аналіз дав змогу показати послідовні зміни протеїнів, що включені в систему енергопродукції та мітохондріального антиоксидантного захисту [71]. Такий аналіз також довів, що при періодичній гіпоксії дуже виразно зростала експресія не менш як 9 протеїнів, які залучаються в мітохондріальний енергетичний метаболізм [49].

У відділі з вивчення гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України на підставі комплексного дослідження розподілу в різних органах щурів матричної РНК усіх субодиниць HIF за нормоксичних та гіпоксичних умов отримано нові дані про зміни кількості мРНК HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$ , HIF-2 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  у різних органах [72–75]. Застосування методу полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі дало можливість уперше встановити значне підвищення рівня експресії мРНК субодиниці HIF-3 $\alpha$  у серці, легенях і нирках щурів при ІГТ.

Для того, щоб пояснити можливу реакцію збільшення експресії мРНК саме субодиниці HIF-3 $\alpha$ , за допомогою сучасної біоінформативної технології було проведено пошук елементів, чутливих до гіпоксії (послідовності HRE – A/GCGTG) у промоторах таких генів щура: EPO, VEGF, IGF-2 (про які вже достеменно відомо, що їх експресія регулюється транскрипційним фактором HIF) та HIF-3 $\alpha$ . Результати пошуку дали змогу припустити, що експресія саме гена HIF-3 $\alpha$  може контролюватися іншими  $\alpha$ -субодиницями HIF. Отже, білки HIF-1 $\alpha$  та HIF-2 $\alpha$  ймовірно стимулюватимуть експресію матричної РНК гена HIF-3 $\alpha$  при гіпоксії.



Таким чином, збільшення експресії мРНК гена HIF-3 $\alpha$  при гострій гіпоксії та ІГТ певною мірою може бути зумовлене наявністю у промоторі цього гена елемента, чутливого до гіпоксії. І це збільшення виступає маркером реакції навіть на помірну гіпоксію з боку системи транскрипційних факторів HIF і мРНК їх гена-мішені еритропоетину. В літературі є нечисленні відомості про те, які молекулярні механізми задіяні в індукції експресії HIF-1 $\alpha$  при періодичній гіпоксії, – це генерація АФК через НАДФН-окисдазу, АФК-залежний кальцієвий сигнальний шлях, який включає активацію фосфоліпази С- $\gamma$  і групи кіназ: протеїнкінази С, mTOR і S6-кінази. В результаті, збільшення mTOR-залежного синтезу HIF-1 $\alpha$  і зменшення пролілігдроксилазалежної HIF-1 $\alpha$  деградації роблять свій внесок в акумуляцію HIF-1 $\alpha$  при інтервальній гіпоксії [76].

Портніченко та співавт. [77, 78] досліджували зміни споживання кисню, температури тіла та експресії генів HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$  в легенях у щурів молодого та зрілого віку, адаптованих до впливу хронічної гіпоксії на висоті 2100 м, та при адаптації до періодичної гіпоксії у барокамері. Виділено чотири фази фізіологічних змін при дії ІГТ. Перша фаза, гіпометаболічна (1–3 сеанси), характеризується зниженням споживання кисню та температури тіла, індукцією HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$ . У другій, перехідній фазі (3–4 сеанси) відбувається перебудовується метаболізм і знижується гіпоксична реактивність. Третя фаза, гіперметаболічна (4–5 сеанси), характеризується посиленням енергетичного метаболізму і компенсацією гіпоксичних порушень. Четверта фаза (після 5-го сеансу) – це стан метаболічної адаптації з нормалізацією споживання кисню та температури тіла, експресії HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$ , мітохондріального дихання, підвищенням окиснення НАД-залежних вуглеводних і ліпідних субстратів. ІГТ призводили до транскрипційної активації гена HIF-1 $\alpha$  в легенях і сприяли швидкому відновленню метаболізму у 6-місячних щурів. У 12-місячних тварин спостерігали фор-

мування HIF-3 $\alpha$ -опосередкованих захисних механізмів у легенях і повільне відновлення метаболічних процесів.

Встановлені закономірності реакції різних субодиниць HIF на гостру та інтервальну гіпоксію можуть мати значення при виборі протоколів ІГТ для профілактики та лікування різних хвороб, а також при тренуванні спортсменів. Крім того, нові дані щодо функцій HIF в енергетичному метаболізмі (з огляду на органоспецифічність) з'ясовують можливість фармакологічного регулювання системи HIF як нового терапевтичного підходу до лікування багатьох хвороб, включаючи рак, діабет, жирову дистрофію печінки тощо [20].

Таким чином, розкриття молекулярних, генетично детермінованих механізмів адаптації до періодичної гіпоксії є фундаментальним аспектом фізіології і патофізіології та може слугувати потенційно новим терапевтичним підходом до лікування хвороб людини, пов'язаних з дією хронічної гіпоксії різного генезу. Проведені дослідження дозволили встановити закономірності розвитку мітохондріальної дисфункції у різних тканинах тварин і людини та їх зв'язок з порушеннями системних, тканинних, клітинних та генетичних механізмів доставки та утилізації кисню в мітохондріях. Це дає підґрунтя для подальшого удосконалення методів ІГТ з урахуванням індивідуальних особливостей організму кожного пацієнта.

**И.Н. Маньковская, Т.В. Серебровская**

### **МИТОХОНДРИИ КАК МИШЕНЬ ИНТЕРВАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ**

В обзоре рассматриваются механизмы влияния интервальной гипоксической тренировки (ИГТ) на структуру и функции митохондрий в сравнении с действием острой гипоксии. Показано, что острая гипоксия вызывает набухание митохондрий, вакуолизацию органелл, дезорганизацию и деструкцию митохондриальных мембран. При воздействии ИГТ увеличивается общее количество митохондрий и уменьшается количество структурно измененных органелл, появляются энергетически активные митохондрии с везикулярными кристами, происходит образование

микромитохондрий. Одним из ключевых механизмов повреждения клеток при гипоксии и реоксигенации является чрезмерное производство активных форм кислорода (АФК) в митохондриях, которые окисляют белки, липиды и ДНК. С другой стороны, низкое содержание продукции АФК является защитным и служит в качестве триггера для адаптивных реакций. ИГТ перепрограммирует метаболизм митохондрий, обеспечивая адекватную продукцию АТФ. Активация транспорта калия в митохондриальный матрикс при ИГТ является защитным механизмом от перегрузки ионами Са, вызванного острой гипоксией. Интенсивность энергопродукции митохондриальных нейронов непосредственно связана с регуляцией метаболизма нейротрансмиттеров – глутамата и ГАМК, которые, в частности, задействованы в механизмах формирования дыхательного ритмогенеза. Применение ИГТ способствует оптимизации этих процессов. Все реакции адаптации к ИГТ обусловлены факторами, индуцируемыми гипоксией: HIF-1, HIF-2, HIF-3, обладающими транскрипционной активностью. Каждая из HIF-субъединиц играет свою роль в зависимости от режима гипоксической нагрузки. Установленные закономерности могут иметь значение при выборе режимов ИГТ для профилактики и лечения различных болезней. Новые данные об органоспецифичности функций HIF дают потенциальную возможность фармакологического регулирования системы HIF в качестве нового терапевтического подхода к лечению заболеваний. Ключевые слова: митохондриальная дисфункция, интервальная гипоксия, морфология митохондрий, свободнорадикальные процессы, глутаматергическая система, фактор, индуцируемый гипоксией.

**I.M. Mankovska, T.V. Serebrovska**

### **MITOCHONDRIA AS A TARGET OF INTERMITTENT HYPOXIA**

Mitochondria (Mt) play a key role in the physiology and pathology of humans and animals. Signaling from Mt has divergent physiological and pathophysiological consequences. Critical lack of oxygen causes Mt dysfunction, while adaptation to intermittent hypoxia training (IHT) leads to positive changes in Mt. The focus of this review is to summarize the current knowledge about the mechanisms of IHT impact on Mt structure and functions in compare with the effects of acute hypoxia (AH). It was shown that AH causes mitochondrial swelling, vacuolization of organelles, disorganization and destruction of Mt membranes. When exposed to IHT, the increase in the total number of Mt, the reduction of the number of structurally modified organelles, the appearance of energetically active Mt with vesicular cristae, the microMt formation are observed. AH is associated with oxidative damage, calcium dyshomeostasis, defective ATP synthesis, or induction of the permeability transition pore. Under IHT, the low level of ROS production is protective and serves as a trigger for adaptive responses. IHT leads to reprogramming of Mt metabolism, providing adequate ATP production.

Activation of potassium transport in the Mt matrix during IHT is a protective mechanism against Ca<sup>2+</sup> overload caused by AH. Mt energy production in brainstem neurons is directly related to the regulation of neurotransmitters - glutamate and GABA which involved in the respiratory rhythmogenesis formation. All adaptive reactions to hypoxia are regulated by HIF-factors (HIF-1, HIF-2, HIF-3). Each of HIF-subunits plays a certain role depending on the mode of hypoxic stress. These peculiarities can be important when choosing a mode of IHT for the prevention and treatment of various diseases. New data about the HIF organ specificity provide potential pharmacological regulation of HIFs as a new therapeutic tool. Key words: mitochondrial dysfunction, intermittent hypoxia, morphology of mitochondria, free radical processes, glutamatergic system, HIF.

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

### **REFERENCES**

1. Bolisetty S, Jaimes EA. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2013;14(3):6306-44.
2. Smith RA, Hartley RC, Cocheme HM, Murphy MP. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(6):341-52.
3. Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Suski JM, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion*. 2012;12(1):77-85.
4. Ylikallio E, Suomalainen A. Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann Med*. 2012;44(1):41-59.
5. Cooper A, Laluzza-Fox C, Anderson S, Rambaut A, Austin J, Ward R. Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature*. 2001;409(6821): 704-7.
6. Sheu SS, Dirksen RT, Pugh EN. The 65th Symposium of the Society for General Physiologists: Energizing research in mitochondrial physiology and medicine. *J Gen Physiol*. 2011; 138(6):563-67.
7. Lukyanova LD, Kirova Yu I, and Germanova EL. Energotropic Effects of Intermittent Hypoxia: Role of Succinate-Dependent Signaling. In: Lei Xi & Tatiana V. Serebrovska (Eds). *Intermittent Hypoxia and Human Diseases 2012*; Springer, UK, Chapter 20: 239-52.
8. Vladimirov JuA. Deregulation of mitochondrial membrane permeability, necrosis and apoptosis. *Deregulation pathology: A guide for doctors and biologists* (ed. GN Kryzhanovsky). M.: Medicine. 2002; 127-56.
9. Cadenas E, Boveris A. Mitochondrial free radical production, antioxidant defenses and cell signaling. *The Handbook of Environmental Chemistry*. 2005;2(O):219-34.
10. Sazontova TG, Anchishkina NA, Zhukova AG, Bedareva IV, Pylaeva EA, Kriventsova NA, Polianskaia AA, Iurasov AR, Arkhipenko IuV. [Reactive oxygen species and redox-signaling during adaptation to changes of oxygen

- level]. *Fiziol Zh.* 2008;54(2):18-32. Review. [Russian].
11. Mankovska IM, Gavenauskas BL, Nosar VI, Nazarenko AI, Rozova KV, Bratus LV. Mechanisms of muscle tissue adaptation to load hypoxia under intermittent hypoxia. *Sports medicine.* 2005; 1: 3-11. [Ukrainian].
  12. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing *Cell Metab.* 2005;1:401-08.
  13. Yin F, Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial energy metabolism and redox signaling in brain aging and neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(2):353-71.
  14. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757(5-6):509-17.
  15. Chandel NS. Mitochondria as signaling organelles *BMC Biol.* 2014;12(1): 34-40.
  16. Nanduri J, Vang N, Yuan G, Khan SA, Souvannakitti D, Peng YJ, Kumar GK, Garcia JA, Prabhakar NR. Intermittent hypoxia degrades HIF-2 via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:1199-1204.
  17. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev.* 2012;92: 967-1003.
  18. Xi L, Serebrovskaya TV (Eds). *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications.* Nova Science Publishers NY. 2009; 602 pp.
  19. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148(3):399-408.
  20. Goda N, Kanai M. Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. *Int J Hematol.* 2012;95:457-63.
  21. Serebrovskaya TV, Manukhina EB, Smith ML, Downey HF, and Mallet RT. Intermittent Hypoxia: Cause of or Therapy for Systemic Hypertension? *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233(6):627-50.
  22. Zhong N, Zhang Y, Zhu H.F, Zhou ZN. Intermittent hypoxia exposure prevents mtDNA deletion and mitochondrial structure damage produced by ischemia/reperfusion injury. *Scheng Li Xue Bao.* 2000;52(5):375-80.
  23. Rozova KV, Trepatskaya TV. Ultrastructural features of destruction and morphogenesis of mitochondria in body tissues during hypoxia of different genesis. In: *Challenges, achievements and prospects of life sciences development and health care practice. Proceedings of SI Georgievski Crimean state medical university.* 2006; 142 (III): 126-9.
  24. Rozova KV. Effect of normo- and hypobaric hypoxia on ultrastructure of the lung and myocardial tissue. *Fiziol Zh.* 2008;54(2):63-8. Ukrainian.
  25. Gonchar OA, Rozova EV. Effects of different modes of interval hypoxic training on morphological characteristics and antioxidant status of heart and lung tissues. *Bull Exp Biol Med.* 2007 Aug;144(2):249-52. Russian.
  26. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Autophagy in ischemic heart disease. *Circ Res.* 2009;104:150-8.
  27. Semenza GL. Life with oxygen. *Science.* 2007;318:62-4.
  28. Skulachev VP. New data on biochemical mechanism of programmed senescence of organisms and antioxidant defense of mitochondria. *Biochemistry,* 2009;74(12): 1400-03.
  29. Gonchar O, Mankovska I. Moderate hypoxia/hyperoxia attenuates acute hypoxia-induced oxidative damage and improves antioxidant defense in lung mitochondria. *Acta Physiol Hungarica.* 2012; 99(4): 436-46.
  30. Steshenko MM. Changes in prooxidant-antioxidant balance and functional state of rat myocardium mitochondria during acute hypoxia and means for their prevention. Ph.D. thesis. Kyiv. 2012; 24 pp.
  31. Arkhipenko YuV, Sazontova TG, Zhukova AG. Adaptation to periodic hypoxia and hyperoxia improves resistance of membrane structures in heart, liver, and brain. *Bull Exp Biol Med.* 2005;140 (3):278-81.
  32. Sazontova TG, Arkhipenko YuV. Intermittent hypoxia in resistance of cardiac membrane structures: role of reactive oxygen species and redox signaling. In: *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications (Eds: Lei Xi, Serebrovskaya Tatiana V).* Nova Science Publishers NY. 2009; Chapter 5: 113-50.
  33. El'chaninova SA, Smagina IV, Koreniak NA, Varshavskii Bla. The influence of interval hypoxic training on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity. *Fiziol Cheloveka.* 2003 May-Jun;29(3):72-5. [Russian].
  34. Kalachev AG, Elchaninova SA, Filippova AG. Using of long hypoxic training for secondary prevention of coronary heart disease. *Bulletin arrhythmology.* 2004; 35: 30-1. [Russian].
  35. Serebrovskaya TV, Nesvitailova KV, Bakunovsky AN, and Mankovska IN. Intermittent Hypoxia in Treatment of Bronchial Asthma in Childhood. In: *Lei Xi, Serebrovskaya Tatiana V (Eds). Intermittent Hypoxia and Human Diseases / Springer, UK.* 2012; Chapter 11: 235-46.
  36. Steshenko MM, Gonchar OO, Mankovska MI. Mitochondrial oxidative violations during hypoxia and its correction by means of interval hypoxic-hyperoxic training. *Exper & Clin Physiol and Biochem.* 2010; (1): 12-17. [Ukrainian].
  37. Mironova GD, Kachaeva EV, Kopylov AT. Mitochondrial ATP-dependent potassium channel. 1. The structure of the channel, the mechanisms of its functioning and regulation]. *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 2007;(2):34-43. [Russian].
  38. Akopova OV, Kolchinskaya LI, Nosar VI, Smirnov AN, Malysheva MK, Mankovska IN, Sagach VF. The effect of permeability transition pore opening on reactive oxygen species production in rat brain mitochondria. *Укр біохім журн.* 2011;83(6): 46-55.
  39. Dzeja PP, Holmuchaamedov EL, Ozcan C, Pucar D, Jahangir A, Terzic A. Mitochondria: gateway for cytoprotection. *Circ Res.* 2000; 89 (9): 744-46.

40. Facundo HT, Fornazari M, Kowaltowski AJ. Tissue protection mediated by mitochondrial K<sup>+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1762: 202-12.
41. Czyz A, Szewczyk A, Nałecz MJ, Wojtczak L. (). The role of mitochondrial potassium fluxes in controlling the protonmotive force in energized mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;210(1):98-104.
42. Holmuchamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers prevent Ca<sup>2+</sup> overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol*. 1999;519(2): 347-62.
43. Cancherini DV, Trabuco LG, Reboucas NA, Kowaltowski AJ. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in renal mitochondria. *Am J Physiol*. 2003;285: F1291-6.
44. Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, Gross GJ. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial KATP channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol*. 2000;278, H305-12.
45. Kolesnikova EE, Nosar VI, Mankovskaya IN. The role of glutamate in the mechanisms of adaptation of rat control breathing system to intermittent hypoxia. *Neurophysiology*. 2009; 41 (2): 183-91.
46. Opanasenko HB, Bratus' LV, Havenauskas BL, Honchar OO, Man'kovs'ka IM, Nosar VI, Frantsuzova SB. Disturbances of oxygen-dependent processes in periodontal tissues under prolonged immobilization stress and ways of their pharmacological correction]. *Fiziol Zh*. 2013;59(1):17-24. [Ukrainian].
47. Serebrovskaya TV, Nosar VI, Bratus LV, Gavenauskas BL, Mankovska IM. Tissue oxygenation and mitochondrial respiration under different modes of intermittent hypoxia. *High Alt Med Biol*. 2013;14(3):280-8.
48. Wang ZH, Cai XL, Wu L, Yu Z, Liu JL, Zhou ZN, Liu J, Yang HT. Mitochondrial energy metabolism plays a critical role in the cardioprotection afforded by intermittent hypobaric hypoxia. *Exp Physiol*. 2012;97(10): 1005-18.
49. Magalhaes J, Falcao-Pires I, Goncalves IO, Lumini-Oliveira J, Marques-Aleixo I, dos Passos E, Rocha-Rodrigues S, Machado NG, Moreira AC, Miranda-Silva D, Moura C, Leite-Moreira AF, Oliveira PJ, Torrella JR, Ascensao A. Synergistic impact of endurance training and intermittent hypobaric hypoxia on cardiac function and mitochondrial energetic and signaling. *Int J Cardiol*. 2013; 168:5363-71.
50. Magalhaes J, Goncalves IO, Lumini-Oliveira J, Marques-Aleixo I, dos Passos E, Rocha-Rodrigues S, Machado NG, Moreira AC, Rizo D, Viscor G, Oliveira PJ, Torrella JR, Ascensao A. Modulation of cardiac mitochondrial permeability transition and apoptotic signaling by endurance training and intermittent hypobaric hypoxia. *Int J Cardiol*. 2014, 15;173(1):40-5.
51. Akopova OV, Nosar VI, Bouryi VA, Mankovskaya IN, and Sagach VF. Influence of ATP-Dependent K<sup>+</sup>-Channel Opener on K<sup>+</sup>-Cycle and Oxygen Consumption in Rat Liver Mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*. 2010;75(9): 1139-47.
52. Zieliński J. Effects of intermittent hypoxia on pulmonary haemodynamics: animal models versus studies in humans. *Eur Respir J*. 2005;25(1):173-80.
53. Mateika J.H., Sandhu K.S. Experimental protocols and preparations to study respiratory long term facilitation. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;176(1-2):1-11.
54. Lopata VA, Serebrovskaya TV. Hypoxicators: Review of the Operating Principles and Constructions. In: Lei Xi & Tatiana V. Serebrovskaya (Eds). *Intermittent Hypoxia and Human Diseases* /Springer, UK. 2012; Chapter 24: 291-302.
55. Fagan KA. Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia. Selected contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. *J Appl Physiol*. 2001;90:2502-07.
56. Lin AM, Chen CF, Ho LT. Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron-induced oxidative injury in rat brain. *Exp Neurol*. 2002;176(2):328-35.
57. Neckár J, Papousek F, Nováková O, Ost'ádal B, Kolár F. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol*. 2002;97(2):161-67.
58. Zong P, Setty S, Sun W, Martinez R, Tune JD, Ehrenburg IV, Tkatchouk EN, Mallet RT, Downey HF. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(8):806-12.
59. Vavilova HL, Serebrovs'ka TV, Rudyk OV, Bielikova MV, Kolesnikova IE, Kukoba TV, Sahach VF. Effect of the hypoxia training on the sensitivity of phenylarsineoxide-induced mitochondrial permeability transition pore opening in the rat heart. *Fiziol Zh*. 2005;51(4):3-12.
60. Naryzhnaia NV, Neckar J, Maslov LN, Lishmanov IuB, Kolar F, Lasukova TV. The role of sarcolemmal and mitochondrial K(ATP)-channels in realization of the cardioprotection and antiarrhythmic effect of different regimens of hypobaric adaptation. *Russ Fiziol Zh im IM Sechenova*. 2009;95(8):837-49.
61. Manukhina EB, Jasti D, Vanin AF, Downey HF. Intermittent hypoxia conditioning prevents endothelial dysfunction and improves nitric oxide storage in spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236(7):867-73.
62. Rozova K, Gonchar O, Mankovska I. Benefits and Risks of Different Regimen of Intermittent Hypoxic Training. In: Lei Xi & Tatiana V. Serebrovskaya (Eds). *Intermittent Hypoxia and Human Diseases*. Springer, UK. 2012;Chapter 22:273-80.
63. Bianchi L, Denavit-Saubie M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev*. 1995;75: 1-45.
64. Madl J E, Royer S M. Glutamate dependence of GABA levels in neurons of hypoxic and hypoglycemic rat hippocampal slices. *Neurosci*. 2000; 96(4):657-64.
65. Kolesnikova E É, Nosar' VI, Man'kovskaya I N, Serebrovskaya T V Role of Glutamate NMDA Receptors in the Control of Respiration in Mitochondrial Dysfunction in Brainstem Neurons. *Neurophysiology*. 2012; 44 (2): 98-105.
66. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 alpha. *Cell*



- Death Differ. 2008; 15:621.
67. Kim JW, Tchernyshov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006;3:177-85.
  68. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2008;283:10892-903.
  69. Fernandez-Markos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(4): S 884-90.
  70. Montaigne D, Hurt C, Neviere R. Mitochondria death/survival signaling pathways in cardiotoxicity induced by anthracyclines and anticancer-targeted therapies. *Biochem Res. Int.* 2012; 951539.
  71. Stěrba M, Popelová O, Lenčo J, Fučíková A, Brčáková E, Mazurová Y, Jirkovský E, Simůnek T, Adamcová M, Mičuda S, Stulík J, Geršl V. Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(5):849-62.
  72. Drevitska T, Dosenko V, Nagibin V, Mankovska I. HIF-1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , HIF3 $\alpha$  and HIF1 $\beta$  mRNA expression changes in different tissues under intermittent hypoxic training/ In: *Intermittent Hypoxia. From Molecular Mechanisms to Clinical Applications.* Eds: Lei Xi & Tatiana V. Serebrowskaya/ Nova Science Publishers. 2009;Chapter 21: 419-36.
  73. Drevytska T, Gavenauskas B, Drozdovska S, Nosar V, Dosenko V, Mankovska I. HIF-3 $\alpha$  mRNA expression changes in different tissues and their role in adaptation to intermittent hypoxia and physical exercise. *Pathophysiology.* 2012; 19 (3):205-14.
  74. Mankovska IM, Drevitska TI, Dosenko VE. Role of mRNA Expression of Hypoxia Inducible Factor Subunits in Adaptation to Hypoxia. In: *Adaptation Biology and Medicine (Vol.6: Cell Adaptations and Challenges).* Eds: P.Wang et al. Narosa Publishing House. 2011; 279-92.
  75. Drevytska T, Gavenauskas B, Drozdovska S, Nosar V, Dosenko V, Mankovska I. HIF-3 $\alpha$  mRNA expression changes in different tissues and their role in adaptation to intermittent hypoxia and physical exercise. *Pathophysiology.* 2012;19(3):205-14.
  76. Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1 expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca<sup>2+</sup>-signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol.* 2008;217:674-85.
  77. Portnichenko VI, Portnychenko AG, Dosenko VE, Sidorenko AM. Expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  in the lungs and metabolic changes during intermittent hypoxia in rats of different ages. *Achievements Clin Exper Med.* 2010; 2: 3-8.
  78. Portnichenko VI, Nosar VI, Portnichenko AG, Drevitskaia TI, Sidorenko AM, Man'kovskaia IN. Phase changes in energy metabolism during periodic hypoxia. *Fiziol Zh.* 2012;58(4):3-12. [Russian].

*Матеріал надійшов  
до редакції 02.09.2014*



## ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ



**Олександр Григорович Резніков**  
(до 75-річчя з дня народження)

12 листопада 2014 р. виповнилося 75 років з дня народження завідувача відділу ендокринології репродукції та адаптації ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України”, доктора медичних наук, професора, члена-кореспондента НАН України, академіка НАМН України, заслуженого діяча науки і техніки України Олександра Григоровича Резнікова.

О.Г. Резніков у 1962 р. закінчив з відзнакою лікувальний факультет Одеського медичного інституту і протягом наступних 1962–1965 рр. працював головним лікарем Сухо-Єланецької лікарні у Николаївській області. У 1965 р. він захистив кандидатську дисертацію, а в 1974 р. – докторську, в якій було узагальнено результати досліджень, присвячених створенню, аналізу механізму дії та впровадженню в медичну практику препарату “Хлодитан” і його аналогів – засобів лікування раку кори надниркових залоз і хвороби Іценка–Кушінга.

Від 1965 р. і до сьогодні наукова діяльність Олександра Григоровича пов’язана

з ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”. З 1973 р. він керував організованою ним лабораторією нейрогормональної регуляції розмноження, а з 1991 р. очолив відділ ендокринології репродукції та адаптації.

О.Г. Резніков – відомий у світі вчений-патофізіолог, учень члена-кореспондента АМН СРСР М.Н. Зайка і академіка В.П. Комісаренка. Головними напрямками його наукової діяльності є фундаментальні та прикладні проблеми фізіології та патофізіології ендокринної системи, нейроендокринологія, патогенез ендокринних і гормонзалежних захворювань, ендокринна фармакологія.

У кожному з цих напрямів О.Г. Резніков здобув вагомні наукові результати, що збагатили світову науку й отримали визнання в СНД і за кордоном. Уперше в СНД він започаткував роботу із дослідження та створення антиандрогенних засобів для лікування раку передміхурової залози та гіперандрогенних станів у жінок, є одним із засновників нової галузі патофізіології – функціональної нейротератології, автором теорії гормон-медіаторного імпринтингу мозку. Він обґрунтував новий напрям медицини – превентивну нейроендокринологію, запропонував нові методи діагностики та лікування ендокринних і онкологічних захворювань. В останні роки вчений активно працює в галузі нанотехнології.

Наукові розробки О.Г. Резнікова викладено у 560 працях, серед них 25 монографій, 6 підручників із патофізіології та ендокринології. Він є автором 20 винаходів. Під його керівництвом підготовлено й успішно захищено 8 докторських і 24 кандидатських дисертацій.

О.Г. Резнікова відрізняє висока ерудиція та професіоналізм, організаторський і педагогічний талант, широкий світогляд та творча натхненність. Протягом 25 років (1975–1999) він керував Міжнародним центром з репродукції людини ВООЗ. На запрошення працював в університетах США і Канади, зміцнюючи авторитет України у світовій науці.

Як визнаний учений і талановитий громадський діяч та організатор науки протягом багатьох років Олександр Григорович був головою проблемної комісії МОЗ і АМН України “Патологічна фізіологія та імунологія”, а також членом наукових рад з фізіології вісцеральних систем АН СРСР і АМН СРСР, заступником голови експертної ради ВАК України, заступником голови Комісії з питань біоетики при Кабінеті міністрів України, засновником і першим головою правління Асоціації репродуктивної медицини України. Нині Олександр Григорович – член бюро Відділення біохімії, фізіології та молекулярної біології НАН України, редколегій багатьох наукових журналів, співголовою постійного семінару “Молекулярна медицина” НАН України та НАМН України. Його обрано почесним членом Міжнародного товариства

нейроендокринологів та інших Міжнародних товариств, віце-президентом Наукового товариства патофізіологів України, головою Київського обласного товариства патофізіологів.

Наукові здобутки О.Г. Резнікова відзначено Державною премією УРСР, відзнакою НАН України “За наукові досягнення”, премією ім. О.О. Богомольця, премією ім. В.П. Комісаренка НАН України, медаллю ім. В.В. Підвисоцького НАН України, медаллю ім. В.Я. Данилевського, преміями з теоретичної медицини НАМН України, Почесними грамотами Кабінету міністрів, Президій НАН України і НАМН України, МОЗ України.

Щиро вітаємо вельмишановного Олександра Григоровича з ювілеєм і бажаємо міцного здоров'я, творчої наснаги та успіхів у реалізації творчих задумів.



**Микола Юхимович Макарчук**  
(до 60-річчя з дня народження)

Макарчук Микола Юхимович – талановитий учений і педагог, доктор біологічних наук, професор, академік Академії наук вищої школи України народився 1 жовтня 1954 р. у мальовничому поліському краї на Житомирщині. По закінченні біологічного факультету Київського державного університету ім. Т.Г. Шевченка у 1977 р. він вступає до аспірантури при кафедрі фізіології людини і тварин, де під науковим керівництвом академіка П.Г. Богача виконує і у 1981 р. успішно захищає кандидатську дисертацію на тему «Функціональне значення різних груп та окремих ядер мигдалеподібного комплексу в умовно-рефлекторній діяльності щурів».

З 1980 р. М.Ю. Макарчук працює на посаді асистента кафедри фізіології людини і тварин Київського державного університету ім. Т.Г. Шевченка, а з 1981 р. по 1995 рр. – наукового співробітника Інституту фізіології університету. У цей період він присвячує свою наукову діяльність з'ясуванню ролі сенсорних систем, зокрема нюхового аналізатора, та різних видів стресу у поведінці людини і тварин. Микола Юхимович не полишає і викладацьку роботу на кафедрі,

він читає лекції (на загальних засадах) студентам університету. У 1995 р. М.Ю. Макарчука запрошують на посаду доцента кафедри фізіології людини і тварин університету, а з 1999 р. його обирають завідувачем кафедри. Логічним підсумком його більш ніж 20-річної наукової діяльності є написання та блискучий захист у 1999 р. докторської дисертації «Роль нюхового аналізатора в інтегративній діяльності мозку». У 2000 р. М.Ю. Макарчук отримує вчене звання професор.

На основі багаторічних експериментальних досліджень нюхового аналізатора у людини і тварин професором М.Ю. Макарчуком сформульована оригінальна концепція про те, що нюхова система крім виконання чисто сенсорних функцій – вкрай важлива ланка емоціогенної системи мозку, яка через свої несенсорні механізми, що пов'язані з диханням і генерацією в нюхових структурах високоамплітудної і високочастотної активності, є однією з головних систем активації кіркових структур переднього мозку.

Організаторські здібності Миколи Юхимовича не залишилися не поміченими керівництвом університету – з 2001 р. і по нинішній час він є директором (за сумісництвом) НДІ фізіології імені академіка Петра Богача КНУ. Він очолює наукову школу світового рівня «Психофізіологічні основи діяльності людини».

У творчому доробку М.Ю. Макарчука понад 330 наукових і навчальних праць, серед яких 3 монографії, підручник і 2 навчальні посібники з грифом МОНМС, зокрема: «Обоняние и поведение». К., 2000; «Основні поняття і визначення з курсу фізіології людини і тварин». К., 2003; «Teaching physiology is possible without killing» //From guinea pig to computer mouse. InterNICHE, England, 2003; «Фізіологія центральної нервової системи». К., 2011; «Психофізіологія». К., 2011.

Великий внесок М.Ю. Макарчука у підготовці та атестації науково-педагогічних кадрів вищої кваліфікації. Під його керівництвом захищено 15 кандидатських і 1 докторська дисертації. Він є заступником

голови спеціалізованої вченої ради із захисту кандидатських і докторських дисертацій – за спеціальністю “фізіологія людини і тварин” у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка та членом ще двох рад: в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України – за спеціальністю “фізіологія людини і тварин” та у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка – за спеціальністю «загальна психологія, історія психології». Постійно виступає офіційним опонентом дисертаційних робіт.

М.Ю. Макарчук – член учених рад університету та ННЦ «Інститут біології», академік-секретар відділення біології і хімії Академії наук вищої школи України.

Микола Юхимович знаний фахівець у галузі фізіології, що користується заслуженим авторитетом світової науково-педагогічної спільноти: є членом міжнародної організації «За гуманну освіту» InterNICHE і міжнародної комісії «Інновації та альтернативи при вивченні фармакології та фізіології в університетах Східної Європи». За вагомих внесок у розвиток фізіологічної науки та підготовку висококваліфікованих науково-педагогічних кадрів М.Ю. Макарчука нагороджено орденом «За заслуги» III ступеня (2009). Він – лауреат нагороди Ярослава Мудрого АН ВШ України (2007) та відмінник освіти України.

Бажаємо ювілярові доброго здоров'я, щастя, радості, наснаги та творчих успіхів.

## VI пленум наукового товариства патофізіологів України

23–25 вересня 2014 р. в м. Вінниця на базі Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова відбувся VI пленум наукового товариства патофізіологів України та науково-практична конференція за участю міжнародних спеціалістів «Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології» (місце проведення Пленуму – ДП клінічний санаторій «Хмільник»). В організації пленуму взяли участь співробітники Національної академії наук України, Національної академії медичних наук України, Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

На пленум прибули 57 делегатів з 14 областей України, в тому числі ректори медичних вищих навчальних закладів, завідувачі кафедр, голови обласних патофізіологічних товариств, провідні спеціалісти кафедр медичних вищих навчальних закладів, науково-дослідних інститутів та установ. Серед присутніх були 6 академіків НАНУ та НАМНУ, 2 члени-кореспонденти НАНУ та НАМНУ, 29 докторів наук, 14 кандидатів наук та 8 делегатів без вченого ступеня.

Делегати заслухали та обговорили 29 усних і стендових доповідей, які були представлені на пленарному та наукових засіданнях: «Молекулярно-генетичні аспекти патофізіології»; «Запалення: механізми розвитку»; «Загальні питання патофізіології», а також на науково-практичній конференції «Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології».

Крім того, було проведено засідання круглого столу з актуальних проблем викладання патофізіології у вищих наукових закладах України.

У пленарній доповіді президента наукового товариства патофізіологів України акад. НАНУ О.О. Мойбенка «Активаційні та гальмівні механізми у патогенезі захворювань серця» були представлені нові уявлення щодо ролі активаційних впливів (стрес, збудження симпатичної нервової системи, гіперадренергічні впливи) як факторів пошкодження серця і гальмівних впливів як кардіопротективних.

Серед останніх підкреслено значення системи мікроРНК у захисті серця. Запропоновано низку інгібіторів ферментів для кардіопротекції, які можливо використовувати в клінічній практиці.

Привернула увагу доповідь віце-президента НТПУ акад. НАМНУ, чл.-кор. НАНУ О.Г. Резнікова «Патогенетична роль андрогенного чинника у розладах здоров'я», в якій висвітлена роль взаємозв'язку андрогенного статусу організму і таких порушень як серцево-судинні ускладнення, ризик гормонзалежних новоутворень, атерогенні зсуви.

Великий інтерес викликав виступ чл.-кор. НАНУ В.Ф. Сагача «Газотрансмітери, мітохондрії та функціональні порушення серцево-судинної системи», в якій були висвітлені ключові питання, пов'язані з функцією мітохондрій та роль газотрансмітерів (оксиду азоту, оксиду вуглецю, сірководню). Отримані нові дані відносно участі сірководню в патогенезі захворювань серця.

На високому рівні була представлена доповідь д.м.н., проф. В.Є. Досенка про роль протеасомного протеолізу та системи транскрипційного фактора SREBP у патогенезі атеросклерозу у щурів зі спонтанною гіпертензією.

З надзвичайною увагою була заслухана доповідь зав. каф. патофізіології Кримського



державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського д.м.н., проф. А.В. Кубишкіна щодо VII Міжнародного конгресу з патофізіології, який відбувся 4–7 вересня 2014 р. у м. Рабат (Марокко), де він брав активну участь і був обраний в керівні органи International Society for Pathophysiology.

Доповіді з питань механізмів розвитку найпоширеніших захворювань серцево-судинної, дихальної, нервової, імунної та травної систем зробили провідні вчені України: проф. Т.В. Дегтяренко, проф. М.О. Клименко, проф. О.В. Ніколаєва, д.м.н. Н.А. Рикало, д.м.н. А.Г. Портниченко, д.м.н. Р.С. Вастьянов, д.м.н. Сілкина Ю.В. та ін.

Висновком роботи круглого столу з питань педагогіки було підняти рівень наукових досліджень на кафедрах патофізіології України, оприлюднювати результати цих досліджень у наукових виданнях, що індексуються базами SCOPUS і Web Of Science, а також Науковому товариству патофізіологів України стати одним із засновників електронного наукового видання «Загальна та клінічна патофізіологія».

Пленум постановив провести наступний Конгрес Наукового товариства патофізіологів України у 2016 році у м. Харків на базі кафедри патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету за участю кафедри патофізіології Харківського медичного державного університету та кафедри патофізіології Харківської медичної академії післядипломної освіти.

Були відзначені змістовні та прекрасно

ілюстровані стендові та усні доповіді: Рикало Н.А., Гумінська О.Ю., Полінкевич С.Г., Яровенко Л.О. «Патологічні зміни печінки статевозрілих щурів при хронічних токсичних гепатитах різної етіології»; Рикало Н.А., Яровенко Л.О., Шемет В.С., Шиманський А.О. «Вікові особливості біохімічних та морфологічних змін при хронічній алкогольній інтоксикації у щурів»; Секрет Т.В. «Визначення рівня лептину у хворих з первинним ожирінням та компонентами метаболічного синдрому»; Нагібін В.С., Пашевін Д.О., Тумановська Л.В., Досенко В.Є., Мойбенко О.О. «Вплив інгібування протеасомного протеолізу на виділення ДНК з ізольованих нейтрофілів щура під час формування нейтрофільних позаклітинних пасток»; Янчій Р.І., Литвиненко А.П., Шепель О.А., Вознесенська Т.Ю., Грушка Н.Г., Макогон Н.В., Бризгіна Т.М., Павлович С.І., Мартинова Т.В., Блашків Т.В. «Порушення репродуктивної функції самиць мишей за умов експериментального системного імунокомплексного ушкодження».

Матеріали пленуму опубліковані в журналі «Вісник морфології», 2014, Т.20, №2 і «Вісник Вінницького національного медичного університету», 2014, Т.18, №2.

Оргкомітет висловлює щиро подяку організаторам пленуму, особливо ректору Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова Герою України, професору В.М. Морозу, завідувачу кафедри патофізіології д.м.н., доц. Н.А. Рикало та співробітникам кафедри патофізіології, які доклали великих зусиль щодо його проведення.

Президент Наукового товариства  
патофізіологів України  
академік НАН України О.О. Мойбенко

Вчений секретар Наукового товариства  
патофізіологів України  
ст.н.с., к.б.н. С.І. Павлович

## CONTENTS

A.V. Kotsuruba, B.S. Kopjak, V.F. Sagach, N.JA.Spivak. Restoration of erythrocytes stability to acid hemolysis by cerium oxide nanoparticles in old rats	3
K.V.Tarasova, T.S.Lagodych, T.I.Drevytska, I.M.Karvatsky, S.B.Frantsuzova. The impact of pharmacological activation of ATP-sensitive potassium channels on the parameters of spontaneous activity of isolated neonatal rat cardiomyocytes	10
A.V. Basanets, L.V. Dolinchuk, T.A. Andrushchenko. The association of promoter gene matrix metalloproteinase-9 polymorphism C <sup>-1562</sup> →T with the risk of chronic obstructive pulmonary disease in miners	16
N.A. Dorofeyeva, K.O. Drachuk, V.F.Sagach. Cardiohemodynamics and efficiency of Frank–Starling mechanism during aging	22
S.V. Chorna, N.A. Strutynska, O.M. Semenykhina, S.O.Talanov, Dosenko V.E., A.V.Kotsuruba, G.L. Vavilova, V.F. Sagach. Long exercise training improves heart function in aged rats by NO-dependent decrease in mitochondrial pore sensitivity to calcium	27
L.N. Plotnikova, V.A. Berezovskii. Reaction of fibroblast-like blood cells to a low partial oxygen pressure	36
Yu.O. Fedotova, G.O. Frolova. Effects and quiperole and sulpiride on emotional behaviors in female rats	41
V.V. Ramazanov, E.L. Volovelskaya, V.A. Koptelov, V.A. Bondarenko. Properties of erythrocytes with low degree of integrity after freezing with non-penetrating and penetrating cryoprotectants	46
N.V. Grigороva. The effect of adaptive hormones on the secretory activity of insular apparatus and the zinc content in it and in the cells of hippocampus, pineal and thymus glands in rats with alloxan-induced diabetes	54
O.A. Kravchenko, I.V. Yakubtsova, T.D. Khilko, T.D. Preobrazhenska, L.I. Ostapchenko, V.F. Chekhun. Influence of complex natural substances trigonella foenum graecum l. Seeds on forming aberrant crypt foci in the mucosa at experimental colon cancer in rats	62
E.L.Toryanik. Hemostatic features in hypertensive pregnant rats	69
<b>REVIEWS</b>	
Mitochondria as a target of intermittent hypoxia	75
<b>ANNIVERSARIES</b>	87
<b>CHRONICLE</b>	91