

**Конференція молодих учених Інституту фізіології
ім. О.О.Богомольця НАН України
“Перспективні напрями досліджень сучасної фізіології”,
Київ, 17-18 листопада 2003 р.**

А.Ю. Богуславський

Вплив активації мітохондріальної пори на діяльність серця та скорочення скелетного м'яза собаки

Відомо, що одним із основних чинників, котрі ініціюють оксидативний стрес, є активація так званої мітохондріальної пори (МП). В експериментах на наркотизованих собаках досліджували вплив активації МП на діяльність серця, периферичну циркуляцію, силу та кисневі показники роботи м'яза. Як активатор МП використовували ішемію – реперфузію серця та введення феніларсиноксиду (ФАО) в стегонову артерію. Ішемію міокарда створювали припиненням кровопостачання однієї з гілок лівої коронарної артерії, яку ретроградно катетеризували та перфузували власною кров'ю собаки без розтину грудної порожнини.

Відтворення ішемії–реперфузії призвело до виразних порушень скорочувальної активності міокарда. Тиск лівого шлуночка вірогідно знижувався на кінець ішемії і лишався нижчим за контрольний упродовж наступної реперфузії. Коронарний кровотік у період реперфузії був нижчим за вихідні значення більш ніж на 30%. dP/dt_{max} і dp/dt_{min} вірогідно знижувалися під час ішемії та становили на кінець реперфузії $66 \pm 3,1$ та $51,6\% \pm 4,6\%$ від вихідних значень. Пригнічення скорочувальної активності міокарда супроводжувалося вивільненням у системний кровотік мітохондріального стабільного фактора (МСФ), який реестрували спектрофотометрично у діапазоні довжин хвиль 230–260 нм. На 1-2-й хвилинах реперфузії амплітуда збільшення оптичної густини

сироватки становила $0,29 \pm 0,05$, а у пробах, зібраних на 3-й хвилині реперфузії – $0,31 \pm 0,06$, що відповідало підвищенню концентрації МСФ. Введення ФАО в стегонову артерію призводило до зниження в ній тиску на $19,1\% \pm 1,6\%$ і кровотоку на $39,6\% \pm 4,2\%$ порівняно з вихідними показниками, що свідчило про активну вазоконстрикторну реакцію (судинний опір збільшувався на 26%). Приріст кровотоку у відповідь на електричну стимуляцію м'яза на фоні ФАО був вірогідно нижчим за контрольний. При цьому сила м'язових скорочень істотно зменшувалась, а киснева вартість роботи м'яза була значно більшою щодо контролю. Розвиток порушень регіонарного кровообігу, зменшення силових показників м'язових скорочень та ефективності використання кисню м'язом, зумовлені ФАО, супроводжувалися появою в пробах крові зі стегової вени МСФ. Амплітуда підвищення оптичної густини в цих пробах крові становила $0,24 \pm 0,021$. Таким чином, активація МП і розвиток оксидативного стресу за умов ішемії – реперфузії або під дією ФАО супроводжувалися порушенням регіонарного кровообігу в коронарному і шкіро-м'язовій ділянці, вірогідним зменшенням сили м'язових скорочень та ефективності використання кисню, а також появою МСФ у пробах крові. Отже, МСФ можна використовувати як маркер оксидативного пошкодження клітин за умов цілого організму.

А.В. Будає, Б.С.Сушко

Особливості поведінкової больової реакції у мишей різних генетичних груп

Робота присвячена вивченню відмінностей поведінкових больових реакцій у мишей генетичних ліній СВА/СаЛас, С57BL/6J і нелінійних (білих) мишей. Визначення реакції на тонічний біль проводилося за допомогою формалінового тесту, а рівня больової чутливості (больового порогу) – на електрифікованій підлозі. Вибірка для формалінового тесту складалася з 12 тварин кожної лінії. У ліву задню стопу підшкірно вводилося 20 мкл 5 %-го розчину формаліну. Час спостереження – 1 год. Реєстрація поведінки і попередня обробка результатів експерименту виконувалась оператором за допомогою програми “LadyPain”. Для визначення больового порогу використано по 11 мишей у кожній групі. Керування напругою електрифікованої підлоги і реєстрацію експериментальних результатів здійснювали за допомогою спеціально розробленого програмно-апаратного комплексу “Електрифікована підлога”. В досліді використовувалася постійна напруга від 0 до 80 В; швидкість підвищення напруги – 5 В/с. Струм вмикався через 3, 5 і 7 хв після поміщення тварини в електрифіковану камеру. Отримані результати оброблялися за допомогою статистичних

алгоритмів Стьюдента (Independent-Samples T-test) і Фішера (однофакторний дисперсійний аналіз, One-Way ANOVA) програмним пакетом SPSS 11. Була показана вірогідна різниця в рівні больової поведінкової реакції між мишами ліній СВА, С57 і нелінійними мишами. Відмінності в рівні больового порогу між мишами лінії С57 та нелінійними мишами і між мишами лінії СВА та нелінійними – вірогідні. Під час послідовних випробувань спостерігалось зменшення больового порогу в усіх вивчених групах. Найнижчий рівень больового порогу (41,91 В) мають нелінійні миші, найвищий (54,22 В) – миші лінії С57. Середній больовий поріг мають миші лінії СВА (49,5 В), він вищий, ніж у нелінійних, але нижчий за такий у мишей лінії С57. Рівень больового порогу частково співвідноситься з інтенсивністю больової реакції. Найбільш виражена больова реакція у мишей лінії С57 (1064,67 с), найменше – у мишей лінії СВА (603,33 с). Отримані результати свідчать про те, що генетичні відмінності між лініями лабораторних тварин визначають особливості поведінкових больових реакцій.

В.Ю. Загорій, В.Є.Досенко

Взаємозв'язок активності протеасоми та нейтральних протеїназ у тканинах мозку, мозочку та лейкоцитах крові старих щурів

Катаболізм білків у клітині забезпечує лізосомальний і протеасомальний протеоліз. Не

виключено, що ці процеси є взаємопов'язаними і можуть мати спільні регуляторні

контури. Компенсаторна, пов'язана з віком, активація протеолізу зумовлена значним збільшенням кількості модифікованих (окиснених, дезамідованих, ацильованих тощо) білків. При старінні катаболізм білків порушується (в першу чергу у тих тканинах, клітини яких не здатні до поділу), що може призводити до їх накопичення та порушення функціонування клітини [1]. Це може бути спричинено як зменшенням активності протеолітичних ферментів, так і порушенням транспорту білків, що підлягають утилізації, до лізосом. Метою нашої роботи було вивчення взаємозв'язку активності протеасомального протеолізу в лейкоцитах крові (моноцитах, лімфоцитах і нейтрофільних гранулоцитах), тканинах кори мозку та мозочку у старих тварин. Досліди проведено на щурах віком 5 (контроль) та 18 (дослід) міс. Моноцити, лімфоцити та нейтрофіли виділяли центрифугуванням стабілізованої крові у градієнті щільності перколу. Тканини кори головного мозку та мозочку гомогенізували в тріс-НСІ буфері (рН 7,4) при 4°C. Хімотрипсиноподібну активність протеасоми визначали за інтенсивністю гідролізу специфічного флюорогенного субстрату сукциніл-лейцил-лейцин-валін-тирозин-7-амідо-4-метилкумарину (довжина хвилі збудження / емісії (Ex/Em) - 360/440), а пептидглютаміл пептид-гідролазну активність – за допомогою субстрату Cbz-лейцин-лейцин-

глутамін-β-нафтиламіну (Ex/Em 333/410). Інтенсивність гідролізу визначали на спектрофлюориметрі "Hitachi 4000". Специфічність протеолізу підтверджувалась пригніченням гідролізу під дією селективного інгібітора протеасоми класто-лактоцистин β-лактону. Активність нейтральних протеїназ визначали за інтенсивністю розщеплення протамінсульфату. У результаті проведених дослідів було показано, що активність нейтральних протеїназ у тканинах головного мозку та мозочку, знаходилася на більш низькому рівні у старих щурів порівняно з контролем на 34,6% (P=0,26) та 33,2% (P=0,03) відповідно, а активність протеасоми була підвищена: хімотрипсиноподібна – в 2,2 рази (P=0,08) та на 20,5% (P=0,47), а пептидглютаміл пептид-гідролазна активність – на 48,1% (P=0,01) та 14% (P=0,47) відповідно. Активність протеасоми в моноцитах, лімфоцитах і нейтрофільних гранулоцитах у старих тварин, навпаки, була суттєво нижчою, ніж у контролі. Хімотрипсиноподібна активність протеасоми у моноцитах була меншою на 41,2% (P=0,048), у лімфоцитах – у 6 разів (P=0,049), а у нейтрофільних гранулоцитах – на 32% (P=0,5) порівняно з контролем. Різноспрямовані зміни активності протеасоми та нейтральних протеїназ у клітинах головного мозку і мозочку, що повільно оновлюються, і в лейкоцитах крові, що дуже швидко оновлюються, можуть мати адаптаційне значення при старінні.

О.М. Левашов

Спрямована хімічна модифікація кісткової тканини як метод моделювання патофізіологічних змін її електричних властивостей при дефіциті механічного навантаження

Тривале обмеження механічного навантаження на кістку призводить до змін складу

кісткового матриксу, його мінеральної, органічної та водної компонентів. Характер

і ступінь виявлення цих змін можна оцінити за динамікою основних електричних показників кісткової тканини. Однак чітких уявлень про патофізіологічні та біофізичні механізми змін електричних властивостей кістки за умов довготривалого дефіциту механічного навантаження та їх зв'язку зі зміною окремих компонентів кісткового матриксу до цього часу не існує. Значною мірою це пов'язано з труднощами, які виникають при проведенні досліджень *in vivo*. Метою нашої роботи було дослідження взаємозв'язку змін окремих компонентів кісткового матриксу та електричних показників кістки при її спрямованій хімічній модифікації *in vitro*, яка імітує такі самі зміни у разі дефіциту механічного навантаження. Електричні властивості свіжовиділених і хімічно модифікованих препаратів, отриманих з діафізарної частини стегнових кісток 12 статевозрілих щурів-самців лінії Вістар масою 130–140 г, досліджували на прецизійному LCR-метрі 1920 ("QuadTech", США) за методикою Kosterich і співавт. (1983). Декальцинацію та депротейнізацію кісткових препаратів здійснювали у розчинах ЕДТА і гідрозину за методом Black і Mattson (1982). Усі виміри проводили при частоті 104 і 106 Гц за умов повної імерсії зразків у фізіологічному розчині при 360 С. Декальцинація кісткової тканини призводила до зменшення початкової маси препаратів на 55,0% і збільшення ступеня їх гідратації у 4,5 раза. Якщо до початку декальцинації співвідношення основних компонентів кісткового

матриксу (кальцій : колаген : вода) було 0,65: 0,20 : 0,15, то після декальцинації воно суттєво змінювалось у бік переважання рідкої фази – 0: 0,33 : 0,67. Як показали розрахунки, фактичне зменшення маси кісткових препаратів становило 65,0% і частково компенсувалося внаслідок заміщення мінеральних компонентів кісткового матриксу фізіологічним розчином. Зміни електричних властивостей кісткової тканини після демінералізації виявлялись у значному збільшенні її питомої ємності, зменшення величини імпедансу, його активної і реактивної складових. Депротейнізація кісткових препаратів призводила до зменшення їх початкової маси на 21,0%, а об'єм рідини збільшувався в 1,3 раза. Внаслідок цього співвідношення основних компонентів кісткового матриксу істотно змінювалось у бік переважання мінеральної складової – 0,81 : 0 : 0,19. Фактичне зменшення маси кісткових препаратів через депротейнізацію становило 20% і частково компенсувалося заміщенням органічної компоненти матриксу фізіологічним розчином. Для депротейнізованих препаратів дуже характерним було збільшення питомої ємності. Електричний імпеданс змінювався меншою мірою, що було зумовлено відносним збільшенням реактивного і зменшенням активного опору. Одержані результати свідчать про те, що характер змін у складі кісткового матриксу при спрямованій хімічній модифікації кісткових препаратів можна ідентифікувати та диференціювати на підставі дослідження їх електричних властивостей.

І.Г. Літовка, В.О. Безчасна, О.Г. Чака

Дослідження міжвидових і внутрішньовидових варіацій резистентності дрозofil до впливу термінальної гіпоксії

Участь кисню в біоокисненні була експериментально доведена Р.Верт в 1878 р. Вперше

було показано, що гірська хвороба людини розвивається не через розрідження атмосфе-

ри, а через зниження парціального тиску O_2 в повітрі. Проблема гіпоксії експериментально й клінічно досліджується понад 300 років, проте існує низка недостатньо з'ясованих питань. До них відноситься і наявність внутрішньовидових варіацій до гіпоксії. Мета нашої роботи – дослідити міжвидові і внутрішньовидові варіації резистентності дрозозфіл до впливу термінальної гіпоксії. Досліди проведено на мухах дрозозфілах двох видів: *Melanogaster* (лінії *Contones*, *Yellow*, *White*) і *Virilis* (лінії *V-9*, *Elf*). Для визначення індивідуальної стійкості мушок до гострої гіпоксії кожен окрему групу піддавали випробуванню у спеціальній пробірці, в якій за допомогою електричного вакуумного насоса створювали тестуюче розрідження, що відповідало висоті 16500 м над рівнем моря і атмосферному тиску 72,1 мм рт. ст. Реєстрували тривалість утримування комах на стінках пробірки, а коли починалося їх масове опадання на дно, здійснювали “спуск” за 2 хв до рівня нормального атмосферного тиску. Випробування кожної групи дрозозфіл проводили 4 рази з інтервалом 4 год. Аналіз результатів показав, що у мушок виду *Virilis*, лінії *V-9* час перебування на висоті в активному стані з кожним підйомом істотно збільшувався: I підйом – 318 с, II – 375 с, III – 500 с, IV підйом – 522 с. У мушок цього ж виду, лінія *Elf* – час перебування на висоті з кожним підйомом теж підвищувалась, але не так інтенсивно та рівномірно: I підйом – 293 с, II – 386 с, III – 355 с,

IV – 543 с. При цьому в обох випадках декілька (від 1 до 4) мух залишалися сидіти на стінках пробірки до кінця експерименту. У іншого виду дрозозфіл *Melanogaster* досліджували лінії *c-s* і *White*. У них не відбувалося стійкого збільшення часу перебування на висоті 16500 м. Навіть навпаки, після деякого збільшення часу тривалості перебування в стані гіпоксії під час II і III підйому – спостерігали значне скорочення перебування під час IV підйому. За нашими спостереженнями мухи виду *Melanogaster* менш стійкі до впливу жорсткої гіпоксії. На відміну від виду *Virilis*, до кінця підйому жодної особини вгорі на стінках пробірки не залишилося, всі впали на дно. Отримані результати можуть бути наслідком різної активності ферменту лактатдегідрогенази. Активність ферменту після підйомів дрозозфіл виду *Virilis*, лінії *V-9* знижувалась на 56,1%, а лінії *Elf* – 34,6%. У той же час у виду *Melanogaster*, лінії *Contones* активність ферменту підвищувалась на 137,8%. Різниця між видами ймовірно пов'язана з фізіко-хімічними показниками ферменту та загальними філогенетичними особливостями комах. Виявлені розбіжності можуть зумовлювати різні адаптивні можливості витривалості при гіпоксії видів *Melanogaster* і *Virilis*. Таким чином, можна зробити висновок, що дрозозфіли виду *Virilis* набагато легше переносять термінальну гіпоксію та витриваліші за цих умов. Дрозозфіли виду *Melanogaster* менш стійкі до нестачі кисню і гірше пристосовуються до низького PO_2 .

В.С. Нагібін, С.М. Пивовар, В.Є. Досенко

Фторований аналог діазоксиду попереджує апоптоз неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії –реоксигенації

Починаючи з 1986 р., коли вперше було помічено, що короткочасні періоди ішемії –

реперфузії призводять до формування підвищеної стійкості міокарда до подаль-

шого більш інтенсивного ішемічного пошкодження, проводяться активні дослідження цього феномену – так званого прекодиціонування. Серед фармакологічних засобів відтворення прекодиціонування особливий інтерес викликають активатори АТФ-чутливих калієвих (K_{ATP}) каналів. Ці канали є на саркоплазматичній мембрані та внутрішній мембрані мітохондрій кардіоміоцитів і за звичайних умов знаходяться переважно у закритому стані. Їх активація відбувається в разі зменшення співвідношення між АТФ та АДФ, тобто при гіпоксії, ішемії, порушенні окисного фосфорилування. Одним з важливих механізмів ушкодження серця при ішемії та реперфузії є збільшення кількості клітин, що гинуть через апоптоз. За умов прекодиціонування розвиток апоптозу при ішемії – реперфузії значно зменшується. Враховуючи викладене, метою нашої роботи було дослідження впливу діазоксиду та його фторованого аналога (синтез здійснено в Інституті органічної хімії НАН України під керівництвом професора Л.М. Ягупольського) на апоптоз кардіоміоцитів під час аноксії – реоксигенації. Досліди було проведено на первинній культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів, отриманих з міокарда шлуночків дводобових щурів за допомогою ферментативного гідролізу з використанням колагенази II типу та панкреатину. Культивування проводили при 37°C у газовому середовищі, що містило

$5\% \text{CO}_2$ та 95% атмосферного повітря протягом доби. Аноксію – реоксигенацію моделювали аерацією клітин безкисневою газовою сумішшю такого складу: $5\% \text{CO}_2$ та $95\% \text{Ar}$ протягом 30 хв із наступною заміною живильного середовища та культивуванням клітин за вихідних умов протягом 60 хв. Активатор калієвих каналів діазоксид або його фторований аналог додавали у середовище за 15 хв до початку аноксії, а блокатор саркоплазматичних і мітохондріальних калієвих каналів глібенкламід за 5 хв до застосування активаторів K_{ATP} -каналів. Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин оцінювали цитологічно за допомогою забарвлення кардіоміоцитів біс-бензимідом (Hoechst 33342) і пропідіум йодидом в однаковій концентрації. Отримані результати свідчать про те, що при відтворенні аноксії – реоксигенації в культурі кардіоміоцитів в 2,1 рази збільшується кількість апоптотичних клітин. Діазоксид і його фторований аналог однаковою мірою попереджують цей процес, знижуючи кількість апоптотичних клітин до $3,7\text{--}4,2\%$, що відповідає контрольним значенням. Глібенкламід повністю нівелював ефект і кількість апоптотичних клітин при аноксії-реоксигенації залишалася високою. Слід зазначити, що вірогідних змін кількості некротичних клітин при дії активаторів K_{ATP} -каналів не відбувалося, а кількість живих певною мірою збільшилася внаслідок зменшення апоптотичних клітин.

С.М. Надточій

Активация митохондриальной поры за умов ізольованого серця

Мітохондріальні пори (МП) являють собою неселективні мегаканали в мембранах мітохондрій, що утворюються під час дії на клітину різних за походженням патоло-

гічних факторів. Активация МП призводить до деполаризації мітохондріальної мембрани, набряку мітохондрій, розриву дихального ланцюга і вільнорадикального вибуху.

В експериментах на ізольованих серцях морських свинок, які перфузувалися за методом Лангендорфа, було досліджено роль активації МП у діяльності серця. За нашими результатами відкриття МП як під час ішемії – реперфузії, так і за допомогою хімічних активаторів – феніларсиноксиду (ФАО) та антимицину А – призводило до схожих характерних негативних змін у діяльності серця: різкого зниження тиску у лівому шлуночку (Рлш), скорочувальної активності міокарда (dP/dt_{max} , dP/dt_{min}) зниження коронарного потоку (КП) та ефективності споживання кисню. Зниження Рлш з 63,5 мм рт.ст. \pm 1,78 мм рт.ст. у вихідному стані до 30,8 мм рт.ст. \pm 3,57 мм рт.ст. (на 52%) на 40-й хвилині реперфузії після 20-ти хвилин ішемії ($P < 0,05$) супроводжувалося пригніченням dP/dt_{max} і dP/dt_{min} на 66 і 45% відповідно та виразним зменшенням КП з 14 мл \pm 1,32 мл у контролі до 9,5 мл \pm 1,16 мл на 40-й хвилині реперфузії. Киснева вартість роботи серця вірогідно підвищувалась і в кінці спостереження на 82% перевищувала вихідні значення. Порушення функціональної активності міокарда при активації МП супроводжувалися вивільненням у відтікаючий від серця розчин стабільного мітохондріального фактора (СМФ), який був зареєстрований нами спектрофотометрично в ультрафіолетовій ділянці спектра в діапазоні довжин хвиль 230–260 нм з максимумом $\lambda = 240$ –250 нм. Амплітуда піка поглинання у розчині, відтікаючому від ішемізованого серця, на 1-й хвилині реперфузії становила $0,11 \pm 0,014$. Інгібітори МП циклоспорин А і

водорозчинний вітамін Е – тролокс – при попередньому введенні ефективно зменшували постішемичні пошкодження серця. Тиск, показники скорочувальної активності міокарда і коронарний потік вірогідно перевищували показники, що були зареєстровані протягом реперфузії у контрольній серії. Максимальний позитивний ефект спостерігався при введенні тролоксу тваринам *per os*. Рлш на 5-й хвилині реперфузії серця знижувався лише на 21% ($P < 0,002$) відносно вихідного значення та підтримувався на цьому рівні протягом 40 хв спостереження. Значення dP/dt_{max} і dP/dt_{min} на 40-й хвилині реперфузії становили 88 (1482 ± 128) та 85% (1257 мм рт.ст./с \pm 93 мм рт.ст./с) відповідно, а коронарний потік – 75% від вихідного рівня ($P < 0,03$), що значно вище, ніж у контрольній серії дослідів. Киснева вартість роботи серця у цей період лише на 23% перевищувала вихідні значення. Амплітуда оптичної густини поглинання при попередньому введенні циклоспорину А була $0,027 \pm 0,01$, а при застосуванні тролоксу – $0,046 \pm 0,01$, що значно нижче за контроль. Показано, що рівень пригнічення функції серця при активації МП і можливість відновлення його нормальної діяльності при використанні інгібіторів МП корелювали з величиною піка СМФ. Наведені результати вказують, що активація МП пригнічує функціональну активність ізольованого серця і призводить до вивільнення у відтікаючий розчин стабільного мітохондріального фактора. Зареєстрований фактор може виступати маркером активації МП різного генезу.

С.М.Пивовар, Р.Б.Струтинській, А.М.Шиш, О.О.Мойбенко, Л.М.Ягупольський

Дослідження вазодилататорних властивостей нових фторвмісних аналогів діазоксиду

Останнім часом показано, що АТФ-залежні калієві (K_{ATP}) канали є одним з важливих

регуляторних механізмів у серцево-судинній системі, особливо за паталогічних умов,

пов'язаних з гіпоксією та ішемією тканин. $K_{ATФ}$ -канали судинних клітин беруть участь у регуляції судинного тонуусу, тобто є медіаторами відповідей судин на гіпоксію, ацидоз та алкалоз крові, на різні ендogenousні біологічно активні речовини. Також показано, що активування $K_{ATФ}$ -каналів кардіоміоцитів захищає міокард при ішемічних і гіпоксичних станах. Нині відома будова лише сарколемальних $K_{ATФ}$ -каналів, тоді як існування мітохондріальних $K_{ATФ}$ -каналів виявлено лише фармакологічним шляхом: за допомогою використання специфічного активатора – діазоксиду та селективного інгібітора – 5-гідроксидеканової кислоти. Відомо, що діазоксид має широкий спектр дії, а саме, є вазодилатором, проявляє кардіопротекторні властивості, зменшує секрецію інсуліну β -клітинами, сприяє функціонуванню мітохондрій в оптимальному режимі роботи та забезпечує їх захист від перевантаження кальцієм. Раніше нами було показано, що фторвмісні активатори $K_{ATФ}$ -каналів, аналоги пінацидилу мають значно меншу токсичність та яскраво виражені вазодилаторні й, особливо, кардіопротекторні властивості, що і зумовило створення фторованих аналогів діазоксиду, названих DiazoFp і DiazoFm. Метою цієї роботи було дослідження вазодилаторних властивостей нових фторвмісних

аналогів діазоксиду та ідентифікація механізму їх дії. Дослідження вазодилаторних ефектів DiazoFp і DiazoFm проводили на фоні підвищеного судинного тонуусу препаратів аорти, яке отримували за допомогою попереднього використання норадреналіну (10 мкмоль/л), або гіперкалієвого розчину Кребса (K^+ –90 мкмоль/л). Встановлено, що нові фторвмісні аналоги діазоксиду в концентрації 1–100 мкмоль/л проявляють дозозалежні вазодилаторні властивості та посилюють свою вазодилаторну дію з часом перфузії. Специфічний блокатор $K_{ATФ}$ -каналів глібенкламід (10 мкмоль/л) пригнічував ефекти DiazoFp і DiazoFm на 43,96 та 33,22 % відповідно. Слід відмітити, що вони подібно діазоксиду проявляли на фоні гіперкалієвої деполяризації значно менші вазодилаторні ефекти, ніж при норадреналіновій вазоконстрикції. В експериментах на ізольованому перфузованому за Лангердорфом серці встановлено, що DiazoFp і DiazoFm дозозалежно зменшують перфузійний тиск коронарних судин. Таким чином, менші вазодилаторні ефекти нових фторвмісних сполук на фоні гіперкалієвої деполяризації мембрани, їх подібність до ефектів діазоксиду та пригнічення глібенкламідом дає змогу нам припустити, що DiazoFp та DiazoFm є новими активаторами $K_{ATФ}$ -каналів.

О.Д Присяжна

Ендотеліальна дисфункція за умов цукрового діабету та можливі шляхи її корекції

Дослідження можливих шляхів відновлення функції ендотелію є одною з найактуальніших проблем сучасної діабетології. Метою нашої роботи було вивчення можливих механізмів розвитку дисфункції ендотелію, а також, відповідно, пошук речовин, які б позитивно впливали на його функцію. Досліди проводили на щурах з стрептозо-

тоциніндукованим цукровим діабетом. Вміст глюкози крові становив $21,1 \text{ ммоль/л} \pm 6,7 \text{ ммоль/л}$ (контроль – $6,4 \text{ ммоль/л} \pm 0,6 \text{ ммоль/л}$). Дослідження реактивності аорти показало, що за умов цукрового діабету, порушується, в основному, ендотеліозалежна релаксація (розслаблення преактивованих норадреналіном кільцевих

препаратів аорти у відповідь на додавання до перфузуючого розчину ацетилхоліну гідрохлориду (10^{-6} моль/л) зменшувалося з $101,5\% \pm 12,3\%$ у контрольних тварин до $16,6\% \pm 3,4\%$ у щурів з діабетом), тоді як ендотелійнезалежні реакції (розслаблення у відповідь на введення натрію нітропрусида у дозі 10^{-4} моль/л) – майже не змінені. При вивченні біохімічних змін ми отримали такі результати: активність конститутивної NO-синтази в серці зменшена з $56 \pm 6,22$ до $4,38$ пмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка $\pm 0,15$ пмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка, а в аорті з $329,92 \pm 34,17$ до $95,83$ пмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка $\pm 12,56$ пмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка. Таке зменшення активності NO-синтази має призводити до зниження синтезу оксиду азоту. Дійсно, вміст метаболіту NO нітрит-аніона за умов цукрового діабету зменшується з $454,44 \pm 41,55$ до $43,28$ пмоль/мг білка $\pm 10,65$ пмоль/мг білка в серці, та з $341,43 \pm 53,61$ до $235,88$ пмоль/мг $\pm 40,09$ пмоль/мг білка в аорті. Таким чином, отримані результати підтверджують припущення щодо розвитку ендотеліальної дисфункції за умов експериментального цукрового діабету. Для вирішення питання про механізми розвитку такої дисфункції було проведено кілька серій біохімічних досліджень (що є маркером розвитку оксидативного стресу). Показано, що за умов цукрового діабету, вміст дієнових кон'югатів збільшується в серці з $3,26 \pm 0,49$ до $32,07$ нг/мг білка $\pm 1,71$ нг/мг білка, а в аорті – з $7,42 \pm 0,94$ до $24,77$ нг/мг білка $\pm 3,56$ нг/мг білка. Вміст перекису водню в аорті також збільшується в 1,5 раза (з

$57,96 \pm 6,16$ до $88,72$ пмоль/мг білка $\pm 0,1$ пмоль/мг білка). Отже, одним з можливих механізмів розвитку пошкодження судин за умов цукрового діабету, є оксидативний стрес.

Враховуючи такі результати, було проведено кілька серій дослідів з введенням щурам з діабетом і контрольним щурам відомих антиоксидантів – мелатоніну та водорозчинного аналога вітаміну Е – тролоксу. Їх вводили внутрішньоочеревинно в дозі 10 мг/кг, а тролокс – перорально в дозі 7–8 мг/кг за одну годину до експерименту. Для досліду *in vitro* до перфузуючого розчину мелатонін додавали в концентрації $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, а тролокс – $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Мелатонін і тролокс істотно не впливали на ендотелійзалежну вазодилатацію контрольних щурів. Як додавання мелатоніну до перфузуючого розчину (вплив *in vitro*), так і введення його внутрішньоочеревинно за 60 хв до початку досліду (вплив *in vivo*) призводили до майже повного відновлення порушеної функції ендотелію ($87,4 \pm 11,8$ та $81,8\% \pm 9\%$ відповідно). Подібну дію мав і тролокс, причому найбільш впливовим виявилось введення препарату *in vitro* та *per os* ($70,9 \pm 10,5$ та $70,7\% \pm 8\%$ відповідно), а внутрішньоочеревинне введення мало дещо меншу, але також суттєву відновлювальну дію ($58,2\% \pm 8,8\%$). Отримані результати свідчать, що використання препаратів антиоксидантної дії може майже повністю відновлювати функцію ендотелію.

Автор висловлює подяку А.В. Коцюрубі за допомогу в проведенні біохімічної частини досліджень.

О.В.Рудик, Н.А.Струтинська, Л.Л.Шабрацька

Експресія м-РНК *bax* і відкриття мітохондріальної пори в серці старих щурів

Пошкодження мітохондрій може бути наслідком токсичної дії оксидативного

стресу при старінні, що призводить до зміни проникності внутрішньої мембрани міто-

хондрій, активації мітохондріальних пор (МП) і розвитку апоптозу. Серед агентів, що сприяють посиленому перебігу цих процесів, розрізняють апоптотичні білки родини Bcl-2, мішенню дії яких є мітохондрії. Посилена експресія проапоптотичного білка Вах може призводити до активації МП, виходу в цитозоль цитохрому С та інших проапоптотичних факторів з міжмембранного мітохондріального простору, розгортання програми клітинної смерті, тоді як антиапоптотичний білок Bcl-2 виявляє протилежну дію, захищаючи клітину від апоптозу. Відомо, що експресія генів Вах і Bcl-2 змінюється при старінні. Припускають також, що мітохондріальна дисфункція і, зокрема, підвищена чутливість МП до індукторів, відіграє значну роль у віковій дегенерації м'язової та нервової тканин, а також клітин імунокomпетентних органів. Мета представленої роботи полягала в дослідженнях чутливості МП до її індуктора феніларсиноксиду (ФАО) та базального рівня експресії м-РНК генів Вах і Bcl-2 у тканинах серця молодих (6 міс) і старих (24 міс) щурів; а також вивчення можливого протекторного впливу тролоксу на відкриття МП за умов дії ФАО. Відкриття МП реєстрували за набуханням мітохондрій, ізольованих із тканин серця. Таке дозозалежне набухання спостерігалось при дії ФАО в діапазоні концентрацій 10^{-8} – 10^{-4} моль/л як молодих, так і старих щурів з максимальною величиною набухання при концентрації ФАО 10^{-4} моль/л. Індукцію МП у серці молодих щурів оцінювали різницею набухання мітохондрій при дії ФАО в діапазоні концентрацій 10^{-6} – 10^{-4} моль/л

порівняно з контролем, у той час як ФАО в концентрації 10^{-8} – 10^{-7} моль/л помітно не впливав на набухання мітохондрій. Натомість у старих щурів спостерігалось збільшення набухання як у контролі, так і за умов дії ФАО в діапазоні концентрацій 10^{-8} – 10^{-4} моль/л порівняно з молодими, що свідчить про підвищену чутливість мітохондрій старих щурів до ФАО. До того ж, у тканині серця старих щурів спостерігалось посилення експресії гена Вах порівняно з молодими тваринами, тоді як рівень експресії гена Bcl-2 не відрізнявся помітно в обох групах. Попередня інкубація мітохондрій з класичним інгібітором МП циклоспорином А за умов дії ФАО (10^{-5} моль/л) перешкоджала їх набухання, що є прямим доказом причетності набухання суспензії мітохондрій до відкриття МП. Однак в той час як набухання мітохондрій серця молодих щурів пригнічувалось циклоспорином А повністю, то в старих щурів – тільки наполовину. Подібну до циклоспоринової дію виявляли й відомі антиоксиданти мелатонін і тролокс у концентрації 10^{-5} моль/л, попередня інкубація мітохондрій з якими частково запобігала їх набухання за умов дії ФАО (10^{-5} моль/л). Таким чином, нами встановлено, що мітохондрії серця старих щурів є більш чутливими до ФАО при відкритті МП, ніж мітохондрії молодих щурів. Збільшення експресії м-РНК Вах у серці старих щурів, імовірно, свідчить про дію білка Вах, яка сприяє відкриттю МП при старінні. Мелатонін і тролокс виявляють захисну дію на відкриття пори в мітохондріях серця старих щурів.

А.М. Смірнов, І.М. Прудніков

Генетичне маркування ембріональних клітин щурів

Мета нашої роботи – специфічне маркування клітин для їх ідентифікації через експресію генів

маркера та візуалізація білкових продуктів за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Етапи досліджу:

Трансформація штаму *E.coli* XL1 – Blue Supercompetent cell плазмідом (p_{hr} – GFP – Nuc) для її виділення та очищення у необхідній кількості.

Отримання необхідної кількості ембріональних клітин щурів.

Трансфекція ембріональних клітин розмноженою плазмідом.

Культивування клітин, підданих трансфекції, скринінг результатів.

Такий аспект роботи було обрано тому, що трансфекція первинно виділених еукариотних клітин чужорідною ДНК часто носить транзйентний характер, в інших випадках – стабільний (що можливо лише за умови проведення спеціальної селекції клітин). Згідно з існуючими на цей час уявленнями, причина транзйентної трансфекції полягає в існуванні ендонуклеазної системи, яка впізнає кільцеві чужорідні ДНК-фрагменти та знищує їх. Як вона працює (впізнавання чужорідних фрагментів ДНК, впізнавання саме кільцевих молекул) нині не повністю зрозуміло. Тому наша робота є фрагментом комплексного дослідження, яке можливо зможе дати визначену відповідь на це та інші питання.

Результати проведеного дослідження:

Розмножено плазмідом p_{hr} – GFP – Nuc

за допомогою штаму *E.coli* – XL1 – Blue Supercompetent cell, після чого її виділено та очищено. Із загальної кількості очищеної плазмиди близько 40–50% належало до фракції суперспіралізованої.

Отримано ембріональні клітини щурів із зародків від 8 діб терміну вагітності (починаючи зі стадії „щитка” – 9-та стадія), до 11 діб (13-та стадія). При цьому виділялися клітинні маси з органів, що формуються (мозок, серце, печінка, дерма тощо).

Показано, що трансфекція суперспіралізованої векторної конструкції з GFP-nuclear target як для лінійних (НЕК 293), так і для ембріональних клітин носить транзйентний характер.

Для хімічної трансфекції лінійних клітин (НЕК 293 у даному випадку) найкраще підходять суперспіралізовані плазмиди. Доведено, що GFP-білок може напрацьовуватися в ембріональних клітинах щурів і направлятися саме в ядро.

Ефективність хімічної трансфекції як для лінійних, так і для ембріональних клітин низька: для перших – близько 16%, для других – не більше ніж 1%. Імовірно, що причина цього явища – висока активність внутрішньоклітинної системи захисту від чужорідної ДНК. Відповідь на це та інші питання будуть отримані при подальших дослідках.

Н.Г.Хабатюк, Г.М.Корнійчук, Н.В.Макогон, І.М.Алексєєва

Участь тромбоксану в апоптотичній загибелі гепатоцитів і купферівських клітин щурів у культурі

Тромбоксан (Тх) є продуктом метаболізму арахідонової кислоти за циклооксигеназним шляхом, який утворюється і метаболізується тромбоцитами й іншими клітинами, зокрема гепатоцитами та клітинами Купфера (КК). У функціонуванні печінки та її ушкодженні суттєву роль відіграють медіатори, що виділяються КК, зокрема Тх. Роль

останнього в апоптотичній та некротичній загибелі гепатоцитів і КК вивчена недостатньо. Метою нашого дослідження було вивчити значення Тх в апоптозі гепатоцитів і КК щурів в окремих первинних культурах за умов впливу екзогенного ТхV₂ та блокади синтезу ендогенного Тх інгібітором тромбоксансинтетази бензилімідазолом

(БІА). Вивчали як інтактні культури гепатоцитів і КК, так і культури гепатоцитів, оброблені чотирехлористим вуглецем (CCl_4) і хенодизоксихолевою кислотою (ХДХК), які спричиняють загибель гепатоцитів за апоптотичним та некротичним шляхами. Для диференціювання живих, некротичних та апоптотичних клітин використовували метод флуоресцентної мікроскопії після подвійного прижиттєвого забарвлення клітин барвниками Хехст 33342 і пропідіум йодид. Підраховували відсоток живих, некротичних і клітин з вираженими морфологічними ознаками апоптозу (конденсація хроматину, фрагментація ядра та утворення апоптотичних тілець).

Встановлено, що ураження гепатоцитів CCl_4 (10 ммоль/л) викликало як некроз, так і апоптоз, що призводило до зменшення відсотка живих клітин у культурі. Відомо, що гепатоцити, уражені CCl_4 , продукують ендогенний Тх (Marinovich et al., 1989). У наших дослідах інгібітор тромбоксансинтетики БІА зменшував апоптоз гепатоцитів на 22% відносно дії лише CCl_4 . На відміну від останнього ХДХК (100 ммоль/л)

викликала загибель гепатоцитів переважно за апоптотичним шляхом. БІА на фоні дії ХДХК не впливав суттєво на апоптоз гепатоцитів. Екзогенний ТхВ₂, застосований на фоні CCl_4 і ХДХК, посилював апоптоз гепатоцитів. Так, на фоні застосування CCl_4 ТхВ₂ у дозі 10^{-6} моль/л збільшував кількість апоптотичних гепатоцитів на 21%, у дозі 10^{-7} моль/л – на 27%. На фоні застосування ХДХК кількість апоптотичних гепатоцитів збільшувалася на 29 та на 25% при дозах ТхВ₂ 10^{-6} і 10^{-7} моль/л відповідно.

Встановлено, що вплив екзогенного ТхВ₂ (10^{-6} моль/л) на інтактні клітини печінки був виражений значно більше в разі його застосування в культурі КК. Так, апоптоз гепатоцитів підвищувався з 1,9 до 3,2%, а апоптоз КК в 4,4 раза.

Ці результати свідчать, що Тх є важливим модулятором життєздатності та загибелі гепатоцитів і КК. Він сприяє загибелі клітин печінки за апоптотичним шляхом, дія його більш виражена щодо КК. Таким чином, фізіологічна роль Тх може полягати в активації видалення клітин, але зі значно меншим травмуванням тканини.

А.М. Шиш, С.М. Пивовар

Вплив модифікації фосфоліпідного складу мембран на реактивність серцево-судинної системи

Епідеміологічні дослідження показали, що ω -3 поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) мають кардіопротекторну дію. Вони конкурують з арахідоновою кислотою (АК) за місце в складі фосфоліпідів мембран, метаболіти якої відіграють значну роль у процесах тромбоутворення, розвитку констрикторних реакцій судин, запальних процесах, активації утворення вільних радикалів (Kang J.X., Leaf A., Engler M.M.). Більшість експериментальних робіт присвячена вивченню впливу ω -3 ПНЖК на

реактивність серцево-судинної системи у тварин з різною патологією. Водночас практично нічого невідомо про зміни реактивності серцево-судинної системи на фізіологічні подразники (адренергічні, холінергічні) при модифікації фосфоліпідних мембран. Метою нашої роботи було визначення впливу модифікації жирнокислотного складу мембранних фосфоліпідів за допомогою ω -3 ПНЖК на адренергічні реакції серцево-судинної системи інтактних щурів. Для експериментів використовували сам-

ців-щурів масою 250–300 г. Тварини були розподілені на дві групи: I – контрольна (тварини, що знаходились на раціоні віварію); II – дослідна (щури, яким до повсякденного раціону протягом 4 тиж додавали ω -3 ПНЖК). Ізольовані серця щурів перфузували ретроградно за методом Лангендорфа. Адренергічну реактивність у дослідах з визначенням залежності доза – ефект ізольованого серця щурів вивчали при додаванні норадреналіну в перфузуючий розчин. Дослідження вазомоторних реакцій судин проводили на ізольованих препаратах кільця грудної аорти щурів. Усі тестування судинних препаратів здійснювали в ізометричному режимі при початково заданій напруженості, при якій вони генерували максимальну силу у відповідь на 3-хвилинну інфузію норадреналіну у зростаючих концентраціях. Зміни жирнокислотного складу фосфоліпідів мембран визначали хроматографічно. Було показано, що вміст АК у мембранах кардіоміоцитів зменшувався в 3,4 раза, вміст ейкозапентаєнової та докозагексаєнової кислот збільшувався

у 6,9 і у 1,4 раза відповідно. Зменшувалось утворення активних метаболітів АК – тромбоксану B_2 та лейкотриєну C_4 у тканині міокарда у 1,9 та 3,0 раза відповідно. Інотропні реакції сердець з модифікованими мембранами на норадреналін були значно слабшими, при його дії у дозі 10^{-11} моль/л систолічний тиск у лівому шлуночку у тварин II групи був на 21,29% ($P < 0,05$) нижчим, ніж у контрольних щурів. Швидкість скорочення та розслаблення серцевого м'яза була меншою на 19,6 та 17,85% ($P < 0,05$) відповідно до контролю. Частота серцевих скорочень у контрольних і дослідних тварин відрізнялася і становила 154 та 134 xv^{-1} відповідно. У дослідах на ізольованих кільцях аорти зафіксовано зменшення напруження судинних смужок тварин II групи на 22,67% ($P < 0,05$) відносно контролю. Таким чином, отримані результати показують, що модифікація жирнокислотного складу мембран за допомогою включення в склад фосфоліпідів замість АК ПНЖК типу ω -3, призводить до зменшення реактивності серцево-судинної системи на адреноагоністи.

М.Я. Юзьків, О.О. Мойбенко

Роль системи оксиду азоту в функціонуванні серцево-судинної системи за умов експериментальної гострої ішемії – реперфузії міокарда

Дані літератури про роль NO у функціонуванні серцево-судинної системи є суперечливими, що зокрема пояснюється мультифакторіальністю його дії. Так окремі NO-залежні механізми, виявлені на культурах клітин або на рівні ізольованих органів можуть відрізнятися від інтегративної дії NO на рівні цілісного організму. Метою нашої роботи було комплексне вивчення ролі системи оксиду азоту в розвитку та компенсації порушень діяльності серцево-

судинної системи при гострій ішемії–реперфузії міокарда у собак. Досліди виконувалися на безпородних собаках-самцях, масою від 16 до 23 кг під хлоралозо-уретановим наркозом (0,07 і 0,7 г/кг внутрішньовенно), з використанням методу ретроградної катетеризації гілки коронарної артерії. Реєстрували ЕКГ у I і III стандартних відведеннях, коронарний перфузійний тиск, середній артеріальний тиск, тиск у порожнині лівого шлуночка. Скоротливу

функцію лівого шлуночка оцінювали за змінами першої похідної внутрішньо-шлункового тиску й індексу скоротливості міокарда – $(dp/dt_{\max})/p$. Хвилинний об'єм крові визначали методом термодилуції. За результатами хвилинного об'єму крові та середнього артеріального тиску розраховували загальний периферичний опір. Протягом експерименту проводили забір артеріальної крові для визначення сумарної активності NOS, аргінази, вмісту сечовини, NO_2^- , лейкотриєну C_4 , тромбоксану B_2 . Ці самі показники визначали в гомогенатах серця некротичної, прилеглої та інтактної зони. Встановлено, що разом з порушеннями кардіогемодинаміки при ішемії – реперфузії міокарда відбувається зниження активності нітрикоксидсинтаз і зменшення вмісту стабільного метаболіту $NO - NO_2$ у прилеглій і некротичній зонах, водночас спостерігається підвищення активності аргіназ і вмісту сечовини в уражених ділянках серця. Це визначає напрям корекції ішемічних уражень міокарда. Порушення кардіо- та гемодинаміки при ішемії – реперфузії міокарда значно посилюються після системної блокади NOS за допомогою введення L-NNA (50 мг/кг). Особливо різко підвищується опір коронарних судин і загальний периферичний опір.

Істотними є порушення ритму. Показано, що компенсаторна дилатація коронарних судин неішемізованих ділянок міокарда при його локальній ішемії зникає після системної блокади NOS, що вказує на NO-залежний характер цієї дилататорної реакції. Активація продукції оксиду азоту за допомогою введення субстрату NOS L-аргініну значною мірою коригує порушення кардіогемодинаміки за умов експериментальної ішемії – реперфузії міокарда, значно зменшуючи вазоконстрикторні реакції коронарних і периферичних судин і порушення серцевого ритму, а також зменшує розміри некротичної ділянки міокарда більше ніж удвічі. Встановлено, що активація NOS, поєднана з антиоксидантною дією та інгібуванням ліпоксигенази при внутрішньовенному введенні, розробленого нами препарату корвітину має виражений кардіопротекторний ефект при ішемії – реперфузії міокарда. Система оксиду азоту проявляє значний протекторний ефект при гострій ішемії – реперфузії міокарда (перші 5 год). До найважливіших захисних механізмів за цих умов слід віднести коронарну вазодилатацію в неішемізованих ділянках міокарда та вазодилататорні реакції периферичних судин, тобто судинний компонент реакції, а також стабілізацію ритму діяльності серця.