

**МАТЕРІАЛИ V МІЖНАРОДНОГО СИМПОЗИУМУ  
“АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ БІОФІЗИЧНОЇ МЕДИЦИНИ” КИЇВ, 2007 р.**

**Вступне слово академіка Платона Григоровича Костюка**

В этом году в Украине впервые проводится весенний фестиваль науки. В нем принимают участие представители гуманитарных и естественно-научных дисциплин, практически все научно-исследовательские и учебные заведения нашей страны. Цель мероприятия – подчеркнуть значение фундаментальных и прикладных исследований в различных областях знания для развития общества, повышения его гуманитарного и экономического уровня.

Естественно, что Институт физиологии им. А.А. Богомольца, основной задачей которого являются фундаментальные и прикладные исследования, принимает активное участие в этом симпозиуме, который приурочен к проведению общегосударственной кампании по популяризации новейших данных в области биологии.

Известно, что физиология – это фундаментальные знания о том, что происходит в организме в различных условиях, а патофизиология – это основа медицины и залог эффективности любых терапевтических мероприятий. Известно, что условия жизни человека в промышленно развитых странах стремительно меняются и не в лучшую сторону. Антропогенные выбросы промышленности, автотранспорта и больших скоплений людей, а также образ жизни современного человека в большом городе создают ряд отрицательных моментов, ухудшающих его здоровье.

Уровень развития медицины достиг значительных высот. Созданы новые диагностические методы, приборы для терапевтических и реабилитационных воздействий, синтезированы сотни новых лекарственных средств. Однако количество болезней не уменьшается, а даже возрастает. Более того, вместо острых, кратковременно протекающих процессов, появляются вялотекущие, хронические формы заболеваний, которые тянутся месяцы и годы. Это существенно снижает работоспособность и производительность человека, наносит урон обществу в целом.

Исследования в области молекулярной биологии, клеточной физиологии и биохимии дали новые знания о роли ионов кальция в жизнедеятельности клетки, новые направления в создании фармакологических препаратов для лечения наиболее распротсранных болезней цивилизации. Больших успехов достигли исследователи в области генетики и геномной инженерии. Тем не менее, еще очень многое необходимо сделать для того, чтобы хоть частично скомпенсировать те неблагоприятные изменения наружной и внутренней среды, которые возникли в промышленно развитых странах.

В этом отношении большие перспективы имеет современная тенденция ко все более широкому внедрению в практику теоретической и клинической медицины биофизических методов, которые дают принципиально новую информацию о жизненных процессах и возможность успешно сочетать современные фармакологические методы лечения с биофизическими воздействиями. Есть данные о том, что такое сочетание позволяет уменьшить дозы фармакологических препаратов. Усиленное внимание к биофизическим методам лечения прослеживается во многих странах мира и соответствует рекомендации Всемирной организации здравоохранения, обеспокоенной возрастанием числа случаев избыточного или неправильного применения лекарственных средств.

Мы гордимся тем, что разработанный в Институте метод лечебно-профилактического использования дозированной гипоксии для стимуляции метаболической активности клеток

---

сегодня используется медицинскими учреждениями не только Украины и России, но и многих стран мира. Этот метод направлен на сочетание и более полное взаимодействие физиологических защитных сил организма, что может иметь особое значение в условиях повышенного радиационного и химического фона, типичного для современных условий.

Очень давно, готовясь к битве с арабами в Египте Наполеон обратился к своим солдатам с такими словами: «Один араб сильнее одного француза; десять арабов равны по силе десяти французам; сто французов сильнее ста арабов, потому что мы являемся организованной силой».

Недаром мы называем биологические системы «организмом». Природа дала силу и устойчивость организму благодаря высокому уровню взаимодействия его элементов, надежности составляющих, наличию нескольких уровней дублирования. Однако человечество умудрилось так модифицировать среду своего обитания, воду, воздух, почву и продукты питания, что серьезно ухудшило уровень собственного здоровья. Сейчас даже дети все чаще страдают от многочисленных болезней цивилизации, а каждый из пожилых людей является носителем «букета» разнообразных форм патологии и постоянным посетителем лечебных учреждений.

Биофизические методы регулирования жизненных процессов имеют существенные преимущества перед общепринятым фармакологическим направлением терапии. Они не создают эффекта кумуляции, не вызывают привыкания, не насыщают организм вторичными продуктами распада химических соединений. Они не требуют антидотов, поскольку воздействие биофизического фактора может быть прекращено моментально. Нынешняя экологическая и медико-социальная ситуация создает большие перспективы все более широкого клинического применения биофизических методов лечения, и я желаю участникам настоящего симпозиума дальнейших успехов в раскрытии секретов организации биологических систем, разработке и внедрению новых биофизических технологий в практику современной медицины.

В.А. Березовский

## Качество жизни и биофизическая медицина

*Проаналізовано об'єктивні та суб'єктивні складові, що впливають на якість життя людини в сучасному урбанізованому суспільстві. Розглянуто невідповідність зусиль, спрямованих на розвиток фармакологічного напрямку боротьби з "хворобами цивілізації" та наслідками цих зусиль, які виявилися неспроможними зупинити зростання захворюваності, зниження народжуваності та загрозову тенденцію до зменшення населення України. Показано, що в сучасних умовах трикомпонентна модель біосфери за Вернадським перетворилась у п'ятикомпонентну та істотно змінилося співвідношення між продуцентами і консументами. Для стабілізації рівня здоров'я населення, ефективної боротьби з хронічними формами патології слід компенсувати дефіцит фізичного навантаження, негативний вплив надмірної щільності міського населення та забруднення середовища. Найменш ризикованим напрямком такої компенсації може бути застосування природних та інструментальних технологій біофізичної медицини, здатних підвищити резистентність організму до несприятливих умов середовища.*

Качество жизни человека зависит от двух основных составляющих. К первой можно отнести геофизические и социальные условия окружающей среды, т. е. климатические особенности места проживания, состояние воздуха, питьевой воды и почв, жилищные условия, общественный климат в доме, на работе и в государстве, экономическое состояние семьи и др. Второй, возможно еще более важной составляющей, является уровень здоровья человека, т. е. его соматическое и психологическое состояние, включая субъективные требования к собственному здоровью и положению. Первая составляющая формируется традициями и обществом, вторая – личными качествами человека и его предков.

По определению ВОЗ здоровье – это состояние полного физического, душевного и социального благополучия при отсутствии болезней или физических дефектов[1,2]. Если принять это определение, то трудно будет найти взрослого человека, уверенного в том, что он здоров. Латентные формы патологии слишком распространены в

© В.А. Березовский

наше время. Только дети не задумываются над проблемами здоровья. Более конкретный подход к определению здоровья используют специалисты медико-санитарной статистики. Под понятием «здоровье» для каждого человека принимают отсутствие выявленных заболеваний или расстройств жизнедеятельности. Исходя из этого ребенок или юноша, который ни разу не обращался к врачу и удовлетворен всеми формами жизнедеятельности организма, может считать себя здоровым, даже в случае неумеренного употребления никотина, алкоголя или легких наркотиков. Но спортсмен, не вполне восстановившийся после предыдущего выступления, вправе считать себя недостаточно здоровым. Современная литература дает около 150 дефиниций термина «здоровье». Однако от этого проблема его смыслового содержания не становится яснее.

### КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ

Для определения здоровья популяции существуют более строгие критерии.

Увеличение рождаемости и средней длительности жизни, снижение уровня смертности, заболеваемости и инвалидности рассматриваются как индикаторы здоровья и свидетельствуют о повышении уровня здоровья населения. В случаях, когда происходит обратное – можно с уверенностью говорить о том, что здоровье популяции ухудшается. Статистические данные последних лет характеризуют неблагоприятные демографические сдвиги на территории ряда экономически развитых стран западной и восточной Европы, в том числе и Украины (рис. 1).

За период с 1990 по 2005 годы численность населения Украины сократилась с 51,8 до 47,3 млн человек. Каждый год страна теряла около 382 тыс. граждан, индекс смертности повышался, индекс рождаемости – снижался. В 1913 г. число новорожденных (на 1000 человек населения) составляло 44,1, в 2007 г. оно снизилось до 10,3. Цифры свидетельствуют об интенсивном процессе депопуляции [11]. И это происходит несмотря на увеличение числа врачей, оснащение лечебных учреждений новейшей диагностической аппаратурой и создание тысяч новых лекарственных средств. Возможно, причины такой тенденции не имеют отношения к медицине, а лежат в иной плоскости?

### ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ

Согласно данным ВОЗ, соотношение различных факторов, определяющих уровень здоровья населения ( в порядке убывания степени их влияния ) таково:

- условия и образ жизни – 50 %,
- генетика и наследственность – 20 %,
- внешняя среда, природные условия – 20 %,
- здравоохранение и медицинская помощь – 10 %.

Если принять эти цифры как объективную реальность, то влиять на уровень своего здоровья разумный человек должен путем сознательного регулирования образа жизни и выбора наиболее физиологических условий пребывания, работы, отдыха и других проявлений жизнедеятельности. К сожалению, для преимущественного большинства граждан такая задача не является первостепенной, а для некоторых – просто невыполнимой.

В отличие от европейской точки зрения, большая часть населения планеты, исповедующая принципы восточной философии и медицины, к основным факторам, определяющим уровень здоровья человека, относит несколько другие критерии. В порядке убывания они составляют:

- образ мыслей – 70 %,
- образ жизни – 20 %,
- питание – 10 %.

Религиозно-этические и философские воззрения мыслителей Востока основную движущую силу высокого уровня здоровья человека видят в соответствующем образе его религиозных убеждений, особенностей мышления и вытекающего из этого поведения, влияющего на остальные факторы.

Многие поколения наших предков боролись за высокий уровень здоровья и устранения болезней, разрабатывая способы предупреждения заболеваний и совершенствуя методы лечения. Особенно рез-

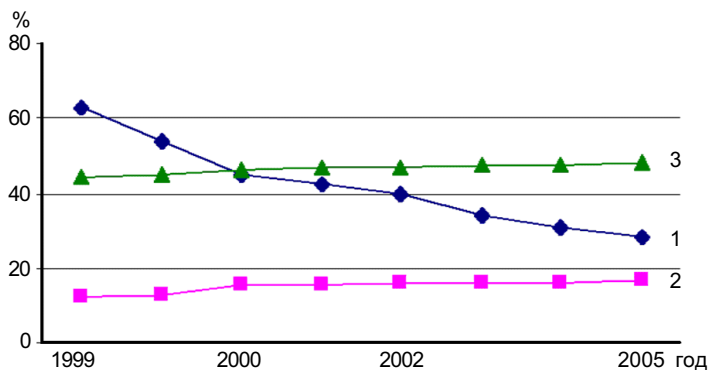


Рис. 1. Индикаторы состояния здоровья населения Украины: 1 – показатель условного здоровья, %; 2 – общий коэффициент смертности; 3 – количество врачей на 10 тыс. населения

кий скачок уровня медицинских знаний произошел благодаря развитию физики, созданию Левенгуком микроскопа и гению Пастера, заложившего основы микробиологии и иммунологии. Ушел в прошлое самый страшный бич средневековой Европы – «черная чума», унесшая миллионы жизней наших предков. Однако сохранились туберкулез и грипп, появился СПИД, эндокринопатии, психические заболевания. Изменились уклад, темпы и условия жизни, возросла общая заболеваемость, появилась хроническая усталость, десинхронозы, внезапная смерть без видимых признаков патологии. В чем же корни проблемы? Естественно, их много, но вот один из них.

### **ГИПОКИНЕТИЧЕСКИЙ СИНДРОМ**

В прежние века основная масса населения планеты занималась сельским хозяйством, охотой, войной. Все варианты деятельности наших предков на протяжении многих миллионов лет были сопряжены с интенсивным физическим трудом. Только последние 200–300 лет мышцы, сердце и скелет получили возможность некоторого отдыха. Произошел так называемый энергетический переворот. По данным академика Берга, современный человек, освоивший энергию полезных ископаемых и технические устройства, использует не более 1–2 % физических возможностей своих мышц по сравнению с затратами энергии прежних поколений. Недостаточная физическая нагрузка, детренированность современного человека в сочетании с антропогенным загрязнением, являются главными причинами снижения общей устойчивости организма к стрессогенным воздействиям окружающей среды, в том числе и резистентности к патогенным микроорганизмам. В результате возрастает общая заболеваемость и уровень смертности, снижается рождаемость, развивается процесс депопуляции промышленно разви-

тых стран. Дефицит двигательной активности горожан имеет серьезные последствия. Мышца ведь не только орган движения, но и секреторный аппарат [20,29,34].

Интенсивное развитие новейших медицинских диагностических и лечебных технологий оказывается не в состоянии компенсировать те негативные антропогенные влияния, которые изменяют образ жизни человека, денатурируют окружающую среду, индуцируют массовые формы патологии и условия для демографического кризиса. Тем не менее, средняя продолжительность жизни человека в некоторых странах мира (Китай, Япония, Канада, Ирландия, Испания, Нидерланды) постепенно возрастает. По статистическим данным 90-х годов прошлого столетия общая смертность в Китае составляла всего 6 человек на 1 тыс. населения, в Украине – около 16. Одновременно с этим возрастает инвалидность, что снижает качество жизни населения. Увеличение числа врачей и медицинских учреждений, новейших медикаментов, продлевают жизнь, но не улучшают ее качество. Многие лекарственные препараты через некоторое время оказываются в лучшем случае токсичными, в худшем – канцерогенными или тератогенными. Медицина XXI столетия оказывается не в состоянии нейтрализовать те негативные антропогенные изменения окружающей среды и образа жизни человека, которые возникли в итоге «промышленного прогресса».

### **ДИСБАЛАНС КОМПОНЕНТОВ БИОСФЕРЫ**

Академик Вернадский ввел в науку новое понятие и термин «биосфера» [8]. Она охватывает все формы жизни и состоит из трех компонентов: продуценты, консументы (потребители) и редуценты. Растения (продуценты) составляют 99,9 % массы биосферы. Животные и человек – всего 0,1 % ее массы. Но именно человек,

преждевременно назвавший себя «Homo sapiens», и результаты его разрушительной деятельности уже привели к дисбалансу компонентов биосферы. Именно он породил техносферу и индустриальные консументы, продукты деятельности которых отравляют все живое. Человечество уничтожает леса бассейна Амазонки и Сибири, уменьшается объем поступающих в атмосферу фитогормонов, фитонцидов и кислорода, необходимых для здоровья человека и животных [27]. Возрастает выброс двуокси углерода, происходит потепление климата да и население Земли увеличивается. В итоге – сдвигается экологическое равновесие между продуцентами и консументами (коэффициент П/К), возникают новые условия жизни человека в денатурированной среде, не способствующей сохранению здоровья.

Из недр земли подняты на ее поверхность миллионы тонн полезных для промышленности, но вредных для здоровья человека ископаемых. Продукты их сгорания инициируют кислотные дожди, повреждают остатки растительности, разрушают альвеолярный эпителий, обуславливая хронические неспецифические заболевания

легких, аллергии, бронхиальную астму и сердечно-сосудистые болезни. Вода, почва и пищевые продукты настолько насыщены токсическими отходами промышленности, что при ультразвуковом обследовании состояния печени студенческой молодежи лишь в 4–6 % случаев нам удавалось выявить действительно здорового по этому признаку человека. Можно смело утверждать, что при комплексном обследовании по нескольким показателям различных органов и систем доля здоровых будет прогрессивно снижаться.

### МЕДИЦИНА: ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ИЛИ БИОФИЗИЧЕСКАЯ?

Современная медицина достигла разительных успехов. Благодаря интенсивному развитию фармакологии и фармацевтической промышленности мы научились лечить большинство известных инфекционных заболеваний. Но... лечить – еще не означает излечивать. Возникла странная ситуация: после успешного лечения грудного ребенка от простудного заболевания антибиотиками у него возникает дисбактериоз.

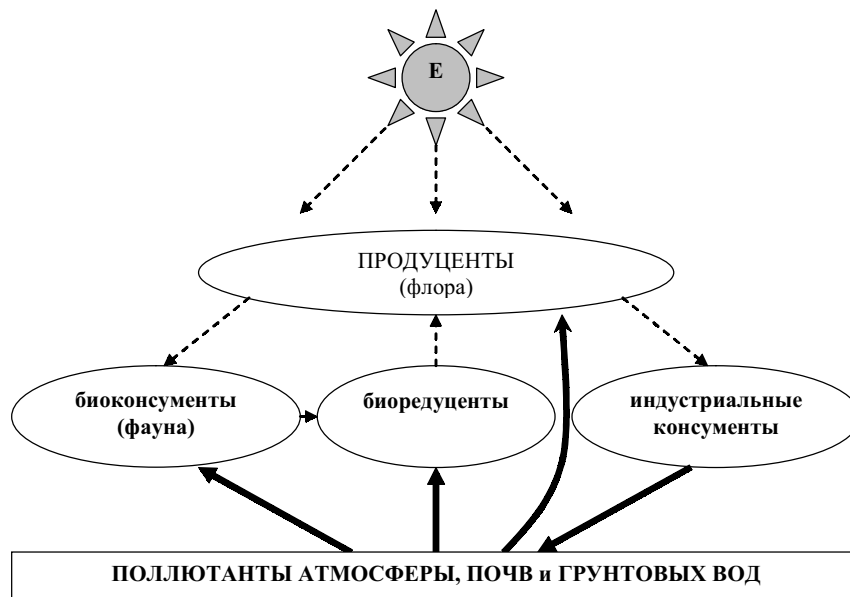


Рис. 2. Пятикомпонентная схема взаимосвязи элементов биосферы в технократическом периоде развития человечества. E – энергия солнечного излучения.

Он тянется годами, тормозит полноценное развитие организма и превращает ребенка в постоянного пациента лечебных учреждений. Курящая молодая мать после родов не способна полноценно кормить ребенка грудью, восполняя его питание искусственными молочными смесями. Ребенок не получает материнских антител, отстаёт в развитии, болеет с первых дней жизни, становится аллергиком и инвалидом детства. Возможно, правильнее было бы называть его инвалидом тупиковой цивилизации.

Практически все фармакологические препараты обладают тем или иным побочным действием. Цитокины, стероидные гормоны и другие соединения, индуцирующие апоптоз, стимулируют продукцию клетками активированных форм кислорода, снижают содержание клеточных антиоксидантов, создают угрозу повреждения ДНК [14]. Даже такой проверенный временем медикамент как аспирин, после столетнего применения оказался противопоказанным некоторым группам населения [15]. До 20 % лекарственных средств являются фальшивкой, не прошедшей государственного контроля. Все это вместе взятое привело к возникновению нового класса заболеваний, получившего название «медикаментозные болезни». Их доля в общей заболеваемости всех стран мира составляет до 30 %.

## **ПЛОТНОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ КАК ПАТОГЕННЫЙ ФАКТОР**

Еще одним неблагоприятным фактором, ухудшающим состояние здоровья людей, является процесс урбанизации, порожденный нуждами промышленности. На 1 января 2005 г., доля городских жителей нашей страны составляла 68 % всего населения. Это означает, что 2/3 украинцев проживает в городах. Они привлекают сельских жителей гарантированным трудоустройством, реальными и воображае-

мыми благами цивилизации. Процессы миграции молодежи в города существуют во всех развивающихся странах. Опыт США показывает, что в сельском хозяйстве занято лишь 4 % населения. Это приводит к мысли, что процесс урбанизации в Украине еще не достиг своего предела. А нужно ли нам стремиться к этому?

Наша страна принадлежит к ряду государств с относительно высокой плотностью размещения населения. Для Украины в целом она составляет 78 человек на 1 км<sup>2</sup> [11]. Однако в разных областях и регионах плотность населения неодинакова. Так, в Донецкой области, где 90 % населения сконцентрировано в городах, она существенно выше. На втором и последующих местах по этому показателю находятся Луганская (86 %), Днепропетровская (83 %), Харьковская (79 %) и Запорожская (76 %) области. Иными словами в индустриальном восточном регионе страны свыше 3/4 населения проживает в скученных городских условиях. Вместе с тем в Украине существуют зоны с меньшим преобладанием городского населения. Первое место в этом ряду занимают Ивано-Франковская и Тернопольская области (по 57 %), на втором месте Черновицкая область (59 %), на третьем – Закарпатская область (63 %).

Представляло интерес проследить, существует ли связь между высокой плотностью населения в городах, уровнем заболеваемости и коэффициентом естественного прироста населения. Оказалось, что по количеству впервые диагностированных заболеваний активным туберкулезом, минимальное число пациентов, действительно, выявлено в Закарпатской, Ровенской и Ивано-Франковской областях, для которых характерно рассредоточенное размещение населения. А максимальное количество этих заболеваний выявлено в Луганской, Донецкой и Днепропетровской областях, основная масса населения

которых сконцентрирована в городах.

По количеству впервые диагностированных злокачественных новообразований минимальные показатели типичны для Закарпатской, Ровенской, Ивано-Франковской и Волынской областей Украины. Максимальное количество этих заболеваний выявлено в промышленно развитых Кировоградской, Николаевской, Одесской и Запорожской областях.

Известно, что наиболее чувствительными к неблагоприятным воздействиям среды являются дети. Дефекты остроты зрения в сельских районах характерны для 39 % детей, в городах – для 52 % детей. Нарушение состояния позвоночника у сельских детей наблюдается в 33 %, у городских – в 45 % случаев. Несмотря на казалось бы лучшие условия и материальное обеспечение, городские дети имеют более низкий иммунитет и высокую степень алергизации, связанную с избыточным использованием средств бытовой химии.

Анализ заболеваемости детей в западных регионах с преимущественно сельским населением и малой плотностью населения по сравнению с густонаселенным, промышленным восточным регионом, позволяет отметить четкую закономерность. Если число заболеваний детей западного региона принять за 100 %, то в восточном регионе количество случаев инфекционных и паразитарных заболеваний детей составляет 150 %, заболеваний нервной системы – 160 %, развития бронхиальной астмы – 170 %, а заболеваний системы кровообращения – 176 % [11].

Особенно неблагоприятными нарушениями здоровья являются расстройства высшей нервной деятельности и психики [12]. По официальным статистическим данным 2002 г. из 100 тыс. населения в сельской местности расстройства психики наблюдались у 6 человек, в городах – у 30. Алкогольные психозы у сельских жителей

составляют 14, а у городских – 25 человек. Количество зарегистрированных случаев наркомании в сельской местности составляет 5–7 человек, в городах 31–32 человека. Общая заболеваемость населения городов в 1,5–3 раза выше, чем в сельской местности. Как свидетельствует статистика, чем выше плотность размещения населения, тем выше риск возникновения инфекционных заболеваний. В местах лишения свободы, где скученность достигает максимума, заболеваемость туберкулезом в 80 раз больше средней.

### **УРБАНИЗАЦИЯ КАК ФАКТОР ДЕНАТУРАЦИИ СРЕДЫ**

Высокая концентрация промышленных предприятий, автотранспорта и сопутствующее им химическое загрязнение городской среды приводит к тому, что естественные процессы дыхания, питания или беременности женщины происходят в неблагоприятных для матери и будущего ребенка условиях. Подтверждением этому может служить нормированное число мертворождений, которое для Донецкой области в 2005 г. составило 185, в Харьковской 147, в Днепропетровской 145 случаев. В этом же году в Черниговской области зарегистрировано 35, в Сумской 36, в Полтавской 56 случаев мертворождений.

Немецкие экологи провели специальные исследования для оценки влияния городской среды на основные климатические показатели [30]. За 100 % были приняты условия сельской местности. Основные показатели этих исследований приводятся в таблице.

К сожалению, наши коллеги не внесли в таблицу концентрацию различных химических примесей в воздухе, воде и продуктах питания горожан, которые отрицательно сказываются на здоровье и мужчин, и женщин. Но если для первых эти загрязнения проявляются в ухудшении уровня



**Минимальные и максимальные показатели отклонения состояния городской среды  
(по сравнению с сельской местностью)**

Показатель	Минимальное отклонение	Максимальное отклонение
Общее излучение	-20%	- 40%
Ультрафиолетовое излучение зимой (летом)	- 70% (-10%)	-90% (-30%)
Туман аэрозоли зимой (летом)	+100% (+20%)	+30%
Годовое количество осадков	+5%	-10%
Роса – осадки	-65%	-65%
Снегопад	-5%	-10%
Зимний минимум температуры	+0,5°C	1°C
Длительность периода морозов	-25%	-25%
Дни с морозом и льдом	-45%	-45%
Годовое испарение	-30%	-60%
Относительная влажность воздуха	-6%	-20%
Скорость ветра	-20%	-30%
Физическая нагрузка	-45%	-80%
Плотность населения	+200	+800%
Денатурация воздуха	-20%	-70%
Денатурация флоры и фауны	-20%	-85%

здоровья самого человека, то для вторых это сопряжено с угрозой передачи той или иной формы патологии последующим поколениям, частичной или полной потерей способности деторождения. А с каждым годом химический прессинг в городах возрастает.

Наглядной иллюстрацией этого положения может служить число новорожденных в разные периоды времени. В 1913 г. этот показатель составлял – 44, в 1985 г. – 15, в 1990 г. – 13, в 2007 г. – 10 новорожденных на 1000 человек населения Украины. Снижение рождаемости, возрастание заболеваемости и смертности обусловлены комплексом неблагоприятных социальных, экономических и экологических факторов. Вместе с тем профилактика ранних форм патологии и заболеваемости средствами натуральной и биофизической медицины может быть одним из рычагов, способствующих сдерживанию демографической катастрофы.

### **ПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ УРБАНИЗАЦИИ**

Жители современных мегаполисов – это постоянно напряженные, вечно спешащие,

эмоционально неуравновешенные существа. Они настолько удручены постоянным дефицитом времени, настолько сконцентрированы на деловых проблемах, что не могут расслабиться даже на отдыхе. Их рабочий день начинается с раннего утра и кончается поздней ночью. Утром они вынуждены выпивать крепкий кофе, чтобы взбодриться. Вечером они принимают снотворное, чтобы уснуть. Не все выдерживают такую нагрузку. Многие страдают от синдрома хронической усталости, избыточной массы тела, депрессивных состояний. Количество суицидов у горожан вдвое выше, чем у сельских жителей [12].

Торопливый прием пищи наряду с малоподвижным образом жизни – одна из причин накопления избыточной массы жировых отложений и диабета, принявших в США масштабы эпидемии во всех возрастных группах, не исключая детей. По данным американских страховых обществ до 60 % населения страны страдает от ожирения и его последствий. Еще большее число граждан постоянно применяют транквилизаторы. Высокоактивными фармакологическими препаратами пользуется

более 70 % населения.

Возникает психологический парадокс. Нас уверяют, что эффективность лечения заболеваний возрастает с каждым годом. В то же время мы не можем не верить данным статистики, свидетельствующим о постоянном возрастании заболеваемости населения, которое происходит на фоне ухудшения экологической обстановки. Накапливается и тревожная информация о том, что широкое использование медикаментов проявляется в разнообразных побочных действиях лекарственных средств, усугубляющих химическое загрязнение внутренней среды организма. Мы начинаем понимать, что первая заповедь врачебной клятвы Гиппократов «не навреди» – в эпоху фармакологической медицины должна звучать с особой силой, поскольку и количество препаратов, и их биологическая активность, и гиперболизированная рекламная привлекательность не сопоставимы с возможностями арсенала античной медицины. Многие лекарственные соединения современной медицины несут иммунную и генетическую угрозу популяции. А лечить больного необходимо. Но как уменьшить риск медицинских процедур и назначений?

### **ВОЗМОЖНОСТИ НАТУРАЛЬНОЙ БИОФИЗИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ**

Наименее рискованным вариантом воздействия на состояние здоровья человека современного общества, по-видимому, являются методы натуральной и биофизической медицины. Внедрение таких физических принципов, как ультразвуковое исследование, компьютерная томография, ядерно-магнитный резонанс и др. в диагностику состояния здоровья уже привело к «бархатной» революции в выявлении ранних стадий возникновения патологии [13]. А чем раньше мы останавливаем патологический процесс, тем больше шансов на

выздоровление пациента. Не менее интенсивно осуществляется использование физических факторов для профилактики и лечения заболеваний, плохо или совсем не поддающихся медикаментозным технологиям. Биофизическая медицина XXI столетия становится все более эффективным рычагом управления здоровьем [1, 4, 5, 17, 19, 28].

Одним из направлений этой относительно молодой отрасли немедикаментозной медицины является использование естественных природных факторов различных климатических зон [10, 19, 22]. Разработаны также современные технологии инструментального воспроизведения лечебно-профилактических свойств аридных зон, морского и горного климата, гидро-, спелео- и оротерапии. По мнению основоположника этого направления натуральной медицины – Н.Н. Сиротина, главным лечебно-профилактическим фактором горного воздуха является пониженное парциальное давление кислорода и определенная степень ионизации воздуха [22]. Состояние гипоксии, которое наступает при подъеме в верхние слои атмосферы, во время авиационного перелета или при поездке в горы, стимулирует секрецию эндорфинов, создает ощущение эйфории, активизирует деятельность нейронов головного мозга, пролиферацию клеточных образований различных органов [18, 23, 24]. Эксперименты с клеточными культурами подтверждают стимулирующее влияние умеренной гипоксии на пролиферацию клеток [33]. Подтверждением этого же факта являются общеизвестные данные, характеризующие изменения процессов гемопоэза [25] или темпов прироста массы плода во время его внутриутробного развития (рис. 3).

Известно, что первые этапы развития оплодотворенной яйцеклетки начинаются еще до ее имплантации в слизистую оболочку матки, когда тканевое дыхание осуществляется исключительно диффу-

зионным путем в условиях низкого парциального давления кислорода ( $P_{O_2}$ ). По мере развития плацентарного кровообращения  $P_{O_2}$  в тканях эмбриона достигает более высоких значений, однако всегда остается ниже  $P_{O_2}$  плацентарной крови, которое составляет всего 47–50 мм рт.ст. Но именно в первом триместре беременности, при самом низком давлении кислорода в тканях, темп прироста массы плода оказывается максимальным. Это полностью соответствует точке зрения Эрнеста Геккеля, который постулировал: «онтогенез повторяет филогенез». Ведь именно в раннем периоде возникновения жизни на Земле первичная атмосфера планеты содержала минимальное количество кислорода. Только с развитием сине-зеленых водорослей и зеленых наземных растений первичная бескислородная атмосфера постепенно трансформировалась во вторичную с нарастающим содержанием и парциальным давлением кислорода [6].

## ПРИРОДНАЯ ОРОТЕРАПИЯ И ОРОПРОФИЛАКТИКА

В настоящее время атмосфера, отчасти напоминающая первичную, в естественных условиях существует только в горах. Возможно, именно поэтому там легко встретить местного жителя преклонного возраста, ведущего активную жизнь, выполняющего интенсивные физические нагрузки и не жалующегося на здоровье. Средняя длительность жизни горцев, обитающих на умеренных высотах в атмосфере с пониженным  $P_{O_2}$ , до определенного предела оказывается прямо пропорциональной высоте местности над уровнем моря (рис. 4).

Исследованиями Н.Н. Сиротинина (1939–1981), М.М. Миррахимова (1970) было показано, что даже кратковременное пребывание в горах (2–4 нед.) способствует перестройке физиологических и биохимических

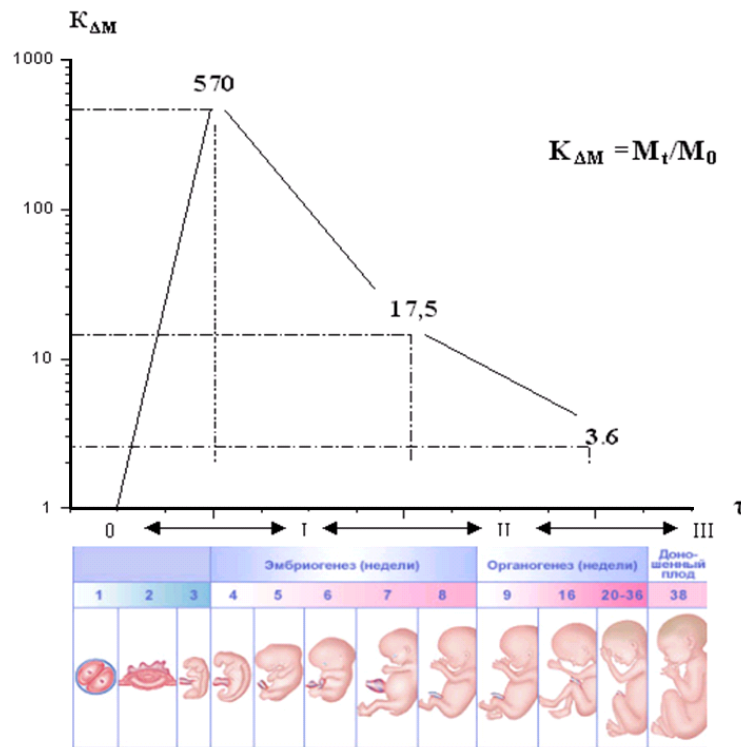


Рис. 3. Темпы развития массы плода в I, II и III триместрах беременности:  $m_0$  – начальная масса,  $m_t$  – масса в конце триместра

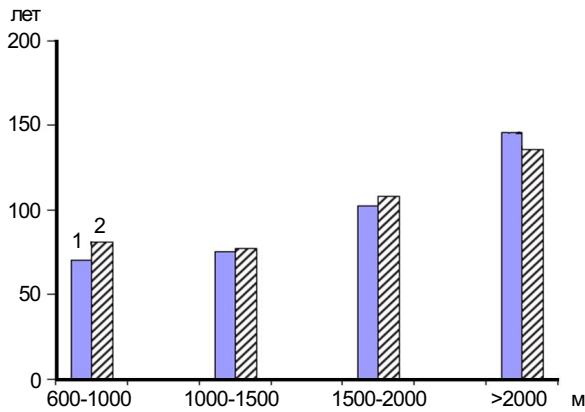


Рис. 4. Средняя продолжительность жизни населения Киргизии на различных высотах над уровнем моря: 1 – мужчины, 2 – женщины [7]

мических процессов в организме, улучшению локального кровоснабжения и метаболизма, а также объективных и субъективных показателей состояния здоровья [10, 22]. Недаром люди, страдающие начальными формами сердечно-сосудистых заболеваний, получали и сегодня получают заряд здоровья в Кисловодске (600–800 м над уровнем моря) или на перевале Туя-Ашу в Киргизии [19], а значительная часть населения Европы проводит отпускной период в горах Швейцарии, на саногенных высотах от 1800 до 2600 м над уровнем моря.

Для улучшения уровня здоровья и качества жизни населения Украины целесообразно вспомнить о реабилитационном потенциале Карпатского региона, который в настоящее время используется недостаточно. Одна из причин этого заключается в необходимости затраты определенных средств и времени для поездки в горы, что доступно не всем нуждающимся в оротерапии и оздоровлении. Вместе с тем развитие современных мембранных технологий в биофизическом приборостроении, создало новые возможности применения целебных свойств горного воздуха в условиях клинических учреждений, расположенных на уровне моря.

## ИНСТРУМЕНТАЛЬНАЯ ОРОТЕРАПИЯ И ОРОПРОФИЛАКТИКА

С целью более широкого внедрения лечебно-профилактического применения саногенных свойств горного воздуха ряд исследователей предложили использовать инструментальный вариант применения оротерапии, нашедший свое воплощение в специальных устройствах климатотерапии «горным воздухом» при нормальном атмосферном давлении [4, 21, 24]. Благодаря разработке в Японии полупроницаемых газоселективных мембран и полимерных пленок, выполняющих роль молекулярного сита, возникла возможность качественно нового решения проблемы генерации искусственного горного воздуха непосредственно по месту жительства или лечения пациентов. В зависимости от величины перепада давления мембранные газоразделительные элементы способны генерировать газовые смеси с концентрацией кислорода в азоте от 6 до 16 % (рис. 5).

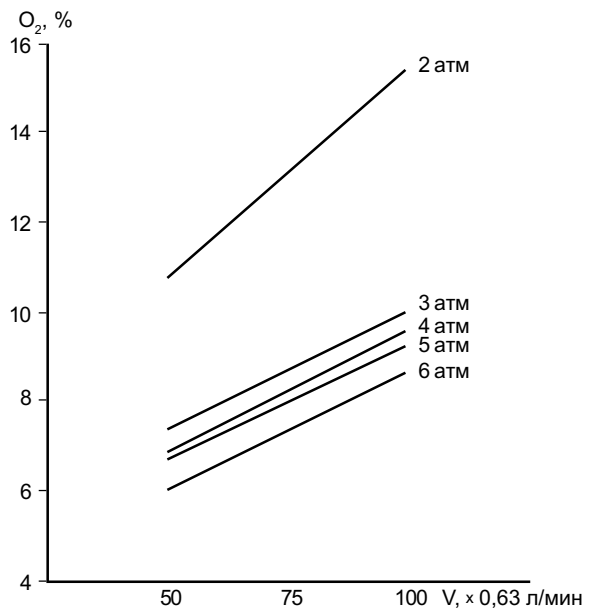


Рис. 5. Семейство характеристик мобильного газоразделительного элемента при различных давлениях воздуха на входе и различных объемах искусственного горного воздуха (100 и 50 делений поплавкового расходомера (PM-0,63 Г))

Практический опыт работы показывает, что для большинства пациентов терапевтический эффект наступает при содержании кислорода 10–12 %, тяжелые формы бронхиальной астмы требуют 9–10 % и лишь для тренировки спортсменов уместны концентрации кислорода в пределах 7–8 %.

Аппараты искусственного горного воздуха под названием «Оротрон» (для коллективного пользования) или «Борей» (для индивидуального применения) выпускаются в Украине медико-инженерным центром «НОРТ» Национальной академии наук Украины (рис. 6) для лечебно-профилактических учреждений.

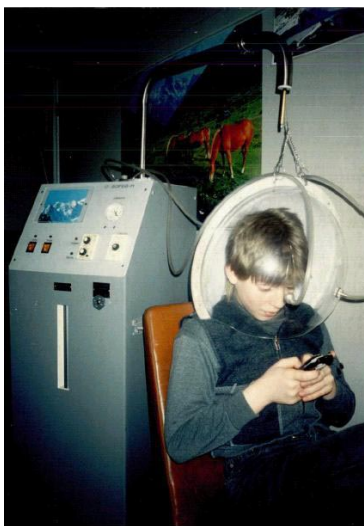
Аппараты обеспечивают периодическое воздействие на человека условной высоты от 2 до 8 тыс. м над уровнем моря без изменения общего атмосферного давления, что исключает известные негативные барореакции и, в то же время, создает возможность обеспечивать лечебные эффекты горных курортов типа Кисловодска, Теберды или прославленного Томасом Манном в романе «Волшебная гора» швейцарского центра европейского оздоровления – Давоса.

Многие пациенты, страдающие сердечно-сосудистыми заболеваниями, анемией, бронхиальной астмой, аллергией, полу-

чившие в прежние годы существенное улучшение после пребывания на горных курортах, отмечают, что инструментальная оротерапия создает аналогичные эффекты с достаточно длительным положительным последствием.

Различными авторами показано, что как природный горный климат, так и инструментальная оротерапия существенно улучшают кровоснабжение мозга, миокарда и легких, устраняют ишемические боли, восстанавливают ритм сердца. Биохимическими исследованиями установлено, что оротерапия активирует гуморальную регуляцию окислительного метаболизма, гемопоза и остеогенеза, восстанавливает пассивные электрические свойства костной ткани после гипокинезии, сокращает периоды реабилитации спортсмена после спортивных травм. Дозированная нормобарическая гипоксия стимулирует секрецию эндорфинов, растормаживает гены, ответственные за синтез характерных для раннего онтогенеза белков-ферментов с оптимумом активности в условиях низкого  $PO_2$ . В результате – возрастает синтез эндотелинов, купируется ишемический синдром, улучшается микроциркуляция, общее состояние и самочувствие пациентов [3-5,10,17-19,22-26].

Особенно эффективно применение оротерапии у часто болеющих детей и под-



а

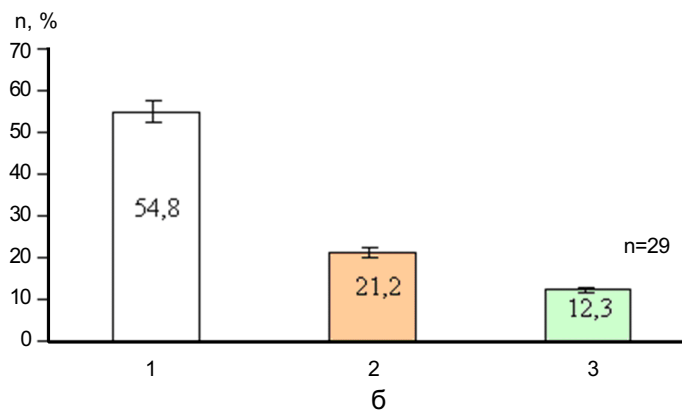


Рис. 6. Общий вид аэротерапевтической установки индивидуального пользования типа «Борей» (а) и количество пропущенных по болезни дней учебы (б) до (1), через 3 мес (2) и через 6 мес (3) после проведения курса лечения

ростков, обладающих высоким адаптивным потенциалом. Вдыхание «горного воздуха» позволяет предупредить развитие «оксидативного стресса» [9,14], астматических бронхитов и приступов бронхиальной астмы, устранить проявление аллергий, избавить ребенка от частых простудных заболеваний (см. рис. 6), вернуть его к активному образу жизни и полному здоровью [17, 26, 28].

## ВЫВОДЫ

1. Образ жизни человека в большом городе в условиях денатурированной среды и недостаточной физической нагрузки создает предпосылки развития патологических процессов, приводящих к возникновению «болезнями цивилизации».

2. Преимущественное использование медикаментозного принципа лечения хронических форм «болезней цивилизации» на фоне ослабленной детоксикационной функции печени усугубляет состояние пациента либо оказывается малоэффективным и небезопасным для его здоровья.

3. Биофизические методы восстановления здоровья природными или инструментальными стимулами легко дозируются, не оставляют в организме вторичных продуктов метаболизма, не создают эффекта кумуляции, не угнетают функции печени, т.е. минимально травматичны.

4. Парциальное давление кислорода во вторичной атмосфере Земли избыточно для большинства биологических видов и может быть одной из причин оксидативного стресса, активации апоптоза, ухудшения состояния здоровья и преждевременного старения.

5. В условиях дефицита физической нагрузки и гипокинезии принцип управляемой атмосферы с дозированным снижением парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе (кислородная депривация) может быть использован в качестве неспецифического метода предупреждения болезней цивилизации.

V.A. Berezowskiy

## THE LIFE QUALITY AND BIOPHYSICAL MEDICINE

We analyzed the objective a. subjective constituents which influence the mans life quality in the modern civilized a. urbanized society. There are considered disparity of the efforts, in the traditional pharmacology treatment civilization indused illnesses and it's results. Pharmacologial medicine appeared unable to stunt a growth of morbidity, diminishment of birth-rate and threatening tendency to the population Ukrainian diminishment. It is shown that in modern condition the three component biosphere model after Vernadskiy must be transformed to the five component one's because the correlation between producents and consuments substantially changed after the industrial consuments a. powertull polutants appierenses. For stabilization the health level and effective protects the chronic pathology it is necessity to compensate the deficit of the physical loading, negative influencing of surplus closeness of urban population and contamination of environment. Least risky direction of such compensation can be application of natural and instrumental technologies of biophysical medicine, including the kinezotherapy a. orotherapy, wich are able to promote resistant of organism to the unfavorable environment condition.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРИИ

1. Апанасенко Г.Л. Избранные статьи о здоровье. – К., 2005. – 48 с.
2. Апанасенко Г.Л. Книга о здоровье. – К.: Медкнига, 2007. – 132 с.
3. Березовский В.А. Аллопатический и гомеопатический принципы в лечении заболеваний, связанных с кислородным голоданием. – В кн.: Молекулярные аспекты адаптации к гипоксии. – К.: Наук. думка, 1979. – С. 224–231.
4. Березовский В.А., Дейнега В.Г. Физиологические механизмы саногенных эффектов горного климата. – К.: Наук. думка, 1988. – 224 с.
5. Бреслав И. С. Восприятие дыхательной среды и газопреферendum у человека и животных. – Л.: Наука, 1970. – 174 с.
6. Бudyко М.И., Ронов А.Б., Яншин А.Л. История атмосферы. – Л.: Гидрометеиздат, 1985. – 208 с.
7. Бурмин Л.С. О долголетию в Киргизии. – Фрунзе: Илим, 1966. – 178 с.
8. Вернадский В.И. Очерки по геохимии // Избр. соч., М.: Изд-во АН СССР, 1954. – Т.1. – 460 с.
9. Владимиров Ю.А. Активные формы кислород и азота: Значение для диагностики, профилактики и терапии//Биохимия. – 2004. – 69, вып.1. – С. 5–7.
10. Дейнега В.Г., Березовский В.А. Реабилитация горнорабочих угольных шахт и лиц с пылевыми забо-

- леваниями легких в условиях горного климата// Методич. рекомендации МЗ УССР. – Донецк, 1986. – 12 с.
11. Державний комітет статистики України. Діти, жінки та сім'я в Україні. Стат. зб. – К., 2006. – 398 с.
  12. Зараковский Г.М., Нетумова Н.Ф. Психофизиологические эффекты глобальных изменений природной среды и климата (прогнозная гипотеза)// Физиология человека. – 1992. – **18**, №5. – С.15.
  13. Залесский В.Н., Дынник О.Б. Коронарная томографическая диагностика. Новые методы визуализации в клинике. Этюды современной инструментальной диагностики. – К.: УДК, 2007. – Вып. 4. – 280 с.
  14. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Вольский Н.Н., Козлов В.А. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз// Усп. совр. биологии, 1999. – **119**, № 5. – С. 440–450.
  15. Княжинская Н.П., Чучалн А.Г. Современные аспекты аспириновой бронхиальной астмы // Пульмонология. – 1999. – №2. – С.91–94.
  16. Куликов В.П., Киселев В.И. Потребность в двигательной активности. –Новосибирск: Наука, 1998. – 150 с.
  17. Левашов М.І. Респіраторні та гемодинамічні механізми саногенної дії штучного гірського клімату: Автореф. дис. ... д-ра мед.наук. – К., 1994. – 32 с.
  18. Літовка І.Г. Адаптивна перебудова кісткової тканини при дефіциті навантаження та механізми її відновлення під впливом дозованої гіпоксичної стимуляції: Автореф. дис. ... д-ра біол.наук. – К., 2006. – 46 с.
  19. Миррахимов М.М., Гольдберг П.Н. Горная медицина. – Фрунзе: Кыргызстан, 1978. – 184 с.
  20. Попов Д.В., Цвиркун Д.В., Нетреба А.И. Увеличение мышечной массы и силы при низкоинтенсивной силовой тренировке без расслабления связано с гормональной адаптацией//Физиология человека. – 2006. – **32**, № 5. – С. 121–127.
  21. Радионов Б.В. Значение тренировок к гипоксии в подготовке к пневмоэктомии больных распространенным фиброзно-кавернозным туберкулезом легких: Автореф. дис. ... канд.мед.наук. – К., 1972. – 26 с.
  22. Сіротівін М.М. Життя на висотах і хвороба висоти. – К.: Вид-во АН УРСР, 1933. – 226 с.
  23. Степанов О.Г. Влияние прерывистой нормобарической гипоксии на состояние слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки человека // Физиол. журн. – 1992. – №5. – С.95–97.
  24. Стрелков Р.Б., Караш Ю.М., Чижов А.Я. и др. Повышение неспецифической резистентности организма с помощью нормобарической гипоксической стимуляции//Докл. АН СССР. – 1987. – №2. – С. 493–496.
  25. Ужанский Я.Г. К механизму стимуляции кровотока при гипоксиях. – В кн.: Гипоксия. – Тр. конф. по проблемам кислородной недостаточности организма. – К.: Изд-во АН УССР, 1949. – С.219–233.
  26. Фролькис В.В. Гипоксия как рефлекторный раздражитель сердечно-сосудистой системы. – В кн.: Физиология и патология дыхания, гипоксия, оксигенотерапия. – К.: Изд-во АН УССР, 1958. – С. 44–48.
  27. Холодный Н.Г. Биологическое значение фитогенных органических веществ атмосферы //Бюл. Моск. об-ва испытателей природы. – 1948. – **53**, вып.1. – С. 53–71.
  28. Bogomoletz O. Artificial mountaine climat in complex allergodermatosis treatment. – In: 18<sup>th</sup> World Congress of Dermatology. – NY, 1992. – P.23A.
  29. Burton H.W., Barclay J.K. Metabolic factors from exercising muscle and the proliferation of endothelial cells// Med. Sci. Sports Exers, 1986. – **18**, №4. – P.390.
  30. Heinrich D., Hergt M., Dtv-Atlas Ökologie. Deutcher Tashenbuch Verlag. – К.: Знання-Прес, 2001. – 288 с.
  31. Goldspink G. Mechanical signals, IGF – I gene splicing, and muscle adaptation //Physiology (Bethesda). – 2005. – **20**. – P. 232.
  32. McCall G., Grindeland R., Roy R., Edgerton V. Muscle afferent activity modulates bioassayable growth hormone in human plasma //J. Appl. Physiol. – 2000. – **89**. – P.1137.
  33. Ruecert R., Mueller G.C. Effect of oxygen tension on hela cell growth// Cancer Res. – 1960. – **20**, №6. – P. 944–949.
  34. Takarada Y., Nakamura Y., Aruga S. et al. Rapid increase in plasma growth hormone after low – intensity resistance exercise with vascular occlusion //J. Appl. Physiol. – 2000. – **88**, №1. – P. 61.

*Ин-т физиологии им. А.А. Богомольца НАН  
Украины, Киев  
E-mail: vadber@biph.kiev.ua*

Т.Г. Сазонтова, Н.А. Анчишкина, А.Г. Жукова, И.В. Бедарева, Е.А. Пылаева, Н.А. Кривенцова, А.А. Полянская, А.Р. Юрасов, Ю.В. Архипенко

## Роль активных форм кислорода и редокс-сигнализации при адаптации к изменению содержания кислорода

*Обзор литературы последних 15 лет с привлечением собственных экспериментальных данных посвящен проблеме участия активных форм кислорода (АФК) и редокс-сигнализации в индукции защитных систем клетки и формировании адаптационной резистентности организма. Даны современные представления о роли АФК в редокс-сигнализации, в индукции факторов транскрипции и белков с протекторной функцией, вариантах клеточного ответа при действии АФК, необходимых ограничениях при применении экзогенных антиоксидантов. Представлена концепция об участии АФК в неспецифической компоненте повышения резистентности организма. Обсуждены особенности нового, предложенного авторами способа адаптации к изменению содержания кислорода и приведены собственные экспериментальные данные об эффективности адаптации к периодической гипоксии-гипероксии от АФК-индуцирующих стрессорных повреждений различной природы.*

Участие ишемических, реперфузионных и гипоксических состояний в патогенезе различных заболеваний ставит перед современной медициной проблему повышения резистентности организма к этим повреждающим факторам. Один из основных механизмов их действия – активация свободнорадикального окисления, поэтому актуальным вопросом является коррекция состояний организма, связанных с чрезмерным содержанием активных форм кислорода (АФК). В качестве подобной защиты наиболее часто применяют антиоксиданты. Однако на фоне большого потока работ по антиоксидантной терапии в последние годы появляются сообщения о том, что применение природных и синтетических антиоксидантных средств в терапии, а особенно профилактике ряда заболеваний, не всегда приводит к благоприятному эффекту. Например, это касается от-

даленных, часто не учитываемых, последствий продолжительного применения антиоксидантов, поскольку большинство используемых препаратов могут вызывать подавление собственной, эндогенной системы антирадикальной защиты организма [8, 16, 18, 19, 28, 37].

Помимо отмеченного в ряде случаев отсутствия положительного результата антиоксидантной терапии заболеваний, формально опосредованных высоким содержанием АФК, отмечают, напротив, положительный эффект при использовании ограниченных по интенсивности прооксидантных воздействий, например, в результате широко применяемых за последние 20–30 лет полиненасыщенных жирных кислот в терапии и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Поэтому перспективными являются методы, позволяющие ограничивать чрезмерную активацию

© Т.Г. Сазонтова, Н.А. Анчишкина, А.Г. Жукова, И.В. Бедарева, Е.А. Пылаева, Н.А. Кривенцова, А.А. Полянская, А.Р. Юрасов, Ю.В. Архипенко



свободнорадикального окисления за счет индукции синтеза собственных защитных, и в частности, антиоксидантных систем, путем периодического, ограниченного по интенсивности АФК-сигнала. К таким методам относятся различные виды адаптационных тренировок, в том числе действие периодического изменения содержания кислорода. К последним относятся разные типы адаптации к гипоксии – периодическая гипобарическая гипоксия в барокамерах и интервальная нормобарическая гипоксическая тренировка.

*Роль АФК в редокс-сигнализации.* Из работ последних лет стало очевидным, что АФК играют важнейшую роль, участвуя при физиологических условиях в ключевых регуляторных механизмах живой клетки [31, 32, 38, 52]. В частности, они принимают участие в начальных этапах внутриклеточной сигнализации, которая является многокомпонентной системой передачи сигнала к клеточному ядру, и получила название редокс-сигнализации по начальному звену, чувствительному к окислительно-восстановительному состоянию [14, 21, 48].

В настоящее время известно множест-

во медиаторов и соответствующих им рецепторов, благодаря взаимодействию которых осуществляются различные специфические реакции. Типичный пример – катехоламины и соответствующие им адренорецепторы [15]. Однако для большого количества действующих агентов как внешнего, так и внутреннего происхождения, специфических рецепторов не обнаружено. Прежде всего это относится к действию гипоксии, температуры, а также различных окислителей, восстановителей и т.д. Тем не менее, клеточный ответ на эти воздействия развивается и без таких специфических рецепторов благодаря сигнальной цепи, именуемой редокс-сигнализацией. Кроме того, даже те медиаторы, которые имеют свои специфические рецепторы, действуют параллельно через активацию редокс-сигнализации. Недавними исследованиями установлена ключевая роль АФК в перекрестной активации рецепторов и cross-talk сигнальных путей, поскольку АФК образуются при активации самых разных рецепторов – гормональных, цитокиновых и т.д.

Реализация активации редокс-сигнального пути показана на рис. 1. После обра-

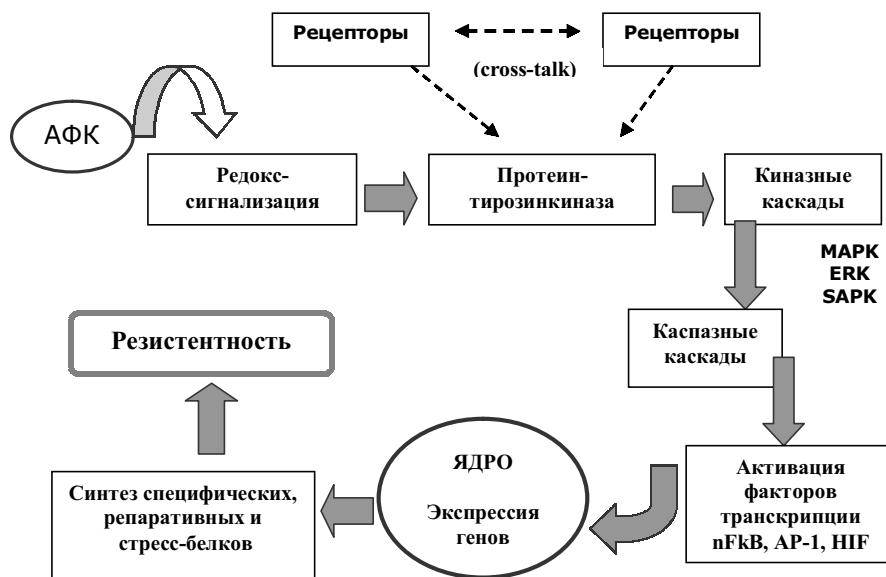


Рис. 1. Роль активных форм кислорода (АФК) в редокс-сигнализации и активации синтеза защитных белков

зования АФК происходит окислительно-восстановительная модификация сульфгидрильных групп сенсорных белков, от которых затем сигнал передается по уже известным регуляторным каскадам, работающим и при активации специфических рецепторов. Показано, что стадия активации протеинтирозинкиназы является общим звеном при специфическом и неспецифическом (АФК-зависимом) приеме внешнего сигнала. В дальнейшем индуцируются киназные и каспазные каскады, изменяется работа ионных каналов и т.д., что в свою очередь приводит к передаче сигналов следующим внутриклеточным медиаторам.

*Факторы транскрипции и белки с протекторной функцией.* Одним из важнейших следствий инициации редокс-сигнализации и АФК-опосредованной передачи сигнала является активация ядерных факторов транскрипции, которые индуцируют многочисленные гены белков с защитной функцией. В настоящее время большое значение придается таким факторам транскрипции, как NF- $\kappa$ B [24], AP-1 [34], NIF- $\alpha$ , NIF-3  $\alpha$  [13, 48, 56]. Последние играют важную роль при развитии гипоксических состояний, поскольку через активацию генома приводят к увеличению так называемых «гипоксических» белков, чья активность способствует адаптации и выживаемости клеток в условиях гипоксии.

Среди белков, синтезирующихся при АФК-сигнале, наибольшее значение имеют такие неспецифические молекулы, как ферменты антиоксидантной защиты, кристаллины, белки семейства HSP и другие белки срочного ответа, которые индуцируются в ответ на гипоксию, стресс, ишемию, реперфузию и другие воздействия [25, 34, 38, 39, 43, 58].

*Эндогенная защита и пути ее формирования.* АФК образуются при различных воздействиях на организм: стресс, воспаление, гипоксия, высокие и низкие температуры, физическая нагрузка, практически

все патологические состояния сопровождаются, помимо специфического ответа, и неспецифическим увеличением содержания АФК.

Кроме индукции АФК при внешних воздействиях, они образуются в организме постоянно, вне любых патологических состояний. Иными словами, образование АФК и свободнорадикальное окисление является естественным физиологическим процессом, постоянно протекающим в организме. Поэтому источниками АФК, в частности супероксидного анион-радикала, являются самые разные процессы, как экзогенные, так и внутриклеточные. Однако основные источники его образования – ферментативные системы: электронно-транспортная цепь митохондрий [5, 35] – митохондриальная цитохром-*c*-оксидаза, а также НАДФН-оксидаза фагоцитирующих клеток, ксантинооксидаза и микросомальные монооксигеназы [1, 3, 50, 59]. Помимо этого, значительный вклад в образование АФК вносит автоокисление катехоламинов [22], окисление тиолов, флавинов, хинонов, ксенобиотиков [23, 41, 53]. В гипоксических условиях процесс образования АФК сохраняется на высоком уровне за счет активации ксантинооксидазной системы [30, 36, 55], а также высвобождения индукторов образования АФК – металлов с переменной валентностью, в частности железа и меди от гемопротеинов – гемоглобина, цитохромов, церуллоплазмينا, супероксиддисмутазы [2, 43].

Таким образом, в организме, во-первых, существуют постоянные источники АФК, даже в условиях сниженного содержания кислорода, во-вторых, множественные системы индукции АФК дублируют друг друга, подчеркивая необходимость существования свободнорадикальных процессов для жизнедеятельности клетки. Иными словами, в клетке, несмотря на небезопасность использования АФК, идет постоянное их образование.

Образующиеся АФК участвуют в двух разнонаправленных, но постоянно протекающих физиологических процессах – катаболизме старых и синтезе новых молекул. В период катаболизма разрушаются старые или поврежденные биологические молекулы, при этом АФК и свободнорадикальное окисление являются непосредственными участниками и движущей силой такого обновления. С помощью АФК в клетке происходит окисление тех липидов и белков, которые должны быть подвержены деструкции. Это облегчает дальнейшее действие ферментов деградации, поскольку они имеют гораздо большее сродство именно к окисленному субстрату [9, 54, 57]. Таким образом, АФК включены в постоянно протекающие катаболические процессы.

С другой стороны, АФК участвуют в синтезе. Именно с помощью свободнорадикального окисления полиненасыщенных жирнокислотных остатков фосфолипидов, составляющих биологические мембраны, происходит синтез таких физиологически активных веществ липидной природы, как лейкотриены, тромбоксаны, простагландины [26, 29, 42].

Поэтому, участвуя в катаболизме и синтезе, АФК способствуют адаптации клетки к новым условиям среды, изменяя состав мембранных фосфолипидов и обновляя белковый спектр.

Помимо основной, физиологической роли, присущей АФК, давно известно, что избыточное их содержание в живой клетке может быть, как повреждающим фактором, нарушая структуру и функционирование внутриклеточных компонентов, включая ДНК, и развитием патологических состояний. Поэтому одним из универсальных механизмов защиты организма является синтез эндогенных протекторных неспецифических факторов.

Таким образом, в результате каскада редокс-сигнализации клетка насыщается

молекулами, которые повышают ее защиту от самых разных повреждающих экзогенных и эндогенных воздействий, действие которых опосредованно индукцией свободнорадикального окисления.

Ясно, что чем выше защитный барьер клетки, тем большую защиту будут иметь ее структуры от действия повреждающих факторов. При этом наиболее действенный барьер – не внешний, созданный с помощью экзогенных добавок, подавляющих свободнорадикальное окисление, а именно, эндогенный уровень защиты, т.е. сформировавшийся в самой клетке. В экспериментах оказалось, что ингибирование свободнорадикального окисления с помощью добавки внешних антиоксидантов не приводит к активации защитных систем организма и не оказывает долговременного защитного эффекта. Это было впервые показано на примере добавок антиоксидантов в диетическое питание, обогащенное прооксидантами – полиненасыщенными жирными кислотами класса  $\omega$ -3 ( $\omega$ -3 ПНЖК). Появилось предположение о том, что повышение содержания АФК является необходимой стадией проявления положительного кардиопротекторного действия  $\omega$ -3 ПНЖК [27]. Действительно [37], потребление антиоксиданта витамина Е снижает проявление некоторых биологических эффектов  $\omega$ -3 ПНЖК, поэтому рекомендовано их применение без антиоксидантов.

С учетом последних данных о редокс-сигнализации становится понятна причина этого явления (рис. 2). Возвращаясь к факторам транскрипции, т.е. тем соединениям, которые непосредственно активируют генетический аппарат клетки, нужно иметь в виду, что у них есть активаторы и ингибиторы. При этом индукторами активации различных факторов транскрипции выступают АФК, в то время, как антиоксиданты блокируют активацию NF- $\kappa$ B, AP-1 и других факторов транскрипции. Поэтому при активации АФК-опосредованного

окисления происходит индукция факторов транскрипции, что в свою очередь приводит к синтезу протекторных белков, среди которых наиболее важными являются репаративные белки, способствующие восстановлению структуры и функции белков и нуклеиновых кислот, а также ряд специфических белков, среди которых ферменты антиоксидантной защиты занимают существенное место. В то же время по мере повышения в результате этих процессов содержания антиоксидантов, происходит ингибирование факторов транскрипции и, следовательно, синтез защитных белков прекращается. Таким образом, синтез протекторных систем идет лишь до момента компенсации АФК-сигнала и для того, чтобы вновь индуцировать защитные системы, необходим новый АФК-сигнал, т.е. данный процесс является дискретным. Поскольку повторной активации синтеза защитных структур можно ожидать только при повторном действии прооксидантов, то с помощью поступления периодических, дискретных свободнорадикальных сигналов и следующей за ними индукции защитных систем и реализуется основной принцип периодической адаптации.

*Участие АФК в неспецифической компоненте резистентности организма.* Важно, что при различных видах адаптации используются повторяющиеся воздействия, сопровождающиеся, как показано за последнее десятилетие периодической активацией АФК [45], что ведет к увеличению резистентности организма к свободнорадикальному окислению. За последние годы на основе многочисленных работ по соотношению прооксидантов и антиоксидантов при острых и адаптационных воздействиях нами была сформулирована концепция участия АФК в создании неспецифической компоненты повышения резистентности организма при периодически действующем факторе. Результатом ответа клетки на повторяющийся свободнорадикальный сигнал и включение редокс-сигнального каскада является периодическая активация соответствующих факторов транскрипции и синтез защитных внутриклеточных компонентов, в том числе с антиоксидантной функцией [12, 47].

Важно, что повторяющаяся, ограниченная генерация АФК является механизмом повышения резистентности организма при самых разных воздействиях. Это пока-

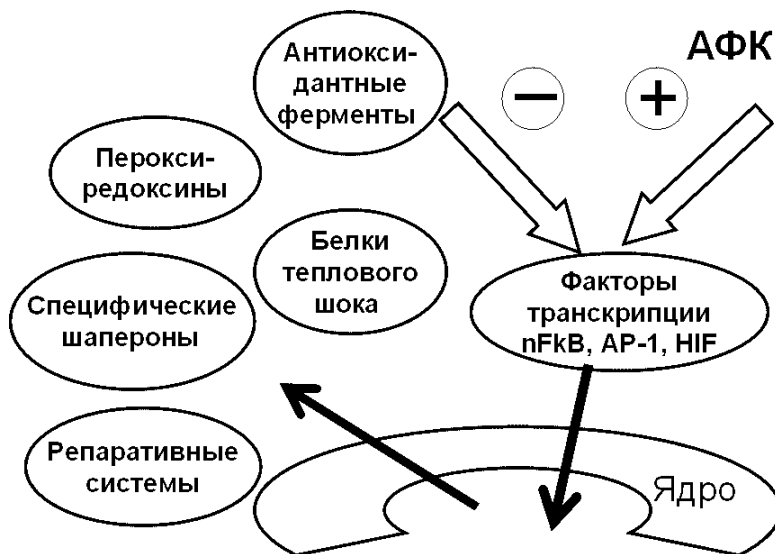


Рис. 2. Спектр экспрессии защитных белков, индуцированной активными формами кислорода (АФК). Указаны активаторы (+) и ингибиторы (-) факторов транскрипции

зано при стрессе [8], физической тренировке [11, 40], холодовой адаптации [51], применении пищевых адаптогенов [20, 44, 49], диеты, обогащенной субстратами окисления –  $\omega$ -3 ПНЖК [10, 27], а также при гипобарической интервальной гипоксической тренировке [17]. В последнее десятилетие появились данные о сходстве механизмов защитного действия не только периодических видов снижения содержания кислорода, как при действии гипо- или нормобарических гипоксических тренировок, но и периодического увеличения содержания кислорода, как в случае гипербарической оксигенации в адаптационном режиме [4].

Таким образом, кардинальный принцип адаптации, заключающийся в периодичности действия адаптирующего фактора, в настоящее время может быть сформулирован, как периодически действующий фактор, инициирующий активацию свободнорадикального сигнала.

Приняв это за основу, ясно, что повышение устойчивости к гипоксическим, ишемическим и реперфузионным воздействиям, может быть реализовано при адаптации организма к периодическому изменению содержания кислорода. При этом конкретный способ достижения такого изменения становится вторичным фактором, а на первый план выдвигается общий принцип адаптации клетки к периодическому увеличению и снижению, новому увеличению, снижению и т.д. содержания кислорода, т.е. к периодической активации свободнорадикального окисления. Благодаря этому, не только различные виды адаптации к гипоксии имеют сходные молекулярные основы повышения резистентности клеток, но и периодическое действие гипероксии при применении гипербарической оксигенации, несмотря на внешне значительную разницу, имеют общие закономерности. В совместной работе с Масловым [33] мы использовали газохроматографическое

определение пентана в выдыхаемом воздухе пациентов с ишемической болезнью сердца I-II степени. Оказалось, что введение в комплексную терапию интервальной нормобарической гипоксии или периодической гипербарической гипероксии эффективно и практически в равной степени ингибирует процессы свободнорадикального окисления при лечении таких больных, что подтверждает наличие общих механизмов этих адаптационных воздействий на организм.

*Новый способ адаптации к изменению содержания кислорода.* В последние годы с учетом обнаруженных общих механизмов формирования адаптационной резистентности к действию гипоксии и умеренной гипероксии нами был предложен новый вид адаптации к изменению содержания кислорода. Он включает периоды гипоксии и умеренной гипероксии, при этом его особенностью является увеличение интенсивности свободнорадикального сигнала по сравнению с классической интервальной нормобарической гипоксией (Патент № 2289432; 20.12.2006 г.; Грант РФФИ 05-04-08102-офи\_а). Важно, что при подобном, но более интенсивном адаптационном режиме значительно быстрее, чем при классической интервальной гипоксии – нормоксии достигался защитный эффект у больных пациентов с ишемической болезнью сердца, хотя не было зарегистрировано изменений в липидном спектре крови или энергетическом обмене [6]. Введение гипероксической компоненты в классическую интервальную нормобарическую гипоксию ранее применялось крайне редко и лишь на основе эмпирических наблюдений. Поэтому вполне понятно, что не существует работ по обоснованию и изучению механизмов такого способа адаптации. Более того, уровень гипероксии, как правило, составлял 50–60 %, а время воздействия было значительным.

В нашу задачу в связи с этим входило следующее:

а) разработка способов адаптации к изменению содержания кислорода на основе смены гипоксических (не ниже 10 %  $O_2$ ) и умеренно гипероксических (не более 30 %  $O_2$ ) интервалов. Такая адаптация должна обладать повышенным АФК-сигналом по сравнению с классической адаптацией к гипоксии, но не повреждать чувствительные к действию АФК органы;

б) сравнение уровня защитных систем и формирования резистентности мембранных структур сердца, печени и мозга после курса интервальной нормобарической гипоксии и тренировки, сочетающей периоды гипоксии и гипероксии;

в) проверка эффективности адаптации к гипоксии–гипероксии от АФК-индуцирующих стрессорных повреждений различной природы.

За последних 5 лет получены следующие основные результаты:

а) метод интервальной нормобарической гипоксии относится к мягким адаптационным воздействиям, опосредованным периодической низкоинтенсивной индукцией АФК. При его длительном применении (23 сут) нами ранее [46] было отмечено повышение резистентности к действию АФК

мембранных структур сердца, печени и коры головного мозга. Однако формирование протекторного эффекта за более короткое время требует увеличения АФК-сигнала, что нежелательно, поскольку углубление гипоксии ниже 10 % приводит к отрицательным последствиям на уровне наиболее чувствительных к действию АФК органов (рис. 3). Поэтому, чтобы увеличить АФК-сигнал, мы заменили период нормоксии в классической адаптации к гипоксии на периоды умеренной гипероксии, что привело к двукратному усилению, но без углубления гипоксической составляющей.

В результате была использована более короткая тренировка в 2 режимах – классической адаптации – интервальной нормобарической гипоксия и нового вида тренировки – гипоксия и гипероксия (15 сут, 3–5-минутные интервалы 10 % гипоксии и 30 % гипероксии, по 60 мин ежедневно), что соответствует окончанию периода срочной адаптации. Воздушная смесь со сниженным и повышенным содержанием  $O_2$  создавалась в специальных блоках с помощью установки, работающей по принципу мембранного деления газов. Установка является оригинальной разработкой лабо-

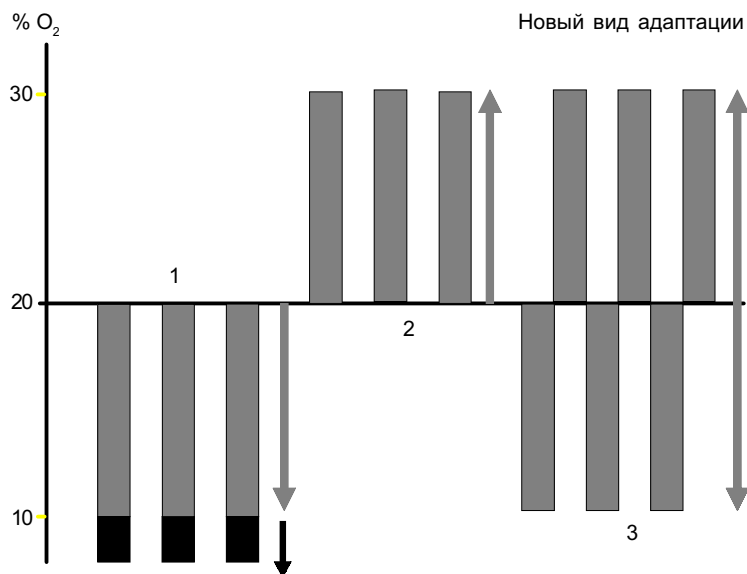


Рис. 3. Рис. 3. Виды адаптации к изменению содержания кислорода: 1 – гипоксия-нормоксия, 2 – гипероксия-нормоксия, 3 – гипоксия-гипероксия

ратории адаптационной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова совместно с фирмой «Метакс»;

б) оценка уровня защитных систем в органах показала:

классическая интервальная нормобарическая гипоксия в 15-суточном режиме приводила к достоверному увеличению активности СОД в печени, мозгу и сердце – на 19, 21 и 20 % соответственно, активности каталазы в сердце на 30 % от контроля, а также снижению глутатионредуктазы – в печени на 28 %, в мозгу – на 34 % от контроля. Таким образом, после интервальной нормобарической гипоксии в сердце зарегистрирована активация ферментов антиоксидантной защиты, в мозге и печени она слабее или отсутствует, а некоторые ферменты антиоксидантной защиты ингибируются. Это позволяет предположить больший защитный эффект кратковременной интервальной нормобарической гипоксии на ткань миокарда, более слабый на мозг и печень.

При изучении резистентности внутриклеточных мембранных структур этих органов наши предположения были подтверждены.

В печени после кратковременной интервальной нормобарической гипоксии повышается чувствительность ткани к индукции

АФК-опосредованных процессов (скорость накопления продуктов окисления увеличена от контроля через 40 мин на 33 % ( $P < 0,05$ )). В отличие от адаптации к интервальной нормобарической гипоксии, при которой чувствительность печени к индукции свободнорадикального окисления повысилась, т.е. ее устойчивость к АФК снижена, новый вид адаптации, сочетающий периоды гипоксии и гипероксии, не снижал резистентность мембран печени к АФК (рис. 4,а). Важно, что в отличие от интервальной нормобарической гипоксии, 15 дней тренировки для режима гипоксия–гипероксия достаточно для формирования устойчивой стадии адаптации, при которой адаптирующий фактор часто скомпенсирован. Действительно, после адаптации к гипоксии и гипероксии зарегистрировано отсутствие стрессорной и гипоксической компонент, о чем судили по возвращению к контрольному уровню активности ферментов антиоксидантной защиты и отсутствию синтеза индуцибельных форм белков срочного ответа – HSP70 и HSP32 – гемоксигеназы-1 (Western-блот, моноклональные антитела к HSP70 и HSP32, вторые антитела с пероксидазной меткой).

В сумме эти данные свидетельствуют о наличии защитного эффекта режима гипоксии

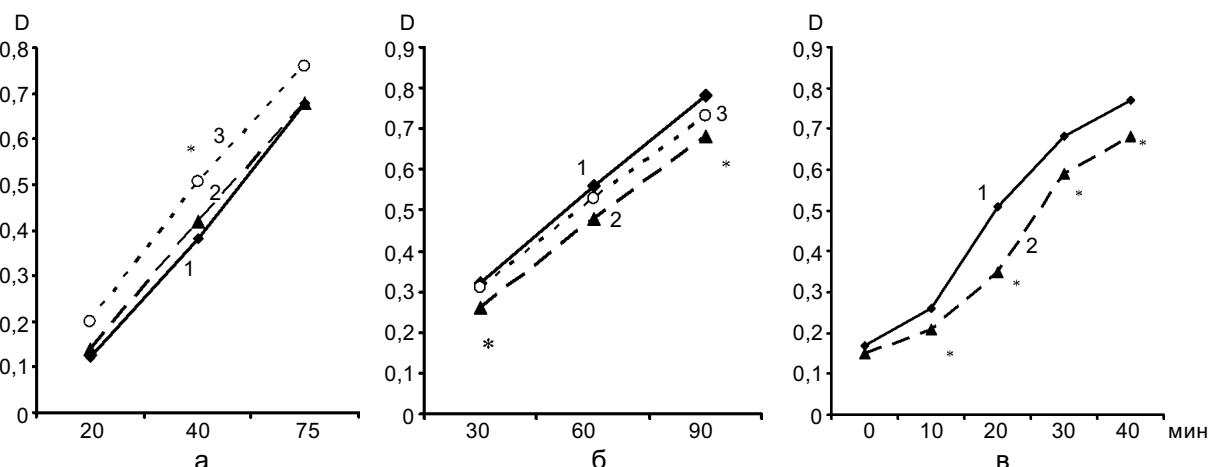


Рис. 4. Влияние адаптации к изменению содержания кислорода, накопление ТБК-активных продуктов свободнорадикального окисления при его индукции *in vitro* в системе с аскорбатом: а – печень, б – мозг, в – сердце; 1 – контроль, 2 – гипоксия и гипероксия, 3 – гипоксия и нормоксия

и гипероксии, в том числе на уровне высокочувствительной к действию АФК печени.

В мозгу изменения ферментов антиоксидантной защиты носят сходный характер при режимах интервальной нормобарической гипоксии и гипоксии, а также гипероксии. Тем не менее, уровень накопления продуктов свободнорадикального окисления при его индукции *in vitro* различается (см. рис. 4,б). При адаптации интервальной нормобарической гипоксии резистентность ткани мозга к действию АФК не отличается от контроля, в то время как при гипоксии и гипероксии устойчивость к АФК увеличена. Так, содержание продуктов окисления достоверно снижается от контроля через 30 мин индукции окисления на 19 % ( $P \leq 0,01$ ) и через 90 мин – на 13 % ( $P \leq 0,05$ ).

Таким образом, адаптация в режиме гипоксии и гипероксии вызывала большую устойчивость ткани мозга к индукции свободнорадикального окисления.

В сердце кратковременная (15 сут) адаптация к гипоксии и гипероксии не увеличивала активность СОД, каталазы и глутатионредуктазы, а также экспрессии HSP70 и HSP32, которые с одной стороны являются маркерами повреждения, а с

другой, – выполняют защитную функцию от действия АФК в клетке. Это означает, что к 15-м суткам адаптации к гипоксии и гипероксии произошло снижение интенсивности свободнорадикального сигнала, т.е. достижение стадии долговременной адаптации, несмотря на уменьшенное время тренировки. При этом резистентность мембранных структур сердца к индукции свободнорадикального окисления после адаптации к гипоксии и гипероксии увеличилась (см. рис. 4,в). Так, уровень накопления свободнорадикальных продуктов при его индукции *in vitro*, после тренировки был на 20–30 % ( $P \leq 0,01$ ) ниже по сравнению с контролем.

Кроме того, после адаптации к гипоксии и гипероксии повысилась устойчивость кальций-транспортирующей системы саркоплазматического ретикулаума миокарда к действию повреждающих факторов – низкой концентрации  $Ca^{2+}$  – на 59 % ( $P \leq 0,01$ ) и к кальциевой нагрузке – на 18 % ( $P \leq 0,05$ ), а также к действию автолиза и индукции свободнорадикального окисления (рис. 5).

Таким образом, по разделу б) можно заключить следующее:

1) показана принципиальная возмож-

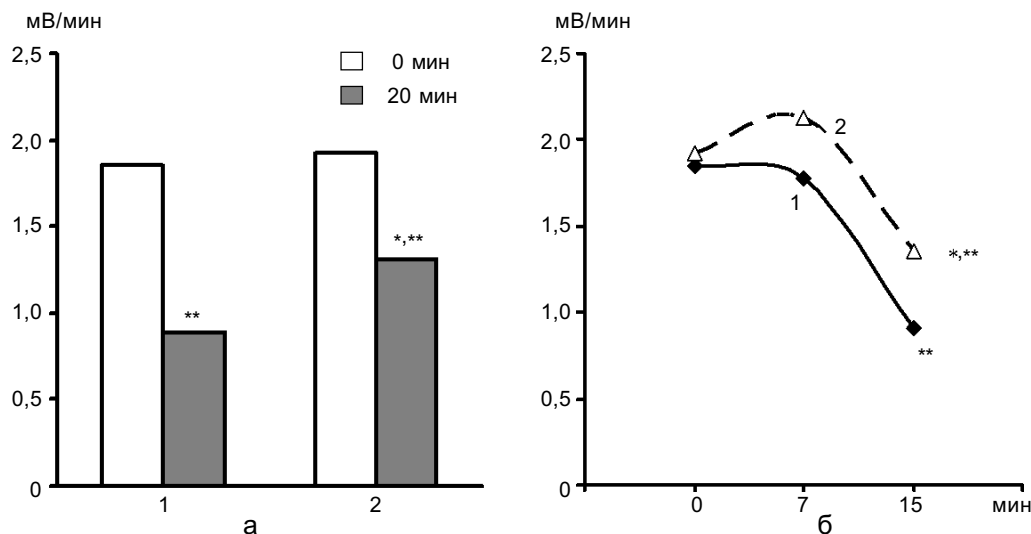


Рис. 5. Влияние адаптации к гипоксии-гипероксии на устойчивость кальциевого насоса саркоплазматического ретикулаума миокарда: а – к действию автолиза, б – к индукции свободнорадикального окисления *in vitro*; 1 – контроль, 2 – гипоксия и гипероксия. \* по сравнению с контролем, \*\* по сравнению с исходным состоянием



ность достижения устойчивого защитного эффекта при применении адаптации, сочетающей периоды гипоксии и умеренной гипероксии.

2) введение гипероксической компоненты в классический режим интервальной нормобарической гипоксической тренировки без углубления гипоксии повышает резистентность ткани печени, чувствительной к действию АФК.

3) режим комплексного применения гипоксических и умеренно гипероксических периодов позволяет получить эффект стойкой адаптационной защиты при снижении времени тренировок.

Это означает, что с помощью введения гипероксической компоненты эффект классической интервальной нормобарической гипоксической тренировки может быть достигнут раньше и в более мягких условиях, что особенно важно в случае применения данного вида тренировки в комплексной терапии и профилактике;

в) самые последние работы были направлены на проверку эффективности нового вида адаптации к гипоксии и гипероксии при стрессорной индукции АФК:

1) оценивали антистрессорное влияние двух видов кратковременной адаптации – интервальная нормобарическая гипоксия, а также гипоксия и гипероксия на модели гипокинезии (антиортостатическое вывешивание крыс линии Вистар массой 250 г, 3 ч, на опоре только передние лапы по методу Morey-Holton). После острой гипокинезии в печени в 2,5–3 раза увеличивается скорость накопления продуктов свободнорадикального окисления при его индукции *in vitro* (рис. 6), что свидетельствует о присутствии выраженной стрессорной компоненты. Кратковременный курс адаптации к интервальной нормобарической гипоксии имел частичный защитный эффект от такого стресса, что выражалось в 25%-м снижении интенсивности окисления, а добавление гипероксической компоненты в адаптацию к гипоксии (гипоксия и гипероксия) значи-

тельно повышало выраженность протекторного антистрессорного эффекта – резистентность клеточных мембран печени повысилась по сравнению с животными без адаптации в 1,5–2 раза.

Относительно синтеза защитных белков срочного ответа показано, что в отличие от неизменной активности каталазы, значительно изменяется экспрессия стресс-индуцированного белка с протекторной функцией – HSP70, уровень которого одновременно характеризует интенсивность АФК-сигнала (рис. 7, 8). После гипокинезии содержание HSP70 в скелетной мышце и сердце значительно повышено, предварительная адаптация снижает его в скелетной мышце на 22–47 %, в сердце в 4–4,2 раза, указывая на значительное подавление АФК-сигнала.

Таким образом, предварительная адаптация к гипоксии и гипероксии предупреждает стресс-индуцированное увеличение интенсивности АФК-сигнала при гипокинезии;

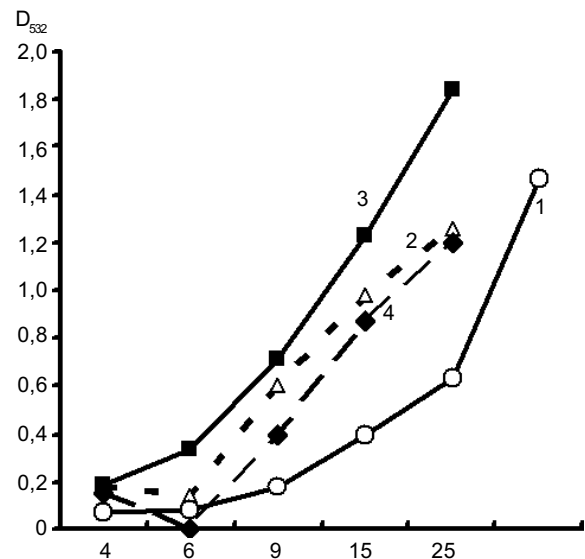


Рис. 6. Эффект предварительной адаптации к изменению содержания кислорода на интенсивность накопления продуктов свободнорадикального окисления в печени при гипокинезии (индукция *in vitro* в системе с Fe<sup>2+</sup>-аскорбат): 1 – контроль, 2 – адаптация к гипоксии-нормоксии и гипокинезии, 3 – адаптация к гипоксии-гипероксии и гипокинезии, 4 – обдувка воздухом и гипокинезия

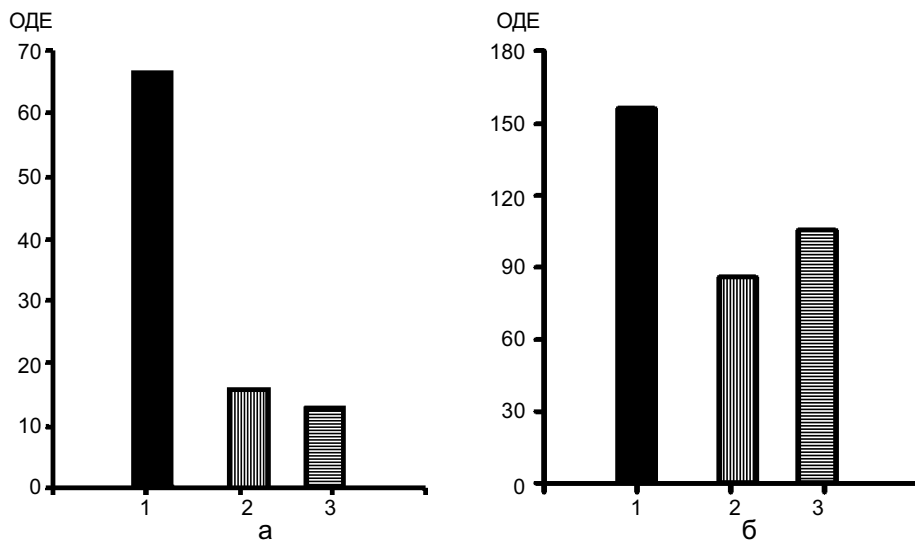


Рис. 7. Эффект предварительной адаптации к изменению содержания кислорода на экспрессию стресс-белка HSP70 (Western blot-анализ) при гипокинезии в сердце (а) и скелетной мышце (б): 1 – обдувка воздухом и гипокинезия, 2 – адаптация к гипоксии-нормоксии и гипокинезия, 3 – адаптация к гипоксии-гипероксии и гипокинезия. ОДЕ – относительные денситометрические единицы

2) другим тестирующим стрессорным воздействием явилась истощающая физическая нагрузка – плавание до отказа. При однократном плавании адаптация к интервальной нормобарической гипоксии не обладает защитным действием, в отличие от нового способа адаптации к гипоксии и гипероксии, после которого животные плавали значительно дольше (рис. 9). При трехкратной нагрузке, продемонстрирована эффективность обоих видов адаптации, однако эффект нового вида – гипоксия и гипероксия – был выше.

Однократное плавание до отказа приводит к резкому (в 2,9 раза) увеличению в сердце экспрессии HSP 70 по сравнению с контролем (рис. 10), что свидетельствует о значительной стрессорной компоненте этого воздействия и чрезмерного АФК-сигнала. Это подтвердилось в тесте на устойчивость мембранных

структур печени к индукции свободнорадикального окисления *in vitro* (рис. 11). После однократной физической нагрузки чувствительность печени к АФК-процессам возрастает на 18–34 % от контроля. Оба вида адаптации эффективно предупреждают чрезмерную интенсивность свободнорадикальных процессов при острой физической нагрузке и возвращают ее к контрольному уровню. Более того, после предварительной адаптации к интервальной нормобарической гипоксии и к гипоксии и гипероксии в 1,8–3,7 раза снижается содержание стресс-индуцибельного белка HSP70 относительно физической нагрузки без адаптации (см. рис. 10).

Таким образом, адаптация к изменению содержания кислорода эффективно компенсирует чрезмерный АФК-сигнал при острой

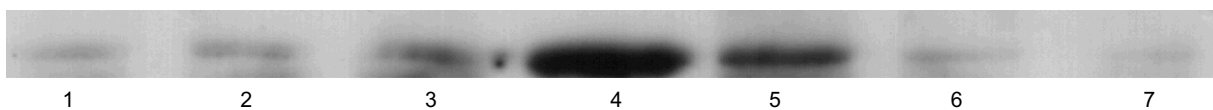


Рис. 8. Оригинальные денситограммы содержания HSP70 в скелетной мышце (1-3) и в сердце (5-6) при гипокинезии (3 ч) без и на фоне предварительной адаптации: 1 – адаптация к гипоксии-нормоксии и гипокинезия, 2 – адаптация к гипоксии-гипероксии и гипокинезия, 3 – обдувка воздухом и гипокинезия, 4 – обдувка воздухом и гипокинезия, 5 – адаптация к гипоксии-нормоксии и гипокинезия, 6 – адаптация к гипоксии-гипероксии и гипокинезия

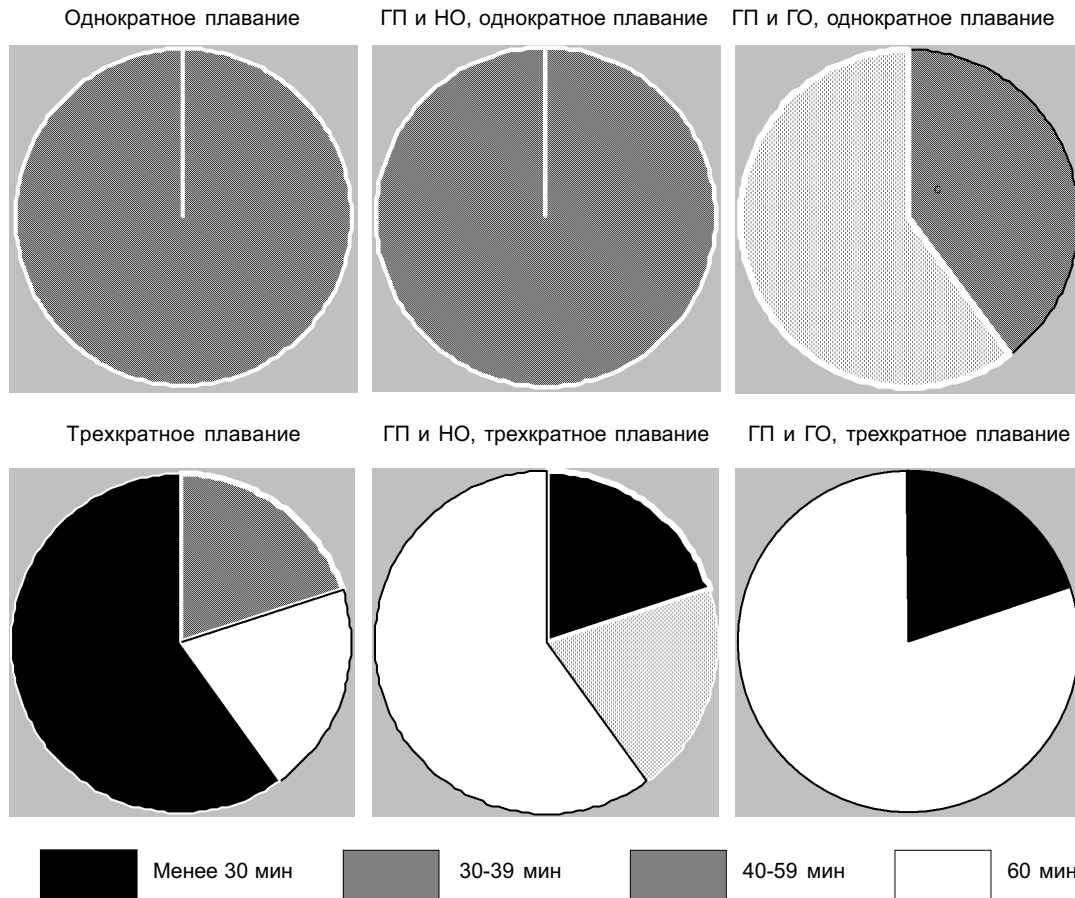


Рис. 9. Увеличение длительности плавания до отказа после предварительной адаптации к изменению содержания кислорода – к гипоксии-нормоксии (ГП и НО) и к гипоксии-гипероксии (ГП и ГО) при однократном и трехкратном плавании (по одному плаванию в каждый из трех последовательных дней)

физической нагрузке, а длительность самого плавания значительно увеличивается при новом виде адаптации – к гипоксии и гипероксии.

Следует отметить, что адаптационные тренировки с использованием изменения содержания кислорода во вдыхаемом воздухе приводят к дозированной индукции АФК-сигнала и синтезу протекторных компонентов, защищающих клетку от чрезмерного увеличения содержания АФК при различных стрессорных нагрузках.

С учетом тканеспецифичности проявления ответа на один и тот же внешний стимул и индивидуальной чувствительности к действию повреждающих факторов, чрезвычайно важным, на наш взгляд, является

расширение спектра используемых гипоксических тренировок, среди которых находится и адаптация к периодической гипоксии и гипероксии – способ увеличения интенсивности адаптирующего АФК-сигнала без углубления гипоксической компоненты.

**T.G.Sazontova, N.A.Anchidhkina, A.G.Zhukova, I.V.Bedareva, E.A.Pylaeva, N.A.Krivencova, A.A. Polianskaya, A.R. Iurasov, Yu.V.Arhipenko**

#### **ACTIVE OXYGENE FORMS AND REDOX-SIGNALING ROLE IN ADAPTATION TO OXYGENE CONTENTS CHANGING**

Review of last 15 years literature and own experimental data on role of reactive oxygen species (ROS) and redox signalization in induction of cell protective systems and development

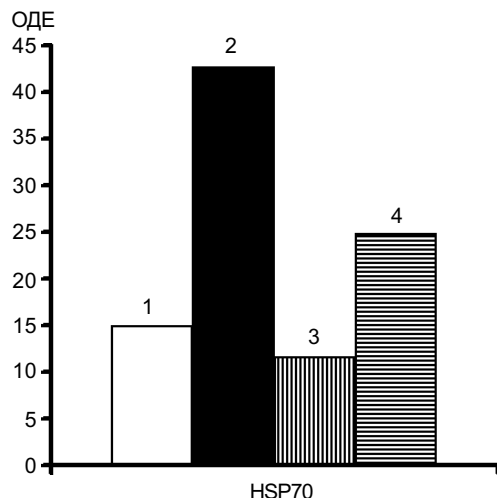


Рис. 10. Содержание стресс-индуцибельного белка срочного ответа – HSP70 в сердце крыс при однократной физической нагрузке плаванием. ОДЕ – относительные денситометрические единицы (Western blot-анализ): 1 – контроль, 2 – физическая нагрузка, 3 – физическая нагрузка на фоне предварительной адаптации к гипоксии-нормоксии, 4 – физическая нагрузка на фоне адаптации к гипоксии-гипероксии

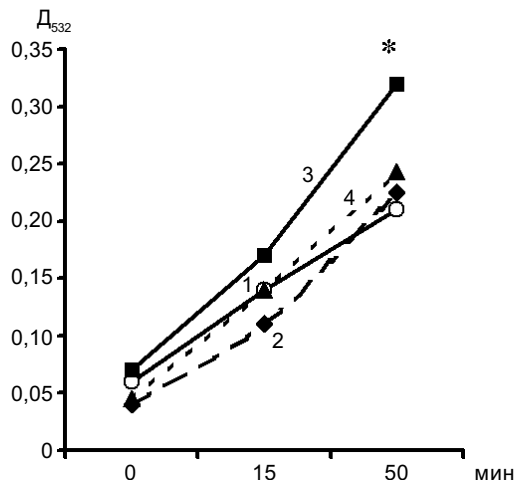


Рис. 11. Уровень накопления ТБК-активных продуктов свободнорадикального окисления в печени при однократной физической нагрузке плаванием: 1 – контроль, 2 – физическая нагрузка, 3 – физическая нагрузка на фоне предварительной адаптации к гипоксии-нормоксии, 4 – физическая нагрузка на фоне адаптации к гипоксии-гипероксии. \*P<0,05 по сравнению с контролем

of adaptive resistance. Modern ideas of ROS involvement in redox signalization, induction of transcription factors and protective proteins, ways of cell response to ROS, essential limitations of exogenic antioxidants are shown. Concept of ROS involvement in non-specific component of increase resistance is introduced. Peculiarities of author's method of adaptation to change oxygen level are discussed. Experimental data on efficacy of adaptation to periodic hypoxia/hyperoxia from ROS-induced stresses are presented.

Moscow State University named M.Lomonosov;  
State Research Common Pathology and Pathophysiology  
Institute Russian Academy Medical Sciences, Moscow

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М., Наука, – 1972.
3. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1991. – 29. – 249 с.
4. Киселев С.О. Механизм действия ГБО на организм // Гипербар. физиол. медицина. – 2002. – 2. – С.3–7.
5. Леденев А.Н., Рууге Э.К. Генерация супероксидных радикалов митохондриями сердца в условиях

ишемии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1985. – 100 (9). – С. 303–305.

6. Маев Э.З., Козырев П.В., Виноградов Н.В. и др. Комплексное применение нормобарической интервальной гипокситерапии в сочетании с кислородно-воздушной реоксигенации, гало- и спелеотерапией при лечении патологии кардиореспираторной системы у лиц пожилого и старческого возраста. – В кн.: Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. – М., 2004. – С.569–578.
7. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. – М.: Изд-во РАМН, 2000. – 51 с.
8. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., Меерсон Ф.З. Увеличение активности ферментов антиоксидантной защиты сердца при адаптации крыс к коротким стрессорным воздействиям // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1987. – 103 (10). – С. 411–413.
9. Сазонтова Т.Г. Стрессиндуцированные изменения функционирования Са-транспортирующей системы саркоплазматического ретикулаума сердца и ее устойчивость к эндогенным повреждающим факторам // Там же. – 1989. – 108 (9). – С. 271–274.
10. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., Меерсон Ф.З. Адаптация к периодической гипоксии и диета с ПНЖК n-3 класса, обладающие кардиопротекторным действием, повышают устойчивость Са-

- транспорта саркоплазматического ретикулума миокарда к свободно-радикальному окислению // Там же. – 1995. – **120** (7). – С. 42–45.
11. Сазонтова Т.Г., Голанцова Н.Е., Меерсон Ф.З., Архипенко Ю.В. Противоположное влияние адаптации к физической нагрузке на миокард и скелетную мышцу. Са-транспортующая система саркоплазматического ретикулума и ферменты антиоксидантной защиты // Там же. – 1996. – **122** (6). – С. 623–627.
  12. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Роль свободно-радикальных процессов и редокс-сигнализации в адаптации организма к изменению уровня кислорода // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2005. – **91**, №6. – С.636–655.
  13. Сазонтова Т.Г., Жукова А.Г., Анчишкина Н.А., Архипенко Ю.В. Фактор транскрипции HIF-1  $\alpha$ , белки срочного ответа и резистентность мембранных структур в динамике после острой гипоксии // Вестн. РАМН, 2007. – №2. – С.17–25.
  14. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти // Сорос. образ. журн. – 2001. – **7** (6). – С. 4–10.
  15. Ткачук В.А. Введение в молекулярную эндокринологию. – М.: Изд-во Москов. ун-та, 1983.
  16. Arkhipenko Yu.V., Sazontova T.G. Mechanisms of the cardioprotective effect of a diet enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids // Pathophysiology. – 1995. – **2** (2) – P. 131–140.
  17. Arkhipenko Yu.V., Sazontova T.G., Tkachouk E.N., Meerson F.Z. Adaptation to continuous and intermittent hypoxia: role of the active oxygen-dependent system. – In: Adaptation Biology and Medicine. Vol.1 Subcellular Basis / Eds. B.K.Sharma et.al. –New Delhi. Narosa Publishing House, 1997. – P.251–259.
  18. Barja G., Lopez Torres M. et al. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver // Free.Radic.Biol.Med. – 1994. – **17**, № 2. – P.105–115.
  19. Buckman T.D., Sutphin M.S., Mitrovic B. Oxidative stress in a clonal cell line of neuronal origin: effects of antioxidant enzyme modulation // J.Neurochem. – 1993. – **60**, № 6. – P.2046–2058.
  20. Cai Y.N., Appelkvist E.L., Depierre J.W. Hepatic oxidative stress and related defenses during treatment of mice with acetylsalicylic acid and other peroxisome proliferators // J. Biochem. Toxicol. – 1995. – **10** (2). – P. 87–94.
  21. Chandel N.S., Schumacker P.T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight // J. Appl. Physiol. – 2000. – **88**. – P.1880–1889.
  22. Dhalla K.S., Rupp H., Beamish R.E., Dhalla N.S. Mechanisms of alterations in cardiac membrane  $Ca^{2+}$  transport due to excess catecholamines // Cardiovasc. Drugs Theran. – 1996. – **10** (Suppl. 1.) – P.231–238.
  23. Dimascio P., Brivida K., Sasaki S.T. et al. The reaction of peroxynitrite with tert-butyl hydroperoxide produces singlet molecular oxygen // Biol. Chem. – 1997. – **378**. – P.1071–1074.
  24. Flohe L., Brigelius-Flohe R., Salion C. Redox regulation of NF-kappa B activation // Free Rad.Biol.Med. – 1997. – **22**. – P.1115–1126.
  25. Graven K.K., Zimmerman L.H., Dickson E.W. et al. Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific // J. Cell. Physiol. – 1993. – **157** (3). – P.544–554.
  26. Hemler M.E., Cook H.W., Lands W.E. Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides // Arch. Biochem. and Biophys. – 1979. – **193**. – P.340–345.
  27. Hu M.L., Frankel E.N., Leibowitz B.E., Tappel A.L. Effect of dietary lipids and vitamin E on in vitro lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenates // J. Nutr. – 1989. – **119**. – P.1574–1582.
  28. Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1995. – **209** (2). – P.104–111.
  29. Kalsner, S. The effect of hypoxia on prostaglandin output and on tone in isolated coronary arteries // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1977. – **55**. – P.882–887.
  30. Kuzmin A.I., Tskitishvili O.V., Serebryakova L.I. Allopurinol: kinetics, inhibition of xanthine oxidase, and protective effect in ischemic-reperfused canine heart as studied by cardiac microdialysis // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1995. – **25**. – P.564–571.
  31. Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction // FASEB J. – 1997. – **11** (1). – P.118–124.
  32. Lee P.J., Alam J., Wiegand G.W., Choi A.M.K. Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – **93**. – P.10393–10398.
  33. Maslov V.A., Sazontova T.G., Kostin A.I. Free radical oxidation in treatment of patients with ischemic heart disease by intermittent hypoxia and hyperoxia // Hypoxia Med. J. – 2004. – **12** (1–2). – P. 26–29.
  34. Maulik N., Goswami S., Galang N., Das D.K. Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF- $\kappa$ B on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation // FEBS Lett. – 1999. – **443**. – P.331–336.
  35. McKenna M.J. Effects of training on potassium homeostasis during exercise // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1995. – **27** (4). – P.941–949.
  36. Miura T., Suzuki K., Shimamoto K., Imura O. Suppression of the degradation of adenine nucleotides during ischemia may not be a sufficient mechanism for infarct size limitation by preconditioning // Basic. Res. Cardiol. – 1996. – **91**. – P.425–432.
  37. Mosconi C., Colli S., Medini L. et al. Vitamin E influences the effects of fish oil on fatty acids and eicosanoid production in plasma and circulating cells in the rat // Biochem. Pharmacol. – 1988. – **37**. – P.3415–3421.

38. Nanji A.A., Griniuviene B., Yacoub L.K. et al. Heat-shock gene expression in alcoholic liver disease in the rat is related to the severity of liver injury and lipid peroxidation // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1995. – **210** (1). – P.12–19.
39. Peng J., Jones G.L., Watson K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements // Free Rad. Biol. Med. – 2000. – **28** (11). – P.1598–1606.
40. Powers S.K., Criswell D., Lawler J. et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle // Amer. J. Physiol. – 1994. – **266** (2. Pt 2.). – P. R375–R380.
41. Pronai L., Ichimori K., Saigusa Y., Nakazawa H. 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide alone enhances the spontaneous superoxide generation by primaquine // Arch. Biochem. and Biophys. – 1991. – **288**. – P.276–281.
42. Roberts A.M., Messina E.J., Kaley G. Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) mediates hypoxic relaxation of bovine coronary artery strips // Prostaglandins. – 1981. – **21**. – P.555–569.
43. Ryter S.W., Tyrrell R. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Free Rad. Biol. Med. – 2000. – **28** (2). – P.298–309.
44. Sanz M.J., Ferrandiz M.L., Cejudo M. et al. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress // Xenobiotica. – 1994. – **24** (7). – P. 689–699.
45. Sazontova T.G. Regularity of the modulation of cell antioxidative status in response of the activation of free radical oxidation // Hypoxia Med. J. – 2002. – **10** (1–2). – P.2–9.
46. Sazontova T.G., Tkatchouk E.N., Kolmykova S.N. et al. Comparative analysis of peroxidation and antioxidant enzyme activities in rats adapted to different regimes of normobaric hypoxia // Ibid. – 1994. – **2** (4). – P. 4–7.
47. Sazontova T.G., Anchishkina N.A., Zhukova A.G. et al. Increase in resistance of membrane structures in adaptation to changing oxygen Level // Adaptation Biol. Med. – 2007. – **5**. – P. 308–314.
48. Semenza G.L. Perspectives on oxygen sensing // Cell. – 1999. – **98**. – P.281–284.
49. Singh B., Sharma S.P., Goyal R. Evaluation of Geriforte, an herbal geriatric tonic, on antioxidant defense system in Wistar rats // Ann. NY Acad. Sci. – 1994. – **717**. – P. 170–173.
50. Skulachev V.P. Mitochondrial physiology and pathology; concept of programmed death of organelles, cells and organisms // Mol. Aspectg. Med. – 1999. – **20**. – P.139–184.
51. Spasic M.B., Saicic Z.S., Buzadzic B. et al. Effect of long term exposure to cold on the antioxidant defense system in the rat // Free Rad. Biol. Med. – 1993. – **15** (3). – P. 291–299.
52. Suzuki Y.J., Forman H.J., Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction // Ibid. – 1997. – **22** (1–2). – P.269–285.
53. Thomas S., Lowe J.E., Hadjivassiliou V. et al. Use of the Comet assay to investigate the role of superoxide in glutathione-induced DNA damage // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1998. – **243** (1). – P.241–245.
54. Ungemach F.R. Plasma membrane damage of hepatocytes following lipid peroxidation: involvement of phospholipase A<sub>2</sub>. – In: Free radicals liver injury. Proc. Int. Meet. (Turin<sup>2</sup>, June 27–29, 1985). – Oxford, Washington DC, 1985. – 127–134.
55. Van Wylen D.G.L. Effect of ischemic preconditioning on interstitial purine metabolite and lactate accumulation during myocardial ischemia // Circulation. – 1994. – **89**. – P.2283–2289.
56. Wiener C.M., Booth G., Semenza G.L. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1 // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1996. – **225**. – P.485–488.
57. Zolotarjova N., Ho C., Mellgren R.L. et al. Different sensitivities of native and oxidized forms of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to intracellular proteinases // Biochim. and Biophys. Acta. – 1994. – **1192** (1) – P.125–131.
58. Zhukova A.G., Sazontova T.G. Heme oxygenase: function, regulation, biological role // Hypoxia Med. J. – 2004. – № 3–4. – P.30–43.
59. Zulueta J.J., Yu F.-S., Hertig I.A. Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: Role of an NAD(P)h oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane // Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 1995. – **12**. – P.41–49.

Моск. ун-т им. М.В. Ломоносова;

ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва;

ГУ НИИ КПП ПЗ СО РАМН, Новокузнецк

E-mail: arhipenko@fbm.msu.ru

А.Н. Вётош, В.Б. Косткин, О.А. Алексеева, Д.Э. Коржевский

## **Роль стресс-белков семейства Hsp70 в изменении характера наркотического действия гипербарического азота под влиянием нарастающего гипоксического стимула**

*Исследовали двигательную активность и рефлексы позы крыс линии Вистар в ходе компрессии азотом до 4,1 МПа в условиях нормоксии и гипоксии. Установили, что напряжение кислорода в моторной коре мозга животных незначительно меняется при дыхании нормоксической кислородно-азотной газовой смесью на фоне компрессии азотом вплоть до 7,1 МПа. Гипоксия в диапазоне парциальных давлений кислорода 0,012–0,004 МПа увеличивала чувствительность и уменьшала устойчивость крыс к действию повышенного давления азота. Эти процессы имели двухфазный характер. Иммуноцитохимическое исследование динамики содержания стресс-белков семейства Hsp70 в моторной коре мозга крыс показало увеличение в 3,44 раза количества нейронов с высоким содержанием исследуемых молекул после компрессии животных азотом до 4,1 МПа. Экспозиция крыс в условиях 6%-й кислородно-азотной дыхательной смеси увеличивала в 2,2 раза число нейронов моторной коры мозга, содержащих значительное количество стресс-белков семейства Hsp70. Полученные результаты об изменении содержания стресс-белков семейства Hsp70 в клетках мозга на фоне изменённой газовой среды позволяют объяснить новые сведения о влиянии гипоксии на процесс развития наркотического действия азота.*

### **ВВЕДЕНИЕ**

Исследования системных и внутриклеточных механизмов действия повышенного давления азота проводятся более 70 лет [3, 12, 13]. Установлены симптоматика азотного наркоза, нейротропный характер действия этого газа в организме человека и млекопитающих животных, способы коррекции состояния организма в ходе компрессии азотом. Однако клеточные механизмы наркотического действия азота изучены недостаточно [1, 16]. В данном отношении повышенный интерес представляют стресс-белки, выполняющие функцию восстановления нативной структуры внутриклеточных молекулярных агрегатов после завершения стрессового воздействия [9,

15, 23]. Стресс-белки семейства Hsp70 выполняют при гипоксическом стрессовом воздействии основную репаративную функцию [15, 17, 19]. Кроме того, практически отсутствуют данные о системных механизмах сочетанного действия на организм млекопитающих пониженного парциального давления кислорода и повышенного парциального давления азота [3, 10, 14]. В связи с этим целью нашей работы было изучение изменений концентрации стресс-белков семейства Hsp70 в клетках коры мозга крыс на фоне гипоксического воздействия, азотного наркоза и их сочетания.

### **МЕТОДИКА**

Исследования проводили на взрослых

крысах-самцах линии Вистар. Гипоксическую гипоксию и действие повышенного давления азота воспроизводили в барокамере объёмом 107 л. Парциальное давление кислорода в дыхательной газовой среде (ДГС) изменяли в диапазоне 0,002–0,025 МПа. Парциальное давление диоксида углерода в гермообъёме не превышало 0,00046 МПа. Парциальное давление азота изменяли от 0,08 до 4,08 МПа со скоростью 0,1 МПа/мин. Температуру ДГС в камере поддерживали в пределах 25–32 °С [14]. Двигательную активность и рефлекс позы крыс регистрировали визуально и фиксировали в актограммах [3]. Измерение напряжения кислорода в мозгу крыс выполняли по методике Березовского [12]. Материал для иммуноцитохимического исследования белков семейства Hsp статуса нейронов моторной коры мозга крыс получали сразу же после окончания экспозиции животных в условиях изменённой газовой среды. Головной мозг крыс фиксировали в среде: цинк-формалин-спирт [17]. Окрасивание нейронов производили с

помощью первичных (“Novocastra”, Великобритания) и вторичных (“DACS”, Дания) антител иммунореактивных по отношению к белкам семейства Hsp70, используя рекомендации, приведённые в работе Коржевского и соавт. [8]. Эксперименты выполняли в соответствии с требованиями Хельсинской Декларации о гуманном обращении с животными.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Этапы изменения двигательной активности и рефлекс позы крыс в ходе компрессии азотом представлены на рис.1. До начала компрессии азотом животные находились в обычной позе покоя. В течение первых 3–5 мин компрессии отмечалось усиление двигательной активности, которую мы интерпретировали как “реакцию на новизну” обстановки внутри барокамеры (шум газовой струи, повышение плотности и температуры ДГС).

Первые двигательные признаки наркотического действия азота проявлялись под

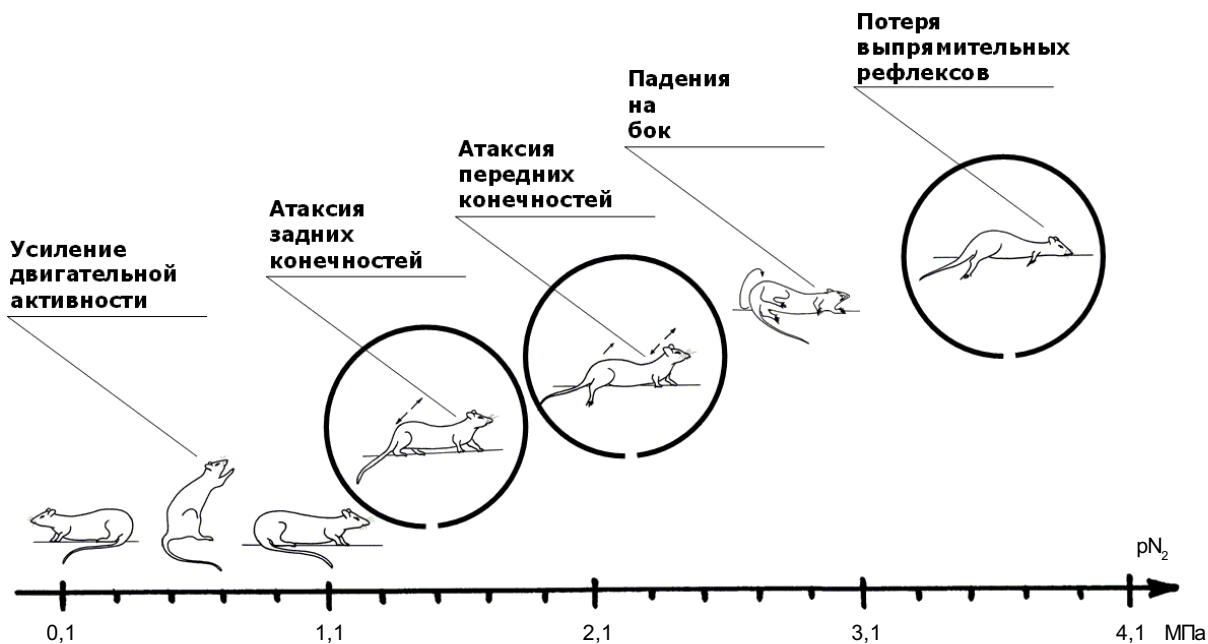


Рис. 1. Изменения двигательной активности и рефлекс позы крыс в ходе развития азотного наркоза. По горизонтальной оси – давление азота в барокамере. Окружностями помечены основные признаки наркотического действия азота



давлением 1,7 МПа в виде атаксии задних конечностей животных при перемещениях по барокамере. По достижении давления 2,6 МПа появлялись признаки атаксии передних конечностей. Под давлением 4,1 МПа наблюдалась потеря выпрямительных рефлексов. Повышение плотности ДГС в ходе компрессии азотом даёт основание предполагать, что в ходе развития азотного наркоза может нарушаться снабжение организма кислородом. Мы проверили это предположение, проведя измерения напряжения кислорода в коре мозга крыс в ходе компрессии азотом вплоть до 11,6 МПа. Результаты этих опытов представлены на рис. 2. В ходе компрессии азотом при содержании кислорода в ДГС 0,02–0,025 МПа напряжение этого газа в коре мозга животных не менялось вплоть до 7,1 МПа. Дальнейшее повышение плотности ДГС, как и ожидалось, приводило к ухудшению снабжения организма кислородом. Однако в выбранном нами для дальнейших иссле-

дований диапазоне давлений азота 0,1–4,1 МПа кислородоснабжение мозга оставалось в пределах нормы.

Двигательная активность и рефлексы позы крыс по мере уменьшения парциального давления кислорода в ДГС со скоростью 1%/мин представлены на рис. 3. Поведенческий характер животных в условиях нарастающей гипоксии выглядит беднее, чем двигательные изменения в ходе компрессии азотом (см. рис. 1). При уменьшении концентрации кислорода в ДГС с 21 до 9 % крысы сохраняли обычную позу покоя. В диапазоне концентраций кислорода 9–7 % отмечалось усиление двигательной активности животных, ниже 7 % – развивалась потеря выпрямительных рефлексов. Это был единственный общий основной признак, объединяющий кислородное голодание и азотный наркоз – терминальная стадия (см. рис. 1, 3). Подобное несовпадение поведенческих характеров позволило провести исследование

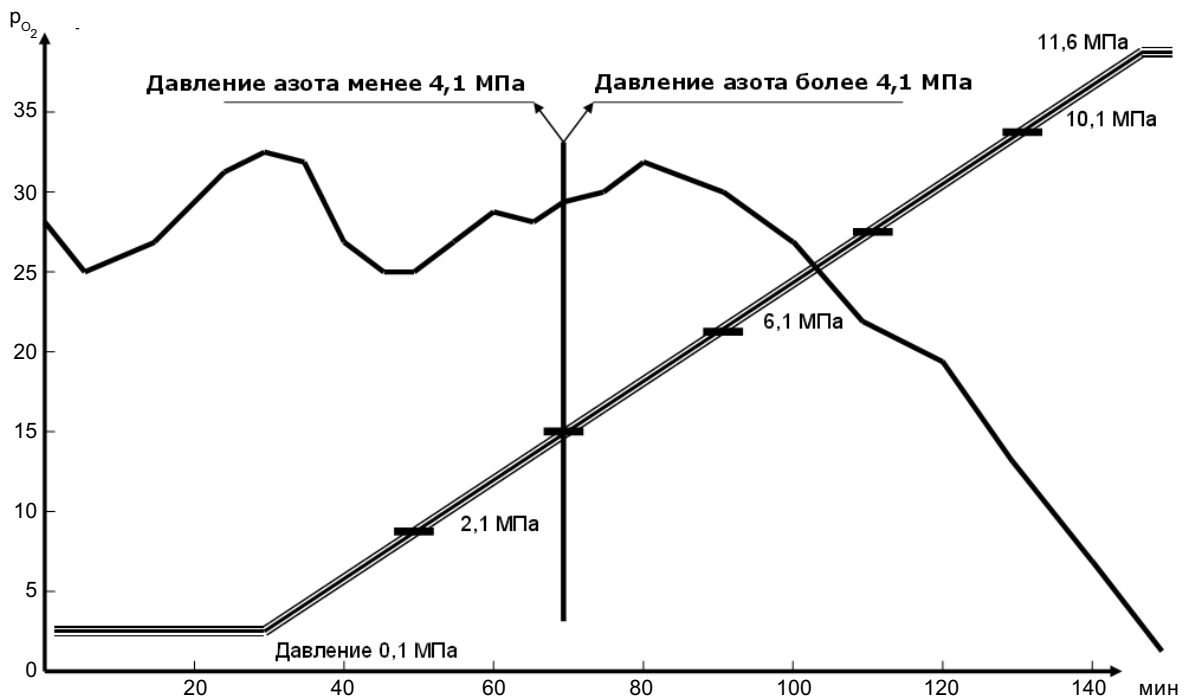


Рис. 2. Динамика напряжения кислорода в моторной коре мозга крыс по мере увеличения давления азота. По вертикальной оси – напряжение кислорода в мозгу, по горизонтальной оси – время эксперимента. Двойная линия – барограмма

азотного наркоза на фоне нарастающего гипоксического стимула, согласно результатам об изменениях двигательной активности и рефлексов позы.

Исследование процесса развития азотного наркоза на фоне гипоксии производилось при концентрациях кислорода в ДГС, равных 21, 12, 8, 6 и 4 %. В качестве основных поведенческих признаков наркотического действия азота использовались: атаксия задних и передних конечностей, и потеря выпрямительных рефлексов (см. рис. 1). Результаты исследования представлены на рис. 4. В условиях нормоксии основные признаки наркотического действия азота впервые проявлялись при давлениях 1,7 МПа (атаксия задних конечностей), 2,6 МПа (атаксия передних конечностей) и 4,1 МПа (потеря выпрямительных рефлексов). Появление самого раннего признака азотного наркоза – атаксии задних конечностей при давлении азота 1,7 МПа мы рассматривали как количественную меру чувствительности организма крыс к наркотическому действию азота. Разницу значений давления

азота между появлением самого раннего и самого позднего признаков азотного наркоза мы рассматривали как количественную меру устойчивости к наркотическому действию азота. В условиях нормоксии она составляла 2,4 МПа. При умеренной, компенсируемой гипоксии (12 и 8 % кислорода в ДГС) все основные поведенческие признаки впервые проявлялись при меньшем давлении. При этом повышалась чувствительность и уменьшалась устойчивость животных к действию гипербарического азота.

В условиях жёсткой, некомпенсируемой гипоксии (6 и 4 % кислорода в ДГС) её влияние на процесс развития азотного наркоза усиливалось. Более быстрыми темпами росла чувствительность и падала устойчивость крыс к наркотическому действию азота. При концентрации кислорода 4 % в ДГС весь спектр поведенческого характера укладывался в диапазон давлений азота 1,1 Мпа, в условиях нормоксии в этом диапазоне отсутствовал любой, даже самый ранний признак азотного наркоза.

Таким образом, результаты, приведённые на рис. 4 убедительно свидетельству-

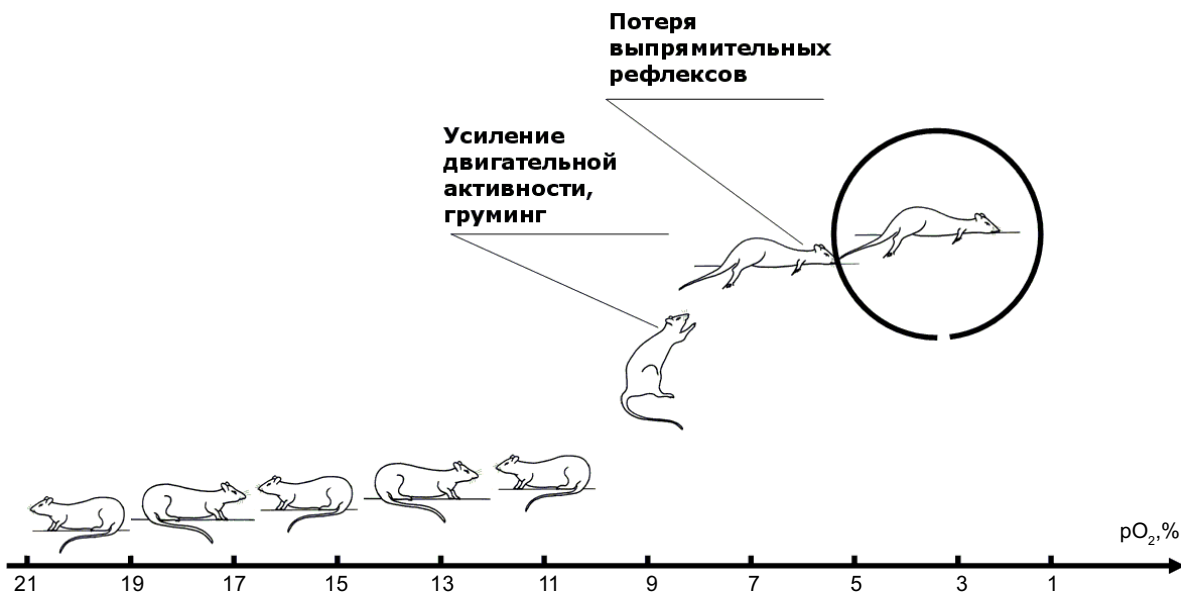


Рис. 3. Изменения двигательной активности и рефлексов позы крыс в ходе развития гипоксии. По горизонтальной оси – концентрация кислорода в барокамере. Окружностью помечен основной поведенческий признак гипоксического состояния животных

ют о том, что процесс развития азотного наркоза является кислородозависимым в диапазоне концентраций кислорода в ДГС 0,021–0,004 МПа. При этом двухфазно увеличивалась чувствительность и уменьшалась устойчивость организма млекопитающих к наркотическому действию азота.

Влияние повышенного давления азота, как и гипоксическое воздействие бесспорно являются стрессующими факторами на организм в целом и его отдельные клетки в частности. Не вызывает сомнения нейротропный характер наркотического действия азота и гипоксии. В связи с этим мы исследовали динамику концентрации стресс-белков семейства Hsp70 в нейронах моторной коры мозга крыс, испытывших действие повышенного давления азота и дефицита кислорода (таблица).

У интактных животных, содержащихся до опыта в стандартных условиях вивария, около 40 % нейронов моторной коры мозга

имели в цитоплазме существенное количество белков семейства Hsp70. При этом число нейронов, цитоплазма которых была насыщена значительным количеством стресс-белков, составляло 2,5 %.

Сеанс гипербарического азотного воздействия увеличивал количество нейронов с высоким содержанием белков Hsp70 в 3,44 раза. Гипоксия, в свою очередь, увеличивала число Hsp-активных нейронов в 2,2 раза, а также умеренно Hsp-активных нейронов – с 37 до 51,1 %. Следует отметить, что иммуноцитохимическая реакция на стресс-белки семейства Hsp70 проявлялась преимущественно в цитоплазме и лишь в небольшой степени в ядрах клеток. Полученные результаты указывают на усиление роли стресс-белков семейства Hsp70 в восстановлении повреждённых клеточных молекулярных агрегатов при гипербарическом азотном воздействии и кислородном голодании.

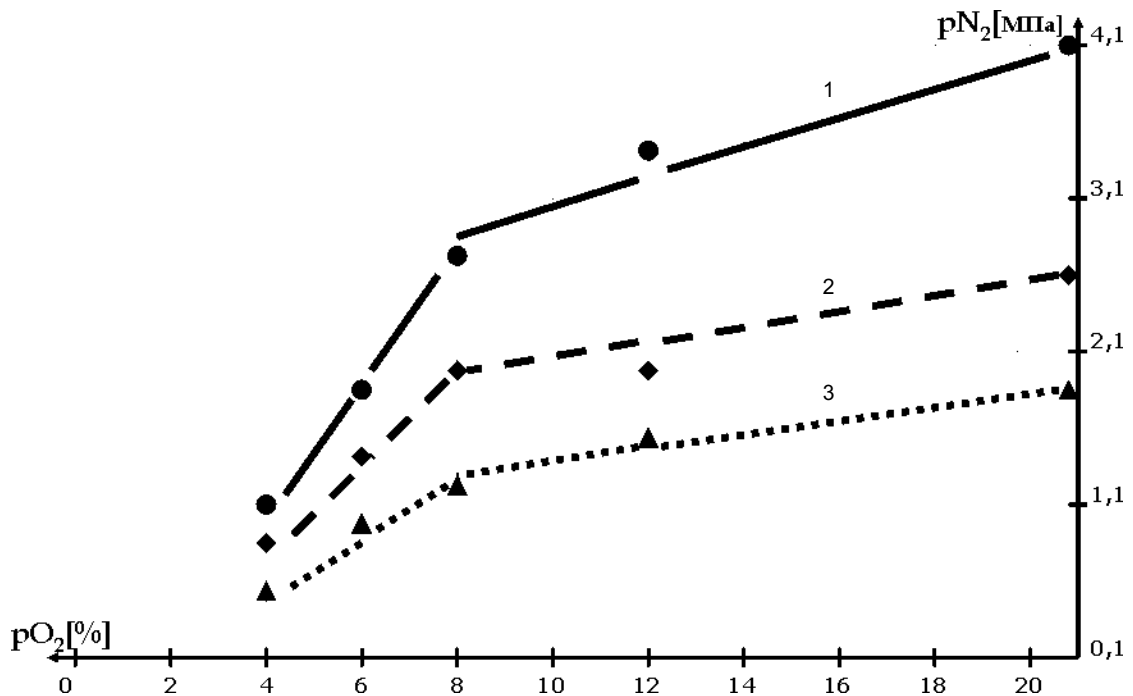


Рис. 4. Изменения двигательной активности и рефлексов позы крыс в ходе развития азотного наркоза на фоне нарастающего гипоксического стимула. По горизонтальной оси – концентрация кислорода в дыхательной газовой смеси, по вертикальной оси – парциальное давление азота: 1 – потеря выпрямительных рефлексов, 2 – атаксия передних конечностей, 3 – атаксия задних конечностей

**Содержание стресс-белков семейства Hsp70 в нейронах коры мозга крыс (% общего числа исследованных нейронов)**

Условия исследования	Значительное количество	Умеренное количество	Незначительное количество
Контроль	2,5	37	60,5
Азотный наркоз	8,6	39,3	52,1
Гипоксия (6 % O <sub>2</sub> )	5,5	51,1	43,4

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что наркотическое действие азота усиливается в гипоксических условиях. При этом значительно увеличивается пул нейронов моторной коры мозга крыс, содержащих большое количество стресс-белков семейства Hsp70. Рассмотрим вероятные клеточные механизмы, которые можно положить в основу объяснения полученных новых результатов и построения тактики дальнейшего научного поиска.

На рис. 5 представлена схема, объясняющая роль стресс-белков в восстановлении нативной структуры внутриклеточных молекулярных агрегатов [3, 9, 20, 22].

В ходе рутинного функционирования клетки возникают периоды повышения метаболической нагрузки и кратковре-

менного нарушения баланса между возросшей потребностью в кислороде и поступлением молекул этого газа. Данные коллизии чаще происходят в активно работающих клетках, например в нейронах и кардиомиоцитах. В подобных случаях развиваются кратковременные периоды оксидативного стресса, которые приводят к увеличению концентрации активных форм кислорода в митохондриях и пероксисомах [11]. Одна из активных форм кислорода супероксидный анион-радикал, вступая в реакцию с молекулами оксида азота, порождает высокореакционноспособную молекулу пероксинитрита [15, 17]. Этот продукт метаболизма повреждает S-S-связи в молекулах окрестных белков, тем самым, нарушая их нативную конформационную структуру [6]. Постоянно присутствующие в активно работающих

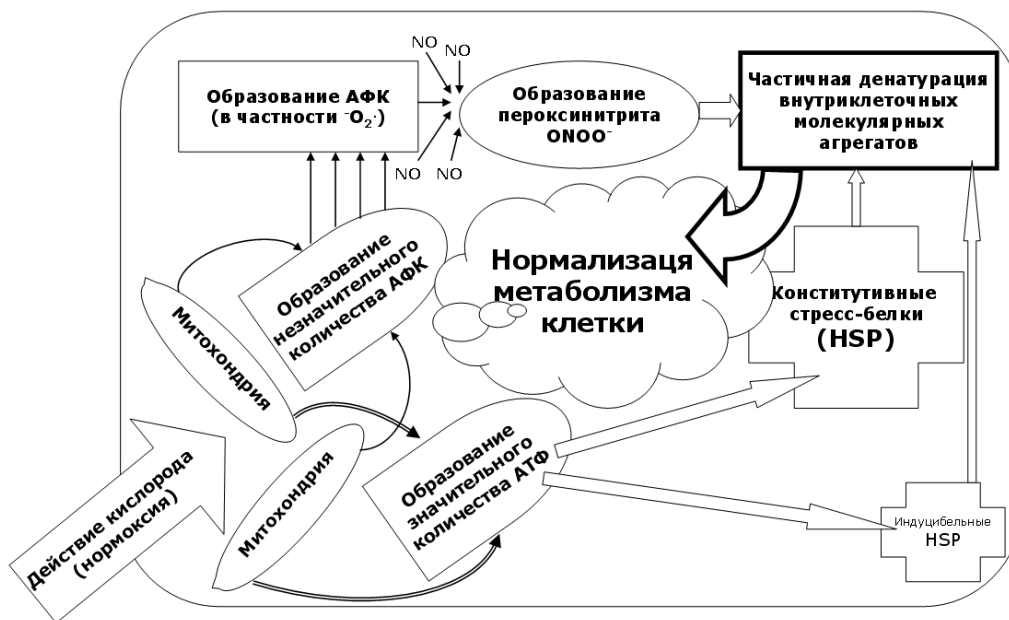


Рис. 5. Внутриклеточная система повреждения и репарации молекулярных агрегатов

клетках конститутивные стресс-белки способны быстро восстановить исходную конформацию повреждённых клеточных молекулярных агрегатов [3, 9, 15, 23]. В случае недостаточности репарационной потенции конститутивных стресс-белков, клетка способна быстро синтезировать дополнительные индуцибельные Hsp [9, 20]. Репарационная активность стресс-белков требует затраты энергии молекул АТФ [15, 18].

В ходе компрессии азотом количество пероксинитрита в клетках увеличивается [21]. Следовательно, усиливается интенсивность повреждения белков и возрастает репарационный ответ активно работающих клеток (см. таблицу).

В условиях гипоксии количество активных форм кислорода в клетках возрастает [11, 15]. Это также приводит к увеличению концентрации пероксинитрита и увеличению количества частично повреждённых белков [6, 15, 17]. Однако процессы репарации в гипоксических условиях затруднены, так как при недостатке кислорода уменьшается синтез АТФ [5, 15]. Такое объяснение хорошо согласуется с нашими результатами (см. рис. 3, таблицу).

И, наконец, в условиях сочетанного действия повышенного давления азота и гипоксии количество молекул пероксинитрита должно возрастать суммативно. В то же время на фоне гипоксии в клетках уменьшается содержание АТФ и, следовательно, понижается репаративный потенциал конститутивных стресс-белков. Совокупность этих двух обстоятельств, которые усугубляют при гипоксии развитие азотного наркоза, должна вызывать увеличение чувствительности организма крыс к действию повышенного давления азота и уменьшение устойчивости животных к влиянию этого газа под давлением (см. рис. 4).

Таким образом, выявленное нами усугубление процесса азотного наркоза в условиях гипоксии может быть объяснено

вовлечением в механизмы наркотического действия азота, развития гипоксии и их сочетания изменяет содержание стресс-белков семейства Hsp70.

**A.N.Vetosh, V.B.Kostkin, O.S.Alekseeva,  
D.E.Korjevsky**

#### **HSP70 INFLUENCE ON DEVELOPMENT OF NITROGEN NARCOSIS UNDER LOW OXYGEN PRESSURE**

The spontaneous motor activity and pose reflexes of male adult rats (Wistar) were observed in the course of high pressure nitrogen compression up to 4,1 MPa. The experiments were carried out under normoxic and hypoxic conditions. Stable rat motor cortex oxygen tension was recording during the nitrogen compression up to 7,1 MPa under normoxic condition. Sensitivity to nitrogen high pressure to be on the increase under hypoxic conditions. In its turn, resistibility to nitrogen high pressure to be on the decrease under hypoxic conditions (oxygen partial pressure from 0,012 to 0,004 MPa). Quantity of high density heat shock proteins (Hsp70) rats motor cortex neurons was 3,44 times higher after course of high pressure nitrogen compression up to 4,1 MPa. For hypoxic exposure (6% O<sub>2</sub>) the difference was less pronounced – 2,2 times. Data about rat motor cortex neurons Hsp70 concentration under high nitrogen pressure and low oxygen pressure may turn to be a clear base for explanation hypoxic influence on processes of nitrogen narcosis.

*I.M.Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St.Peterburg, Russia;*

*Institute of Experimental Medicine, RAMS, St. Peterburg, Russia*

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Беннетт П., Еллиотт Д. Медицинские проблемы подводных погружений. – М.: Медицина, 1988. – С.247–273.
2. Березовский В. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. – К.: Наук. думка, 1975. – 250 с.
3. Вётош А. Биологическое действие азота. – СПб, 2003. – 231 с.
4. Вётош А., Алексеева О. Развитие гипотермии под действием повышенного давления азота // Докл. Академии наук. – 1997. – **355**, №2. – С. 276–278.
5. Дудченко А., Белоусова В., Лукьянова Л. Влияние различных концентраций кислорода на содержание АТФ в изолированных гепатоцитах адаптированных и неадаптированных к гипоксии крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1994. – **118**, № 12. – С. 1268–1272.

6. Зенков Н., Меньщикова Е., Вольский Н., Козлов В. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Успехи совр. биологии. – 1999, **119**. – №5. – С. 440–450.
7. Коржевский Д., Григорьев И., Отеллин В. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрофизиологических исследованиях // Морфология. – 2006. – **129**, №1. – С. 85–86.
8. Коржевский Д., Гиляров А. Оптимизация метода иммуноцитохимического выявления нестина на парафиновых срезах головного мозга крыс // Там же. – 2006. – **130**, №6. – С. 78–80.
9. Меерсон Ф., Малышев И. Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца. – М.: Наука, 1993. – 158 с.
10. Нессирио Б. ред. Единые правила безопасности труда на водолазных работах. Часть II. Медицинское обеспечение водолазов. – М.: Мортехинформреклама, 1992. – С. 143–145.
11. Саприн А., Калинина Е. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Успехи биол. химии. – 1999. – **39**. – С. 289–326.
12. Behnke A., Thomson R., Motley E. The psychologic effects from breathing air at 4 atmospheres pressure // Amer. J. Physiol. – 1935. – **112**. – №3. – P. 554–558.
13. Bennett P. The aetiology of compressed air intoxication and inert gas narcosis. – Oxford: Pergamon Press, 1966. – 109 p.
14. Bennett P. The physiology of nitrogen narcosis and the high pressure nervous syndrome. – In: Diving medicine / Ed. Strauss R., New York: Grune and Stratton, 1976. – P. 157–180.
15. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiol. Rev. – 1999. – **79**, № 4. – P. 1431–1568.
16. Macdonald A. ed. Effects of High Pressure on Biological Systems. – Berlin: Springer-Verlag, 1993. – 239 p.
17. Malyshev I., Zenina T., Golubeva L. et al. NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia // Nitric oxide. – 1999. – **3**, №2. – P. 105–113.
18. Morimoto R., Nollen E. The Heat-Shock response: Sensing the Stress of Misfolded Proteins. – In: Handbook of Cell Signaling. – New York: Elsevier Science, 2004. – Vol. 3. – P. 269–275.
19. Murphy S., Song D., Welsh F. et al. Regional expression of heat shock protein 72 mRNA following mild and severe hypoxia in neonatal piglet brain // Adv.Exp.Med.Biol. – 1999. – **471**. – P. 155–163.
20. Sharp F., Massa S., Swanson R. Heat-shock protein protection // Trends Neurosci. – 1999. – **22**. – №3. – P. 97–99.
21. Thom S., Fisher D. Enhancement of peroxynitrite-mediated nitration reactions by compressed gases. – In: High pressure biology and medicine / Eds. Bennett P., Demchenko I., Marquis R. – Rochester Press, 1998. – P. 16–21.
22. Valdez L., Alvarez S., Arnaiz S. et al. Reactions of peroxynitrite in the mitochondrial matrix // Free Radical Biol. and Med. – 2000. – **29**. – №3–4. – P. 349–356.
23. Welch W. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease // Physiol. Rev. – 1992. – **72**, №4. – P. 1063–1081.

*Ин-т эволюц. физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия;  
Ин-т эксперим. медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: vjotnn@yahoo.ru*

Т.Г. Щербатюк

## Применения озона в медицине: проблема и перспективы

*В статье обобщены данные экспериментальных и клинических исследований по изучению биологических эффектов озонотерапии. Описаны современные методы и способы, известные показания и противопоказания данного метода окислительной терапии. Проанализированы проблемы озонотерапии и высказаны предложения по перспективам развития озонных технологий в биомедицине.*

Озонотерапия (ОТ) – активно развивающийся раздел как клинической медицины, определяющий возможности применения озono-кислородной смеси при лечении различных заболеваний, так и профилактической медицины. Она относится к группе методов окислительной терапии, в которую входят как давно и достаточно широко используемые методы: гипербарическая оксигенация (ГБО), ультрафиолетовое облучение крови, лазерное излучение низкой интенсивности, так и методы, активно развивающиеся в последнее десятилетие: фотодинамическая терапия (ФДТ), использование доноров оксида азота (NO) для усиления терапевтической эффективности антибиотиков антрациклинового ряда – доксорубина и ФДТ, синглетно-кислородная терапия (СКТ – фотохимической сенсibilизации воздуха и воды с созданием в активационной камере аппарата СКТ VALKION синглетного кислорода – высоко-реактивного вещества с очень коротким (от 2 до 10 мкс) периодом полураспада) [1].

История озонотерапии с момента открытия озона немецким химиком Кристианом Фридрихом Шёнбейном до создания международных специализированных озонотерапевтических клиник (как, например, на Кубе и в США) знает времена бурного рас-

цвета и временного, но стойкого неприятия. Второй период истории ОТ, ознаменовавший ее возрождение на новом теоретически и экспериментально обоснованном уровне, что привело к широкому и активному распространению, связан, прежде всего, с работами врачей и исследователей Нижегородской медицинской академии.

В итоге более чем 25-летних комплексных клинико- экспериментальных исследований обоснованы, разработаны и внедрены в практическую медицину различные методы ОТ, которые успешно применяются более чем в 20 странах мира [12, 15].

Медицинский озон – озono-кислородная смесь, получаемая из медицинского кислорода путем его разложения в электрическом разряде и состоящая из 5 %  $O_3$  и 95 %  $O_2$ .

В зависимости от решаемой задачи в ОТ используют озono-кислородные смеси с концентрацией озона от 0,1 до 100 мг/л (100–100000 мкг/л) при скоростях выходных потоков смесей в диапазоне 0,1–1 л/мин [6, 7].

Озono-кислородные смеси производят с помощью специальных аппаратов – медицинских озонаторов. Для того, чтобы свести к минимуму токсическое влияние озона на организм и повысить его терапевтическую эффективность при использовании озono-кислородной смеси необходимо

© Т.Г. Щербатюк

знать точную концентрацию озона, общую дозу и время воздействия. Особенно важна используемая концентрация данной смеси, получение которой возможно с помощью генераторов озона, обладающих обязательными характеристиками: отсутствие вредных примесей в выходной озono-кислородной смеси, высокая точность и стабильность синтеза во всем диапазоне выходных концентраций озона и скоростей потоков.

Отвечает предъявляемым требованиям и превосходит известные образцы соответствующего медицинского оборудования озонатор АОТ-НСК-01- «С (А-16)», разработанный в Российском федеральном ядерном центре – Всероссийском НИИ экспериментальной физики (г. Саров) совместно с Федеральным управлением медико-биологических и экстремальных проблем Минздрава РФ и Ассоциацией российских озонотерапевтов [6].

Биологическая активность озона, а отсюда и основные принципы его применения в медицине, – результат изменения свободнорадикального статуса организма в ответ на внешний источник активных кислородных и озоновых метаболитов (рис. 1).

Активные формы кислорода (АФК), имеющие неспаренный электрон, в зависимости от концентрации дают прямо противоположные биологические эффекты: при нормальной концентрации – регуляторный, при избыточной – токсический [4, 8].

Действительно, низкие концентрации озона не проявляют токсического действия, т.к. свободные радикалы нейтрализуются антиоксидантной системой защиты организма, тогда как высокие концентрации вызывают чрезмерное насыщение свободными радикалами - окислительный стресс, приводящий к токсическому эффекту (см. рис.1).

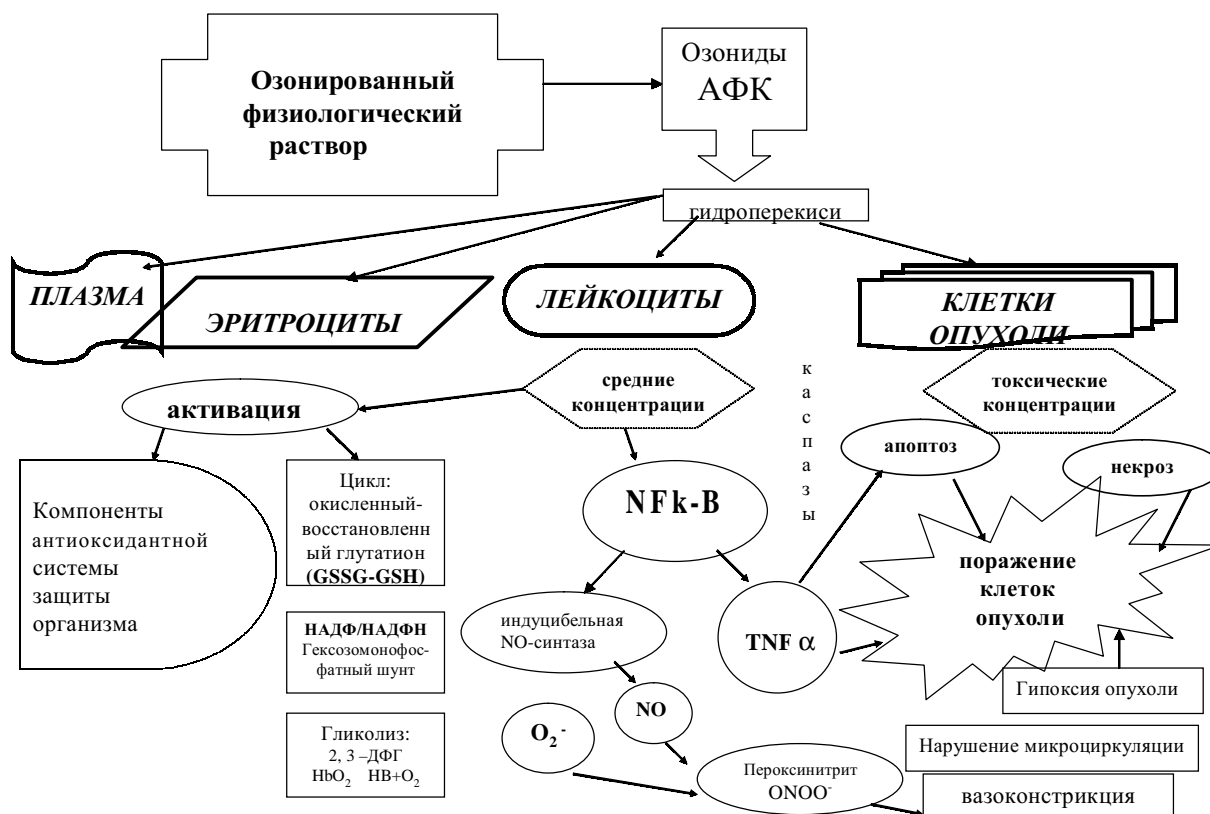


Рис. 1. Биологические эффекты озонотерапии



Применение озона в медицине основывается на двух принципиальных подходах, обусловленных его свойствами:

1) прямое действие: при наружном применении в виде дезинфекционной активности (бактерицидные, фунгицидные, вируцидные свойства используются для очищения ран, усиления антимикробной защиты организма и активации местного иммунитета);

2) системный эффект – вследствие индуцируемых озоном низких концентраций перекисей (активация эритроцитарного обмена, улучшение реологических свойств крови, активации энергетического обмена, модуляция окислительно-восстановительного гомеостаза, иммуномодуляция)

Таким образом, биологическая активность озона – это результат динамического равновесия, которое поддерживается проокислительными свойствами его производ-

ных, с одной стороны, и компонентами антиоксидантной системы защиты – с другой.

Фундаментальная основа эффектов озонотерапии – свободнорадикальная биология, наука, в развитие которой существенный вклад внесли отечественные ученые после пионерских исследований по теории цепных свободнорадикальных реакций, выполненных основателем Института химической физики РАН лауреатом Нобелевской премии академиком Н.Н. Семеновым и его учениками (1956).

Согласно основным положениям свободнорадикальной биологии свободнорадикальное окисление непрерывно протекает в норме во всех тканях живых организмов и свободнорадикальные реакции при их низкой интенсивности являются одним из типов нормальных метаболических процессов. Однако интенсификация сво-



Рис. 2. Свободнорадикальные патологии (D.Narman, 1984, Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н., 2001)

боднорадикальных процессов в тканях может быть следствием гиперпродукции свободных радикалов и (или) недостаточности антиоксидантной системы. Подобное физиологическое состояние клеток, сопряженное с нарушением нормальной регуляции свободнорадикальных реакций, называют «окислительным стрессом», являющимся универсальным механизмом клеточных повреждений, которые приводят к развитию разнообразных патологических состояний, получивших название «свободнорадикальные патологии» [5, 11, 14] (рис. 2). Известно более 100 болезней человека в патогенезе которых свободные радикалы играют важную и даже решающую роль. Поскольку при всех заболеваниях, тканевые повреждения сопровождаются окислительным стрессом [3], становится очевидным, что поиск эффективных физиологических модуляторов окислительного стресса является необычайно актуальным.

В этом плане озono-кислородная смесь в низких концентрациях имеет колоссальный потенциал, потому что, во-первых, модулирует окислительно-восстановительные реакции, т.к. свободные радикалы нейтрализуются антиоксидантами, и в данном случае умеренные концентрации озона являются стимуляторами антиоксидантной системы защиты организма и стимуляции кислородного метаболизма. Во-вторых, озонные технологии приводят к иммуномодулирующим эффектам, поскольку АФК действуют как мессенджеры при активации ядерного фактора транскрипции (ЯФТ) NF-κB, индуцируют экспрессию генов, в результате чего усиливается синтез белков, среди которых особый интерес представляют цитокины – низкомолекулярные белковые вещества, обладающие широким спектром биологического действия. В частности, фактор некроза опухоли, с одной стороны, является цитотоксичным по отношению к бласто-трансформированным клеткам, а, с другой,

опосредованно, через активацию каспаз, может привести к апоптозу опухолевых клеток.

Второй ключевой момент образования ЯФТ – активация синтеза индуцибельной NO-синтазы и увеличение продукции оксида азота, что при наличии супероксидного анион-радикала приводит к образованию пероксинитрита, вызывающего вазоконстрикцию микрососудов и изменяющего микроциркуляцию (см. рис. 1).

Итак, биологические эффекты озона объясняются биорегуляторной ролью свободных радикалов, решающей в активации иммунологического (через транскрипцию фактора NF-κB) и биохимического (гексозо-монофосфатный шунт) механизмов. Таким образом, озон определяет ориентацию обменных процессов, гормонально-вегетативного и иммунного статуса организма.

Поскольку эффекты ОТ дозозависимы, а показатели свободнорадикального гомеостаза, на который, прежде всего, направлено действие озono-кислородной смеси, индивидуальны и динамичны, то озонотерапевтические методы воздействия на организм необходимо проводить на фоне биохимического контроля состояния про- и антиоксидантной системы организма [2].

В медицине озон используется в виде озono-кислородной смеси в концентрации от 400 до 70000 мкг/л. Основополагающим принципом использования определенной концентрации являются некоторые свойства озона: высокие концентрации медицинского озона от 2 мг/л и выше – очищают раны; низкие концентрации менее 2 мг/л – заживляют раны; высокие – от 4000 до 6000 мкг подавляют иммунные реакции; низкие дозы озона обладают иммуностимулирующим эффектом; высокие дозы – кровоостанавливающим эффектом [19, 20].

На основании механизмов действия озона разработаны следующие методы применения озono-кислородной смеси в

медицине: 1) наружные, обеспечивающие прямое действие озона, 2) парентеральные, приводящие к системному действию озона. К наружным методам введения, обеспечивающим прямое действие озона, относятся озоновое орошение в пластиковой камере, бальнеотерапия, различные варианты применения озонированных дистиллированной воды и оливкового масла, внутрисуставные и параартикулярные инъекции озона, регионарное лимфотропное введение озono-кислородной смеси. К парентеральным методам относятся: большая и малая аутогемотерапия с этой смесью аутогемотерапия, внутривенное и лимфотропное капельное введение озона насыщенного физиологического раствора, внутривенное и внутриартериальное введение озono-кислородной смеси, внутримышечные и подкожные инъекции, ректальные инфузии озono-кислородной смеси.

В клинике внутренних болезней ОТ применяется при лечении гепатитов, хронических колитов, хронических гастритов и гастродуоденитов, язвенной болезни желудка, заболеваний органов дыхания (бронхиальной астмы, хронических бронхитов, пневмоний), ишемической болезни сердца, гипертонической болезни, сахарного диабета. Озон в урологии применяется при лечении хронических пиелонефритов и циститов. ОТ в клинике нервных болезней показана при остеохондрозе позвоночника, дисциркулярной энцефалопатии, заболеваниях периферической нервной системы. Этот метод применяется в спортивной медицине и косметологии; в клинике при остром и хроническом гнойных гайморитах, различных формах хронического тонзиллита, хронических средних отитах, сенсоневральной патологии. В стоматологии ОТ применяется при лечении больных с флегмонами челюстно-лицевой области и пародонтопатиях. В дерматологии озono-кислородной смесью лечат грибковые поражения кожи и ногтей, герпетические

инфекции, фурункулез, заболевания, передающиеся половым путем. Применение медицинского озона в практической гинекологии эффективно при воспалительных процессах внутренних половых органов, эндометритах, неспецифических кольпитах и бактериальном вагинозе, эрозивных процессах шейки матки, краурозе вульвы. В хирургической практике ОТ используют в лечении перитонитов, гнойных ран, трофических язв, пролежней, термических травм, гнойно-деструктивных заболеваниях легких и плевры, болезнях суставов и облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей.

Противопоказаниями для проведения ОТ считаются: нарушение свертываемости крови, гипертериоз, судороги в анамнезе, индивидуальная непереносимость озона [9, 13].

Предельно допустимая концентрация (ПДК) озона по ГОСТ 12.1.005-76 в воздухе рабочего помещения не должна превышать  $0,1 \text{ мг/м}^3$ . Ощутимый порог запаха озона не более  $0,02 \text{ мкг/л}$ , поэтому наличие его в помещении с концентрацией значительно выше ПДК легко определяется по специфическому резкому запаху, и применение специальных приборов для контроля ПДК не требуется.

Накопленный опыт позволяет сделать вывод, что ОТ имеет методологическую базу, отличается простотой и доступностью применения, хорошей переносимостью пациентами, практически полным отсутствием побочных действий, а также высокой медико-социальной и экономической эффективностью.

Однако, несмотря на столь значительные успехи, в настоящее время некоторые ученые воспринимают ОТ и полученные результаты с недоверием и скептицизмом. Надо признать, что такое отношение объясняется как объективными, так и субъективными причинами. Очевидно, что любое новое направление, содержащее

огромный потенциал, становится предметом единоборства конкурирующих сторон, которые прекрасно владеют предметом и последовательно отстаивают свои убеждения и интересы. Между этими полюсами находится достаточно инертная среда дилетантов, которая может определять общественное мнение и, как правило, «болеет за победителя». Любая, экстрагированная из общего представления об озоне, информация служит для манипулирования. Например, хорошо известный факт о повреждающем действии газообразного озона в концентрациях, превышающих ПДК, на органы дыхательной системы стал основным аргументом противников озона, постулирующих: «Озон – яд, его применение в медицине недопустимо». Хотя всем, кто знаком с принципами ОТ, понятно, что таким образом озон в медицине никогда не использовался. Боччи сообщает [18], что было зарегистрировано 4 случая смерти вследствие легочной эмболии, которые имели место при непосредственном внутривенном введении озono-кислородной газовой смеси. И эта информация успешно пополнила пакет контраргументов ОТ, несмотря на то, что с 1983 г. данный метод введения озона был запрещен Европейским обществом ОТ. С другой стороны, необходимо признать, что и среди официальных сторонников применения озона в медицинских целях встречается немало исследователей, которые своими недобросовестным отношением к работе, стремлением во что бы то ни стало захватить пальму первенства, дискредитируют ОТ. Остается лишь сожалеть об узости мышления «критиков» и недостойном поведении «сторонников». Однако существуют и объективные причины осторожного отношения к озону в медицине. Во-первых, по мнению Велио Боччи, ОТ часто проводилась методом проб и ошибок, и практически каждый врач стремился разработать свою собственную

терапевтическую концепцию (Ozone-Handbook, 1997). Таким образом, среди озонотерапевтов, несмотря на организацию ассоциаций разного уровня, до сих пор сохраняется определенная разобщенность. Во-вторых, существование на рынке медицинского оборудования озонаторов различного качества, в том числе таких, которые работают нестабильно, приводит к тому, что нет объективных данных об истинности используемой концентрации озона. Кроме этого, российским и европейским озонотерапевтам пока не удалось прийти к общему мнению в вопросе способа выражения концентрации озона. Все это недопустимо, ведь если озон используется как медикамент, то как для любого другого лекарственного средства необходимо проводить точное измерение и выражение концентрации с целью получения терапевтического эффекта и исключения токсического воздействия. В-третьих, очень мало научно-исследовательских центров, которые последовательно и всесторонне проводят работы по изучению механизмов озона в организме при различных патологических состояниях, в то время, когда практикующие врачи очень широко его применяют во многих областях медицины. В итоге тех фундаментальных знаний, которые накоплены к настоящему времени, зачастую не хватает для того, чтобы понять и объяснить наблюдаемые эффекты ОТ, а значит: закрепить ее успех или исправить ошибки. Безусловно, за этим стоят экономические проблемы: серьезные исследования требуют современного дорогостоящего оборудования, государственная поддержка науки минимальна; многочисленные коммерческие структуры по озонотерапевтическим услугам пока работают по принципу самокупаемости; но чем шире внедряется озон в практическую медицину, тем актуальнее становится потребность в основательной научно-исследовательской базе. Известно, что благодаря идеологии С.П. Пе-

ретьягина, в Нижнем Новгороде разработано целое направление ОТ – использование озонированного физиологического раствора, которое, кстати сказать, игнорировалось длительное время европейскими коллегами, и только в последние годы стало не только признаваться, но и применяться в клинической практике. Однако в России до сих пор не удалось организовать работы по изучению качественного и количественного состава свободных радикалов, образующихся при озонировании физиологического раствора; а главное: нет точного представления о времени свободнорадикальной активности озонированного физиологического раствора. И, наконец, в четвертых, законы фармацевтического бизнеса. Именно жесткая борьба на медикаментозном рынке в свое время нанесла существенный урон ОТ.

Видится, что перспективы применения озона в медицине имеют как общий, так и частный характер. К общему следует отнести следующие позиции:

1) понимание механизмов компенсации повреждений, вызванных окислительным стрессом, способствует правильному выбору стратегии при подготовке организма к действию свободных радикалов;

2) согласно положениям комплексной патогенетической терапии [10] дозы воздействий, характеризующихся потенцирующими связями, могут быть снижены, вследствие чего уменьшается вероятность побочных эффектов этих препаратов.

В связи с этим перспективным для практической медицины является изучение эффектов комбинированного использования озона с другими физико-химическими методами.

Частные вопросы перспектив развития ОТ касаются продолжения исследования эффектов озона при различных заболеваниях, например, злокачественных новообразованиях. Ранее в результате экспериментальных работ, доказано, что озон в

высоких концентрациях при наружном применении обладает противоопухолевым эффектом, а в комплексном использовании при парентеральном введении повышает эффективность противоопухолевых воздействий. Стало очевидным, что стимуляция пролиферации опухолевых клеток и опухолетоксическое действие АФК определяется, во-первых, концентрацией озона, во-вторых, стадией роста (исходным уровнем свободнорадикальной активности) как опухоли, так и организма-опухоленосителя [16, 17]. Продолжение исследований позволит установить возможности и ограничения применения озона в онкологии.

Для фундаментальной медицины важно исследование механизмов озонных технологий, которые, по состоянию на сегодняшний день, можно обобщить как эффекты «озонного гормезиса» – инверсионной реакции организма на малые дозы озона, противоположная той, которая развивается на более высокие дозы. Исследование данной проблемы может привести к пересмотру подходов медикаментозной терапии.

**T. G. Scherbatyuk**

#### **MODERN CONDITION AND PROSPECTS OF APPLICATION OF OZONE IN MEDICINE**

The results of experimental and clinical researches on studying biological effects of ozonotherapy were observed. Modern ozonotherapy methods and ways, indications and contra-indications the use of this method of oxidizing therapy were described. The ozonotherapy problems were analysed and offers on prospects of development ozone technologies in biomedicine were stated.

*The Nizhniy Novgorod state medical academy, Nizhni Novgorod, Russia*

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Алехина С.П., Щербатюк Т.Г. Озонотерапия: клинические и экспериментальные аспекты. – Н.Новгород: Литера, 2003. – 240 с.
2. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Метод. реком. – СПб: Фолиант, 2000. – 104 с.

3. Барабой В.А. Биоантиоксиданты. – К.: Книга плюс, 2006. – 462 с.
4. Величковский Б.Т. Свободнорадикальное окисление как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды // Вестн. РАМН, 2001. – № 6. – С. 45–53.
5. Владимирова Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Сорос. образоват. журн. – 2000. – 6, № 12. – С. 13–19.
6. Высокоинтенсивные физические факторы в биологии, медицине, сельском хозяйстве и экологии / Под ред. В.Д. Селемира, Г.М. Спирина, В.И. Карелина. – Саров:РФЯЦ-ВНИИЭФ, 2005. – 480 с.
7. Зайцев В.Я. Озоныды олефинов как относительно новый и весьма перспективный класс биологически активных соединений. – В кн.: Озон в биологии и медицине: Материалы 1 Укр.-рус. науч.-практ. конф. (Одесса). – 2003. – С. 9–11.
8. Зенков Н.К. Окислительный стресс. Диагностика, терапия, профилактика. – Новосибирск: РАМН, Сибир. отд.-е. – 1993. – 181 с.
9. Змызгова А.В., Максимов В.А. Клинические аспекты озонотерапии. – М.: НПЦ Озонотерапии, 2003. – 287 с.
10. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляторная патология // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2002. – №3. – С.2–19.
11. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях: Пособие для врачей. – М.: РКНПК МЗ РФ. – 2001. – 78 с.
12. Масленников О.В., Конторщкова К.Н. Озонотерапия: Внутренние болезни. – Н.Новгород.: НГМА, 1999. – 56 с.
13. Перетягин С.П. Патолофизиологическое обоснование озонотерапии постгеморрагического периода: Автореф. дис. д-ра мед. наук. – Казань, 1991.
14. Саприн А.Н. Окислительный стресс как возможный универсальный этиологический фактор развития различных патологических процессов. – В кн.: Нац. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Свободные радикалы и болезни человека» (19–22 сент.). – Смоленск, 1999. – С.42–44.
15. Сборник научных работ первой научно – практической конференции “Местное и парентеральное применение озонотерапии в медицине”. – Харьков, 2001 г. – 124 с.
16. Щербатюк Т.Г., Послов Г.А., Илларионов В.Ю. Озонотерапия собак при некоторых злокачественных новообразованиях // Ветеринария. – 1998. – №7. – С. 57–60.
17. Щербатюк Т.Г. Озонотерапия злокачественных новообразований: за и против // Нижегород. мед. журн. – 2003. – №1. – С. 52–56.
18. Bocci V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today // J. Biolog. Reg. and Homeost. agents. – 1997. – 10, № 2/3. – P. 31–53.
19. Rilling S., Vieban R. The use of ozone in medicine. – New York: Haug, 1987. – 180 p.
20. Rokitansky O. Klinik und biochemie der ozontherapie // Ozontherapie. – 1982. – 3, №52. – P.643–711.

*Нижегород. мед. академия, Россия*  
*E-mail: ozone\_stg@mail.ru*

О.М. Вайсерман

## Програмування потенціалу життєздатності у ранньому онтогенезі як прояв епігенетичної адаптації організму

*В последние годы предложен ряд новых гипотез старения, постулирующих важность условий раннего онтогенеза в формировании потенциала здоровья и долгожительства. Обычно предполагается, что в основе подобных долговременных эффектов лежат те же механизмы, которые определяют «клеточную память», а именно, процессы на эпигенетическом уровне. Получено много доказательств, что эпигенетические модификации (изменения экспрессии генов, не сопровождающиеся изменениями структуры ДНК), индуцированные влиянием факторов среды, могут определять многие аспекты старения, а также этиологию и патогенез возрастных заболеваний. При определенных условиях возможны и позитивные эффекты (эпигенетическая адаптация). Изменения экспрессии генов были обнаружены при всех продлевающих жизнь «гормезисных» воздействиях: облучении, тепловом и холодовом шоках, калорийном ограничении рациона и гипергравитации, а также при влиянии геропротекторов (например, антиоксидантов). Вероятно, продлевающие жизнь эффекты могут быть скорее следствием неспецифического (гормезисного), чем специфического (геропротекторного) влияния этих факторов, и индукция транскрипционных изменений – общим механизмом всех этих воздействий. Если это так, направленные вмешательства в эпигенетические процессы (например, при помощи пре- и постнатальных умеренных стрессов) могут быть использованы для модуляции процессов старения и продления здоровой жизни.*

Традиційно геронтологічні дослідження зосереджені на пізніх етапах життя при практично повному ігноруванні процесів, пов'язаних з розвитком організму. Дотепер єдине виключення – теорія, що постулює залежність перебігу старіння від особливостей раннього онтогенезу («developmental theory of ageing») [31, 32]. Нещодавно, однак, ситуація радикально змінилася. Було запропоновано декілька нових гіпотез старіння, котрі припускають важливість перебігу ранніх етапів розвитку у визначенні потенціалу здоров'я та тривалості життя [11, 13, 15, 24, 29, 49].

### Ферментативний імпринтинг

Відомо, що велика кількість гормонів, харчових і чужорідних речовин індукує у

клітинах тварин транскрипцію генів, що кодують ферменти, які в свою чергу реалізують гормональні ефекти та метаболізують харчові субстрати і ксенобіотики [7]. Введення таких індукторів дорослим тваринам спричинює короткочасне посилення експресії індукованих генів. Продемонстровано, що повторне введення індукторів новонародженим тваринам у перші два тижні їх життя призводить до того, що зміни в експресії індукованих генів зберігаються протягом багатьох місяців або навіть усього життя тварин [10]. Таке явище стійкої зміни активності неонатально індукованих ферментів було названо «ферментативним імпринтингом» [8]. Отримані дані дали змогу висловити припущення, що у геномі дорослих імпринтованих тварин

© О.М. Вайсерман

стають постійно доступними для транскрипції ділянки ДНК (гени або регуляторні генетичні елементи), які не транскрибуються в інтактних тварин (або транскрибуються слабо), а транскрипція інших ділянок ДНК різко знижується або припиняється взагалі. Автори роблять висновок, що генетичний апарат клітин ссавців у ранній постнатальний період характеризується підвищеною чутливістю до інтенсивної індукції ДНК-залежного синтезу РНК, що контролює синтез адаптивних ферментів та інших білків [9]. До змін, аналогічних пре/постнатальній гормональній індукції, призводить і застосування стресу [2, 7].

Були отримані докази, що навіть слабкі впливи у ранньому онтогенезі, які не викликають явних морфологічних порушень, можуть призводити до довготривалих відхилень у розвитку нервової та ендокринної систем [1–5]. Продемонстровано, що пренатальний стрес у ссавців може стимулювати тривалі зміни у мозкових структурах і функціях та у гіпоталамо-гіпофізарно-адреналовій осі. Так, застосування стресу «вимушеної нерухомості» у самиць щурів протягом третього тижня вагітності призводило до того, що пренатально стресовані новонароджені щури демонстрували більш довгу тривалість секреції кортикостерону після застосування аналогічного стресу у віці 90 діб [4]. Було показано, що різні фізіологічні впливи, подібно до неонатальної індукції певних генів, спричиняють стабільні зміни у транскрипційній активності геному та у спектрі транскрибованих РНК, які забезпечують стійкі зміни експресії генів [9]. Продемонстровано, що від впливів, яких зазнає організм у період внутрішньоутробного розвитку, значною мірою залежить формування адаптаційних механізмів. Показано, що пренатальний стрес може призводити до змін у реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи та до порушення перебігу загального адаптаційного синдрому [1, 3].

### **Прогностичний адаптивний відгук**

Виявлено, що експериментальні тварини можуть реалізовувати різні адаптаційні стратегії відповідно до особливостей оточення, у якому вони, згідно з «перинатальними очікуваннями», будуть жити. У сучасній літературі такий різновид адаптації називають «прогностичним адаптивним відгуком» (predictive adaptive response) [41]. Часто ці стратегії залежать від певних нейрогуморальних «реплік», завдяки яким ембріон, опосередковано через материнський організм, отримує інформацію щодо актуального оточення. У разі відповідності умов оточення після народження таким, що очікувалися «перинатально», організм отримує додаткові переваги щодо виживання, якщо ж ні – це може йому шкодити, наприклад, спричиняти певні захворювання (зокрема, кардіоваскулярні та метаболічні розлади) на пізніх етапах життя [15].

### **Епігенетичне програмування**

Багато авторів припускають, що подібні ефекти залежать від подій, що відбуваються на епігенетичному рівні [26, 28, 39]. До епігенетичних процесів відносять зміни активності (експресії) генів (спричинені метилюванням/деметилюванням ДНК, модифікацією гістонів хроматину тощо), що не супроводжуються змінами структури ДНК. Ці процеси відіграють ключову роль у розвитку [23]. Виявлено, що вони є вкрай чутливими до факторів оточення [40], особливо на «сенситивних» стадіях розвитку, коли клітини організму ще не завершили процесів диференціювання та спеціалізації [37]. Епігенетичні зміни, індуковані певними впливами (наприклад, стресами) у ранньому онтогенезі, можуть відтворюватись у низці клітинних поколінь протягом довгого часу, інколи навіть упродовж усього життя організму [46, 47]. Зауважимо, що й геропротекторні (тобто, такі, що подовжують тривалість життя) втручання виявилися найбільш ефективними, коли їх застосовували на ранніх етапах життя дослідних



тварин [22]. Індуковані чинниками оточення протягом «сенситивних» періодів розвитку (зокрема, у ссавців – пренатального та неонатального періодів) зміни спектра генетичної експресії можуть відтворюватися довгостроково навіть після зникнення сигналу, що призвів до їх виникнення, і, таким чином, тривало впливати на фенотип [43]. Існування феномену «довгострокового програмування» (епігенетичного імпринтування) було неодноразово підтверджено у дослідках на експериментальних організмах [33].

Епігенетичні механізми також визначають різні аспекти старіння, зокрема, етіологію та патогенез пов'язаних з віком хвороб, які є невід'ємною частиною процесу «нормального» старіння [17, 18]. У багатьох видів епігенетичні механізми відіграють важливу роль у детермінації тривалості життя. Наприклад, у деяких видів «соціальних» комах (бджіл, мурах) королеви живуть приблизно у 10 разів довше, ніж робочі індивідууми, що не здатні до репродукції [27]. Оскільки королеви і робочі комахи, які належать до однієї сім'ї, генетично тотожні, такі значні фенотипічні розбіжності між ними можуть бути спричинені виключно різницею у генетичній експресії [19, 25].

### **Епігенетична адаптація**

Зміни генетичної експресії також є ключовими у формуванні одного з видів адаптації, який розпочали активно вивчати останніми роками, а саме, епігенетичної адаптації [44, 45]. Цей вид адаптації дає змогу організму цілеспрямовано змінювати спектр генетичної експресії таким чином, щоб бути максимально пристосованим до умов життя, що очікуються. Відомий етолог Патрік Бейтсон у своїх працях наводить приклад коників, які живуть у східно-африканській савані [14]. У нормі ці коники зелені. Але, якщо вони вилуплюються з кладки яєць, які залишаються живими під час пожежі, то мають чорний колір. Це дозволяє комахам уникати загибелі, оскільки,

якби вони залишалися зеленими, їх могли б легко побачити на чорному ґрунті птахи. А їхні нащадки, котрі з'являються на світ після пожежі, коли трава у савані відростає, знов мають зелений колір. Отже, генетично ідентичні особини можуть бути фенотипічно дуже відмінні залежно від того, які сигнали оточення вони отримують протягом розвитку, і ці відмінності мають адаптивне значення і визначаються епігенетичними змінами, що індуковані цими сигналами. Останніми роками механізми епігенетичної адаптації активно вивчаються групою німецьких дослідників під керівництвом Барбари Тшентке. Вони визначили, що, якщо пташині яйця під час інкубації підлягають дії температурних стресів, птахи, що з них вилуплюються, демонструють протягом життя зміни у термосенситивності нейронів гіпоталамуса, які мають адаптивний характер [44, 45].

### **Можлива роль епігенетичних механізмів у формуванні ефекту «парадоксального стимулювання» (гормезису)**

Деякі автори припускають, що епігенетичні механізми також відіграють важливу роль при формуванні ефекту гормезису. Він полягає в тому, що малі дози факторів, що ушкоджують (радіації, ДДТ, гербіцидів, важких металів, інсектицидів, пестицидів тощо), призводять до «парадоксальної стимуляції» життєдіяльності, зокрема, прискорення розвитку, збільшення репродуктивної активності, резистентності до стресів і тривалості життя. Передбачається, що подібним фактором може бути будь-який подразник, що стресує біосистему. В останні роки активно вивчаються молекулярні та клітинні механізми гормезису. Припускається, що він пов'язаний з індукцією синтезу стрес-білків, стимуляцією систем репарації ДНК, модифікацією процесів запрограмованої загибелі клітин (апоптозу), індукцією систем антиоксидантного захисту, компенсаторною клітинною проліферацією [20, 34].

Останнім часом зі змінами на епігенетичному рівні пов'язують також багато медико-біологічних феноменів, які раніше знаходили своє пояснення у межах інших, більш традиційних, концепцій. Наприклад, «епігенетичне» пояснення було запропоноване для пояснення парадоксального зменшення темпу смертності у старших вікових групах, яке неодноразово спостерігали у демографічних дослідженнях [12]. Автори цього дослідження припустили, що стресування чинниками оточення в молодому віці може призводити до перманентної активзації генів систем антиоксидантного захисту організму, а також генів, що продукують стрес-білки, у певних осіб, які внаслідок цього стають довгожителами. Така горметично-індукована епігенетична адаптація до несприятливих умов життя може, на думку авторів, призводити до зменшення темпу смертності у довгожителів. Зміни генетичної експресії були виявлені при усіх впливах, застосування яких призводило до збільшення тривалості життя дослідних тварин: опроміненні, тепловому та холодному шоках, калорійному обмеженні раціону та гіпергравітації [21, 30, 35, 36, 38, 42], а також при дії так званих геропротекторів (хімікатів, що подовжують тривалість життя), зокрема, антиоксидантів [16]. Можна припустити, що подовження тривалості життя в експерименті є наслідком неспецифічних (гормезисних) ефектів, і саме зміни транскрипційної активності можуть бути загальним механізмом при усіх випадках вдалої геропротекторної («anti-aging») терапії.

Не виключено, що розвиток цих ідей може згодом призвести до певних практичних наслідків. Якщо епігенетична адаптація дійсно є ключовим механізмом програмування довговічності, то певні цілеспрямовані втручання протягом сенситивних стадій раннього розвитку могли б давати змогу досягати оптимального балансу активації/репресії різних генів. Це, в свою

чергу, дозволяло б запобігати дегенеративним віковим захворюванням та подовжувати тривалість життя людей. Сучасні люди живуть в умовах часткового дефіциту певних природних стресорів [48]. Можна припустити, що «епігенетичне перепрограмування» [40] внаслідок індукції систем гормезисного відгуку у ранньому онтогенезі (наприклад, за допомогою «помірних» стресів протягом пре- та неонатальних періодів) могло б надавати довгострокові переваги для організму.

**A.M. Vaiserman**

#### **EARLY-LIFE PROGRAMMING OF VIABILITY AS A SIGN OF EPIGENETIC ADAPTATION**

Recently, a cluster of new hypotheses of aging has been suggested, which explicitly predict the importance of early-life events in health and life span modulations. It has been widely assumed that these long-lasting consequences of early-life exposures may depend on the same mechanisms as those underlying 'cellular memory' i.e. epigenetic inheritance systems. There is growing body of evidence that environmentally-induced perturbations in the epigenetic processes (which involve alterations of gene expression without a change in DNA sequence) can determine different aspects of aging, as well as etiology and pathogenesis of age-related diseases. Long-term beneficial effects (epigenetic adaptation) can also occur under some conditions. Changes in gene expression were detected by the life-extending hormetic interventions, such as irradiation, both heat and cold shocks, dietary restriction and hypergravity, as well as by geroprotectors (e.g., antioxidants). It might be hypothesized that life-extending effects are most likely a consequence of unspecific (hormetic) action, rather than specific (geroprotective) action, and induced transcriptional changes may be a common mechanism for all anti-aging treatments. The epigenetic interventions (e.g., pre- and postnatal mild stresses), it seems, can be specifically useful in the modulation of aging processes and healthy life extension.

*Institute of Gerontology, Kyiv, Ukraine*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Дыгало Н.Н., Юдин Н.С., Калинина Т.С., Науменко Е.В. Генетико-физиологические механизмы гормональной модификации стрессовой реактивности // Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. – 404 с.
2. Мошкин М.П., Селятицкая В.Г., Жигулина Е.И., Аршинова Т.В. Терморегуляторный ответ на

- норадреналин у крыс, испытывавших стрессовые или фармакологические воздействия в раннем постнатальном периоде // *Онтогенез*. – 1993. – № 4. – С. 68–74.
3. Науменко Е.В., Дыгало Н.Н., Маслова Н.Н. Длительная модификация стрессорной реактивности воздействиями в пренатальном онтогенезе. – В кн.: *Онтогенетические и генетико – эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса*. – Новосибирск: Наука, 1990. – С. 40–54
  4. Науменко Е.В., Дыгало Н.Н., Кудрявцева Н.Н. Норадренергические механизмы головного мозга взрослых крыс после воздействия гидрокортизоном в пренатальный период // *Докл. АН СССР*. – 1979. – № 4. – С. 1004–1006.
  5. Носенко Н.Д. Механізми гормон-медіаторного імпринтингу нейроендокринної регуляції репродукції та стрес-реактивності: Автореф. д-ра мед. наук 03.00.13 / Ін-т ендокринології. – К., 1999. – 34 с.
  6. Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д. и др. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. – Черновцы: Медакадемия, 2004. – 351 с
  7. Резников О.Г., Носенко Н.Д. Перинатальна стрессова модифікація реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи // *Фізіол. журн.* – 2000. – №2. – С.146–158.
  8. Салганик Р.И., Грязнова И.М., Маркель А.Л. и др. Влияние введения кортизола и стрессорных воздействий в раннем онтогенезе на гормональную индукцию у взрослых крыс // *Онтогенез*. – 1978. – № 2. – С. 193–196.
  9. Салганик Р.И., Грязнова И.М., Маркель А.Л. и др. Ферментативный «импринтинг» как следствие воздействия генетических индукторов ферментов в раннем периоде после рождения животных // *Докл. АН СССР*. – 1979. – № 2. – С. 473–476.
  10. Салганик Р.И., Кнорре В.Л., Древич В.Ф. и др. Стабильные изменения в матричной активности ядер и структуре ДНК печени крыс, вызванные неонатальной индукцией экспрессии генов // *Там же*. – 1985. – № 5. – С. 1237–1241.
  11. Aihie Sayer A., Cooper C. Early life effects on aging / *Nestle Nutr. Workshop Ser. Clin. Perform. Programme*. – 2002. – 6. – P. 33–44.
  12. Arking R., Giroux C. Antioxidant genes, hormesis, and demographic longevity // *J. Anti-Aging Medicine*. – 2001. – 4. – P. 125–136.
  13. Barker D., Eriksson J., Forsen T., Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis // *Int. J. Epidemiol.* – 2002. – 31. – P. 1235–1239.
  14. Bateson P. Fetal experience and good adult design // *Int. J. Epidemiol.* – 2001. – 30. – P. 928–934.
  15. Bateson P., Barker D., Clutton-Brock T. et al. Developmental plasticity and human health // *Nature*. – 2004. – 430. – P. 419–421.
  16. Brack C., Bechter-Thering E., Labuhn M. N-Acetylcysteine slows down ageing and increases the life span of *Drosophila melanogaster* // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1997. – 53. – P. 960–966.
  17. Budovsky A., Abramovich A., Cohen R. et al. Longevity network: Construction and implications // *Mech. Ageing Dev.* – 2007. – 128. – P. 117–124.
  18. Budovsky K.H., Muradian K., Fraifeld V.E. From disease-oriented to aging/longevity-oriented studies // *Rejuven. Research*. – 2006. – 9. – P. 207–210.
  19. Corona M., Hughes K.A., Weaver D.B., Robinson G.E. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity // *Mech. Age. Dev.* – 2005. – 126. – P. 1230–1238.
  20. Feinendegen L.E. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis // *Brit. J. Radiol.* – 2005. – 78. – P. 3–7.
  21. Fonager J., Beedholm R., Clark B.F., Rattan S.I. Mild stress induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro // *Exp. Gerontol.* – 2002. – 37. – P. 1223–1228.
  22. Frolkis V.V., Muradian K.K. *Experimental life prolongation*. – New York: CRC Press, 1991. – 448 p.
  23. Gan Q., Yoshida T., McDonald O.G., Owens G.K. Epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells // *Stem Cells*. – 2007. – 25. – P. 2–9.
  24. Gavrilov L.A., Gavrilova N.S. Early-life programming of aging and longevity: the idea of high initial damage load (the HIDL hypothesis) // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – 1019. – P. 496–501.
  25. Graff J., Jemielity S., Parker J.D. et al. Differential gene expression between adult queens and workers in the ant *Lasius niger* // *Mol. Ecol.* – 2007. – 16. – P. 675–683.
  26. Jablonka E., Oborny B., Molnar E. et al. The adaptive advantage of phenotypic memory // *Phil. Trans. Royal Soc. (London B)*. – 1995. – 350. – P. 133–141.
  27. Jemielity S., Chapuisat M., Parker J.D., Keller L. Long live the queen: studying aging in social insects // *Age*. – 2005. – 27. – P. 241–248.
  28. Lachmann M., Jablonka E. The inheritance of phenotypes: An adaptation to fluctuating environment // *J. Theoret. Biology*. – 1996. – 181. – P. 1–9.
  29. Leberthal E., Bier D.M. Novel concepts in the developmental origins of adult health and disease // *J. Nutr.* – 2007. – 137. – P. 1073–1075.
  30. Lee C.K., Klopp R.G., Weindruch R., Prolla T.A. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction // *Science*. – 1999. – 285. – P. 1390–1393.
  31. Lints F.A. *Genetics and ageing*. – Basel: Karger, 1978. – 130 p.
  32. Lints F.A., Lints C.V. Influence of preimaginal environment on fecundity and ageing in *Drosophila melanogaster* hybrids. I. Preimaginal population density // *Exp. Gerontol.* – 1969. – 4. – P. 231–244.

33. Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach // *J. Nutr.* – 1998. – **128**. – P. 401–406.
34. Luckey T.D. Radiation hormesis overview // *RSO Magazine.* – 2003. – **8**. – P. 19–36.
35. Matz J.M., LaVoi K.P., Moen R.J., Blake M.J. Cold-induced heat shock protein expression in rat aorta and brown adipose tissue // *Physiol. Behav.* – 1996. – **60**. – P. 1369–1374.
36. Minois N., Guinaudy M.J., Payre F., Le Bourg E. HSP70 induction may explain the long-lasting resistance to heat of *Drosophila melanogaster* having lived in hypergravity // *Mech. Ageing Dev.* – 1999. – **109**. – P. 65–77.
37. Morgan H.D., Santos F., Green K. et al. Epigenetic reprogramming in mammals // *Hum. Mol. Genet.* – 2005. – **14**. – P. 47–58.
38. Nelson G.A., Jones T.A., Chesnut A., Smith A.L. Radiation-induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans* // *J. Radiat Res. (Tokyo)*. – 2002. – **43**. – P. 199–203.
39. Petronis A. Human morbid genetics revisited: relevance of epigenetics // *Trends Genet.* – 2001. – **17**. – P. 142–146.
40. Reik W., Santos F., Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy // *Theriogenology.* – 2003. – **59**. – P.21–32.
41. Rickard I.J., Lummaa V. The Predictive Adaptive Response and metabolic syndrome: Challenges for the hypothesis // *Trends Endocr. Metab.* – 2007. – **18**. – P. 94–99.
42. Tatar M., Khazaeli A.A., Curtsinger J.W. Chaperoning extended life // *Nature.* – 1997. – **390**. – P. 30.
43. Thieffry D., Sanchez L. Alternative epigenetic states understood in terms of specific regulatory structures // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2002. – **98**. – P. 135–153.
44. Tzschentke B., Basta D. Early development of neuronal hypothalamic thermosensitivity in birds: influence of epigenetic temperature adaptation // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* – 2002. – **131**. – P. 825–832.
45. Tzschentke B., Plagemann A. Imprinting and critical periods in early development // *World's Poultry Science J.* – 2006. – **62**. – P. 626–637.
46. Waterland R.A., Garza C. Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats // *J. Nutr.* – 2002. – **132**. – P. 357–364.
47. Waterland R.A., Jirtle R.A. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases // *Nutrition.* – 2004. – **20**. – P. 63–68.
48. Zuk M. Riddled with life: friendly worms, ladybug sex, and the parasites that make us who we are. – Orlando: Harcourt, 2007. – 336 p.
49. Zwaan B.J. Linking development and aging // *Sci. Aging Knowl. Environ.* – 2003. – **47**. – P. 32.

Ин-т геронтології АМН України, Київ  
vaiserman@geront.kiev.ua

О.Г. Чака, В.О. Безчасна, П.В. Лахін

## Вплив кисневої депривації на фотореактивність і термостійкість дрозофіл

*Исследовали фотореактивность и термоустойчивость дрозофил с разной резистентностью к острой гипоксии. Полученные результаты показали, что между высоко- и низкоустойчивыми к действию гипоксии мушками существуют определенные расхождения в стойкости к высокой температуре и фоточувствительности. Дрозофилы линии Canton-S после преадаптации к гипоксии приобретали большую резистентность к повышенной температуре. Дрозофилы линии Умань, с высокой устойчивостью к гипоксии, чаще всего проявляли положительный фототаксис. Это свидетельствует о том, что стойкость к повышенной температуре и фоточувствительность – это, генетически запрограммированные и унаследованные признаки, составная часть механизмов кросс-адаптации.*

### ВСТУП

Широке використання дрозофіл для генетичних досліджень зумовлено їх коротким життєвим циклом (приблизно 120 діб), простотою вирощування, невеликою кількістю хромосом (4 пари) і при цьому великим числом видимих мутацій [6].

Для дрозофіл, і взагалі для комах, характерна висока резистентність до зниження парціального тиску кисню. Вони зберігають здатність утримуватись на вертикальній стінці пробірки при атмосферному тиску 17,1 мм.рт.ст., що відповідає 16,5 тис.м над рівнем моря [2, 6]. В атмосфері чистого азоту дрозофіли дуже швидко (через 30–60 с) втрачають здатність утримуватись на вертикальній стінці пробірки, падають і залишаються нерухомими. Вони можуть знаходитись в цих умовах протягом декількох годин, при цьому середнє споживання кисню на 1г маси тіла дрозофіли знижується на 20% від контролю [9, 17]. Після повернення до нормальних умов мушки повністю відновлюють усі життєво важливі функції.

Дослідженню генетичної мінливості

кількісних ознак у природних популяціях дрозофіл присвячено багато праць [3, 5, 6, 14]. Водночас мінливість прикмет поведінки дрозофіл в природних популяціях вивчена мало. Виявлено [10], що фотореакція – це генетично детермінована ознака, на яку діють будь-які мутації, а також їхня комбінація. Результати наслідування фототаксису свідчать про полігенний характер наслідування з переважним вкладом другої та третьої хромосоми.

У дослідженнях на 20 лабораторних лініях *Drosophila melanogaster* різного походження, було показано залежність реакції на світло (фототаксису) від широти місця походження лінії [5]. Було встановлено, що реакція на світло у ліній азійського походження вища.

Інші дослідники, вивчаючи дрозофіл, зібраних з 13 різних природних популяцій, не знайшли зв'язку між локомоторною активністю, фототаксисом і місцем, звідки були взяті мухи [6]. Різниця в цих експериментах може бути пов'язана з використанням різних методів вимірювання. Відомо, що відповідь на фотостимуляцію у дрозофіл залежить від способу його вимі-

© О.Г. Чака, В.О. Безчасна, П.В. Лахін

рювання. Показано [13], що дрозофіли, які при оцінці в Y-подібному лабіринті мали позитивний фототаксис, у лабіринті Хіршара–Хадлера були фотонейтральними, або мали слабо негативний фототаксис. Для вимірювання фототаксису має значення стан мух під час досліду. Показано [14], що *Drosophila pseudoobscura* у спокійному стані має негативний фототаксис, а у збудженому – позитивний.

Доведено, що фотореакція дрозофіли залежить не тільки від нормально розвинутих та пігментованих очей, але і від фоторецепторів, які в імаго містяться по всьому тілу, в тому числі й на крилах [17]. Більшість *Drosophila melanogaster eyeless* у природній популяції фотонейтральні, частка фотопозитивних мух становить 25 %, фотонегативних – 21 %. Внаслідок направленої відбору відсоток дрозофіл з позитивним фототаксисом у шістнадцятому поколінні збільшився до 79,8 %, решта – мала нейтральну реакцію на світло [6]. Мухок з негативною реакцією на світло в цій популяції не спостерігали.

Метою нашої роботи було дослідити взаємозв'язок стійкості до гіпоксії та фотореактивності різних ліній дрозофіл.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на дрозофілах виду *Virilis* та *Melanogaster*. Мухки виду *Melanogaster* були трьох ліній; зібрані у містах Умань і Чорнобиль та лабораторної лінії *Santon-S*. Всі лінії мушок були надані кафедрою генетики Київського університету ім. Тараса Шевченка.

Спостерігаючи за поведінкою дрозофіл у вертикально розташованій пробірці, ми відмітили закономірний рух мушок вгору по пробірці незалежно від освітлення. Тобто їм притаманний геотаксис. Тому для вивчення фотореакції нами розроблений і використаний прилад з горизонтальним розміщенням циліндрів для розділення мушок залежно від їх реакції на світло

(рис.1). Прилад складається з трьох циліндрів, які розділяються засувками (рис.2). Один бік горизонтально розташованих циліндрів затемнювали чорним ковпаком, другий освітлювали електролампочкою потужністю 20 Вт, яку розміщували перпендикулярно до циліндра-контейнера. Дрозофіл розміщували у середній камері, приєднували лівий і правий циліндри. Вібратором струшували мушок на дно приладу. Фотореакцію оцінювали через 3 хв після того як дрозофіли переходили зі стресового стану у спокійний та розміщувалися у трьох ділянках – освітленій, темній та посередині приладу. Для кожної лінії випробування проводили тричі, після чого розділяли дрозофіл на групи з

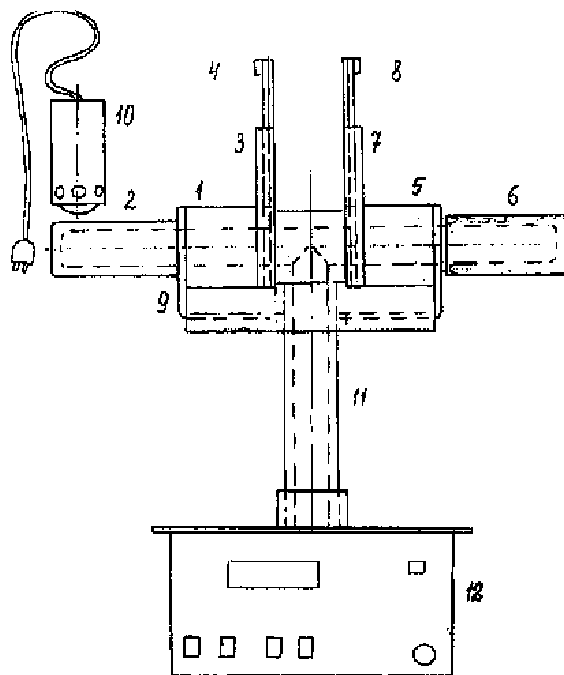


Рис. 1. Пристрій з триходовим лабіринтом для визначення фоточутливості дрозофіл. 1, 5 – обойми для освітлення лівої та правої сторін пристрою; 2 – камера прозора для освітлення; 3, 4 – рамка з направляючими пазами і засувка; 6 – циліндричний екран для затемнення прозорої камери правої сторони пристрою; 7, 8 – рамка з направляючими пазами і засувка для затемненої камери; 9 – штатив з'єднання горизонтальної системи лабіринту; 10 – джерело освітлення; 11 – камера прозора вертикального розташування; 12 – вібратор

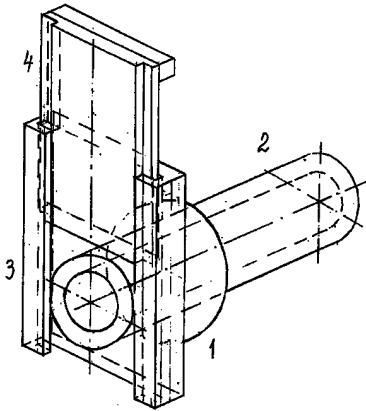


Рис. 2. Фрагмент пристрою для визначення фоточутливості дрозофіл: 1 – обойма, 2 – камера, 3 – рамка з пазами, 4 – заслінка

позитивними і негативним фототаксисом. Для експериментів використовували дрозофіл, попередньо тестованих на чутливість до гіпоксії.

У спеціально розробленому пристрої створювали як гіпобаричну, так і нормобаричну гіпоксію (рис.3). Гіпобаричну гіпоксію моделювали за допомогою вакуумного насоса. У спеціальній камері протягом 3 хв створювали тестове розрідження з барометричним тиском 75 мм рт.ст. висотою 16 тис. м над рівнем моря. Дрозофіл піддавали випробуванню тричі, з перервою у 4 год. Тиск у камері контролювали альтиметром.

Рівень стійкості до гіпоксії визначали

терміном утримання дрозофіл на стінках пробірки. Особини, які залишалися на стінках пробірки після дії стресового фактору, вважали високостійкими, а тих, що падали на дно пробірки – низькостійкими до дії гіпоксії.

Для створення атмосфери зі зниженою концентрацією кисню при нормальному барометричному тиску, в камеру подавали чистий азот з балону протягом 30 с зі швидкістю 40 мл/хв. За цей час азот повністю витискував повітря з камери, вміст кисню був приблизно 0,001 %. Через 30 с подачу газу припиняли. Дрозофіл утримували у камері впродовж 10 хв. Оскільки камера була не герметичною, вміст кисню в ній поступово підвищувався. За цей час частина мушок піднімалась у верхню половину камери – їх вважали високостійкими до дії гіпоксії, тих, що залишалися лежати на дні, або знаходились у нижній частині камери, вважали низькостійкими. Для формування адаптації до гіпоксії личинок дрозофіл, на третій стадії розвитку, коли вони починають активно рухатися і виходять з поживного середовища на стінки пробірок, утримували у гіпоксичному середовищі протягом 20 хв.

Після визначення стійкості до гіпоксії дрозофіл розподіляли на групи високо та низькостійких до впливу гіпоксії. Для кожної групи було відібрано по 500 комах.

Для оцінки теплочутливості дрозофіл

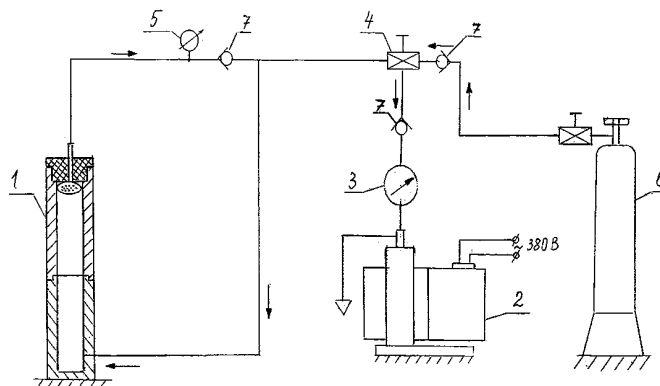


Рис. 3. Пристрій для визначення індивідуальної резистентності дрозофіл до впливу гіпобаричної та нормобаричної гіпоксії. 1 – нормобарична камера, 2 – насос вакуумний, 3 – манометр, 4 – вентиль голчастий газовий, 5 – газоаналізатор, 6 – балон газовий з редуктором, 7 – голчастий кран

проводили термотест. Суть цього методу полягає в тому, що мушок піддавали дозованому тепловому удару при спеціально підібраній температурі та тривалості впливу. Така методика усуває ефект звикання, і дає змогу оцінити стійкість особин до теплового ураження. Для цього дослідження важливо підібрати сублетальну температуру та час експозиції, при яких можна виявити різницю між особинами різних ліній. Ми витримували пробірки з мушками в термостаті при 42°C протягом 25 хв. Визначали частку дрозозфіл, які вижили після теплового впливу.

Також порівнювали плодючість дрозозфіл різних ліній з різною чутливістю до гіпоксії. Визначали термін розвитку від відкладення яєць до часу появи дорослої особини.

Для визначення маси наркотизованих ефіром дрозозфіл зважували на аналітичних вагах.

Для визначення активності лактатдегідрогенази наркотизованих комах гомогенізували у фосфатному буфері. Методом диференційного центрифугування з гомогенату виділяли білкову фракцію [18]. В отриманому супернатанті фотометрично визначали активність лактатдегідрогенази за допомогою наборів фірми «Лакхема» (Чехія).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Експериментальне визначення рівня резистентності до гострої гіпоксії дрозозфіл двох видів *Virilis* та *Melanogaster Conton-S* показало, що мушки виду *Melanogaster* менш стійкі до впливу жорсткої гіпоксії, ніж

виду *Virilis* (рис.4). У особин виду *Virilis* час перебування на умовній висоті 16 тис. м збільшувався з кожним підйомом, у лінії *Melanogaster Conton-S* час утримання на умовній висоті навпаки, дещо знижувався при другому підйомі, при подальших підйомах – залишався без змін.

Тобто у особин лінії *Melanogaster Conton-S* не спостерігали збільшення часу перебування у активному стані за умов гострої гіпоксії при повторних підйомах. Наші дослідження показали, що мушки виду *Virilis* набагато легше переносять жорстку гіпоксію, порівняно з видом *Melanogaster*.

Результати досліджень підтверджують дані, отримані нами раніше [2], що різні лінії дрозозфіл мають неоднакову чутливість до кисневої депривації (таблиця). Так, самці лінії *black* після підйому на умовну висоту 16 тис.м зі швидкістю 200 м/с утримуються на вертикальній стінці скляної посудини на протязі  $69 \text{ с} \pm 6 \text{ с}$ . Особини лінії *yellow* в тих же умовах зберігають активність пильвіл протягом  $104 \text{ с} \pm 7 \text{ с}$ . Найдовше утримуються неінбредні самці лінії *wild* –  $115 \text{ с} \pm 13 \text{ с}$ . Для самиць лінії *black* та *wild* час утримання був суттєво більшим і становив 83 і 232 с відповідно. Тобто самиці трималися на 120 і 200 % довше відносно аналогічного показника у самців. Це відповідає загальнобіологічному принципу більш високої стійкості самиць до різних несприятливих обставин [2, 9, 15, 17].

Повторна експозиція до низького парціального тиску дає змогу з'ясувати швидкість експресії ферментів, які відповідають за стійкість організму до гіпоксії. Дослідження, проведені в нашому Інституті раніше [2] дозволили показати, що час

Середній час (с) утримання дрозозфіл різних ліній на вертикальній стінці пробірки в умовах гострої гіпоксії

Лінія	Самці		Самиці	
	I підйом	II підйом	I підйом	II підйом
Black	69±6	69±3	83±11	117±5
Yellow	104±7	185±10	85±10	93±4
Wild	115±12	93±4	232±52	238±21



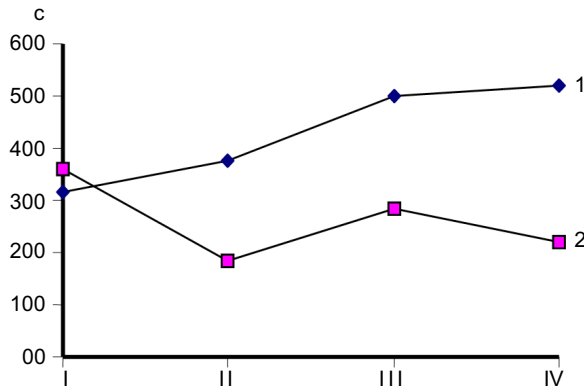


Рис. 4. Зміни часу утримання на вертикальній стінці у умовній висоті 16 тис.м. дрозофіл різних ліній при повторних підйомах (I, II, III, IV): 1 – вид *Virilis*, 2 – вид *Melanogaster*

утримання і час реституції при другому іспиті під вакуумним колоколом, збільшуються порівняно з першим. Самці лінії *black* після другого підйому довше виходять зі стану гіпоксії – у них збільшується час реституції, а час утримання не змінюється, відповідно, знижується стійкість до гіпоксії. Це можна вважати ознакою недостатньої активації генетичних процесів після однократного кисневого голодування. Дрозофіли лінії *yellow* по іншому реагують на повторну гіпоксію. Час утримання при другому підйомі у них збільшився на 118 %, а час реституції зменшився на 31 %. Загальний коефіцієнт стійкості (відношення часу утримання до часу реституції) збільшився на 225 %. Це свідчить про високу активність експресії генів, які відповідають за синтез ферментів, що забезпечують стійкість організму до гіпоксії. Максимальну здатність до адаптації мали дрозофіли лінії *wild*. Співвідношення часу утримання до часу реституції у них зросло с 1,1 до 42,2, тобто в 40 разів.

Подальші дослідження ми

проводили на *Drosophila Melanogaster* ліній Умань, Чорнобиль та Conton-S. Протягом семи поколінь здійснювали направлений добір дрозофіл кожної лінії за стійкістю до гіпоксії. Розподіл дрозофіл залежно від їх реакції на світло проводили у V, VI та VII поколіннях.

Кількість мушок з позитивним фототаксисом у кожній лінії змінювалася від покоління до покоління. В контрольних лініях, які не зазнавали впливу гіпоксії, кількість мушок, які мали позитивний і негативний фототаксис була приблизно однаковою (рис. 5). У високостійких до гіпоксії дрозофіл лінії Умань кількість особин з позитивним фототаксисом була більшою, ніж в контролі, а у дрозофіл ліній Чорнобиль та Conton-S – навпаки, меншою.

У низькостійких до гіпоксії мушок лінії Чорнобиль кількість особин з позитивним фототаксисом була на 12 % меншою відносно контролю, у дрозофіл лінії Умань не відрізнялась від контролю, а у лінії Conton-S була більшою на 15 %. Тобто стійкість різних ліній дрозофіл до гіпоксії

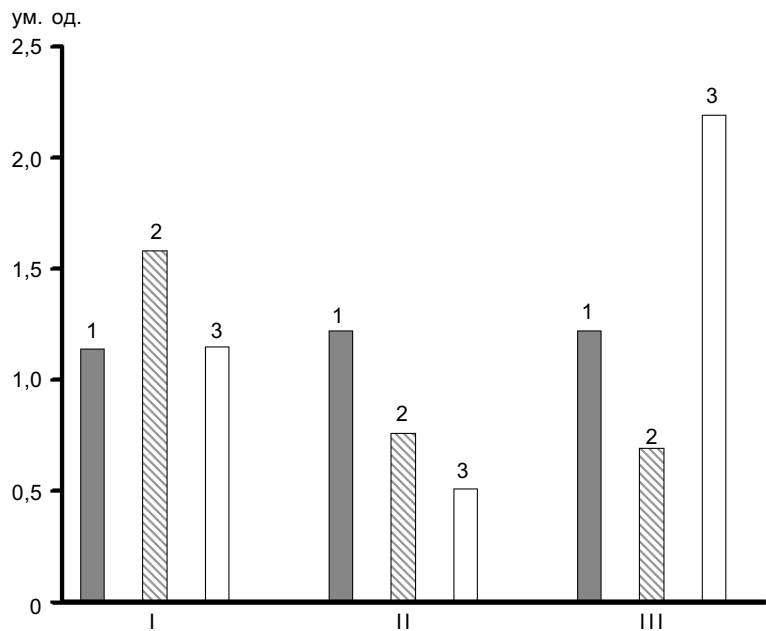


Рис. 5. Відношення кількості дрозофіл з позитивною реакцією на світло до кількості з негативною реакцією. I – лінія Умань, II – лінія Чорнобиль, III – лінія Conton-S: 1 – контрольні, 2 – високостійкі до впливу гіпоксії, 3 – низькостійкі до впливу гіпоксії

має різноспрямований кореляційний зв'язок з їх реакцією на світло.

Маса є важливим показником метаболізму та життєздатності мушок і значною мірою залежить від щільності популяції, температури та парціального тиску кисню. Наші дослідження показали, що маса низькостійких до гіпоксії дрозофіл лінії Умань і Чорнобиль у VI поколінні була нижчою, ніж у контрольних комах. У V поколінні маса високостійких до гіпоксії мушок лінії Умань перевищувала контрольні значення на 20 %. Маса дрозофіл лінії Conton-S високо- та низькостійких до гіпоксії у V та VI поколіннях не відрізнялася від контрольних значень.

Для оцінки відносної пристосованості визначали плодючість дрозофіл з різною чутливістю до гострої гіпоксії. Кількість нащадків однієї самиці у дрозофіл лінії Чорнобиль, високостійких до гіпоксії, було  $18,8 \pm 4,3$ , низькостійких –  $9 \pm 3$ ; лінії Conton-S високостійких –  $24,5 \pm 5$ , низькостійких –  $5,6 \pm 2,1$ ; лінії Умань –  $5,5 \pm 2,3$  та  $5,2 \pm 2,4$  відповідно. Таким чином, плодючість високостійких до гіпоксії мушок ліній Чорнобиль та Conton-S була більшою ніж у низькостійких. Це свідчить про те, що високостійкі до гіпоксії дрозофіли цих ліній мають більшу пристосованість до умов навколишнього середовища, ніж низькостійкі. Розбіжностей у плодючості між високо- та низькостійкими дрозофілами лінії Умань не виявлено.

У працях інших дослідників показано, що особини з позитивним фототаксисом краще переносять вплив високої температури, в умовах аліментарної депривації жили в середньому на 4 год довше та мали більшу плодючість [5]. Дрозофіли з негативним фототаксисом характеризувалися більш тривалим терміном розвитку. Кожне покоління розвивалося на 2 доби довше, порівняно з нащадками дрозофіл з позитивним фототаксисом. Це може свідчити про те, що при доборі за фотореакцією паралельно

відбувається добір за деякими ознаками, що відповідають за пристосованість [10, 12]. Направлений відбір у дев'яти поколіннях за фотореакцією на чотирьох мутантних лініях b, cn, vg призвів до статистично вірогідного підвищення пристосованості всіх ліній. Дрозофіли з позитивним фототаксисом мали більшу адаптаційну здатність порівняно з особинами з негативною фотореакцією [4].

Проведений термотест показав, що у контрольних дрозофіл лінії Conton-S відсоток особин що вижили після нагрівання до  $42^{\circ}$  становив  $27,16 \pm 3,8$ ; лінії Чорнобиль –  $42,42 \pm 3,9$ ; Умань –  $59,85 \pm 3,6$ ; у високостійких до впливу гіпоксії дрозофіл лінії Conton-S –  $55,32$ ; Чорнобиль –  $48,99 \pm 2,9$ ; Умань –  $51,47 \pm 4,2$ ; низькостійких до впливу гіпоксії Conton-S –  $48,51 \pm 4,5$ ; Чорнобиль –  $56,76 \pm 4,5$ ; Умань –  $59,24 \pm 3,7$ .

Порівнюючи здатність контрольних комах різних ліній виживати в екстремальних умовах підвищеної температури ( $42^{\circ}$ ), ми відзначили, що дрозофіли лінії Conton-S найгірше переносять вплив високої температури. У них відсоток живих комах після теплового шоку був удвічі менший, ніж у дрозофіл лінії Умань. Дрозофіли лінії Conton-S, які на стадії личинок зазнавали впливу гіпоксії значно краще витримували вплив високої температури, ніж контрольні. Відсоток особин, що витримали термотест у них був удвічі більший ніж у контрольних. У дрозофіл лінії Чорнобиль, яких піддавали впливу гіпоксії, кількість живих особин збільшувалася на 10–20 % відносно контролю. У особин лінії Умань під впливом гіпоксії не відбувалося підвищення терmostійкості. Можливо, лабораторна лінія Conton-S більш чутлива до зовнішніх екстремальних впливів, ніж мушки диких ліній.

Підвищення стійкості дрозофіл, які зазнавали гіпоксичного впливу до нагрівання, може бути пов'язана з індукцією білків теплового шоку, які є одним з

основних елементів захисної системи клітини і в несприятливих умовах нерідко індукуються не тільки у відповідь на підвищення температури, але й при інших стресових впливах [8].

Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) у м'язах перетворює лактат у піруват, який в аеробних умовах розпадається на вуглекислий газ та воду. В гіпоксичних умовах погіршується тканинне дихання, виникає дефіцит АТФ, розпад пірувату уповільнюється, внаслідок цього відбувається його накопичення. Нестача АТФ найчастіше компенсується за рахунок гліколізу. Тому значення ЛДГ в гіпоксичних умовах збільшується. Відомо, що для дрозофіл найбільша ферментативна активність ЛДГ спостерігається на стадії яйця [1]. У личинок активність ЛДГ знижується і становить 69,8 %, а у лялечок 31,7 % по відношенню до активності ЛДГ на стадії яйця. У дорослих мух активність ЛДГ висока і відповідає активності ферменту на стадії яйця.

Слід відмітити, що активність ЛДГ у дрозофіл різних ліній була неоднаковою, найбільша – у дрозофіл лінії Умань, а найменша – у лінії Conton-S (рис. 6).

Ми порівнювали активність ЛДГ у дрозофіл різних ліній високо- та низькостійких до впливу гіпоксії. Отримані результати показують, що у дрозофіл лінії Умань, низькостійких до впливу гіпоксії, активність ЛДГ підвищувалась, а у високо-стійких, навпаки, знижувалась порівняно з контролем. У дрозофіл лінії Чорнобиль, активність ЛДГ після гіпоксичних впливів вірогідно не змінювалась. У дрозофіл лінії Conton-S високо- і низькостійких до гіпоксії, активність ЛДГ була більшою, ніж в контролі.

## ВИСНОВКИ

Між високо- та низькостійкими до гіпоксії дрозофілами існують певні розбіжності в стійкості до високої температури та фоточутливості.

Дрозофіли лінії Conton-S після преадаптації до гіпоксії набували більш високої стійкості до підвищеної температури. Дрозофіли лінії Умань з високою стійкістю до гіпоксії найчастіше виявляли позитивний фототаксис. Це свідчить про те, що стійкість до підвищеної температури і реакція на світло дрозофіл є генетично запрограмованими і успадкованими ознаками, часткою механізмів крос-адаптації.

O.G.Chaka, V. A.Bezchasna, P.V.Lachin

## INFLUENCE OF OXYGEN DEPRIVATION ON PHOTO SENSITIVENESS AND FIRMNESS OF DROSOPHILA MELANOGASTER

There are certain distinctions in firmness to the high temperature and photo sensitiveness between highly and low steady to the hypoxia action of flies. Flies of line Conton-S after preadaptation to hypoxia acquired more firmness to the high temperature. Most of flies in line Uman, who are high-steady to the action of hypoxia, had positive phototaxis. It goes to show that firmness to the high temperature and phototaxis flies *Drosophila* are genetically programmed and passed on an inheritance.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine*

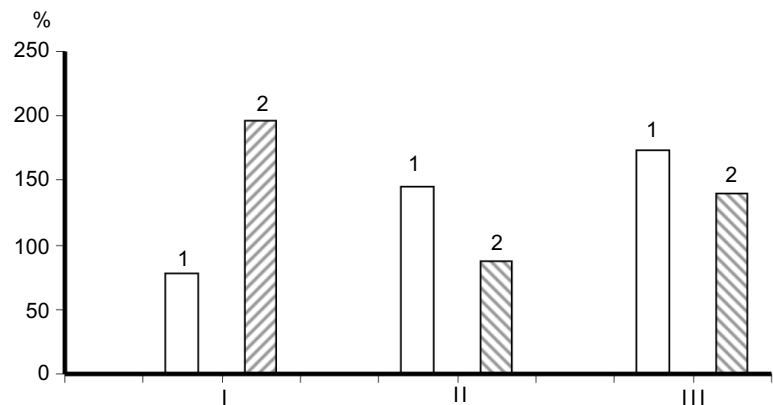


Рис. 6. Зміни активності лактатдегідрогенази у дрозофіл різних ліній (контрольні значення прийняті за 100 %). I – Умань, II – Чорнобиль, III – Conton-S: 1 – високо-стійкі до впливу гіпоксії, 2 – низько-стійкі до впливу гіпоксії

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Белоконь Е.М., Максимив Д.В. Лактатдегидрогеназа в онтогенезе *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 1982. – **16**, №2. – С.13–17.
2. Березовський В.А. Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности. – К. Наук. думка, 1978. – 215 с.
3. Вайсерман А.М. Влияние плотности популяции на личиночной и имагинальной стадиях онтогенеза на жизнеспособность и продолжительность жизни *Drosophila Melanogaster* // Пробл. старения и долголетия. – 1996. – **6**, № 1–2. – С.3–10.
4. Воробйова Л.В., Анопрієва С.О. Роль мутацій *Drosophila Melanogaster* у зміні пристосованості в процесі добору за фотореакцією імаго // Вісн. Львів. ун-ту. – 2004. – Вип. **35**. – С.110–114.
5. Животковский Л.А., Лазебный О.Е., Имашева А.Г. Оценка параметров распределения по фотоактивности у дрозофилы // Генетика. – 1989. – **25**, № 1. – С.75–86.
6. Имашева А.Г., Лазебный О.Е. Изменчивость природных популяций *Drosophila melanogaster* Евразии по признакам поведения // Там же. – 1993. – **29**, №10. – С.1646–1655.
7. Кириченко В.А., Воробьева Л.И. Фототаксис и приспособленность линии *Eyeless Drosophila Melanogaster* // Цитология и генетика. – 2001, № 3. – С.30–34.
8. Andre-Patrick A. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death // *Biol.Chem.* – 2003. – **379**. – P.19–26.
9. Dan Zhou, Jin Xue, Jianming Chen et al Experimental Selection for *Drosophila* Survival in Extremely Low O Environment // *Plos ONE*. – 2007. – **2**(5). – P.490.
10. Dózbhansky T., Judson C.L., Pavlovsky O. Behavior in different environments of populations of *Drosophila, pseudoobscura* selected for phototaxis and geotaxis // *Proc. Natl. Acad Sci USA*. – 1974. – May **71** (5). – P. 1974–1976.
11. Polivanov S. Response of *Drosophila persimilis* to phototactic and geotactic selection // *Behav. Genet.* – 1975. – **5**(3). – P. 255–267.
12. Parsons P.A. Phototactic responses along a gradient of light intensities for the sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* // *Ibid.* – 1975. – **5** (1). – P.17–25.
13. Hadler N.M. Heritability and Phototaxis in *drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 1964. – (50). – P.1269–1277.
14. Hirsch J., Boudreau J.C. Studies in experimental behavior genetics. The heritability of phototaxis in a population of *Drosophila melanogaster* // *J. Comp. Physiol. Psychol.* – 1958. – **51** (6). – P.647–651.
15. Le Corrone H., Hue B., Pitman R.M. Ionic mechanisms underlying depolarizing responses of an identified insect motor neuron to short periods of hypoxia // *J. Neurophysiol.* – 1999. – **81**. – P.307–318.
16. Huang Z.J., Curtin K.D., Rosbash M. PER Protein Interactions and Temperature Compensation of a Circadian Clock in *Drosophila* // *Science*. – 1995. – 267. – P.172–180.
17. Palos L.A., Blasko G. Effect of Hypoxia on the development of *Drosophila melanogaster* (Meigen) // *Aviat.Space Environ. Med.* – 1989. – 50. – P.411–422.
18. Willam Sofer, Hierich Ursprung. *Drosophila* Alcolol Dehydrogenase purification and partial characterization // *J. Biological. Chem.* – 1968. – 243, №11. – P. 3110–3114.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: chaka@biph.kiev.ua*

**К.В. Розова**

## **Вплив нормо- та гіпобаричної гіпоксії на ультраструктуру тканин легень і міокарда**

*Изучена приоритетность влияния изменений концентрации кислорода и/или атмосферного давления на морфофункциональное состояние ткани легких и миокарда при экзогенных воздействиях на организм, приводящих к развитию гипоксических состояний различного генеза. Показано, что прерывистое гипоксическое воздействие без снижения барометрического давления оказывает на ультраструктуру тканей менее травматичное воздействие, чем гипобарическая гипоксия. Дополнительное острое гипоксическое воздействие и острая дозированная кровопотеря сопровождаются менее выраженными структурными нарушениями в ткани легких и миокарде у животных, адаптированных к гипобарической гипоксии. Стрессорные изменения оказываются менее выраженными после нормобарических гипоксических тренировок.*

### **ВСТУП**

Незважаючи на те, що гіпоксична гіпоксія у різних її модифікаціях (інтервальні гіпоксичні тренування, адаптація до умов природного або штучного гірського клімату тощо) останнім часом знаходить все більш широке застосування в клінічній практиці та спортивній медицині [2, 5], механізми її впливу на організм, особливо для виявлення пріоритетності змін концентрації кисню або атмосферного тиску, досліджені недостатньо, а у деяких випадках практично зовсім не вивчені. Зокрема це стосується стану органів і систем, що беруть безпосередню участь у забезпеченні організму киснем, а саме дихальної та серцево-судинної систем [2, 5, 7]. Це питання набуває виключного значення при прийнятті рішення про вибір тренувального впливу в кожному конкретному випадку гіпоксичних газових сумішей з нормальним барометричним тиском або з одночасним зниженням як концентрації кисню, так і тиску.

Метою нашої роботи було дослідження пріоритетності впливу змін концентрації

кисню та/або атмосферного тиску на морфофункціональний стан тканини легень і міокарда при екзогенних впливах на організм, які призводять до розвитку гіпоксичних станів різного генезу.

### **МЕТОДИКА**

Дослідження виконано на білих статевозрілих щурах-самцях масою 250–300 г. Роботу з лабораторними тваринами проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей (Страсбург, 1985).

Тканини легень і серця досліджували у нормобаричних умовах (м. Київ) та в умовах середньогір'я (гіпобарія) на тваринах-аборигенах, які протягом кількох поколінь проживали у с. Терскол на висоті 2100 м над рівнем моря.

Схеми проведення експериментів були такими: 1. Інтервальні гіпоксичні тренування в умовах нормобарії, які проводили за допомогою газової суміші, що містила

© К.В. Розова

12 % O<sub>2</sub> в азоті – тварини дихали по 15 хв гіпоксичною сумішшю з 15-хвилинними нормоксичними інтервалами щоденно по 4 тренувальні цикли (період тренування – 2 тиж). 2. Переривчаста гіпоксична гіпоксія в умовах гіпобарії, яку створювали за допомогою „підйому” у барокамері на умовну висоту 5000 м над рівнем моря зі швидкістю 1000 м за 10 хв та перебування на цій „висоті” протягом 6 год щоденно (період тренування – 2 тиж). 3. Додаткові впливи на організм: а) гостра нормобарична гіпоксична гіпоксія (газова суміш з 7 % O<sub>2</sub> у N<sub>2</sub>, експозиція 30 хв); б) гостра крововтрата 25–30 % від об’єму циркулюючої крові (експозиція 30 хв); в) гострий 6-годинний іммобілізаційний стрес.

Відповідно до поставленої мети, в роботі використовувалися такі поєднання впливів на організм та формувалися відповідні експериментальні групи щурів, що включали по 5-6 тварин кожна:

Номер групи	Умови проведення експерименту
1.	Контрольна група (Київ)
2.	Умови середньогір’я (тварини-аборигени) (Терскол)
3.	Інтервальні гіпоксичні тренування (нормобарична гіпоксія)
4.	Переривчаста гіпоксична гіпоксія (гіпобарична гіпоксія)
5.	Нормобарична гіпоксія та гостра крововтрата
6.	Умови середньогір’я та гостра крововтрата
7.	Нормобарична нормоксія та іммобілізаційний стрес
8.	Умови середньогір’я та іммобілізаційний стрес
9.	Нормобарична гіпоксія та гостра гіпоксична гіпоксія
10.	Гіпобарична гіпоксія та гостра гіпоксична гіпоксія
11.	Нормобарична гіпоксія та іммобілізаційний стрес
12.	Гіпобарична гіпоксія та іммобілізаційний стрес

Препарати для електронно-мікроскопічних досліджень готували за загальноприйнятою методикою з подвійною фіксацією глютаральдегідом і OsO<sub>4</sub>, зневоднюванням спиртами зростаючої концентрації та наступною заливкою в епон [1]. Ультратонкі зрізи товщиною 40–60 нм, контрастовані ураніацетатом і цитратом свинцю, досліджували за допомогою електронних мікроскопів JEM-100 CX та ПЕМ-125К. Морфометричну оцінку тканини легень і міокарда, зокрема товщину аерогематичного бар’єра легень (АГБ) та гемато-паренхіматозного бар’єра в міокарді (ГПБ), виконували відповідно до підходів Вейбеля [6]; інші морфометричні характеристики – за допомогою програми „Image Tool Version 3” (США). Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ідея дослідження сформувалася тоді, коли були виявлені особливості ультраструктури досліджуваних тканин в організмі щурів, котрі протягом кількох поколінь жили та розмножувалися в умовах середньогір’я (2-га група). Зокрема було показано, що у цих тварин розвиваються зміни ультраструктури пристосувального характеру, а саме – значне збільшення кількості сурфактант-синтезуючих структур – ламелярних тілець і вільних сурфактантів у легенях, що перешкоджає злипанню альвеол у гіпоксичних умовах; збільшення кількості та зменшення розмірів мітохондрій в міокарді, що призводить до збільшення площі поверхні мітохондріальних мембран в одиниці об’єму тканини. Дані морфологічні особливості підтверджуються морфометричними характеристиками тканин: в легенях – кількість ламелярних тілець зростала на 35–40 %; середня площа, яку займають вільні (активні та резервні) сурфактанти у порожнині альвеол зростала на 70–75 %; в міокарді – кількість мітохондрій збіль-

шувалася на 35–40 %, а їх діаметр зменшувався майже на 50 %.

Оскільки тривала адаптація до гіпоксії наразі має вже генетичну природу, до пояснення виявлених особливостей можна залучити результати досліджень останніх років, пов'язаних з виявленням ролі генетичних факторів. Зокрема вважають, що в легенях важливе значення для гомеостазу сурфактантів відіграють SP-D-ген та GM-CSF-фактор. З їх допомогою регулюється проліферація та диференціація пневмоцитів II типу, які містять ламелярні тільця, і катаболізм сурфактантів [8, 9]. Можна припустити, що у шурів-аборигенів спостерігається підвищена експресія цих факторів, що не тільки призводить до збільшення кількості ламелярних тілець, але й супроводжується підвищенням кліренсу сурфактантів. В міокарді в умовах хронічної гіпоксії не спостерігається порушення структури саркомерів, що є характерним для гострих гіпоксичних впливів. Окрім цього, не спостерігається загибелі кардіоміоцитів або значних порушень структури мітохондрій. Можна припустити, що нативна структура тканини певною мірою пов'язана з оптимальною для умов існування експресією генів  $\alpha$ - і  $\beta$ -МуНС і PTH type 1 receptor, які від-

повідають за збереженість міокарда [10].

Різниця у розвитку гіпоксичних станів в нормо- та гіпобаричних умовах була виявлена при порівнянні перебігу гострої крововтрати та гострого іммобілізаційного стресу на рівнині та у середньогір'ї. Було встановлено, що в горах крововтрата впливає на морфофункціональний стан тканин значно менше. Якщо в умовах нормобарії (5-та група) з боку тканини легень виявляли наявність деструктивних процесів, набряку, включаючи і набряк як внутрішньоальвеолярний, так і АГБ, то при гіпобарії (6-та група) таких порушень не спостерігалось. При цьому, якщо середня товщина АГБ при крововтраті достовірно не змінювалася відносно відповідного „гірського” контролю, то при крововтраті в умовах нормобаричної гіпоксії середня товщина АГБ знижувалася за рахунок виражених деструктивних процесів у бар'єрі (рис. 1,а).

Така тенденція в цілому зберігалася і в міокарді, однак, оскільки ця тканина є більш стійкою до несприятливих впливів, то, поперше, деструктивні процеси у тканині та ГПБ у тварин 6-ї групи не виявлялися, подруге, гіпергідратація бар'єра у тварин-аборигенів при крововтраті була достовірно

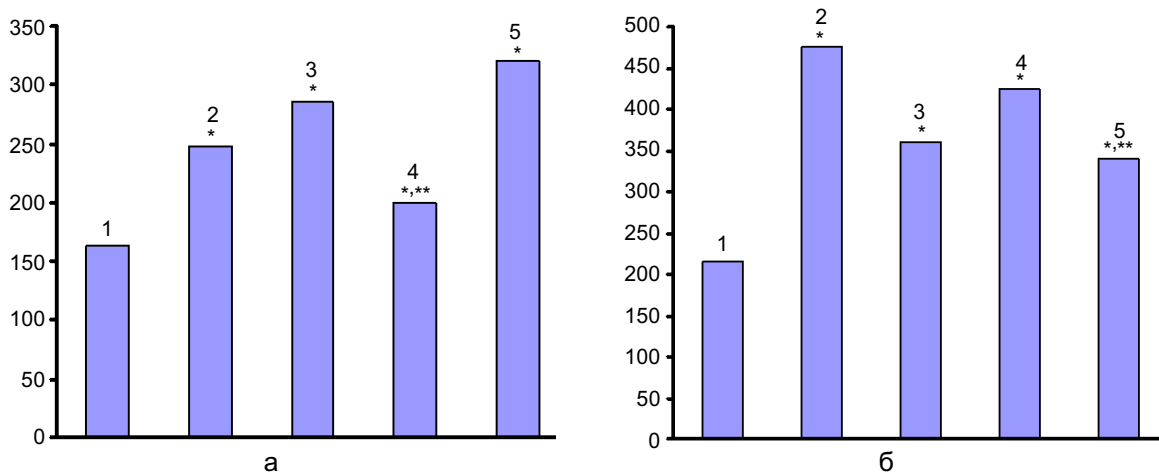


Рис. 1. Середня товщина аерогематичного бар'єра легень (а) та гематопаренхіматозного бар'єра міокарда (б) при гострій крововтраті у шурів в м. Київ та с. Терскол (нм). Умовні позначення: 1 – контроль, 2 – гіпоксія, 3 – умови середньогір'я, 4 – гіпоксія та крововтрата, 5 – умови середньогір'я та крововтрати, \* – достовірність порівняно з контролем, \*\* – зі змінами при впливі гіпоксії

нижчою за відповідний контроль (2-га група) (на рівнині цього ефекту при гіпоксії та крововтраті не спостерігалось) (див. рис. 1,б). При цьому слід підкреслити, що у тварин, які провели у гірських умовах не більше місяця, перебіг крововтрати характеризувався найвиразнішими порушеннями ультраструктури досліджуваних тканин, що вказує на неспроможність пристосувальних механізмів протидіяти несприятливим впливам на організм при незавершеній адаптації [4].

Перебіг іммобілізаційного стресу при нормо- та гіпобарії був практично однаковим щодо змін ультраструктури та морфометричних характеристик тканини легень і міокарда (7-ма та 8-ма групи). В обох випадках зберігалися усі ознаки „стресорних” легень (набряк, деструкція, геморагічні прояви); також спостерігалось достовірне і однакове збільшення товщини АГБ, тобто його гіпергідратація (рис. 2,а). Це саме стосується і змін ультраструктури міокарда та набряку ГПБ (див. рис. 2,б). Імовірно, при стресі відбувається включення механізмів пошкодження (зокрема катехоламінзалежних процесів [3]), які не піддаються позитивному впливу середньогір'я.

Виявлені відмінності змін морфофункціонального стану тканини легень і міокар-

да на рівнині (в нормо- та гіпоксичних умовах) і у середньогір'ї наштовхнули на думку про те, що вони можуть бути зумовленими не тільки змінами концентрації кисню, а і/чи, більшою або меншою мірою, змінами барометричного тиску. Причому цей вплив є відмінним при різних додаткових впливах на організм.

Було показано, що 2-тижневе гіпоксичне тренування тварин без зниження барометричного тиску (3-тя група) справляло на ультраструктуру досліджуваних тканин менш травматичний вплив, ніж гіпобарична гіпоксія (4-та група). Остання супроводжувалася значними пошкодженнями цитоплазматичних мембран клітин та окремих клітинних органел, особливо у тканині легень (рис. 3).

Про це саме свідчила і вираженість проявів набряку біологічних бар'єрів: товщина АГБ і ГПБ значно істотніше збільшувалася при гіпобаричній гіпоксії (рис. 4,а,б).

Додатковий гострогіпоксичний вплив супроводжувався менш вираженими структурними порушеннями в тканинах у тварин 10-ї групи, тренуваних до гіпобаричної гіпоксії. При нормо баричній гіпоксії (9-та група) в тканині легень та міокарді були

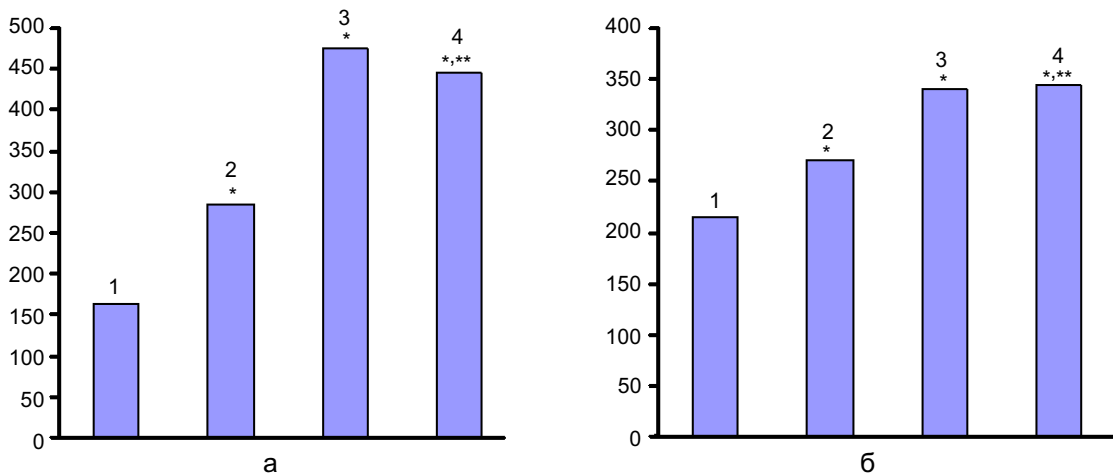


Рис. 2. Середня товщина аерогематозного бар'єра легень (а) та гематопаренхіматозного бар'єра міокарда (б) при іммобілізаційному стресі шурів у м. Київ та с. Терскол (нм). Умовні позначення: 1 – контроль, 2 – умови середньогір'я, 3 – стрес у м. Київ, 4 – стрес у с. Терскол, \* – достовірність порівняно з контролем, \*\* – з умовами середньогір'я



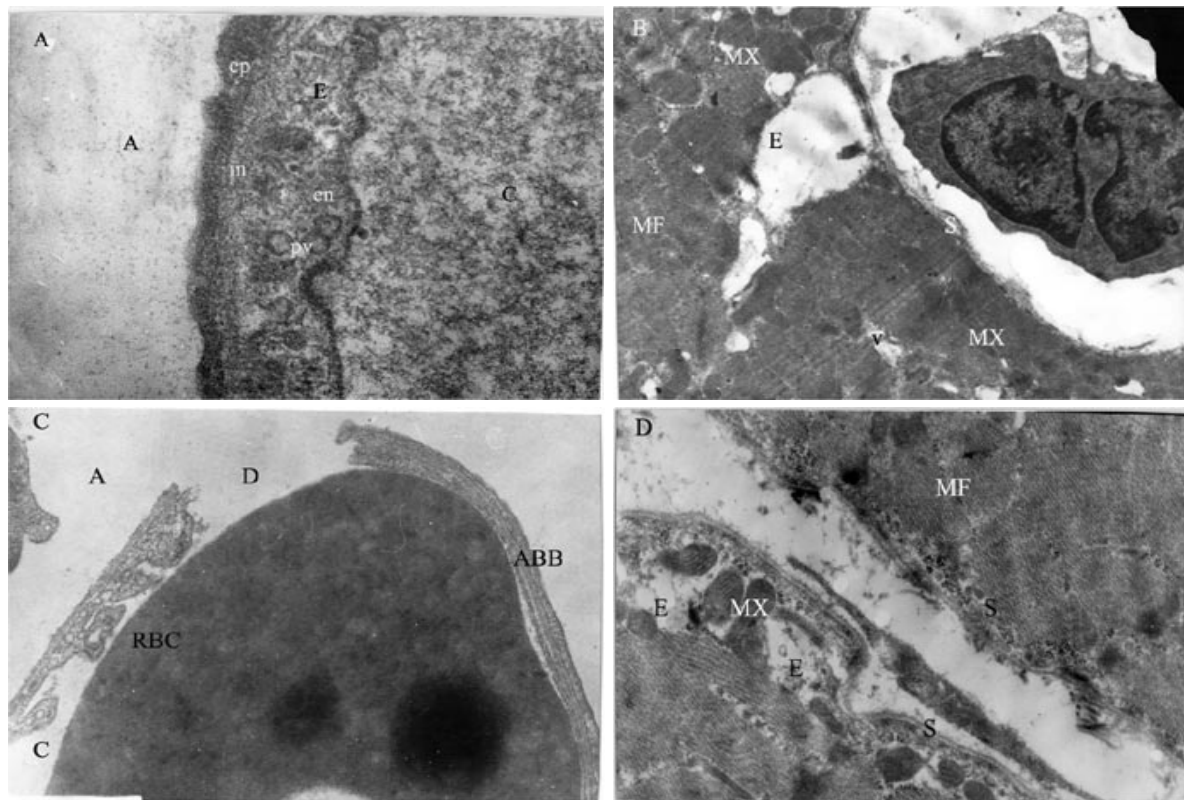


Рис. 3. Ультраструктура тканини легень (А,С) та міокарда (В,Д) під впливом 2-тижневої нормо- (А,В) та гіпобаричної (С,Д) гіпоксії. Умовні позначення: А – альвеола, Е – набряк, С – капіляр, RBC – еритроцит, MX – мітохондрії, MF – міофібрили, S – сарколема, D – деструкція, АВВ – аерогематичний бар’єр, ер – епітелій, in – інтерстицій, ep – ендотелій, v – вакуолі. 3б. А-32000, В-Д-24000

виражені деструктивні процеси та процеси набряку. При гіпобаричній гіпоксії за цих

умов підвищення проникності цитоплазматичних мембран, яке, як правило,

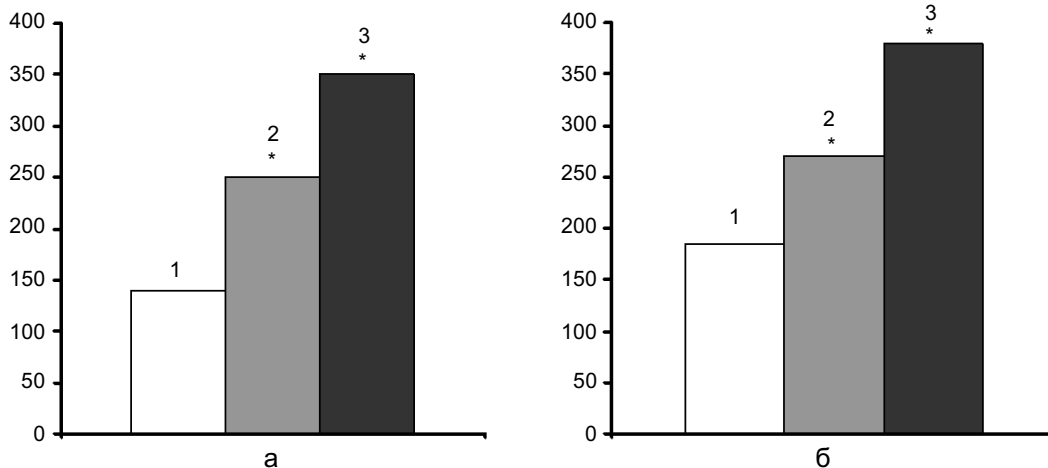


Рис. 4. Середня товщина аерогематичного бар’єра легень (а) та гематоparenхіматозного бар’єра міокарда (б) після гіпоксичних тренувань (нм). Умовні позначення: 1 – контроль, 2 – 2-тижневе гіпоксичне тренування при нормальному барометричному тиску, 3 – 2-тижневе гіпоксичне тренування при зниженому барометричному тиску, \* відмінності достовірні відносно контролю

реалізувалося у локальному набряку (процес утворення вакуолей і так званих пухирів [7]).

Стресорні зміни виявлялися значно менш вираженими в тканинах у тварин після нормобаричної гіпоксії (11-та група). При гіпобарії (12-та група) зберігалися ознаки „стресорних” легень і деструктивні зміни в міокарді. Такі результати збігаються з отриманими в умовах середньогір’я.

Проведені дослідження дають змогу дійти висновку, що як зниження концентрації кисню в навколишньому середовищі, так і зниження атмосферного тиску впливають на морфофункціональний стан тканин легень і міокарда. Причому вираженість дії та пріоритетність цих факторів залежать від наявності додаткових впливів, зокрема таких, що супроводжуються розвитком в організмі гіпоксичних станів різного генезу. Отримані результати вказують на необхідність точної постановки задачі та врахування додаткових ендо- та екзогенних чинників при застосуванні тренувань зі зниженням концентрації кисню в нормобаричних умовах або із залученням для отримання позитивного ефекту гіпобарії.

**K.V.Rozova**

#### **INFLUENCE OF NORMO- AND HYPOBARIC HYPOXIA ON ULTRASTRUCTURE OF LUNG TISSUE AND MYOCARDIUM**

Priority of effect of oxygen concentration and/or atmospheric pressure changes on morphofunctional state of lung tissue and myocardium under exasperate influence on the organism, which lead to the development of different hypoxic states, was investigated. It was shown, that the intermittent hypoxia without barometric pressure lowering influence on ultrastructure of tissues less traumatically, then hypobaric hypoxia. Addi-

tional acute hypoxic influence and acute hemorrhage accompanied with less significant structural violations in lung tissue and myocardium of animals, which were adapted to hypobaric hypoxia. Stress exchanges were less considerable after normobaric hypoxic trainings.

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

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Карупу В.Я. Электронная микроскопия. – К.: Вища школа, 1984. – 208 с.
2. Колчинская А.З., Цыганова Т.Н., Остапенко Л.А. Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте. – М.: Медицина, 2003. – 407 с.
3. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. – М.: Медицина, 1988. – 256с.
4. Механизмы развития и компенсации гемической гипоксии / Под ред. М.М. Середенко. – К.: Наук. думка, 1987. – 200 с.
5. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты / Под ред. Л.Д.Лукьяновой, И.Б.Ушакова. – М.; Воронеж: Истоки, 2004. – 590 с.
6. Ташке К. Введение в количественную цитогистологическую морфологию. – Бухарест: Изд-во АСРР, 1980. – 192 с.
7. Шахламов В.А., Сороковой В.И. Реакция клеток на гипоксию // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1983. – **85**, № 7. – С. 12–25.
8. Ikegami M., Jobe A.H., Huffman Reed J.A., Whitsett J.A. Surfactant metabolic consequences of overexpression of GM-CSF in the epithelium of GM-CSF-deficient mice // Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 1997. – **273**, № 6. – P. 709–714.
9. Lemaire I., Yang H., Lauzon W., Gendron N. M-CSF and GM-CSF promote alveolar macrophage differentiation into multinucleated giant cells with distinct phenotypes // J. Leukoc. Biol. – 1996. – **60**, № 3. – P. 509–518.
10. Marian A.J., Yu Q.-T., Mann D.L. et al. Expression of a Mutation Causing Hypertrophic Cardiomyopathy Disruption Sarcomere Assembly in Adult Feline Cardiac Myocytes // Circulat. Res. – 1995. – **77**, № 1. – P. 98–106.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ  
E-mail: rozova@ukr.net*

І.Г. Літовка, О.С. Костюченко

## Ремоделювання кісткової тканини у молодих і дорослих щурів за умов аліментарної депривації

*Изучено влияние моделированной в течение 28 сут алиментарной депривации на процессы физиологического ремоделирования костной ткани у 3- и 9-месячных крыс-самцов линии Вистар. Исследовано 4 группы животных: I, III – контроль, II, IV – режим ограничения калорийности пищи на 40 % относительно полноценного рациона для каждой возрастной группы. Показано повышение концентрации мелатонина, гликозаминогликанов сыворотки крови и активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови и костной ткани в 1,4 и 1,2 раза соответственно при алиментарной депривации у молодых крыс. У взрослых крыс выявлено снижение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови после алиментарной депривации. Экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста -1 у животных обеих исследуемых групп практически не менялась. Сделан вывод о том, что алиментарная депривация изменяет биохимические маркеры ремоделирования костной ткани у молодых животных, в то время как у взрослых животных они были незначительными.*

### ВСТУП

Фізіологічний процес розвитку кісткової тканини включає три основних періоди, а саме: I – формування кісткової маси у періоді онтогенезу, II – досягнення піку кісткової маси, III – вікова інволюція структури та функції кісток. В онтогенезі кожного виду ссавців відбувається генетично зумовлений процес закладки хрящового кістяка, поступове насичення його мінеральними компонентами та формування кісткової тканини. З часом процес формування кістяка припиняється і змінюється процесом фізіологічного ремоделювання [2, 7, 13, 14].

Дослідження останніх років показали, що у періоді формування кісткової маси та інволюції особливу роль відіграють декілька факторів. Серед них слід відзначити спадковість (сімейний фактор), повноцінне харчування, руховий фенотип, екологічні впливи навколишнього середовища [6, 9–12]. Відомо, що зниження калорійності їжі подовжує тривалість життя і знижує

інтенсивність енергетичного метаболізму. Численні дослідження було проведено в основному на дорослих особинах. А як впливає аліментарна депривація на кісткову систему молодих тварин ретельно не досліджувалося.

Метою нашої роботи було зіставлення впливу обмеженого харчування на показники фізіологічної регенерації кісткової тканини у молодих і дорослих щурів.

### МЕТОДИКА

Досліди проведено у весняний період протягом 28 діб на 32 щурах-самцях лінії Вистар віком 3 і 9 міс на початок експерименту. Щури контрольних груп (I і III) перебували за стандартних умов віварію. Для тварин II і IV груп було застосовано класичну модель обмеження калорійності кормів на 40 % відносно повноцінного раціону для 3-місячних тварин – 20 г, 9-місячних – 25 г [15]. Тобто вміст усіх інгредієнтів, що входили до раціону, було знижено на 40 %, у тому числі необхідних

© І.Г. Літовка, О.С. Костюченко

для побудови скелета мінеральних компонентів і вітамінів. Тварини цих груп мали вільний доступ до води. Всі маніпуляції проводили з виконанням міжнародних вимог про гуманне ставлення до тварин.

У щурів щотижня натщесерце реєстрували масу тіла кожної особини. Загальний стан тварин та інтенсивність метаболізму кісткової тканини контролювали за допомогою фізіологічних, біохімічних і біофізичних методів дослідження.

Матеріалом для досліджень були свіжо-видалені стегнові кістки, печінка та сироватка крові, які одержували від декапітованих під рауш-наркозом тварин. Біохімічні показники фізіологічної регенерації кісткової тканини досліджували за допомогою спектрофотометричних, імуноферментних методів і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). У сироватці крові визначали концентрацію мелатоніну за стандартними наборами реактивів (фірми “Buhlmann”, Швейцарія), у кістковій тканині та сироватці крові – показники формування кісткової тканини: активність лужної фосфатази (ЛФ; КФ 3.1.3.1, реактиви фірми “Лахема”, Чехія) та її кістковий ізофермент. Крім того вивчали показники резорбції кісткової тканини: загальну каталітичну активність кислої фосфатази (КФ; КФ 3.1.3.2) та тартратрезистентну кислоту фосфатазу (ТРКФ; реактиви фірми “Лахема”, Чехія), концентрацію глікозаміногліканів у сироватці крові за методом Кляцкіна [4].

Рівень експресії гена інсуліноподібного фактора росту-1 (ІПФР-1) визначали у гомогенаті печінки. Для цього 20 мг печінки гомогенізували у 375 мл розчину “Рибозоль-А”. По закінченні процедури проби зберігали при  $-70^{\circ}\text{C}$  до проведення ПЛР.

Ген GAPDH (від англ. glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase) був маркером (внутрішній контроль рівня експресії мРНК). Для виділення РНК і видалення слідів геномної ДНК у зразках використовували набори “Рибозоль” (“AmpliSens”,

Росія) та 1 U RNase-free DNase (“Sigma”, США) відповідно. Реакцію оберненої транскрипції проводили з використанням стандартних наборів “Реверта-L-100” (“AmpliSens”, Росія). Кількість специфічної РНК представляли як добуток площі смуги на інтенсивність її світіння за допомогою програми “BioTestColor”. Рівень експресії гена розраховували як відношення кількості специфічної РНК до числа маркерної GAPDH-РНК у тому самому зразку та представляли в умовних одиницях.

Цифрові результати обробляли з використанням пакета програмного забезпечення Magellan 3.0, програми Microsoft Excell 2003. Для визначення вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показали проведені дослідження, маса тіла 3-місячних щурів контрольної групи збільшувалася протягом усього експерименту. Відносний приріст маси тіла тварин цієї групи за перший, другий, третій і четвертий тижні становив 10,7, 23,1, 11,7 і 14,1% відповідно. Загалом за 28 діб цей показник сягав 73,8 % відносно вихідних значень (рис. 1).

Маса тіла у молодих щурів II групи змінювалася дещо по-іншому. За перший тиждень вона знизилася на 3,2 % порівняно з вихідними значеннями. Протягом наступних двох тижнів відносний приріст маси тіла становив 13,4 і 10 % відповідно, за четвертий тиждень – 4,6 %.

У цілому, у тварин II групи з аліментарною депривацією відносний приріст маси тіла був значно нижчим і становив 26,4 % порівняно з вихідними значеннями. Таким чином, найбільша втрата маси спостерігається за перший тиждень періоду обмеження харчування за калорійністю та масою. Згодом поступово втрата маси тіла припиняється і відзначається її повільне

підвищення. Різниця між відносним приростом маси у контрольних 3-місячних щурів і тварин такого самого віку в умовах модельованої аліментарної депривації становила 47 %.

Щотижневі зміни маси тіла 9-місячних контрольних щурів були незначними. За перший тиждень відносний приріст маси становив 1 %, за другий і третій тижні – приблизно 3 % (щотижнево). За четвертий тиждень маса тіла збільшилася на 0,4 %. Загалом за чотири тижні відносний приріст маси тіла становив 7,5 % (див. рис. 1).

Обмеження раціону харчування у щурів IV групи супроводжувалося щотижневим зниженням маси тіла. За перший, другий, третій і четвертий тижні вона знизилася на 2,6, 1,2, 1,2, 0,14 % відповідно. За 28 діб експерименту маса тіла досліджуваних тварин знизилася на 2,8 % відносно вихідних значень.

Маса стегнових кісток тварин обох досліджуваних груп залишалася стабільною відносно контролю. Таким чином, під час часткового обмеження раціону не спостерігали прямої кореляції між зменшенням загальної маси тіла та масою кісткової тканини у досліджуваних тварин усіх груп.

У деяких тварин, що ростуть протягом всього життя, кісткова тканина постійно змінюється за формою, збільшується в

довжині та діаметрі. Основні клітини кісткової тканини, остеобласти та остеокласти, одночасно є на зовнішній і внутрішній поверхнях кістки. Це забезпечує можливість як періостального, так і ендостального росту кісткової тканини. У ранньому віці збільшення маси та розмірів кістки поєднується з її формуванням. Усі ці процеси відбуваються одночасно, визначаючи форму та розмір кожної кістки. У період росту і розвитку скелета формування здійснюється інтенсивніше, ніж резорбція. Обидва процеси на ранніх етапах постнатального онтогенезу мають набагато більші швидкості, ніж у дорослому віці, коли відбувається лише заміна застарілих елементів, тобто здійснюється процес ремоделювання. У скелеті, який досяг максимальної маси і тільки ремоделюється, формування і руйнування зазвичай врівноважені [11]. Швидкість резорбції починає переважати в період вікової інволюції, коли істотно змінюється гуморальна регуляція проліферації та нервова регуляція рухової активності. Проте фактори навколишнього середовища, а саме: незбалансоване харчування, змінене газове середовище, зменшення рухової активності призводять до суттєвих змін стану кісткової тканини. Водночас варто зазначити, що

закономірна втрата елементів кісткової тканини, після досягнення її максимуму у молодому віці – це універсальне явище життя, властиве всім хребетним незалежно від стадії філогенетичного розвитку.

Результати біохімічних досліджень показників ремоделювання кісткової тканини показали вірогідне збільшення у 1,2 раза у сироватці крові щурів II групи концентрації мелатоніну відносно контрольних значень після 28-добової аліментарної депривації (рис. 2). Це свідчить,

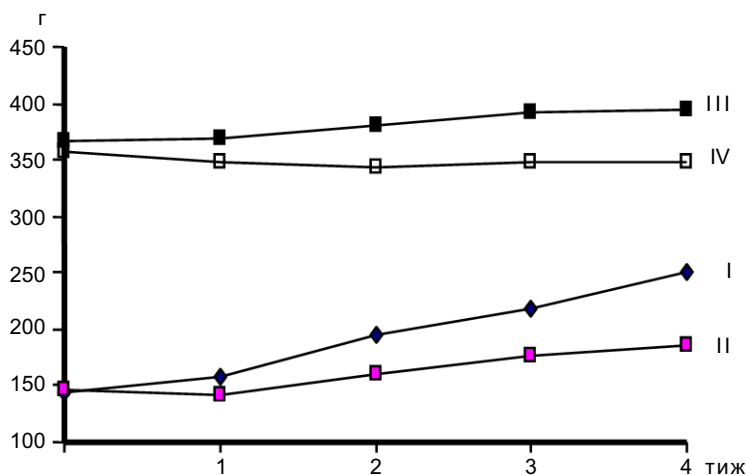


Рис. 1. Зміни маси тіла контрольних (I, III) і дослідних (II, IV) щурів різного віку: 3 і 9 міс відповідно

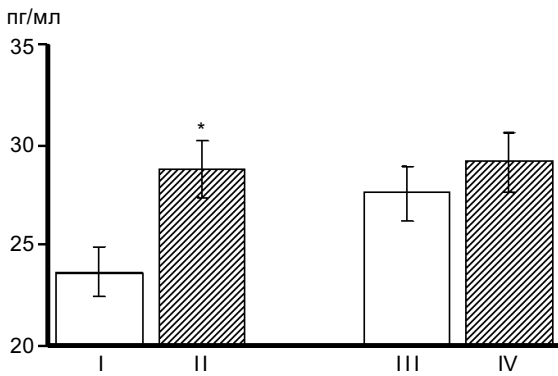


Рис. 2. Зміни вмісту мелатоніну у сироватці крові контрольних (I, III) і дослідних (II, IV) щурів різного віку: 3 і 9 міс відповідно. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем

що аліментарна депривація активує секрецію мелатоніну у молодих тварин і тим самим змінює швидкість процесів фізіологічного ремоделювання кісткової тканини.

У спеціальній літературі існують відомості про наявність прямої кореляції між вмістом мелатоніну, гормону росту та ІПФР-I [16–18]. Проте у проведених нами дослідженнях не виявлено підвищення вмісту ІПФР-I у гомогенаті печінки молодих і дорослих щурів.

Активність ЛФ, яка характеризує діяльність остеобластів у сироватці крові молодих щурів при аліментарній депривації вірогідно підвищувалася на 20 %, а в кістковій тканині – на 40 % порівняно з вихідними значеннями (рис. 3).

Активність КФ, яка відображає діяльність остеокластів у сироватці крові та кіст-

ковій тканині у щурів II групи, не змінювалася порівняно з контрольними значеннями. Активність ТРКФ також залишалася стабільною.

Коефіцієнт ЛФ/КФ та ЛФ/ТРКФ у сироватці крові контрольних молодих щурів дорівнює 3,96 та 6,05 відповідно. При моделюванні аліментарної депривації у тварин II групи він збільшився до 5,14, а ЛФ/ТРКФ – до 8,22, що було у 1,3 і 1,4 раза відповідно вищим від контрольних значень. У кістковій тканині коефіцієнт ЛФ/КФ у цих тварин був нижчим у 6 разів порівняно з контролем. Якщо у контрольних молодих щурів коефіцієнт ЛФ/КФ дорівнював 82,3, то при обмеженні раціону харчування він значно знижувався і становив 14,3. Тобто у молодих тварин спостерігається істотне розбалансування процесів формування та руйнування кісткової тканини.

У проведених експериментах ми спостерігали вірогідне підвищення концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові щурів II групи в 2,4 раза (рис. 4). Відомо, що глікозаміноглікани беруть активну участь у фіксації кристалів гідроксиапатиту в органічний матрикс кісткової тканини, що забезпечує високі біомеханічні властивості кістяка.

Таким чином, у молодих щурів з обмеженим раціоном виявлено високу реактивність, особливо за активністю лужної фосфатази у кістковій тканині, концентрацією мелатоніну, глікозаміногліканів у сироватці крові.

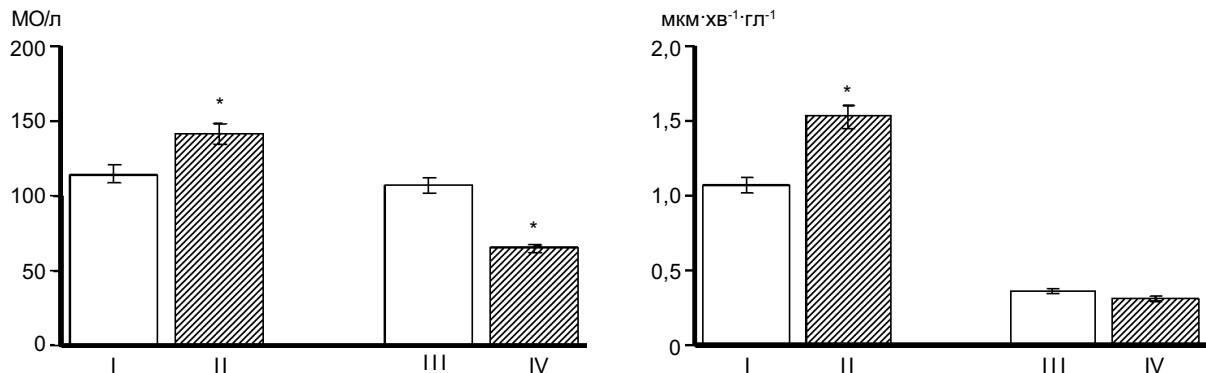


Рис. 3. Зміни активності лужної фосфатази у сироватці крові (а) і кістковій тканині (б) контрольних (I, III) та дослідних (II, IV) щурів різного віку: 3 і 9 міс відповідно

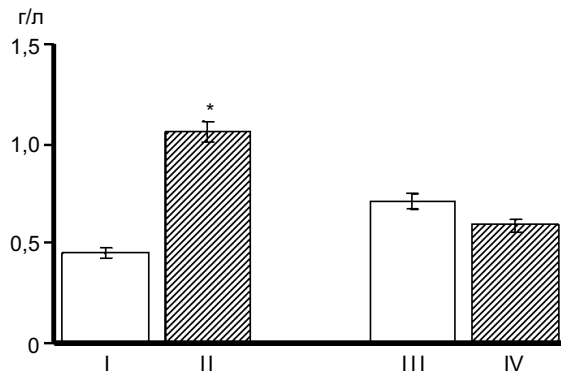


Рис. 4. Зміни концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові контрольних (I, III) та дослідних (II, IV) щурів різного віку: 3 і 9 міс відповідно

У дорослих 9-місячних щурів, незважаючи на досить тривале обмеження раціону, концентрація мелатоніну в сироватці крові, так само як експресія гена ПФР-1 залишалася стабільною.

Активність ЛФ у сироватці крові вірогідно зменшилася в 1,7 раза, у той час як у кістковій тканині вона мала лише тенденцію до зниження (див. рис. 3). Активність КФ в сироватці крові та кістковій тканині, а також ТРКФ у сироватці крові не змінювалися відносно контрольних значень. Співвідношення ЛФ/КФ у сироватці крові контрольних і дослідних дорослих щурів становило 4,83 і 2,68 відповідно, а ЛФ/ТРКФ – 6,05 і 3,9 відповідно. У кістковій тканині коефіцієнт ЛФ/КФ для контрольних щурів становив 40, а для досліджуваних – 31. Концентрація глікозаміногліканів у сироватці крові дорослих щурів мала тенденцію до зниження відносно контрольних значень.

Слід відмітити незначне зниження темпу фізіологічної регенерації кісткової тканини у дорослих тварин. Тобто в умовах обмеження калорійності раціону у дорослих щурів виявляється висока збалансованість процесів руйнування та формування кісткової тканини.

Одержані результати відповідають класичному погляду на провідну роль сполучної тканини у фізіологічній регенерації кісткової тканини [3]. В умовах обмеженого харчування перевага активності про-

цесів руйнування більш виражена у молодих щурів. У дорослих тварин, вірогідно, навіть за таких умов зберігається сталий баланс між формуванням і резорбцією кістки.

Такої самої думки дотримуються і автори, які вважають, що в ранньому онтогенезі під час росту і збільшення маси скелета (моделювання) превалює остеогенез. У період дозрівання скелета процеси руйнування і формування врівноважуються. Остеобласти відіграють надзвичайно важливу роль не лише у формуванні та підтримці стану скелета, а і у регуляції активності остеокластів. Вони мають рецептори до первинних стимуляторів кісткової резорбції – паратиреоїдного гормону, різноманітних факторів росту. Отримуючи відповідний сигнал, остеобласти звільняють розчинний медіатор, який індукує руйнування кістки остеокластами. Тільки після цього остеобласт отримує можливість виконання своїх фізіологічних функцій – утворення кістки. При цьому маса у дорослому віці відновленої за допомогою остеобластів кісткової тканини і маса зруйнованої остеокластами кісткової тканини приблизно однакові [1, 8].

Таким чином, аліментарна депривація змінює темпи фізіологічного ремоделювання кісткової тканини молодих щурів. Про це свідчить підвищення концентрації мелатоніну, глікозаміногліканів та активності ЛФ у сироватці крові. У дорослих щурів спостерігали незначне зниження темпу ремоделювання кісткової тканини, що пов'язано з більш сталою регуляцією остеорезорбції та остеогенезу, енергетичного метаболізму і маси тіла.

**I.G. Litovka, A.S. Kostjuchenko**

#### **THE BONE TISSUE PHYSIOLOGICAL REGENERATION OF YOUNG AND ADULT RATS IN THE DESIGNED ALIMENTARY DEPRIVATION CONDITIONS**

We studied the influencing of designed during 28 days alimentary deprivation on the bone tissue physiological re-

modeling processes for 3- and 9-monthly Wistar rats-males (n=32). 4 groups of animals are probed: I, III – control, II, IV is the mode of calorie limitation (40% in relation to a valuable ration for every age group). It is shown, that alimentary deprivation increase the concentration of melatonin, glycosaminoglycans in blood serum and activity of alkaline phosphatase in serum and bone tissue in 1,4 and 1,2 time accordingly at for young rats. For adult rats the reliable decline of activity of alkaline phosphatase is exposed in the blood serum after alimentary deprivation. Expression of gene of insulinlike growth factor-I for animals of both probed groups did not change practically. We conclude, that alimentary deprivation change the biochemical markers of bone tissue physiological remodeling for young animals, while the changes of physiological regeneration rates were insignificant for adult animals.

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

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аврунин А.С., Корнилов Н.В., Суханов А.В., Емельянов В.Г. Формирование остеопоротических сдвигов в структуре костной ткани. – СПб: Ольга, 1998. – 68 с.
2. Аршавский И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. – М: Наука, 1982. – 270 с.
3. Богомолец О.О. Вибрані твори. – К.: Наук. думка, 1969. – 422 с.
4. Кляцкин С.А., Лифшиц Р.И. Определение гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных // Лаб. дело. – 1989. – №10. – С.51–53.
5. Корнилов Н.В., Аврунин А.С. Адаптационные процессы в органах скелета. – СПб.: МОВ-САРАВ, 2001. – 269 с.
6. Літовка І.Г. Ремоделювання кісткової тканини у низько- і високоактивних шурів в умовах 45-добової гіпокінезії та впливу дозованої кисневої деривації // Косм. наука і технологія. – 2003. – 9, №1. – С.92–95.
7. Оганов В.С. Гипокинезия – фактор риска остеопороза // Остеопороз и остеопатии. – 1998. – №1. – С.13–17.
8. Пальцев М.А., Аничков Н.М. Патологическая анатомия. В 2-х томах. – М: Медицина, 2001. – Т.2, Ч.П. – 680 с.
9. Поворознюк В.В., Григорьева Н.В. Питание и остеопороз // Жен. здоровье. – 2000. – № 3. – С. 36–39.
10. Подрушняк Е.П. Остеопороз – проблема века. – Симферополь: Одиссей, 1997. – 216 с.
11. Прохончуков А.А., Жижина Н.А., Тигранян Р.А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экспериментальном воздействии. – В кн.: Проблемы космической биологии. – М.: Наука, 1984. – 49. – 200 с.
12. Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж. Остеопороз: Пер. с англ. – М. – С-Пб.: ЗАО Изд-во БИНОМ, Невский диалект, 2000. – 560 с.
13. Compston J.E. Sex steroids and bone // Physiol. Rev. – 2001. – 81, №1. – P. 419–447.
14. Eliakim A., Raisz L.G., Brasel J.A., Cooper D.M. Evidence of increased bone formation following a brief endurance – type training intervention in adolescents males // J.Bone Miner. Res. – 1997. – 12, №10. – P.1708–1713.
15. McCay C.M. Reprint size // Science. – 1941. – 94, № 2444. – 415 p.
16. Ohlsson C., Bengtsson B., Isaksson Olle G. Growth Hormone and Bone // Endocrine Reviews. – 1998. – 19, № 1. – P. 55–79.
17. Ostrowska Z., Kos-Kudla B., Nowak M. et al. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats // Endocrin. Regul. – 2003. – 37, № 4. – P. 163–174.
18. Ostrowska Z., Wolkowska-Pokrywa K., Kos-Kudla B. et al. Melatonin and bone status // Pol. Merkur. Lekarski. – 2006. – 21, № 124. – P. 389–93.

*In-t фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ  
E-mail: litir@biph.kiev.ua*



Н.О. Утко, І.М. Пішель, В.В. Безруков, Х.К. Мурадян

## Швидкість газообміну, терморегуляція та активність антиоксидантних ферментів при старінні мишей лінії C57Bl/6

*На 62 молодих (3–5 міс) і 58 старих (23–26 міс) самцях мишей лінії C57Bl/6 изучены тип распределений и коррелятивные взаимоотношения комплекса показателей, характеризующих функциональное состояние систем газообмена, терморегуляции и антиоксидантной защиты. Показано, что коэффициент вариации существенно отличается для разных показателей, но мало изменяется с возрастом. При старении наблюдается снижение средних значений скорости газообмена ( $V_{O_2}$  и  $V_{CO_2}$ ), температуры тела и коэффициента теплопроводности, что, однако, не сопровождается снижением активности антиоксидантных ферментов печени. Более того, активность каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, которые непосредственно участвуют в регуляции содержания перекиси водорода, возрастает в старости. Коэффициенты корреляции  $V_{O_2}$  и  $V_{CO_2}$ ,  $V_{O_2}$  и температуры тела или  $V_{O_2}$  и pH, а также корреляции активности антиоксидантных ферментов мало изменяются при старении. Однако анализ с помощью трехмерных нелинейных моделей нередко указывает на существенные возрастные изменения взаимоотношений изученных переменных.*

### ВСТУП

Протягом еволюційного розвитку різні види тварин виробили захисні механізми, що дають змогу витримувати широкий діапазон коливань швидкості споживання кисню ( $V_{O_2}$ ), температури тіла та продукції активних форм кисню. Так, при максимальних фізичних навантаженнях  $V_{O_2}$  може збільшуватися на порядок та більше, у той час як деякі види амфібій, риб, черепах, морських і наземних ссавців здатні переносити тривалі періоди істотного зниження температури тіла, споживання кисню та навіть аноксії [11]. Такий широкий діапазон адаптивних можливостей, мабуть, забезпечується завдяки строго координованим змінам метаболізму, теплопродукції та антиоксидантного захисту. Погодженість роботи цих систем, безсумнівно, важлива для всіх видів і на всіх етапах клітинного циклу та може лежати в основі довголіття [4, 9]. Однак дослідження,

присвячені вивченню взаємозв'язків газообміну, температуру тіла й антиоксидантного захисту нечисленні не тільки у віковому, але й загальнобіологічному плані. Практично невивченим залишається популяційний аспект цієї проблеми. Тим часом відомо, що існують значні індивідуальні коливання зазначених показників, з'ясування діапазону мінливості яких може дати багато для розуміння принципів регуляції й стабільності цих систем.

Мета нашої роботи – вивчити особливості розподілів і корелятивних зв'язків між комплексом фізіологічних і біохімічних показників, які характеризують рівень метаболізму, терморегуляцію й антиоксидантний захист у популяціях молодих і старих лабораторних мишей.

### МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 62 молодих (3–5 міс) і 58 старих (23–26 міс) інтактних

© Н.О. Утко, І.М. Пішель, В.В. Безруков, Х.К. Мурадян

самцях мишей лінії C57Bl/6, яких утримували у віварії Інституту геронтології АМН України в окремому блоці та на спеціальних раціонах, передбачених для лінійних мишей. У всіх тварин проводили вимір  $Vo_2$  і  $Vco_2$  за допомогою газоаналізатора (Нідерланди). Температуру тіла вимірювали за допомогою спеціально сконструйованого електричного термометра з напівпровідниковим датчиком, вмонтованим у гнучку тонку (до 1 мм) трубку. Коефіцієнт теплопровідності обчислювали згідно з описаною методикою [6]. Тварин наркотизували за допомогою 100 %  $CO_2$  [8], печінку гомогенізували у фосфатному буфері з 0,1 N ЕДТА (рН 7,6) і центрифугували при 10 000 g протягом 20 хв. Частину печінки гомогенізували в дистильованій воді (1:10) для визначення рН за допомогою рН-метра фірми "Oakton" (США). Активність ферментів визначали за загальновідомими спектрофотометричними методами: супероксиддисмутази (СОД, ЄС 1.15.1.1) – [12]; каталази (ЄС 1.11.1.6) – [5]; глутатіонпероксидази (ГП, ЄС 1.11.1.9) – [14]; глутатіонредуктази (ГР, ЄС 1.6.4.2) – [15]; глутатіонтрансферази (ГТ, ЄС 2.5.1.18) – [10] і ксантиоксидази (КО, ЄС 1.2.3.2) – [16]. Отримані результати обробляли за допомогою пакета програм "Statistica-6." Важливим було з'ясувати тип розподілів показників, що вивчали, і, зокрема, перевірити гіпотезу про їх нормальність. Як відомо, наявність нормального розподілу може свідчити про стохастичну природу факторів, що визначають рівень досліджуваного показника, а також обґрунтувати правомірність застосування параметричних методів статистичної обробки результатів [1].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведений аналіз за допомогою специфічних тестів нормальності Колмогорова–Смирнова, Лілліфорса,  $\chi^2$  і Шапіро–Уїлка

(результати не представлено), а також недостовірні коефіцієнти асиметрії й ексцесу (таблиця) не відхилили гіпотезу про нормальність розподілу більшості показників, що вивчали.

Виходячи з відомих міркувань про гетерохронність вікових порушень регуляторних систем [3], передбачалося, що популяція старих тварин повинна відрізнятися більшою індивідуальною варіабельністю досліджуваних показників. З іншого боку, особини з неприпустимо більшими відхиленнями тих або інших показників можуть бути об'єктом селективного вимірювання й, отже, не дожити до старості. Таким чином, при старінні варіабельність біологічних показників може збільшуватися або зменшуватися залежно від того, яка із зазначених тенденцій буде превалювати. Найбільш простим і зручним критерієм для оцінки такої альтернативи є коефіцієнт варіації, що обчислюється відношенням стандартного відхилення та середніх значень. У результаті виходить свого роду «нормована» за середнім значенням безрозмірна величина варіації, що дає змогу порівняти мінливість перемінних з різною розмірністю. У досліджуваному нами комплексі показників найбільш низькі значення коефіцієнта варіації були знайдені для рН, температури тіла і дихального коефіцієнта, а найвищі – для активності ГП, ГТ і каталази. Інші показники мали коефіцієнт варіації у межах 10–20 %, що характерно для більшості біологічних перемінних [1]. Порівняння варіабельності показників у молодих і старих мишей свідчить, що коефіцієнт варіації мало змінюється з віком. У досліджуваному нами комплексі єдиний випадок достовірного збільшення цього показника відповідає температурі тіла, а єдиний випадок зменшення – активності ГП (див. таблицю).

Слід зазначити, що через високу спонтанну рухову активність, виміряти базальний рівень обміну в більшості видів інтакт-

них тварин і, зокрема, у мишей практично неможливо. У цьому разі можна говорити лише про рівень обміну в стані спокою. Але й у цьому стані фізична активність окремих особин і особливо у тварин різного віку істотно розрізняється. Відомо, що фізична

активність при старінні зменшується [3]. Хоча в цій роботі ми не проводили кількісного виміру спонтанної рухової активності, а під час виміру неінвазивних показників фізична активність у молодих мишей була візуально вище, ніж у старих

**Середні значення (СВ) та коефіцієнти варіації (КВ), асиметрії (КА) і ексцесу, а також їхні стандартні помилки ( $\pm$ S.E.) для комплексу вивчених фізіологічних і біохімічних показників у молодих і старих мишей**

Показник, група тварин	СВ $\pm$ S.E.	КВ $\pm$ S.E.	КА $\pm$ S.E.	КЕ $\pm$ S.E.
<b>Швидкість споживання кисню, мл <math>\cdot</math> хв<sup>-1</sup> <math>\cdot</math> М<sup>-1</sup></b>				
молоді	80,4 $\pm$ 1,5	14,7 $\pm$ 1,4	0,22 $\pm$ 0,3	0,23 $\pm$ 0,6
старі	68,4 $\pm$ 1,7*	18,2 $\pm$ 1,8	0,25 $\pm$ 0,3	-0,67 $\pm$ 0,7
<b>Швидкість споживання вуглекислого газу, мл <math>\cdot</math> хв<sup>-1</sup> <math>\cdot</math> М<sup>-1</sup></b>				
молоді	68,6 $\pm$ 1,4	15,4 $\pm$ 1,5	0,19 $\pm$ 0,3	0,66 $\pm$ 0,6
старі	58,8 $\pm$ 1,5*	19,3 $\pm$ 1,9	0,52 $\pm$ 0,3	-0,23 $\pm$ 0,6
<b>Дихальний коефіцієнт</b>				
молоді	0,85 $\pm$ 0,01	4,1 $\pm$ 0,4	0,20 $\pm$ 0,31	-0,65 $\pm$ 0,61
старі	0,86 $\pm$ 0,01	3,3 $\pm$ 0,3	0,17 $\pm$ 0,32	0,16 $\pm$ 0,63
<b>Температура тіла, °С</b>				
молоді	37,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	-0,67 $\pm$ 0,31	-0,72 $\pm$ 0,61
старі	37,1 $\pm$ 0,1*	3,3 $\pm$ 0,3*	-0,32 $\pm$ 0,32	-0,63 $\pm$ 0,63
<b>Коефіцієнт теплопровідності, кДж <math>\cdot</math> г<sup>-1</sup> <math>\cdot</math> хв<sup>-1</sup> <math>\cdot</math> °С<sup>-1</sup></b>				
молоді	5,86 $\pm$ 0,10	13,7 $\pm$ 1,3	-0,11 $\pm$ 0,31	0,75 $\pm$ 0,61
старі	5,22 $\pm$ 0,11*	16,3 $\pm$ 1,6	0,28 $\pm$ 0,32	-0,34 $\pm$ 0,63
<b>РН печінки</b>				
молоді	6,67 $\pm$ 0,02	1,9 $\pm$ 0,2	-0,17 $\pm$ 0,38	-0,66 $\pm$ 0,74
старі	6,71 $\pm$ 0,02	1,6 $\pm$ 0,2	0,75 $\pm$ 0,38*	0,34 $\pm$ 0,74
<b>Супероксиддисмутаза, од <math>\cdot</math> хв<sup>-1</sup> <math>\cdot</math> МГ<sup>-1</sup></b>				
молоді	38,2 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,7	0,40 $\pm$ 0,3	0,19 $\pm$ 0,6
старі	37,2 $\pm$ 0,3	9,1 $\pm$ 0,9	-0,49 $\pm$ 0,3	1,84 $\pm$ 0,6*
<b>Каталаза, мкмоль <math>\cdot</math> хв<sup>-1</sup> <math>\cdot</math> МГ<sup>-1</sup></b>				
молоді	88,8 $\pm$ 2,2	19,3 $\pm$ 1,8	0,43 $\pm$ 0,3	0,30 $\pm$ 0,6
старі	97,3 $\pm$ 2,9*	22,5 $\pm$ 2,2	0,34 $\pm$ 0,3	-0,10 $\pm$ 0,6
<b>Глутатіонпероксидаза, мкмоль <math>\cdot</math> хв<sup>-1</sup> <math>\cdot</math> МГ<sup>-1</sup></b>				
молоді	22,4 $\pm$ 1,5	51,1 $\pm$ 5,7	0,92 $\pm$ 0,30	0,12 $\pm$ 0,6
старі	29,3 $\pm$ 1,3*	33,3 $\pm$ 3,4*	0,31 $\pm$ 0,3*	0,03 $\pm$ 0,6
<b>Глутатіонредуктаза, нмоль <math>\cdot</math> хв<sup>-1</sup> <math>\cdot</math> МГ<sup>-1</sup></b>				
молоді	35,7 $\pm$ 0,5	10,8 $\pm$ 1,0	-0,01 $\pm$ 0,3	-0,25 $\pm$ 0,6
старі	38,5 $\pm$ 0,5*	9,7 $\pm$ 0,9	-0,02 $\pm$ 0,3	0,67 $\pm$ 0,6
<b>Глутатіонтрансфераза, нмоль <math>\cdot</math> хв<sup>-1</sup> <math>\cdot</math> МГ<sup>-1</sup></b>				
молоді	507 $\pm$ 18	28,7 $\pm$ 2,8	0,57 $\pm$ 0,3	0,57 $\pm$ 0,6
старі	532 $\pm$ 21	29,5 $\pm$ 3,0	-0,47 $\pm$ 0,3	-0,02 $\pm$ 0,6
<b>Ксантиноксидаза, нмоль <math>\cdot</math> хв<sup>-1</sup> <math>\cdot</math> МГ<sup>-1</sup></b>				
молоді	13,2 $\pm$ 0,2	12,8 $\pm$ 1,2	0,98 $\pm$ 0,3	1,04 $\pm$ 0,6
старі	12,6 $\pm$ 0,3	14,9 $\pm$ 1,4	0,88 $\pm$ 0,3	1,33 $\pm$ 0,6

\*P<0,05 порівняно з молодими тваринами.

тварин. Як видно, саме ослабленням спонтанної рухової активності можна пояснити вікове зниження газообміну та коефіцієнта теплопровідності у старих тварин (див. таблицю).

Деякою мірою низька рухова активність може бути причиною також зниження температури тіла у старих мишей, хоча при цьому не можна недооцінювати вікове ослаблення термогенезу, зумовлене зниженням експресії та функції мітохондріальних білків-роз'єднувачів, зокрема UCP-1 та UCP-2 [7, 8, 13]. Слід зазначити, що старіння мишей супроводжується не лише зниженням середньої температури тіла, але й зміною типу розподілу. Якщо в популяції молодих мишей більша частина особин має температуру тіла у межах 38,0–38,5 °C, а мінімальна за популяцією температура тіла була вище ніж 36,5 °C, то в групі старих мишей з'являється досить значна за розміром субпопуляція (майже третина особин), температура тіла яких нижча від 36,5 °C (рис. 1).

При старінні середні значення  $Vo_2$  і  $Vco_2$  знижуються (див. таблицю). Однак жорстка пропорційність між цими показниками зберігається до старості, про що свідчать високі позитивні коефіцієнти кореляції  $Vo_2$  і  $Vco_2$  в обох вікових групах ( $r=0,95$ ;  $P<0,00000001$ ). Між  $Vo_2$  і температурою тіла також було виявлено позитивну кореля-

цію як у молодих ( $r=0,34$ ;  $P=0,01$ ), так і у старих мишей ( $r=0,56$ ;  $P=0,00001$ ). У цілому, ці результати збігаються з отриманими нами раніше даними у дослідях на самцях мишей лінії СВА [2].

Індивідуальними розбіжностями моторної активності, ймовірно, можна пояснити також негативну кореляцію між  $Vo_2$  і рН печінки у молодих ( $r= - 0,33$ ;  $P<0,05$ ) і старих мишей ( $r= - 0,34$ ;  $P<0,05$ ). Як відомо, підвищення моторної активності призводить до накопичення проміжних продуктів окиснення кислої природи з наступним зниженням рН організму [3, 9].

Багатомірні моделі мають більшу "чутливість" і дають змогу виявити закономірності, які неможливо побачити за допомогою більш простих, наприклад двомірних, методів. Тривимірний нелінійний аналіз залежності коефіцієнта теплопровідності від температури тіла і  $Vo_2$  показав, що у молодих мишей спостерігається мінімальне значення коефіцієнта теплопровідності при температурі тіла і  $Vo_2$ , які близькі до середніх. В обидва боки від таких, очевидно, оптимальних значень температури тіла і  $Vo_2$  коефіцієнт теплопровідності підвищується. У старих мишей такого мінімального значення коефіцієнта теплопровідності не виявлено (рис. 2).

На тлі зниження газообміну, активність антиоксидантних ферментів печінки старих

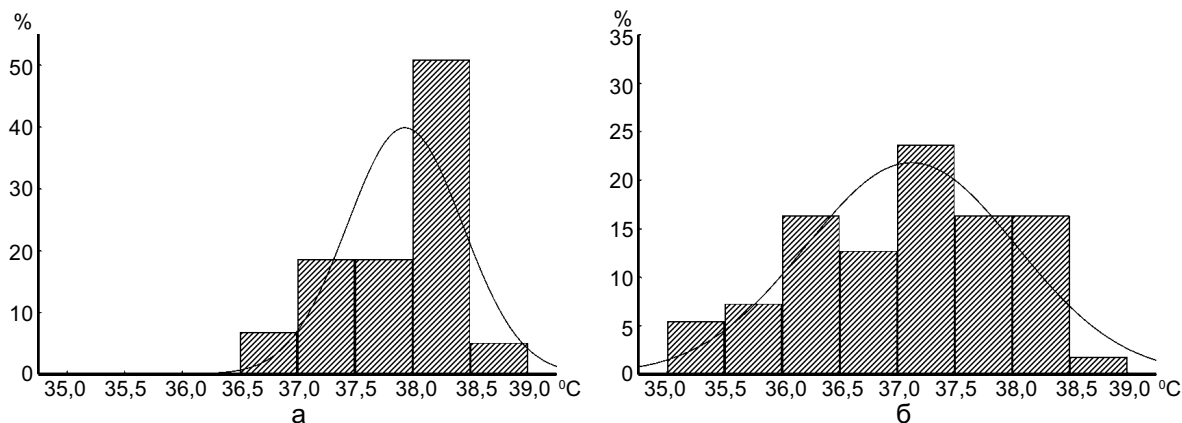


Рис. 1. Частота (%) і лінії нормального розподілу температури тіла (°C) молодих (а) і старих (б) самців мишей лінії C57Bl/6

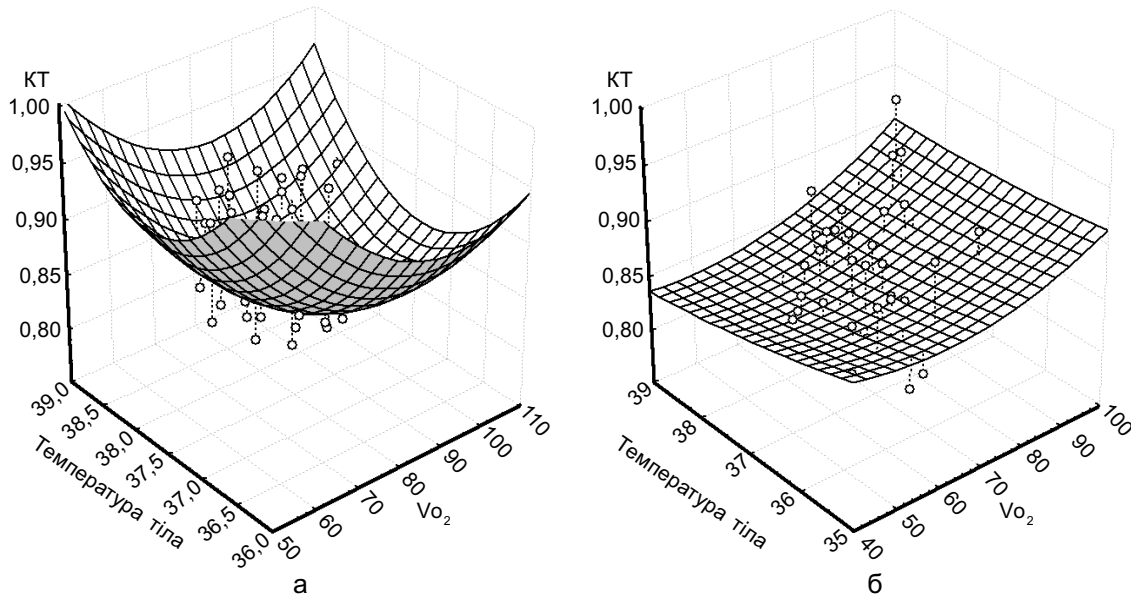


Рис. 2. Тривимірна залежність коефіцієнта теплопровідності (КТ, кДж·г<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>·°С<sup>-1</sup>) від температури тіла (°С) і швидкості споживання кисню (Vo<sub>2</sub>, л·кг<sup>-1</sup>·хв<sup>-1</sup>) у молодих (а) і старих (б) самців мишей лінії С57В1/6

мишей зберігається на стабільному рівні або навіть підвищується (див. таблицю). Слід зазначити, що посилюється активність тільки каталази, ГП і ГР, тобто трьох ферментів, які безпосередньо беруть участь у регуляції вмісту перекису водню. Підвищення активності цих ферментів може бути наслідком необхідності знизити вміст перекису або бути адаптивною відповіддю на можливе підвищення утворення та витоку активних форм кисню із мітохондрій старих клітин [7, 8, 11].

Для ефективного функціонування анти-оксидантного захисту, мабуть, важливі не лише середні значення активності ферментів, але й погодженість їх змін, що можна оцінити, наприклад за допомогою корелятивного аналізу. При такому аналізі слід відмітити, що між активністю каталази та ГП існує негативна корелятивна залежність в обох вікових групах, що, ймовірно, є відбиттям існування реципрокних взаємин цих двох, по суті «паралельних» каналів утилізації перекису водню (рис. 3).

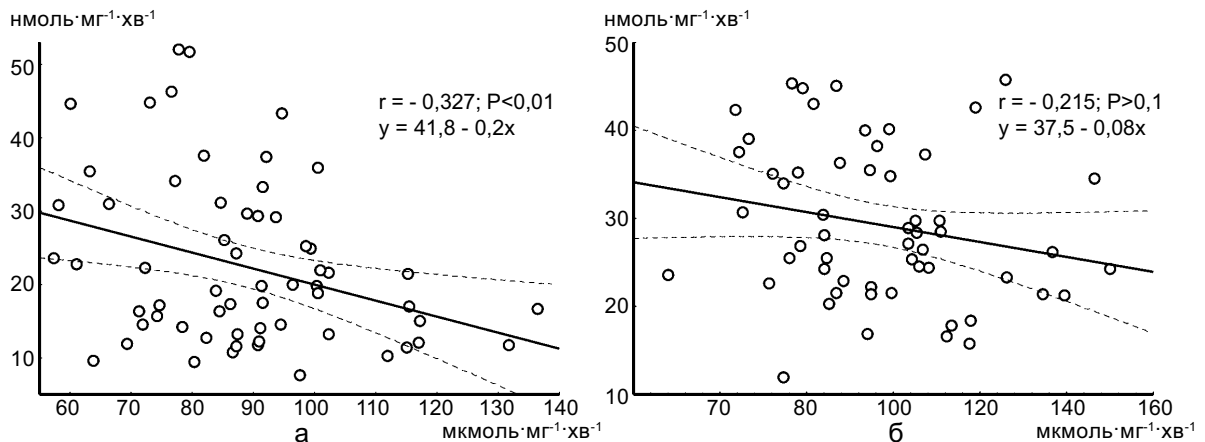


Рис. 3. Діаграми розсіювання, лінії регресії та коефіцієнти кореляції (r) між активністю каталази (вісь абсцис) та глутатіонпероксидази (вісь ординат) печінки молодих (а) і старих (б) самців мишей лінії С57В1/6

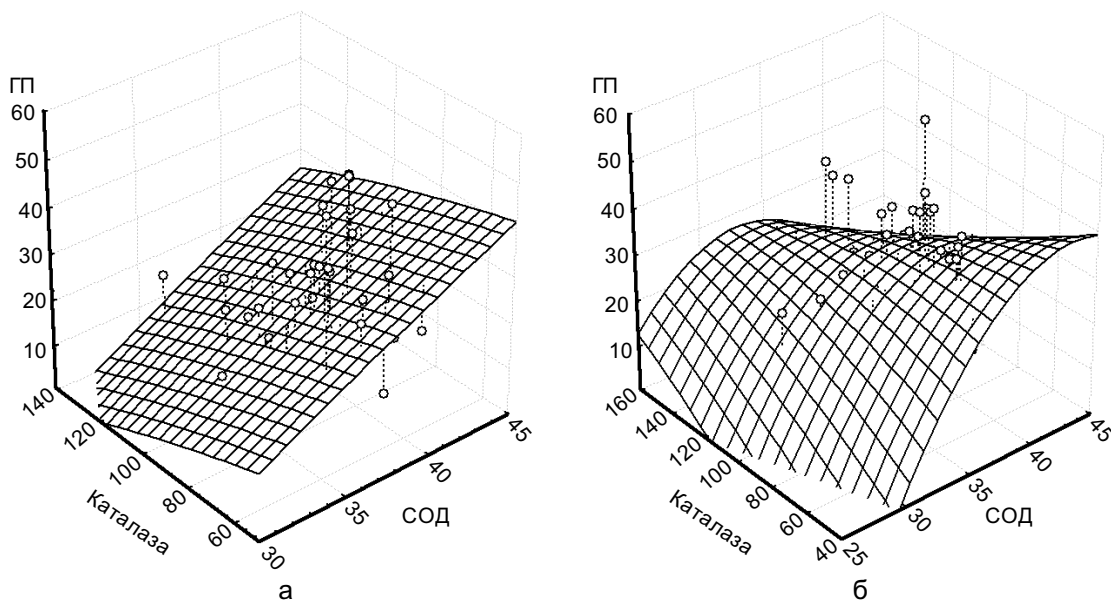


Рис. 4. Тривимірний залежності активності супероксиддисмутази (СОД, од. · хв<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>) від каталази (мкмоль · хв<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>) і глутатіонпероксидази (ГП, нмоль · хв<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>) печінки молодих (а) і старих (б) самців мишей лінії С57В1/6

Тривимірний квадратичний аналіз залежності між активністю трьох ключових ферментів антиоксидантного захисту – СОД, каталази та ГП печінки мишей різного віку показав, що в молодих мишей залежність ГП від СОД і каталази описується майже плоскою поверхнею, з якої видно, що активність ГП позитивно корелює з СОД ( $r=0,31$ ;  $P<0,05$ ), але негативно з каталазою. У старих тварин залежність між цими ферментами антиоксидантного захисту складніша й погано вкладається в рамки використаної множинної регресії (рис. 4).

Таким чином, при старінні самців мишей лінії С57В1/6 на тлі відносно стабільного коефіцієнта варіації спостерігається зниження показників, що характеризують швидкість газообміну ( $V_{O_2}$  і  $V_{CO_2}$ ) і терморегуляцію організму (температура тіла та коефіцієнт теплопровідності). Однак ослаблення інтенсивності окисних процесів і терморегуляції не супроводжується зниженням активності ключових антиоксидантних ферментів печінки. Більше того, активність каталази, ГП і ГР підвищується у старості.

N.A. Utko, I.N. Pishel, V.V. Bezrukov, Kh.K. Muradian

#### THE GASEOUS EXCHANGE, THERMOREGULATION AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN AGING C57BL/6 MICE

The distribution type and correlative links between physiological and biochemical indices characterizing functional condition of the systems of gaseous exchange ( $V_{O_2}$  and  $V_{CO_2}$ ), thermoregulation (body temperature and coefficient of thermoconductivity) and antioxidant defense have been studied in 62 young (3-5 mo.) and 58 old (23-26 mo.) male C57Bl/6 mice. The coefficients of variation differed significantly depending on the variable but not the age-group. Mean values of  $V_{O_2}$  and  $V_{CO_2}$ , body temperature and thermoconductivity, but not activities of the antioxidant enzymes, declined in aging. Moreover, the activities of catalase, glutathione-peroxidase and glutathionereductase, i.e. enzymes involved in regulation of hydrogen peroxide level, increased in aging. The correlations between  $V_{O_2}$  and  $V_{CO_2}$ ,  $V_{O_2}$  and body temperature or  $V_{O_2}$  and the liver pH, as well as between the antioxidant enzyme activities exhibited little age-changes. However, three-dimensional non-linear models revealed significant age-changes in relations between the studied variables.

*Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Боровиков В. STATISTICA. Искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. – СПб:

- Питер, 2003. – 688 с
2. Мурадян Х.К., Утко Н.А., Мозжухіна Т.Г. та ін. Кореляційна залежність між газообміном, температурою тіла та вмістом мітохондріального білка печінки мишей // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, № 4. – С. 14–18.
  3. Фролькіс В.В. Регулирование, приспособление и старение. – Л.: Наука, 1970. – 432 с.
  4. Фролькіс В.В., Мурадян Х.К. Старение, эволюция и продление жизни. – К.: Наук. думка, 1992. – 238 с.
  5. Aebi H. Catalase in vitro // Meth. Enzymol. – 1984. – **105**. – P. 121–126.
  6. Balmagiya T., Rozovsky S.J. Age-related changes in thermoregulation in male albino rats // Exp. Gerontol. – 1983. – **18**, №3. – P.199–210.
  7. Brand M.D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing // Exp. Gerontol. – 2000. – **35**, № 6–7. – P. 811–820.
  8. Brand M.D., Esteves T.C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3 // Cell Metab. – 2005. – **2**, № 2. – P. 85–93.
  9. Frolkis V.V., Muradian Kh.K. Life span prolongation // Boca Raton: CRC Press, 1991. – 425 p.
  10. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W. Glutathione S-transferases // J. Biol. Chem. – 1974. – **249**, № 22. – P. 7130–7139.
  11. Hermes-Lima M., Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress // Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. – 2002. – **133**, №4. – P. 537–556.
  12. McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) // J. Biol. Chem. – 1969. – **244**, № 22. – P. 6049–6055.
  13. Nubel T., Ricquier D. Respiration under control of uncoupling proteins: Clinical perspective // Horm. Res. – 2006. – **65**, № 6. – P. 300–310.
  14. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // J. Clin. Med. – 1967. – **70**. – P. 158–169.
  15. Roos D., Weening R.S., Voetman A.A. et al. Protection of phagocytic leukocytes by endogenous glutathione: Studies in family with glutathione reductase deficiency // Blood. – 1979. – **53**. – P.851–866.
  16. Waud W.R., Rajagopalan K.V. Purification and properties of the NAD<sup>+</sup>-dependent (type D) and O<sup>-</sup>-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase // Arch. Biochem. and Biophys. – 1976. – **172**, № 2. – P. 354–364.

*Ин-т геронтології АМН України*  
*E-mail: kkt@geront.kiev.ua*

О.М. Левашов, В.А. Березовский, М.И. Левашов, С.Л. Сафонов

## Потенциал нагрузки бедренной кости крысы при дозированных механических воздействиях

*Досліджували потенціал навантаження (ПН) вологої стегнової кістки 24 білих щурів-самців лінії Вістар, що знаходилися в умовах нормо- та гіпокінезії. Механічне навантаження на кістку, яке становило 30, 50 і 100 % від маси тіла тварини, здійснювали в аксіальному напрямку. Тривалість перебування щурів в умовах жорсткої гіпокінезії обмеженого простору – 28 діб. У дослідженнях використовували електроди Ag-AgCl з сольовим містком з 0,9%-м розчином NaCl у 2%-му агарі [3]. Встановлено, що амплітуда електричного потенціалу, котра виникає у кістці при механічному навантаженні, залежить від величини цього навантаження. Однак існує визначений оптимум механічного навантаження, що забезпечує максимальний приріст ПН. Цей оптимум знаходиться в діапазоні навантажень фізіологічного рівня ( до 50 % від маси тіла щура). При розвитку гіпокінетичної остеопенії ПН зменшується також найбільш суттєво у діапазоні навантажень фізіологічного рівня. Це може бути однією з причин низької ефективності фізичних навантажень при розвитку вікової остеопенії та уповільненого відновлення кісткової тканини у періоді післядії гіпокінезії.*

### ВВЕДЕНИЕ

Деформации и напряжения кости при воздействии функциональных нагрузок, приводят к возникновению в ней электрических потенциалов нагрузки (ПН). Такие потенциалы возникают как при статических, так и при динамических нагрузках и могут быть зафиксированы на поверхности кости как *in vivo*, так и *in vitro* [2, 13–15, 21]. При этом на вогнутой поверхности кости (поверхность, которая подвергается сжатию) всегда регистрируется отрицательный потенциал, а на ее выпуклой поверхности (поверхность, которая подвергается растяжению) – положительный. Установлено, что ПН определяется свойствами как твердой (неорганический и органический матрикс), так и жидкой фазы кости (кровь, находящаяся в сосудах, тканевая жидкость системы гаверсовых и фолькмановских каналов, каналикул и остеоцитарных лакун).

Происхождение ПН связывают с пьезо-электрическими и электрокинетическими явлениями, возникающими в кости при нагрузках [9, 10, 16]. ПН отводится важная роль в регуляции физиологической перестройки и репаративной регенерации костной ткани, хотя однозначного ответа на вопрос об условиях возникновения, механизмах передачи и восприятия электрических сигналов остеогенными клетками до настоящего времени нет. Показано, что между величиной ПН и степенью деформации кости существует прямая корреляционная зависимость. Максимальная амплитуда ПН на единицу нагрузки уменьшается при снижении градиента деформации [4]. Однако исследования последних лет свидетельствуют о том, что связь между электрическим потенциалом и нагрузкой не такая простая, как представлялось ранее [1]. Полагают, что не только интенсивность, но и характер нагрузки влияют на процессы генерации ПН [6].

© О.М. Левашов, В.А. Березовский, М.И. Левашов, С.Л. Сафонов



Целью нашей работы было исследование закономерностей возникновения потенциала нагрузки во влажной свежeweделенной бедренной кости крыс при различных режимах механических воздействий.

## МЕТОДИКА

Исследования проведены на 24 лабораторных крысах-самцах линии Вистар трехмесячного возраста. Контрольные крысы (n=12) находились в обычных условиях вивария без ограничения подвижности, опытная группа (n=12) – в условиях жесткой 28-суточной гипокинезии. Объектом исследований служили свежeweделенные бедренные кости крыс (n=48).

Для определения ПН использовали установку, состоящую из электронного блока на основе трехкаскадного усилителя электрических сигналов, таймера, устройства для фиксации и увлажнения кости, электродов Ag-AgCl с солевым мостиком из 0,9%-го раствора NaCl в 2%-м агаре и регистратора [3]. Измерения проводили при максимальном разрешении 10 мкВ и базовой погрешности 0,05 %. Электроды располагали в центре диафиза бедренной кости. При этом электрод, расположенный на вогнутой стороне кости, подключали к инвертирующему входу, а электрод противоположной стороны – к неинвертирующему входу усилителя. Для поддержания кости во влажном состоянии использовали систему увлажнения 0,9%-м раствором NaCl с рН 7,2. Исследования проводили при 20–22°C.

Механическую нагрузку на кость осуществляли в аксиальном направлении. Величину нагрузки рассчитывали исходя из условий физиологического распределения весовой нагрузки между передними и задними конечностями крысы, согласно которым 40 % весовой нагрузки приходится на передние конечности, а 60 % – на задние [5]. Таким образом, у крысы в условиях

покоя при опоре на все четыре конечности, на каждую переднюю конечность приходится нагрузка, равная 20 %, а на каждую заднюю – 30 % от массы тела. Все исследования проводили при трех степенях нагрузок: 30 % (I степень), 50 % (II степень) и 100 % (III степень) от массы тела животного. Нагрузка I степени соответствовала весовой нагрузке на задние конечности животного в состоянии покоя. Нагрузка II степени была применена исходя из того, что в определенных условиях крыса может принимать вертикальную позу с опором только на задние конечности. Учитывая то, что в экстремальных ситуациях крыса может совершать прыжки, при которых нагрузка на конечности может возрастать многократно, были проведены исследования при нагрузке, равной 100 % от массы тела (III степень).

Перед началом эксперимента определяли массу тела крысы и рассчитывали величину нагрузки в грам-силе, соответствующую 30, 50 и 100 % от установленной массы. После выведения животного из эксперимента, бедренную кость скелетировали, закрепляли в установке для измерения ПН в вертикальном положении и подключали систему увлажнения. К центру диафиза бедренной кости с медиальной и латеральной стороны подводили электроды. Для обеспечения надежного контакта с поверхностью кости использовали солевой агаровый мостик.

Ступенчатую нагрузку на кость осуществляли путем помещения, а затем удаления с верхней площадки системы крепления головки бедренной кости, груза заданной величины. Исследования повторяли не менее трех раз. Запись ПН проводили на двухкоординатном самописце XY Recorder (Прага). Зависимость электрического потенциала от механической нагрузки на кость оценивали по величине ПН, приходящейся на единицу нагрузки (у микровольтах на 1гс).

Полученные результаты обрабатывали методом статистического анализа с использованием критерия *t* Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При приложении механической нагрузки, равной 50% от массы тела, на поверхности бедренной кости контрольных животных регистрировались характерные двухфазные колебания электрического потенциала, амплитуда которых достигала 1200-1500 мкВ при длительности – 0,4–0,6 с (рис. 1).

Первая фаза ПН имела позитивное начальное отклонение и возникала в ответ на приложение механической нагрузки. Вторая фаза возникала при снятии нагрузки. Ее начальное отклонение имело обратную направленность, а амплитуда была равна или близка к амплитуде первой фазы. Расчетные величины абсолютного прироста потенциала на единицу нагрузки составляли от 1 до 3 мкВ.

Нами была исследована зависимость амплитуды ПН бедренной кости крысы от приложенной механической нагрузки. Установлено, что при увеличении нагрузки от 30 до 100 % от массы тела крысы амплитуда ПН возрастала в экспоненциальной зависимости (рис. 2). Максимальный прирост ПН отмечался уже при нагрузке I степени. При нагрузке II степени ПН продолжал увеличиваться, но меньшими темпами, а при нагрузке III степени его прирост был минимальный.

Если принять амплитуду ПН, которая достигалась при нагрузке III степени за 1,0 (нормализованное значение максимальной амплитуды), то амплитуда ПН при нагрузке I степени составляла 0,45, а при нагрузке II степени – 0,75. Дальнейшее двукратное увеличение нагрузки (с 50 до 100 %) обеспечивало дополнительный рост амплитуды ПН только на 0,25.

Статистический анализ показал, что средние значения амплитуды ПН при нагрузках II и III степени были больше, чем при нагрузках I степени на 53,1 и 113,6 % соответственно,  $P < 0,05$  (рис. 3). Однако значения потенциала, приходящиеся на единицу нагрузки III степени, были на 21,5 и 26,7 % меньше соответственно нагрузок I и II степени (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что амплитуда электрического потенциала, который возникал в кости при механической нагрузке, находилась в прямой зависимости от величины (степени) этой нагрузки. Однако существовал определенный оптимум механической нагрузки, обеспечивавший максимальный прирост ПН. Этот оптимум находился в диапазоне нагрузок физиологического уровня (30, 50 % от массы тела крысы). Прирост амплитуды ПН при значительных механических нагрузках (100 % массы тела) достигался за счет снижения их эффективности, что выражалось в уменьшении прироста величины электрического потенциала на единицу нагрузки.

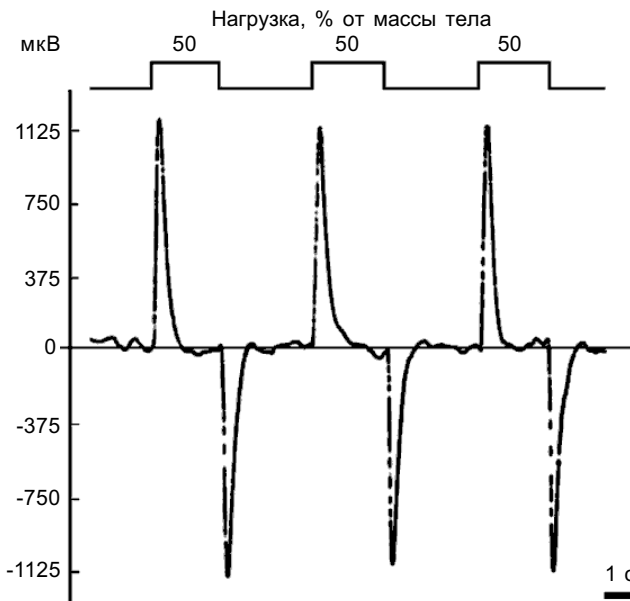


Рис. 1. Пример регистрации типичных потенциалов нагрузки бедренной кости взрослых крыс

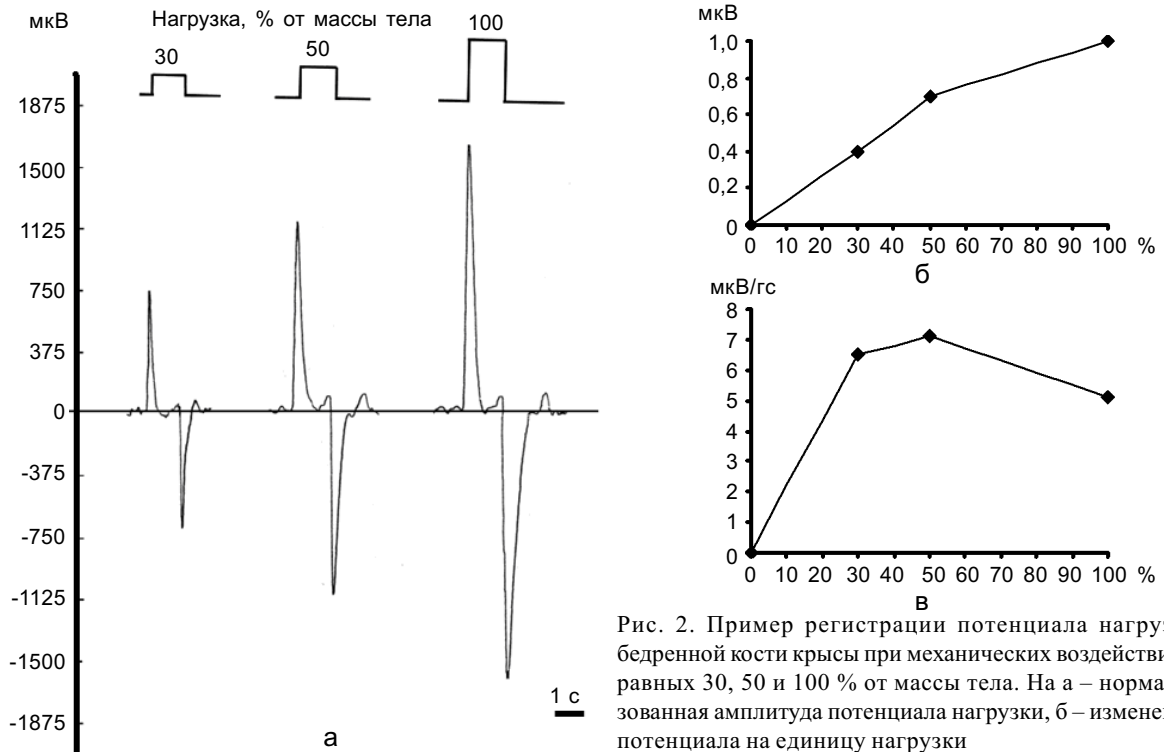


Рис. 2. Пример регистрации потенциала нагрузки бедренной кости крысы при механических воздействиях, равных 30, 50 и 100 % от массы тела. На а – нормализованная амплитуда потенциала нагрузки, б – изменение потенциала на единицу нагрузки

В физиологических условиях кость подвергается функциональным нагрузкам различного характера, интенсивности и продолжительности, что позволяет поддерживать необходимый уровень биоэлектрической регуляции физиологической перестройки костной ткани. В условиях же длительной гипокинезии, вследствие отсутствия механической нагрузки на опорно-

двигательный аппарат, биоэлектрические механизмы регуляции физиологической перестройки костной ткани не могут быть реализованы в полной мере. Однако сведения о том, как функционируют эти механизмы в периоде последствий гипокинезии и восстановления физиологического уровня функциональной нагрузки отсутствуют. Ответ на данный вопрос

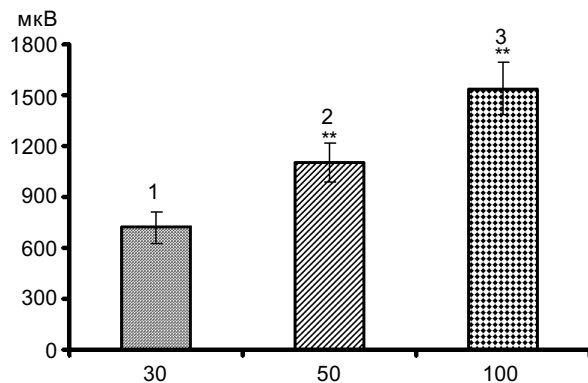


Рис. 3. Амплитуда потенциала бедренной кости крысы при различных нагрузках: 1 – 30 %, 2 – 50 %, 3 – 100 %

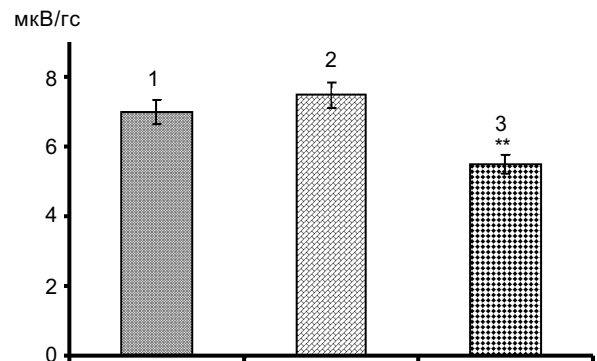


Рис. 4. Прирост потенциала бедренной кости крысы в расчете на 1 г различной нагрузки: 1 – 30 %, 2 – 50 %, 3 – 100 %

представляется чрезвычайно важным для понимания причин замедленного восстановления костной ткани после продолжительной гипокинезии и микрогравитации.

Сравнительный анализ кривых (рис. 5) позволяет говорить о том, что ПН бедренных костей крыс, находившихся в условиях продолжительной гипокинезии, имели меньшую амплитуду, чем у контрольных животных. В представленном примере амплитуда ПН при нагрузках I, II и III степени после гипокинезии составляла лишь 63, 65 и 77 % соответствующего показателя контрольных животных.

Различия значений ПН между контрольными и опытными крысами были наиболее выражены при нагрузках I и II степени. Общая закономерность увеличения амплитуды ПН при возрастании степени нагрузки на бедренную кость, была характерна как для контрольных, так и для опытных животных. Однако у крыс, которые подвергались воздействию гипокинезии, темпы

прироста амплитуды ПН были всегда меньше. Электрический потенциал, приходящий на единицу нагрузки I, II и III степени у животных опытной группы был на 20–25 % меньше, чем у контрольных (рис. 5).

На рис. 6 и рис. 7 представлены средние значения амплитуд ПН и величин электрического потенциала, приходящихся на единицу нагрузки, полученные при исследовании бедренных костей животных контрольной и опытной групп.

Средняя амплитуда ПН у контрольных крыс составила  $720,0 \pm 89,5$ ,  $1102,6 \pm 10,8$  и  $1537,6 \text{ мкВ} \pm 189,6 \text{ мкВ}$ , а у опытных –  $456,8 \pm 54,5$ ,  $812,8 \pm 83,6$  и  $1287,7 \text{ мкВ} \pm 173,1 \text{ мкВ}$  соответственно при нагрузках I, II и III степени. Статистический анализ показал, что при нагрузках I и II степени различия в амплитуде ПН между животными контрольной и опытной групп были достоверными ( $P < 0,05$ ). Средние значения электрического потенциала, приходящихся

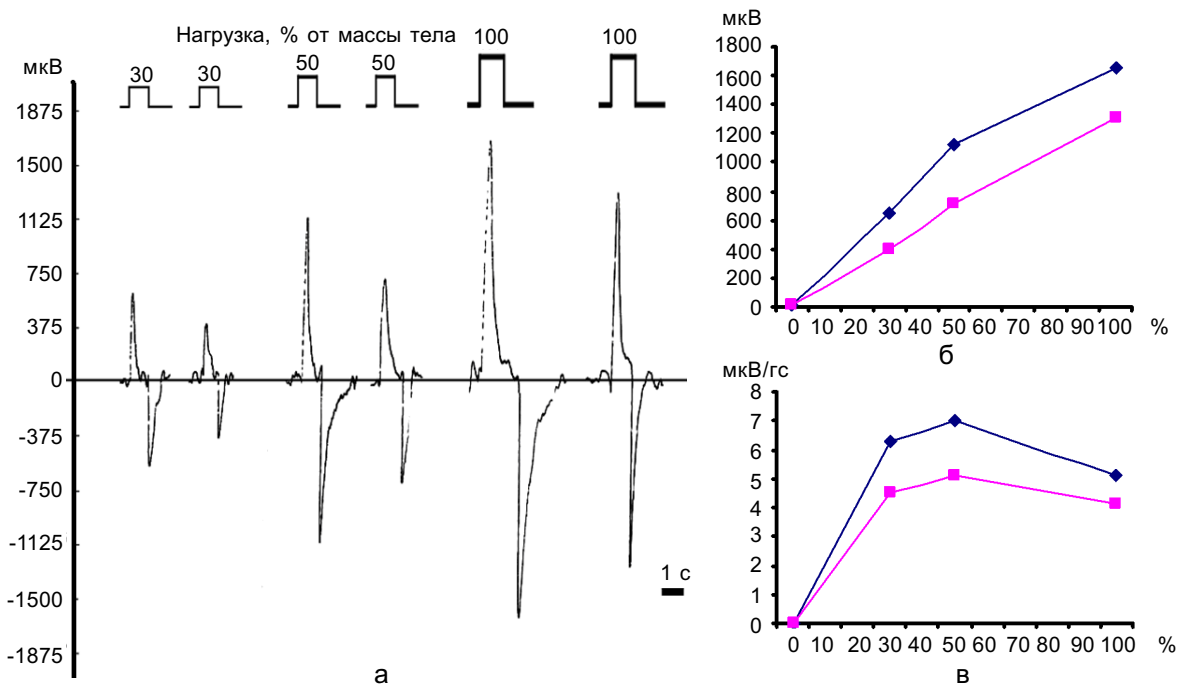


Рис. 5. Пример регистрации (а) потенциалов нагрузки бедренной кости крыс в контроле и после 28-суточной гипокинезии при механических воздействиях, соответствующих 30, 50 и 100 % от массы тела. На б – нормализованная амплитуда потенциала нагрузки, в – изменение потенциала на единицу нагрузки

на единицу нагрузки, у опытных животных при нагрузках I – II степени были на 36,7–35,5 % ( $P < 0,05$ ) меньше, чем у контрольных. При нагрузках III степени достоверных различий в амплитуде ПН и значений потенциала, приходящейся на единицу нагрузки, между контрольными и опытными животными установлено не было.

Уже первые исследования биоэлектрических потенциалов, возникающих в кости при механической нагрузке, показали, что их характер значительно варьирует в зависимости от частоты, величины и длительности деформирующего воздействия. Однако каких-либо четких закономерностей установлено не было. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что амплитуда ПН бедренной кости крысы в значительной степени определяется величиной этой нагрузки. Однако существует определенный оптимум нагрузки, обеспечивающий максимальный прирост величины ПН. Он соответствует уровню стереотипных функциональных нагрузок (30–50 % от массы тела).

Электрические потенциалы, возникающие в кости при функциональной нагрузке, рассматриваются в качестве одного из важнейших мессенжеров, обеспечивающих ее связь с процессами физиологической перестройки кости [2, 14]. В настоящее время большинство исследователей разде-

ляет мнение о том, что в механизме генерации ПН в сухой кости доминирующую роль играют пьезоэлектрические явления, а во влажной – электрокинетические (потенциал протекания – ПП) [9, 17–19]. ПП представляет собой разность потенциалов, возникающую в неоднородной системе при движении ее фаз относительно друг друга под действие каких-либо сил. В костной ткани ПП возникает вследствие переориентации диполей диффузионного слоя жидкости относительно двойного электрического слоя стенки костных полостей под действием разности гидростатического давления, связанной с изменением механической нагрузки [11]. Подтверждением электрокинетической природы ПН служит его зависимость от электропроводности, вязкости, а также состава жидкости, находящейся в кости [19, 22]. Важную роль в возникновении электрокинетических явлений в кости отводят органической составляющей костного матрикса, в первую очередь – коллагену [8]. В пользу этого говорит тот факт, что ПН обнаруживаются не только в костях, но в сухожилиях и хрящах [9], а дегенерация протеогликанов и коллагеновых фибрилл внеклеточного матрикса кости приводит к изменению ПН [7, 10]. Тесная связь электрокинетических явлений с процессами поляризации и электропроводности

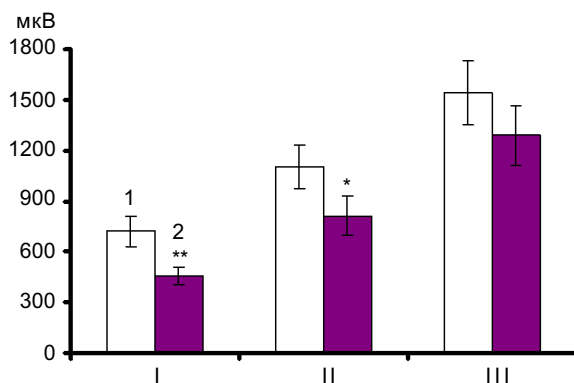


Рис. 6. Амплитуда потенциала бедренной кости крысы в контроле (1) и после гипокинезии (2) при различных нагрузках: I – 30 %, II – 50 %, III – 100 %

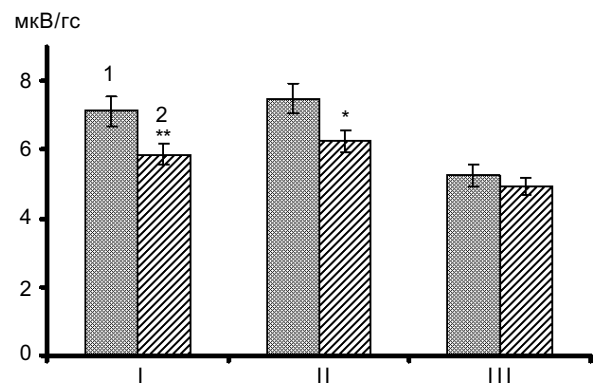


Рис. 7. Величина прироста потенциала бедренной кости крысы в расчете на 1 г различной нагрузки в контроле (1) и после гипокинезии (2): I – 30 %, II – 50 %, III – 100 %

биологических систем является важным биофизическим обоснованием зависимости ПН от пассивных электрических свойств кости [7, 10, 19].

Как было отмечено выше, ПН отводят значительную роль в физиологии и патологии костной ткани. Считают, что он отражает не только особенности движения жидкости в лакуно-каналикулярной системе, но участвует в поддержании гомеостаза и контроле ионного обмена между различными отделами кости [23]. Полагают, что ПН является важнейшим источником информации для костных клеток о состоянии и структуре костного матрикса и изменений биомеханической нагрузки на кость [12, 13]. Существующие данные литературы свидетельствуют о том, что биоэлектрические механизмы участвуют не только в процессах физиологической перестройки, но и репаративной регенерации кости [4, 8].

Поскольку электрокинетические явления, тесно связаны с процессами поляризации и электропроводности кости, несомненный интерес представляет комплексное исследование патофизиологических и биофизических закономерностей изменений потенциала нагрузки и пассивных электрических свойств кости в различных статокINETических условиях.

## ВЫВОДЫ

1. Электрический потенциал, возникающий на поверхности бедренной кости крысы при механических воздействиях, возрастает в экспоненциальной зависимости от прилагаемого усилия. Наибольший прирост электрического потенциала на единицу нагрузки обеспечивают воздействия, соответствующие уровню стереотипных функциональных нагрузок.

2. Развитие гипокINETической остеопении в условиях жесткого ограничения подвижности крысы сопровождается уменьшением электрического потенциала при

всех режимах механической нагрузки на кость.

3. Снижение уровня биоэлектрической регуляции физиологической перестройки кости вследствие уменьшения потенциала нагрузки, может быть одной из причин низкой эффективности стандартных физических нагрузок при развитии возрастной остеопении и замедленного восстановления костной ткани в периоде последствий гипокINETИИ.

**O.M.Levashov, B.A.Berezovskii, M.I.Levashov, S.L.Saphonov**

## THE STRESS GENERATED POTENTIAL IN RATS' FEMUR AT THE DIFFERENT MODES OF MECHANICAL LOADING

It was studied the stress generated potential (SGP) of moist femur bones of 24 Vistar rats-males in normo- and hypokinesia conditions. The mechanical loading on bone was evened 30-50 and 100% from animal body mass. The mechanical pressure was carried out in axial direction. The rats stay in hard hypokinesia for 28 days. In all experiments Ag-AgCl with a salt bridge from 0,9% NaCl in 2% agar were utilized (Cochran G.V. et al., 1989). It was set that amplitude of electric potential which arises up in bones at the mechanical loading depends on the level of this loading. However there is a certain optimum of the mechanical loading which provides the maximal increase of SGP. This optimum is in the range of physiology level of loadings. At development of hypokinetic osteopenia SGP diminished most substantially in the range of physiology level loadings also. It may be one of reasons of low efficiency of the physical loadings at development age-old osteopenia and slow renewal of bone tissue after hypokinesia.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beck D.R., Qin Y.X., NeLeod K.J., Otter M.W. On relationship between streaming potential and strain in an in vivo bone preparation//*Calcif. Tissue Int.* –2002. – **71**(4). – P.335–343.
2. Chilberg P.D., Sale D.G., Webber C.E. Exercise and bone mineral density//*Sports Med.* – 1995. – **19**(2). – P.103–122.
3. Cochran G.V.B., Dell D.G., Palmiery V.R. et al. An improved desing of ektrodes for measurement of streaming potentials on wet bone in vitro and in vivo//*J. Biomechanics.* – 1989. – **22**(6/7). – P.745–750.
4. Cochran G.V., Wu D.D., Lee B.Y. et al. Streaming po-

- tentials in gap osteotomy callus and adjacent cortex. A pilot study//Clin. Orthop. Relat. Res. – 1997. – **337**. – P.291–301.
5. Fukuda S., Iida H. Age related changes in bone mineral density, cross-sectional area and the strength of long bones in the hind limbs and first lumbar vertebra in female Wistar rats//J. Vet. Med. Sci. – 2004. – **66**(7). – P.755–760.
  6. Goodship A.E., Cunningham J.L., Kenwright J. Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing//Clin. Orthop. Relat. Res. – 1998. – **355**, Suppl. – P.105–115.
  7. Gu W.Y., Mao X.G., Rawlins B.A. et al. Streaming potential of human lumbar annulus fibrosus is anisotropic and affected by disc degeneration //J. Biomech. – 1999. – **32**(11). – P.1177–1182.
  8. Guzelsu N., Walsh W.R. Streaming potential of intact wet bone//J. Biomech. – 1990. – **23**(7). – P.673–685.
  9. Hastings G.W., Mahmud F.A. Electrical effects in bone//J. Biomach. Eng. – 1998. – **10**(6). – P.515–521.
  10. Legare A., Garon M., Guardo R. et al. Detection and analysis of cartilage degeneration by spatially resolved streaming potential//J. Orthop. Res. – 2002. – **20**(4). – P.819–826.
  11. Li D., Chen H., Wang Z. Mechanical response numerical analysis of bone tissue based on liquid saturated biphasic porous medium model //Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. – 2004. – **21**(3). – P.381–386.
  12. MacGinitie L.A., Seioz K.G., Otter M.V., Cochran G.V. Streaming potential measurements at low ionic concentrations reflect bone microstructure//J. Biomech. – 1994. – **27**(7). – P.969–978.
  13. Mak A.F., Zhang J.D. Numerical simulation of streaming potentials due to deformation-induced hierarchical flows in cortical bone//J. Bimech. Eng. – 2001. – **123**(1). – P. 66–70.
  14. McDonald F. Electrical effects at the bone surface//Europ. J. Orthods. – 1993. – **15**. – P.175–183.
  15. Nanaka S.V., Sun H.B., Yokota H. Bone formation induced by novel form of mechanical loading on joint tissue//Biol. Sci. Space. – 2004. – **18**(2). – P.41–44.
  16. Otter M., Shoenung J., Williams W.S. Evidence for different sources of stress-generated potentials in wet and dry bone// J. Orthop. Res. – 1985. – **3**(3). – P.321–324.
  17. Otter M., Goheen S., Williams W.S. Streaming potentials in chemically modified bone//J. Orthop. Res. – 1988. – **6**(3). – P.346–359.
  18. Otter M.W., Palmieri V.R., Cochran G.V. Transcortical streaming potentials are generated by circulatory pressure gradients in living canine tibia//Ibid. – 1990. – **8**(1). – P.119–126.
  19. Otter M.W., Palmieri V.R., Wu D.D. et al. A comparative analysis of streaming potentials in vivo and in vitro//Ibid. – 1992. – **10**(7). – P.710–719.
  20. Pollack S.R., Salzstein R., Pienkowski D. The electric double layer in bone and its influence on stress-generated potentials//Calcif. Tissue Int. – 1984. – **36**, Suppl 1. – P.77–81.
  21. Qin Y.X., Lin W., Rubin C. The pathway of bone fluid flow as defined by in vivo intramedullary pressure and streaming potential measurements//Ann. Biomed. Eng. – 2002. – **30**(5). – P.693–702.
  22. Walsh W.R., Guzelsu N. Ion concentration effects on bone streaming potentials and zeta potentials//Biomaterials. – 1993. – **14**(5). – P.331–336.
  23. Walsh W.R., Guzelsu N. Electrokinetic behavior of intact wet bone: compartmental model//J. Orthop. Res. – 1991. – **9**(5). – P.683–692.

*Ин-т фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: levashov@biph.kiev.ua*

Ю.М. Колесник, В.О. Жулінський, А.В. Абрамов, М.А. Калініченко

## **Зміни деяких показників мозкового кровообігу та нейрогуморальної регуляції людини під впливом електромагнітного випромінювання мобільного радіотелефону**

*Исследовано влияние электромагнитного излучения мобильного радиотелефона на показатели кровоснабжения головного мозга, оцениваемые при помощи реоэнцефалографии, и на состояние нейрогуморальной регуляции организма человека с использованием метода анализа кардиоинтервалов. Установлено, что воздействие излучения мобильного радиотелефона приводит к неблагоприятным изменениям со стороны церебрального кровотока и системы нейрогуморальной регуляции.*

### **ВСТУП**

Активне використання людством мобільного зв'язку призвело до того, що вперше в історії еволюції більшість населення земної кулі тісно контактує з мобільним радіотелефоном – джерелом надвисокочастотних електромагнітних полів (ЕМП), що опромінює переважно головний мозок людини. Потужність цього випромінювання, за даними фірм-виробників, не перевищує встановлених гігієнічних нормативів, але є значно більшою за природний електромагнітний фон, до якого людина цілком адаптована. Численні дослідження впливу ЕМП мобільного телефону на організм користувачів дійшли різноманітних висновків [4, 5, 7], але беззаперечним залишається той факт, що людський організм «відповідає» на цей вплив, незважаючи на його низьку інтенсивність.

Метою нашого дослідження було вивчення стану церебрального кровообігу та системи нейроендокринної регуляції організму людини за умов впливу електромагнітного випромінювання мобільного радіотелефону.

### **МЕТОДИКА**

Обстежено 52 практично здорових студентів-добровольців віком від 18 до 20 років. Як джерело електромагнітного випромінювання використовували мобільний телефон «Motorola v3690», для якого швидкість специфічної абсорбції (SAR – показник, що характеризує інтенсивність впливу ЕМП на живу тканину) відповідає середнім значенням серед найбільш поширених моделей мобільних радіотелефонів (0,9–1,1 Вт/кг) [2]. Під час експерименту телефон фіксували на спеціальному штативі та розташовували ліворуч поблизу голови обстежуваного, імітуючи звичайне його положення під час телефонної розмови. Щоб відтворити вплив ЕМП під час користування мобільним телефоном, експериментатор здійснював дзвінок на номер автовідповідача тривалістю 5 хв. На початку і наприкінці експерименту телефон вимикали.

Показники кровопостачання судинних ділянок головного мозку (фронтально-мастоїдальних – передніх та окципітально-мастоїдальних – задніх ділянок праворуч і



ліворуч) реєстрували з використанням комп'ютерного реографічного комплексу «ReoCom»; досліджувані показники (пульсове кровонаповнення, тонус великих судин, тонус середніх і малих судин, периферичний опір судин) оцінювали у відсотках порівняно з індивідуальними нормальними значеннями, прийнятими за 100 % [6]. Запис зазначених показників проводили до вмикання, одразу після вмикання телефону, в кінці 5-хвилинного зв'язку, відразу і через 5 хв після вимикання.

Для оцінки стану нейрогуморальної регуляції використовували 5-хвилинні записи кардіоінтервалів за допомогою комп'ютерного кардіографічного комплексу «CardioLab»: до вмикання, під час роботи та після вимикання мобільного телефону. Наступну обробку отриманих результатів проводили відповідно до стандартів Європейського товариства кардіології та Північноамериканського товариства кардіостимуляції та електрофізіології [8]. Показниками стану нейрогуморальної регуляції були: загальна потужність спектра кардіоінтервалів, потужність дуже низькочастотного, а також високочастотного діапазону, індекс вагосимпатичної взаємодії. Паралельно реєстрували інтегральні показники функціонування серцево-судинної системи (частоту серцевих скорочень, артеріальний тиск).

Статистичний аналіз отриманих результатів виконано за допомогою пакету програм Microsoft Excel з використанням критерію t Стьюдента. Різницю між досліджуваними показниками вважали вірогідною при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження довели, що церебральний кровообіг під впливом електромагнітного випромінювання мобільного радіотелефону зазнає істотних змін (таблиця). В усіх досліджуваних судинних ділянках мозку

після вмикання телефону і під час 5-хвилинного опромінення вірогідно посилювалося пульсове кровонаповнення, що свідчить про підвищений приток артеріальної крові. За умов тривалого користування мобільним телефоном цей феномен переповнення кров'ю церебральних судин може призводити до підвищення внутрішньочерепного тиску та до появи головного болю, що притаманний багатьом користувачам телефону [4, 7].

Під впливом випромінювання мобільного телефону на тлі незмінного тону великих судин у лівій передній судинній ділянці розвивався спазм судин середнього та малого калібру. У лівій задній судинній ділянці після 5-хвилинного опромінення та через 5 хв після вимкнення телефону спостерігалось зниження тону судин середнього та малого калібру, а периферичний опір судин у цій ділянці вірогідно підвищувався як після вмикання телефону, так і після припинення впливу ЕМП. Підвищення периферичного опору судин на тлі зменшення тону середніх і малих судин свідчить про порушення відтоку крові, що також є одним з патогенетичних передумов збільшення внутрішньочерепного тиску. Ймовірно, що внаслідок змін судинного тону погіршується кровопостачання нейронів у всіх судинних ділянках головного мозку і насамперед в тих, що знаходяться безпосередньо поблизу телефону.

Відновлення більшості показників церебральної гемодинаміки було констатовано через 4–5 хв після вимкнення телефону, що збігається з даними літератури [1, 2]. Через 5 хв після закінчення опромінення в передній лівій судинній ділянці відзначено також зниження пульсового кровонаповнення, а в лівій задній ділянці – зменшення тону судин.

Разом зі змінами кровопостачання головного мозку, під впливом електромагнітного випромінювання мобільного радіотелефону змінювались і показники нейро-

**Зміни реографічних показників церебрального кровообігу за умов впливу електромагнітного випромінювання мобільного радіотелефону (у відсотках від індивідуальних нормальних значень, які взято за 100 %), (M±m; n=52)**

Судинні ділянки, показник	Вихідний стан	Одразу після вмикання телефону	5 хв опромінення	Одразу після вимикання телефону	5 хв після вимикання телефону
<b>Ліві судинні ділянки</b>					
<b>передня</b>					
пульсове кровонаповнення	82,0±7,9	92,7±7,8*	91,2±7,7*	80,0±7,4	78,3±7,6*
тонус великих судин	81,9±5,1	83,1±6,5	75,4±6,0	76,4±3,1	77,1±2,7
тонус середніх і малих судин	116,7±13,0	128,1±13,2*	129,1±16,6*	116,1±14,0	115,0±14,2
периферичний опір	101,6±7,9	101,4±7,5	104,1±11,3	106,7±11,2	97,5±9,5
<b>задня</b>					
пульсове кровонаповнення	92,2±4,8	96,2±4,5*	95,5±5,2*	91,4±5,3	91,4±5,4
тонус великих судин	81,4±3,0	83,1±2,6	82,2±3,3	80,8±3,9	78,6±3,5*
тонус середніх і малих судин	113,0±11,1	117,4±10,8	103,3±10,2*	114,1±12,7	104,4±9,3*
периферичний опір	95,4±9,5	106,2±10,9*	96,0±9,1	116,2±12,9*	105,0±11,6
<b>Праві судинні ділянки</b>					
<b>передня</b>					
пульсове кровонаповнення	78,1±5,4	89,2±5,5**	86,5±5,5*	82,6±5,4	80,5±4,9
тонус великих судин	76,5±2,0	75,4±1,9	81,6±8,6	78,6±3,0	75,4±2,0
тонус середніх і малих судин	112,6±12,7	110,6±13,4	109,6±14,9	113,2±13,9	107,7±11,6
периферичний опір	94,5±11,8	84,8±10,2	77,6±14,0	94,2±11,7	88,4±9,8
<b>задня</b>					
пульсове кровонаповнення	100,2±7,0	107,5±7,4*	109,1±7,9*	101,5±7,4	98,7±7,7
тонус великих судин	80,9±2,5	80,1±2,1	80,1±2,3	79,7±2,2	82,3±2,7
тонус середніх і малих судин	118,2±9,7	124,1±11,4	110,8±11,4	116,5±11,4	123,9±11,7
периферичний опір	96,8±11,5	96,1±12,5	85,5±10,4	98,4±12,5	103,1±13,4

\*P<0,05, \*\*P<0,001 порівняно з вихідними значеннями (до вмикання телефону).

гуморальної регуляції організму. Після ввімкнення мобільного телефону вірогідно знижувалася загальна потужність спектра кардіоінтервалів, що свідчило про зменшення сумарної активності регуляторних систем. Цей показник залишався вірогідно нижчим за вихідний також протягом перших 5 хв після вимкнення телефону. На тлі зниження загальної потужності нейрогуморальної регуляції вірогідно підвищилася низькочастотна складова та зменшилася дуже низькочастотна складова, що відповідає розвиткові стрес-реакції під час користування таким телефоном.

Можливими механізмами зрушення показників кровопостачання головного мозку та стану нейрогуморальної регуляції людини є: 1) поглинання енергії ЕМП біологічними тканинами, що викликає зміни просторової орієнтації (коливань) дипольних молекул, головним чином, води, з переходом енергії ЕМП у теплову та нагріванням тканин [1, 3]; 2) виникнення резонансу між частотами ЕМП і деякими частотами головного мозку, що може спричинювати пряме ушкодження нервових клітин; 3) нетермічний – інформаційний – вплив слабких ЕМП надвисокочастотного діапазону, що здатний порушувати

взаємодію нервових клітин і нейрогуморальну регуляцію організму в цілому [5].

## ВИСНОВКИ

1. Під впливом електромагнітного випромінювання мобільного радіотелефону вірогідно змінюються показники церебральної гемодинаміки, що може стати патогенетичною передумовою для виникнення головного болю та порушення функціонування нейронів.

2. Вплив електромагнітного випромінювання мобільного радіотелефону викликає негативні зміни з боку нейрогуморальної регуляції, що відповідають зменшенню резервів та якості життя людини, розвиткові стрес-реакції у відповідь на опромінення.

**Ju.M.Kolesnik, V.A.Zhulinsky, A.V.Abramov,  
N.A.Kalinichenko**

### THE FEATURES OF SOME HUMAN NEUROFI- SIOLOGICAL PARAMETERS MODIFICATION UNDER THE INFLUENCE OF MOBILE PHONE ELECTROMAGNETIC EMISSION

It was investigated in experiment on volunteers the influence of mobile phone (MP) electromagnetic emission on brain blood supply rheoencephalographic parameters, and on status of neurohumoral regulation using the heart rate variability analysis. It was established that influence of MP electromagnetic emission results in adverse movement by cerebral blood flow and regulatory systems of organism.

*Zaporizhzhya Medical University*

*Zaporiz. med. un-t*

*E-mail: zhulinsky@patho.zsmu.edu.ua*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Григорьев Ю.Г. Сотовая связь: радиобиологические проблемы и оценка опасности // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2001. – 41, №5. – С.500–513.
2. Григорьев Ю.Г., Степанов В.С., Григорьев О.А., Меркулов А.В. Электромагнитная безопасность человека. Справочно-информационное пособие. – Рос. нац. комитет по защите от неионизирующих излучений. – 1999. – 146 с.
3. Кирчик О.П., Игнатов С.П., Падучев Н.В., Волкова Л.Е. Некоторые аспекты влияния сотовой связи на человека. – В кн.: Электромагнитные поля и здоровье человека: Материалы 3-й междунар. конф. «Электромагнитные поля и здоровье человека. Фундамент. и прикл. исслед.» (17–24 сент. 2002 г., Москва–Санкт-Петербург). – М., 2002. – С.69–72.
4. Кляп С.И., Курик М.В. Влияние слабых электромагнитных полей мобильного телефона на здоровье человека // Лікар. справа. – 2002. – №1. – С. 26–30.
5. Любимов В.В. Биотропность естественных и искусственно созданных электромагнитных полей. Аналитический обзор. – М.: ИЗМИРАН, 1997. – 85 с.
6. Ронкин М.А., Иванов Л.Б. Реография в клинической практике. – М.: МБН, 1997.
7. Худницкий С.С., Арбузов И.В. Особенности воздействия электромагнитных полей сотовых радиотелефонов на пользователей // Электромагнитные поля и здоровье человека: Материалы 3-й междунар. конф. «Электромагнитные поля и здоровье человека. Фундамент. и прикл. исслед.» (17–24 сент. 2002 г., Москва–Санкт-Петербург). – М., 2002. – С.67–69.
8. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task force of the european society of cardiology and the north american society of pacing and electrophysiology // Europ. Heart J. – 1996. – № 17. – P. 354–381.

Т.А Борисова, Н.В. Крысанова

## Высвобождение глутамата из цитозольного пула синапсом в условиях экспериментальной гипергравитации

*В условиях экспериментальной модели индуцированной гравитации изучено кальций-независимое высвобождение глутамата из синапсом. Протонофор FCCP нарушает протонный градиент синаптических везикул, вызывает снижение содержания АТФ и повышение  $[Na^+]_p$ , что приводит к увеличению цитозольного пула нейромедиатора и реверсному функционированию глутаматных транспортеров. Обнаружено значительное увеличение стимулированного FCCP (1 мкмоль/л) и KCl (35 ммоль/л) освобождения L-[ $^{14}C$ ]глутамата –  $27,0 \pm 2,2$  и  $35,0 \% \pm 2,3$  % в контроле и в условиях гравитации соответственно ( $P < 0,05$ ). Показано, что стимулированное FCCP, KCl, а также FCCP и KCl высвобождение L-[ $^{14}C$ ]глутамата чувствительно к действию нетранспортируемого ингибитора глутаматных транспортеров DL-трео-β-бензилоксияспартата (DL-TBOA), что доказывает непосредственное участие транспортеров глутамата в этом процессе. Транспортируемый ингибитор DL-трео-β-гидроксиаспартат (DL-THA) индуцирует высвобождение глутамата из цитозольного пула синапсом путем гетерообмена, за счет незавершенного транспортного цикла. Показано, что высвобождение L-[ $^{14}C$ ]глутамата, стимулированное FCCP и DL-THA в условиях моделированной гравитации, также существенно выше, чем в контроле. Этот подход совместного применения FCCP, KCl и DL-THA позволил выявить значительные различия функционирования в реверсном режиме глутаматных транспортеров в условиях моделированной гравитации.*

### ВВЕДЕНИЕ

Все живые организмы на Земле эволюционировали под влиянием гравитации. Можно предполагать, что изменение гравитационного воздействия отразится на реализации физиологических функций. Действительно, пребывание астронавтов в условиях микро- и гипергравитации сопровождается нарушением умственных и когнитивных способностей [16, 26, 37]. В настоящее время активно исследуется феномен, который наблюдается в индуцированной центрифугированием гипергравитации, в условиях полета, а также выполнения различных летных маневров. Синдром назван «индуцированная гравитацией потеря сознания» [27, 35, 40, 41]. Состояние, предшествующее

потере сознания, характеризуется амнезией, нарушением сенсорных и когнитивных функций, смятением, замешательством, трудностями в формировании слов. Одной из причин, вызывающих индуцированную гравитацией потерю сознания, считается снижение содержания кислорода в мозгу. Представляется целесообразным подразделить все исследования в области космической физиологии животных на два направления. Одно развивает изучение влияния непосредственно всемирного тяготения на гравичувствительные системы организма, другое уделяет внимание исследованию действия неспецифических стрессовых факторов, сопровождающих пребывание организма в условиях измененной гравитации. Одним из наиболее

© Т.А Борисова, Н.В. Крысанова

влиятельных неспецифических стрессовых факторов, способных вызвать значительные нарушения функционирования мозга, является гипоксия. Мозг чрезвычайно чувствителен к поступлению кислорода. При недостаточном снабжении его кислородом наблюдается нарушение ментальных способностей [1]. В настоящее время в области космической нейробиологии большое внимание уделяется исследованию этого вопроса [7, 8, 24, 27–29, 30, 34, 35, 40, 41]. Однако влияние измененной гравитации до конца не исследовано.

Известно, что глутамат действует как основной возбуждающий нейромедиатор. В то же время его высокие концентрации в синаптической щели приводят к сверхстимуляции постсинаптических рецепторов и являются нейротоксичными. Содержание аминокислоты вне клетки поддерживается на низком нетоксичном уровне за счет быстрого удаления из синаптической щели. Основная функция транспортеров глутамата нейронов и глиальных клеток – поглощение аминокислоты из синаптической щели. По-видимому, транспортеры выполняют сложные функции модуляции нейротрансмиссии [11–15, 17–21, 23, 25, 31–33, 36, 38–39]. При определенных условиях, в основном при развитии патологических состояний, транспортеры глутамата функционируют в реверсном режиме, когда их работа направлена не на поддержание концентрации нейромедиатора на низком уровне, а на перенос его из цитозольного пула в синаптическую щель [11, 15, 19, 21, 23, 25, 31]. В этом случае высвобождение нейромедиатора является кальцийнезависимым процессом. Как показывают термодинамические расчеты, ему способствует увеличение концентрации внеклеточного калия и уменьшение внеклеточного содержания натрия. Кальцийнезависимое высвобождение – основной путь высвобождения глутамата при ишемии, гипоксии и мозговой травме [10, 12, 19, 20, 23]. Гипокси-

ческое поражение нейронов характеризуется увеличением высвобождения глутамата из цитозольного пула посредством реверсного функционирования его транспортеров [15, 18, 21, 25, 31, 32, 33, 38]. Нами показано, что активность транспортеров глутамата снижается после воздействия моделированной гравитации [2–6].

Цель настоящего исследования – изучить кальцийнезависимое высвобождение глутамата из пресинаптических нервных окончаний в контроле и в условиях экспериментальной гипергравитации.

## МЕТОДИКА

Получение синаптосом. Работу проводили на препарате изолированных нервных окончаний головного мозга крыс – синаптосомах. Последние обладают такими характеристиками интактного нервного окончания, как мембранный потенциал, способность к активному накоплению и высвобождению нейромедиаторов при деполяризации плазматической мембраны.

В опытах использовали половозрелых самцов крыс линии Вистар, массой 100–120 г. Гравитационную нагрузку на животных проводили в специальных контейнерах на центрифуге диаметром 5 м при 10 g в течение часа. Животные не теряли сознания и полностью восстанавливались после окончания гравитационной нагрузки. Синаптосомы выделяли дифференциальным центрифугированием и центрифугированием в градиенте плотности фикола-400, применяя метод Котмана [9] с небольшими модификациями: раствор сахарозы для приготовления градиента фикола содержал 5 ммоль/л HEPES-NaOH и 0,2 ммоль/л ЭДТА, pH 7,4. Синаптосомы, полученные при фракционировании в градиенте фикола, разводили 10 объемами 0,32 моль/л сахарозы, 5 ммоль/л HEPES-NaOH, pH 7,4 и центрифугировали при 20000 g в течение

20 мин. Осадок ресуспендировали на льду в стандартном холодном оксигенированном солевом растворе следующего состава (ммоль/л): NaCl – 126, KCl – 5, MgCl<sub>2</sub> – 2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0, HEPES – 20, d-глюкоза – 10, pH 7,4. Полученную суспензию синапсом (концентрация белка 4 мг/мл) использовали в экспериментах в течение 2–4 ч после получения. В бескальциевую среду добавляли 2 ммоль/л ЭГТА. Все процедуры проводили при 4°C. Концентрацию белка определяли, как описано у Larson [22].

Высвобождение L-глутамата. Для определения высвобождения L-[<sup>14</sup>C]глутамата из синапсом суспензию (концентрация белка 2 мг/мл) в стандартном буфере инкубировали 10 мин при 37°C, затем добавляли 500 нмоль/л L-[<sup>14</sup>C]глутамата и инкубировали еще 10 мин при 37°C, после чего разводили 10 объемами охлажденного стандартного солевого раствора, центрифугировали 10 мин при 4000 g, затем осадок ресуспендировали в том же буфере при 4°C и использовали в эксперименте (концентрация белка 4 мг/мл). Суспензию синапсом разводили стандартным бескальциевым буфером до концентрации 0,5 мг белка/мл. Высвобождение L-[<sup>14</sup>C]глутамата осуществляли следующим образом: 125 мкл синапсом преинкубировали 10 мин при 37°C, добавляли деполяризующий реагент, инкубировали 6 мин и быстро осаждали в микроцентрифуге (20 с при 10000 g). Аликвоты надосадочной жидкости (100 мкл) смешивали со сцинтилляционной жидкостью ACS (1,5 мл) и определяли радиоактивность с помощью счетчика «Tracor Analytic Delta 300». Повышение содержания внеклеточного L-[<sup>14</sup>C]глутамата при инкубации предварительно нагруженных меченым нейромедиатором синапсом при 37°C в течение различных временных интервалов определяли как нестимулированное (базальное) высвобождение L-[<sup>14</sup>C]глутамата. Высвобождение нейромедиатора выражали как процент от обще-

го содержания меченого нейромедиатора. Результаты представлены как среднее значение ± квадратичная ошибка.

Материалы. В экспериментах были использованы фиколл-400 («Serva»), HEPES («Sigma»), ЭДТА («Calbiochem»), d-глюкоза («Sigma»), L-глутамат («Sigma»), L-[<sup>14</sup>C]-глутамат («Amersham»), SDS («Fluka»), NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> (о.с.ч. «Реахим»), сцинтилляционная жидкость ASC («Amersham»).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что нестимулированное, базальное высвобождение L-[<sup>14</sup>C]глутамата из синапсом не изменялось после воздействия моделированной гравитации. Экспериментальные результаты представлены ниже с вычетом данных о базальном высвобождении. Деполяризация плазматической мембраны 35 ммоль/л KCl в бескальциевой среде приводила к высвобождению нейромедиатора из цитозольного пула. При изучении KCl-стимулированного высвобождения L-[<sup>14</sup>C]глутамата в бескальциевой среде обнаружено незначительное его увеличение – с 7,7 % ± 2,8 % в контроле до 11,0 % ± 2,0 % общего содержания метки в синапсоме после воздействия моделированной гравитации. То есть наблюдалась тенденция к увеличению высвобождения глутамата из цитозольного пула после гравитационной нагрузки. Для детального исследования высвобождения L-[<sup>14</sup>C]глутамата нервными окончаниями был использован конкурентный несубстратный ингибитор глутаматного транспорта DL-трео-β-бензилоксиаспартат (DL-TBOA), который проявлял дозозависимый ингибиторный эффект на процесс высвобождения как в контроле, так и в условиях моделированной гравитации, что позволило предположить, что высвобождение в обоих случаях шло при участии глутаматных транспортеров, функционирующих в реверсном режиме.

Протонофор FCCP нарушает протонный градиент синаптических везикул и митохондриальной мембраны, вызывает деполаризацию плазматической мембраны, снижение содержания АТФ и повышение  $[Na^+]_i$ . Эти изменения приводят к высвобождению глутамата из синаптических везикул, увеличению цитозольного пула нейромедиатора и реверсному функционированию работы глутаматных транспортеров. 1 мкмоль/л FCCP *per se* вызывает кальцийнезависимое высвобождение глутамата из синапсом. Разницу в FCCP-стимулированном высвобождении между нормой и гравитацией наблюдали только в начальный период действия FCCP. За 30 с высвобождается  $5,0 \pm 1,0$  и  $9,0 \% \pm 1,2 \%$  общего содержания метки в синапсоммах в контроле и после гипергравитации соответственно ( $P < 0,05$ ), через 2 мин разница нивелируется (рис. 1). В настоящей работе было исследовано KCl-стимулированное высвобождение L-[ $^{14}C$ ]глутамата после 5 мин инкубации синапсомом с 1 мкмоль/л FCCP. При этом через 10 мин наблюдали значительное увеличение высвобождения L-[ $^{14}C$ ]глутамата –  $27,0 \pm 2,2$  и  $35,0 \% \pm 2,3 \%$  в контроле и после гравитационной нагрузки соответственно ( $P < 0,05$ ; рис. 2,а). Было показано, что стимулированное FCCP, FCCP+KCl высвобождение L-[ $^{14}C$ ]глутамата чувствительно к действию ингибитора глутаматных транспортеров DL-TBOA, что доказывает непосредственное участие транспортеров в этом процессе. Таким образом, было показано что FCCP-индуцированное высвобождение глутамата из синаптических везикул, увеличение цитозольного пула нейромедиатора и нарушение баланса между цитозольным и везикулированным пулами приводит к увеличению стимулированного де-

поляризацией кальцийнезависимого высвобождения глутамата. Причем в условиях моделированной гравитации высвобождение глутамата из цитозольного пула значительно выше, чем в контроле.

Конкурентный ингибитор транспортеров глутамата DL-трео- $\beta$ -гидроксиаспартат (DL-TНА) индуцирует высвобождение глутамата из цитозольного пула синапсомом путем гетерообмена, из-за незавершенного транспортного цикла. Показано, что высвобождение L-[ $^{14}C$ ]глутамата за 10 мин, вызванное 100 мкмоль/л DL-TНА и 1 мкмоль/л FCCP в условиях моделированной гравитации, существенно выше, чем в контроле ( $44,0 \pm 2,0$  в контроле и  $52,0 \% \pm 2,3 \%$  при гипергравитации; см. рис. 2,б). Таким образом, результаты, полученные с применением DL-TНА, также свидетельствуют об увеличении высвобождения глутамата из цитозольного пула после индуцированной центрифугированием гипергравитации.

Подход совместного применения FCCP, KCl и DL-TНА позволил выявить значительные различия функционирования в реверсном режиме глутаматных транспортеров в условиях моделированной гравитации. Как выше было сказано, увеличение высвобождения глутамата из цитозольного пула является маркером гипоксического поражения нейронов [15, 18, 21, 25, 31, 32,

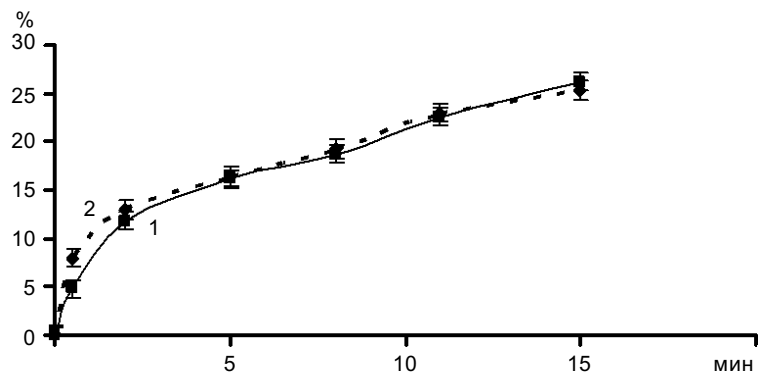


Рис. 1. Кальцийнезависимое высвобождение L-[ $^{14}C$ ]глутамата, индуцированное 1 мкмоль/л FCCP, из синапсомом контрольных животных (1) и животных после гравитационной нагрузки (2). Здесь и на рис. 2 по оси ординат – высвобождение глутамата

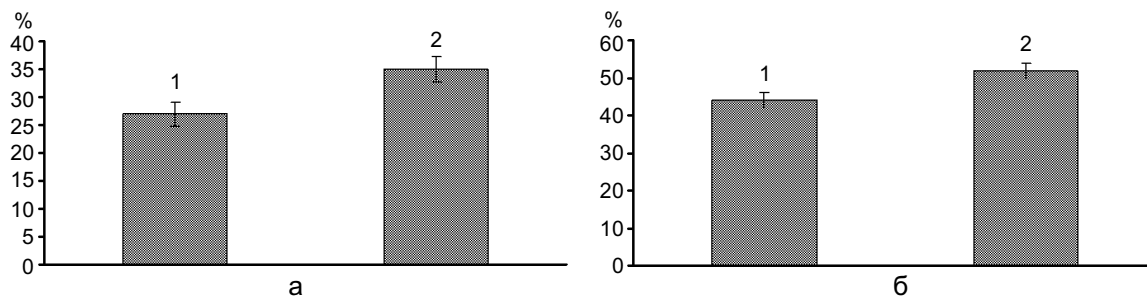


Рис. 2. Индуцированное 1 мкмоль/л FCCP и 35 ммоль/л KCl (а) высвобождение L-[<sup>14</sup>C]глутамата в бескальциевой среде за 10 мин из синапсом контрольных животных (1) и животных после гравитационной нагрузки (2) и 1 мкмоль/л FCCP и 100 мкмоль/л DL-трео-β-гидроксиаспартата (б)

33, 38]. Увеличенное высвобождение глутамата может приводить к нарушениям умственных и когнитивных способностей, а в дальнейшем и к нейротоксичности и судорогам в условиях измененной гравитации.

**T.A. Borisova, N.V. Krisanova**

#### ENLARGED CA<sup>2+</sup>-INDEPENDENT RELEASE OF GLUTAMATE FROM SYNAPTOSOMES UNDER CENTRIFUGE-INDUCED HYPERGRAVITY MODELING

The release of L-[<sup>14</sup>C]glutamate via Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters functioned in the reverse mode was investigated in cortical synaptosomes under centrifuge-induced hypergravity. The protonophore carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone (FCCP) induced increase in [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, depolarized the plasma membrane, dissipated the proton gradient across synaptic vesicles and mitochondrial membrane, caused a fall in both the ATP level and the ATP/ADP ratio. 35 mM KCl-stimulated L-[<sup>14</sup>C]glutamate release from synaptosomes preliminary treated with 1 μM FCCP considerably increased from 27.0±2.2 % to 35.0±2.3 % of total accumulated synaptosomal label after centrifuge-induced hypergravity as compared to control animals (P<0.05). We found the competitive nontransportable glutamate transporter inhibitor DL-threo-β-benzyloxyaspartate to inhibit FCCP and high KCL-stimulated release of L-[<sup>14</sup>C]glutamate. The release would be expected to occur via plasma membrane glutamate transporters. Transportable inhibitor of glutamate transporters-DL-threo-beta-hydroxyaspartate (DL-THA) induced heteroexchange of L-[<sup>14</sup>C]glutamate from enlarged by FCCP cytosolic pool of the neurotransmitter. DL-THA-evoked release of L-[<sup>14</sup>C]glutamate was also increased significantly after hypergravity. Combined application of KCl, DL-THA and FCCP unmasked dramatic changes in the activity of the glutamate transporters functioning in the reverse mode after centrifuge-induced G-loading.

*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bloogg S., Gennser M. Cerebral blood flow velocity and psychomotor performance during acute hypoxia // *Aviation, Space and Environmental Med.* – 2006. – **77**. – P. 107–111.
2. Borisova T.A., Krisanova N.V., Himmelreich N.H. Artificial gravity and functional plasticity of nerve system L-[<sup>14</sup>C]-glutamate uptake by nerve terminals from rat cerebellum and cerebral hemispheres under hypergravity stress // *J. Gravitat. Physiol.* – 2002. – **9**(1) – P. 25–26.
3. Borisova T.A., Krisanova N.V., Himmelreich N.H. Exposure of animals to artificial gravity conditions leads to the alteration of the glutamate release from rat cerebral hemispheres nerve terminals // *Adv. Space Res.* – 2004. – **33**. – P.1362–1367.
4. Borisova T.A., Himmelreich N.H. Effects of the inhibitors on glutamate uptake by nerve terminals after exposure of rats to centrifuge – induced hypergravity // *J. Gravitat. Physiol.* – 2004. – **11** (2). – P.37–38.
5. Borisova T.A., Himmelreich N.H. Centrifuge-Induced Hypergravity: [<sup>3</sup>H]GABA and L-[<sup>14</sup>C]glutamate Uptake, Exocytosis and Efflux Mediated by High-Affinity, Sodium-Dependent Transporters // *Adv. Space Res.* – 2005. – **36**. – P.1340–1345.
6. Borisova T.A., Krisanova N.V., Himmelreich N.H. Artificial gravity loading increases the effects of the glutamate transporter inhibitors on the glutamate release and uptake in rat brain nerve terminals // *Micrograv. Sci. and technol.* – 2006. – XVIII-3/4. – P.230–233.
7. Cai Q., Liu H., Zhan Z. et al. A study of apoptosis and related gene bcl-2 and p53 expression in hippocampus of rats exposed to repeated +Gz // *Space Med. Eng. (Beijing)*. – 2000. – **13**. – P.263–266.
8. Cidon S., Sihra T. Characterization of an H<sup>+</sup>-ATPase in Rat Brain Synaptic Vesicles // *JBC.* – 1989. – 264. – P.8281–8288.
9. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // *Methods Enzymol.* – 1974. – **31**. – P.445–452.
10. Cousin M.A., Robinson P.J. Two mechanisms of synaptic vesicle recycling in rat brain nerve terminals // *J. Neurochem.* – 2000. – **75**. – P.1645–1653.



11. Danbolt N.C. Glutamate uptake // *Progr. Neurobiol.* – 2001. – 65. – P.1–105.
12. Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain // *J. Neurochem.* – 1984. – 42. – P.1–11.
13. Gegelashvili G., Schousboe A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity // *Mol. Pharmacol.* – 1997. – 52. – P.6–15.
14. Gegelashvili G., Dehnes Y., Danbolt N. et al. The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms // *Neurochem. Int.* – 2000. – 37. – P.163–170.
15. Gemba T., Oshima T., Ninomiya M. Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes // *Neuroscience.* – 1994. – 63. – P.789–795.
16. Guinan M., Horowitz J., Fuller C. Effects of hyperdynamic fields on input-output relationships and long-term potentiation in the rat hippocampus // *J. Gravitat. Physiol.* – 1998. – 5. – P.31–40.
17. Headley P.M., Grillner S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1990. – 11. – P.205–211.
18. Ikemoto A., Bole D., Ueda T. Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles // *JBC.* – 2003. – 278. – P.5929–5940.
19. Jabaudon D., Shimamoto K., Yasuda-Kamatani Y. et al. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin // *PNAS USA.* – 1999. – 96. – P.8733–8738.
20. Jensen J. B., Pickering D. S., Schousboe A. Depolarization-induced release of [<sup>3</sup>H]D-aspartate from GABAergic neurons caused by reversal of glutamate transporters // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2000. – 18. – P.309–315.
21. Kauppinen R.A., McMahon H.T., Nicholls D.G. Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: possible relevance to hypoglycaemia and anoxia // *Neuroscience.* – 1988. – 27. – P.175–182.
22. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // *Analit. Biochem.* – 1986. – 155. – P.243–248.
23. Levi G., Raiteri M. Carrier-mediated release of neurotransmitters // *Trends Neurosci.* – 1993. – 16. – P.415–419.
24. Liu H., Cai Q., Ji G. et al. Changes of mRNA expression of IL-1 beta and TNF-alpha in rat brain after repeated exposure to +Gz // *Space Med. Eng. (Beijing).* – 2000. – 13. – P.371–373.
25. Longuemare M.C., Swanson R.A.. Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake // *J. Neurosci. Res.* – 1995. – 40. – P.379–386.
26. Manzey D., Lorenz B. Mental performance during short-term and long-term spaceflight // *Brain Res. Rev.* – 1998. – 28. – P.215–221.
27. Matsuda T., Gotoh T., Tanaka K. et al. Vestibulo-sympathetic reflex mediates the pressor response to hypergravity in conscious rats: contribution of the diencephalons // *Brain Res.* – 2004. – 1028. – P.140–147.
28. Rahmann H., Slenzka K., Kortje K. et al. Synaptic plasticity and gravity: ultrastructural, biomedical and physico-chemical fundaments // *Adv. Space. Res.* – 1992. – 12. – P.63–72.
29. Raymond J., Dememes D., Blanc E. et al. Development of the vestibular system in microgravity. – In: *The Neurolab Spacelab Mission: Neuroscience Research in Space.* – 2003. – P.143–149.
30. Rijken P., Boonstra J., Verkleij A. et al. Effects of gravity on the cellular response to epidermal growth factor // *Adv. Space Biol. Med.* – 1994. – 4. – P.159–188.
31. Roettger V., Lipton P. Mechanism of glutamate release from lateral sclerosis // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – 326. – P.1464–1468.
32. Rossi D.J., Oshima T., Attwell D. Glutamate release in D.G., Presynaptic receptors and the control of glutamate severe brain ischemia is mainly by reversed uptake // *Nature.* – 2000. – 403. – P.316–321.
33. Sanchez-Prieto J., Gonzalez P. Occurrence of a large Ca<sup>2+</sup>-independent release of glutamate during anoxia in isolated nerve terminals (synaptosomes) // *J. Neurochem.* – 1988. – 50. – P.1322–1324.
34. Shahed A., Son M., Lee J. et al. Expression of c-fos, c-jun and HSP70 mRNA in rat brain following high acceleration stress // *J. Gravitat. Physiol.* – 1996. – 3. – P.49–56.
35. Shender B., Forster E., Hrebien L. et al. Acceleration-induced near-loss of consciousness: the „A-loss syndrome» // *Aviation, Space and Environment. Med.* – 2003. – 74. – P.1021–1028.
36. Shioi J., Ueda T. Artificial imposed electrical potential drive L-glutamate uptake into synaptic vesicles of bovine cerebral cortex // *Biochem. J.* – 1990. – 267. – P.63–68.
37. Signore A., Mandillo S., Rizzo A. et al. Hippocampal gene expression is modulated by hypergravity // *Eur. J. Neurosci.* – 2004. – 19. – P.667–677.
38. Szatkowski M., Barbour B., Attwell D. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake // *Nature.* – 1990. – 348. – P.443–446.
39. Tretter L., Chinopoulos C., Adam-Vizi V. Plasma membrane depolarization and disturbed Na<sup>+</sup> homeostasis induced by the protonophore carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone in isolated nerve terminals // *Molec. Pharmacol.* – 1998. – 53. – P.734–74.
40. Whinnery J. Observations on the neurophysiologic theory of acceleration induced loss of consciousness // *Aviation, Space and Environment. Med.* – 1989. – 69. – P.869–874.
41. Wilson G., Reis A., Tripp L. EEG correlates of G-induced loss of consciousness. *Aviation // Ibid.* – 2005. – 76. – P.19–27.

*Ин-т біохімії ім. А.В.Палладина НАН України, Київ*  
*E-mail: tborisov@biochem.kiev.ua*

О.Б. Дынник, С.Е. Мостовой, В.А. Березовский

## Биофизические методы оценки состояния микроциркуляторного русла кожи

*В роботі проаналізовано можливості біофізичних методик у комплексній оцінці мікроциркуляторного русла в сучасній клінічній практиці. Капілярорезистометрія, цифрова капіляроскопія, а також лазерна доплерівська флоуметрія можуть виявити мікроциркуляторні розлади, зумовлені порушеннями реології крові, функцію ендотелію і тонуусу артерійол у пацієнтів з дифузними захворюваннями печінки. Ці методи можуть бути використані для впровадження в комплекс клінічних досліджень при виявленні ранніх форм патології. Метод лазерної доплерівської флоуметрії має важливе значення для динамічного спостереження за мікроциркуляторним руслом з метою підбору та якості призначеного лікування. Комплекс представлених досліджень призначений для об'єктивізації виявлених порушень структури та функції системи мікроциркуляції.*

### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительный технический прогресс в развитии медицинской диагностической техники, методов инструментальной оценки состояния микроциркуляции в клинике не так и много. Наиболее известные из них – прямые методы, которые включают инвазивные и неинвазивные. Первые используются преимущественно в экспериментальных лабораториях: определение объемной скорости тканевого кровотока (по клиренсу водорода и радиоактивной метке); исследование микроциркуляции крови с помощью радиометрии при введении перфторана, томографические радиоизотопные методы; двулучевой фотометрический метод, селективная ангиография, а также биопсия. Прямые неинвазивные методы оценки микроциркуляции: лазерная доплеровская флоуметрия; микроскопические методы: зрительная, аналоговая и цифровая капилляроскопия ногтевого ложа, биомикроскопия сосудов конъюнктивы глазного яблока, офтальмоскопия, полярография, фотопле-

тизмография, термография. Существуют косвенные методы оценки микроциркуляции – это классические пробы на ломкость капилляров: пробы «жгута», «щипка», баночные пробы Нестерова и Кончаловского–Румпеля–Леде. Для оценки состояния гистогематического барьера предложено определять время рассасывания кожного волдыря, пробы Лещинского–Кавецкого, Лэндиса, МакКлюра–Олдрича и Вальдмана [3,14]. К косвенным методам неинвазивного исследования состояния микрососудистой системы с помощью ультразвука в доплеровском режиме относят также и оценку эндотелиальной дисфункции по методу Selermajer, а также ультразвуковую высокочастотную доплерографию [1, 6, 7, 15].

Капиллярорезистометрия. В основе метода – разрушение целостности монослоя эндотелиоцитов и базальной мембраны физическим воздействием с образованием петехий – участков мелкоочечного кровоизлияния на коже или слизистой диаметром до 1 мм, которые учитываются как результат травмы.

© О.Б. Дынник, С.Е. Мостовой, В.А. Березовский

Из наиболее известных ангиорезистометрических методов для оценки ломкости капилляров, как маркер поражения эндотелия микроциркуляции – это пробы Вальдмана и Нестерова. Методика Вальдмана – способ выявления эндотелиоза (набухания, пролиферации, разрыхления и сдувания эндотелия кровеносных сосудов) путем создания с помощью медицинской банки разрежения на ограниченном участке кожи с последующим определением содержания моноцитов в крови, взятой с этого участка [2, 6, 8, 14]. Нестеров в 1958 г. предложил выполнять пробу на резистентность капилляров при помощи специального аппарата НПК-5 с созданием отрицательного давления 300 мм рт. ст. под контролем аппарата Ривароччи для исследования гиповитаминоза С. Мы модифицировали эти методики и предложили способ стандартизации ангиорезистометрической пробы Нестерова, которая проводится прибором – капиллярорезистометром [6, 11]. Капиллярорезистометрия основана на подсчете числа петехий на коже плеча или предплечья в зоне локально создаваемого присоской площадью 4 см<sup>2</sup> отрицательного давления -300 мм рт. ст. после 2 мин экспозиции и спустя 5 мин после снятия присоски (рис.1).

После механического воздействия (давления) на капилляры кожи у здорового человека не наступает каких-либо сущест-

венных изменений, а допустимое число петехий не более 4. При нарушении нормального состояния стенки капилляров (слоя эндотелия и базальной мембраны), повышается ломкость сосудов, и в месте наложения присоски возникают многочисленные петехии или кровоподтеки, свидетельствующие о нарушении сосудистого и/или тромбоцитарного компонента гемостаза. Появление более чем 8–12 петехий указывает на положительную пробу [3, 6, 14].

Цифровая компьютерная капилляроскопия – как метод неинвазивной оценки микроциркуляции ногтевого ложа пальцев кисти известна с 50-х годов прошлого века. Основным средством получения изображения капилляров был приспособленный для исследования ногтевого ложа микроскоп – оптический капилляроскоп, оборудованный специальной подсветкой пальца сверху, которая позволяла просветить участок кожи ногтевого ложа. Аналоговая модель давала увеличение изображения в 30 раз.

Цифровая компьютерная капилляроскопия дала новый импульс в оптическом изучении микроциркуляции. Прибор для этой методики состоит из фотодиодной осветительной системы, которая создает и фокусирует на ногтевом ложе пальца световое пятно. Специальная оптическая система передает изображение на ПЗС-матрицу цифровой видеокамеры, а потом в компьютер. Компьютерный капилляроскоп

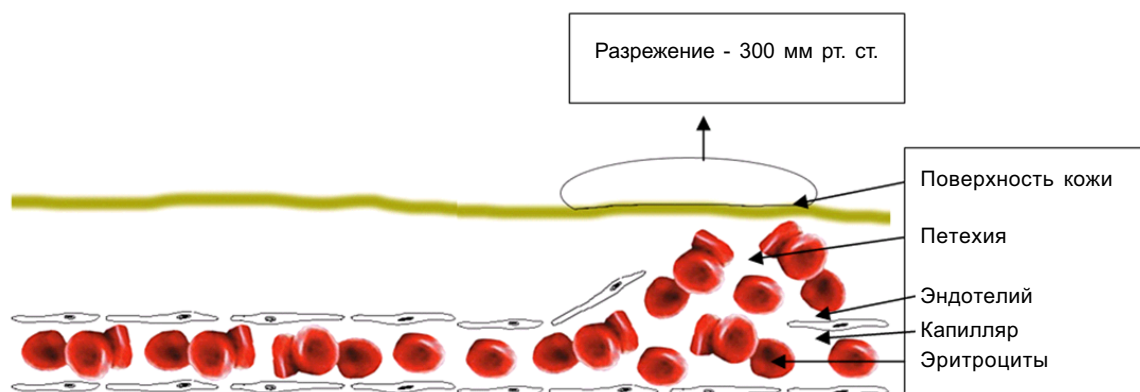


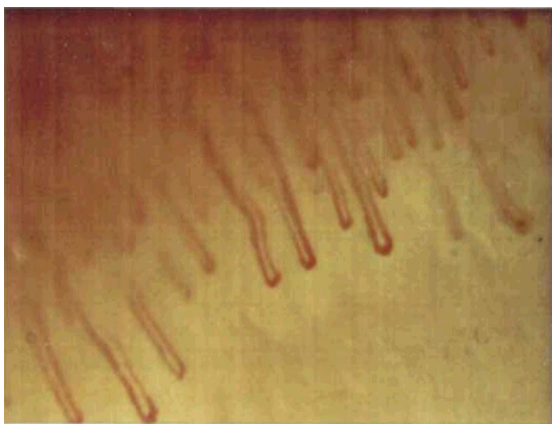
Рис. 1. Капиллярорезистометрия

позволяет производить увеличение в 100, 150, 200 и 400 раз. Этот прибор не только фиксирует капиллярный кровоток в эпонихии ногтевой фаланги пальца, а также на основе программной обработки получаемого видеоизображения позволяет получить ряд качественных и количественных характеристик капиллярного кровотока [1, 12]. На рис. 2. представлено изображение капилляра с учетом его структуры и функции, полученное в «Центре анализа веществ» (Москва, Россия).

В трактовке капиллярограмм важно структурно-функциональное состояние капилляра, который в организме выполняет двойную функцию: обменную и транспортную. Артериальный его отдел является терминальным в артериальной системе и отражает насосную функцию сердца, а также транспортную функцию магистральных сосудов. На уровне артериального отдела происходит выход кислорода и питательных веществ из крови в ткани. В венозном отделе происходит возврат крови к сердцу, осуществляется выход продуктов метаболизма из тканей в кровь. Постепенное увеличение диаметра капилляра от начала артериального отдела к концу венозного, изменение направления потока крови в области переходного отдела, способствуют снижению скорости кровотока и, соответственно, к постепенному снижению гидростатического давления на протяжении капилляра. Данное морфологическое строение капиллярного русла эпонихии конечностей полностью согласуется с классической теорией Старлинга, которая объясняет механизмы транспорта воды через стенку капилляра соотношением гидростатического и коллоидно-осмотического давлений крови и тканевой жидкости [1, 7, 17].

В норме средняя линейная скорость капиллярного кровотока артериального отдела – 500–900 мкм/с, в венозном – 400–700 мкм/с. Градиент скорости составляет от 10 до 200 мкм/с. Кровоток в капиллярах носит колебательный характер. Его называют еще поршневым или болюсным кровотоком, скорость которого меняется от 300 до 1200 мкм/с до 4 раз в секунду. Эти изменения линейной скорости капиллярного кровотока зависят от: 1) пропульсивной работы сердца, 2) проходимости и эластичности магистральных сосудов, 3) вазомоторной активности артериоло-веноулярного звена сердечно-сосудистой системы, 4) состояния эндотелия капилляров. Колебательный характер капиллярного кровотока обусловлен также морфологическими и функциональными особенностями проксимально расположенных отделов: терми-

нального артериального отдела, венозного терминального отдела и переходного отдела. В норме капиллярный кровоток характеризуется наличием «язычков» крови, выходящих из артериального отдела в венозный. При хроническом вирусном гепатите С (В) капиллярный кровоток характеризуется отсутствием «язычков» крови, выходящих из артериального отдела в венозный, что свидетельствует о нарушении функции капилляра.



а



б

Рис. 2. Изображение капилляра эпонихии ногтевого ложа пальца руки в норме (а) и при хроническом вирусном гепатите С (б)

нальных артерий, резистивных сосудов – артериол, метартериол. На рис. 2 представлены примеры капиллярограмм в норме и при патологии.

Лазерная доплеровская флоуметрия. Метод основан на доплеровском сдвиге частот лазерного монохроматического сигнала при оптическом сканировании ткани, а также анализе частотного спектра сигнала, отраженного от движущихся в микроциркуляторном русле эритроцитов. Глубина оптического зондирования ткани существенно зависит от длины волны лазера и для красного излучения 632 нм она не превышает 1 мм [7, 12, 16]. Сигнал характеризует кровоток в микрососудах в

объеме 1–1,5 мм<sup>3</sup> ткани, около 3,4 x 10<sup>4</sup>/мкл эритроцитов. В 1992 г. в Лондоне европейская группа по лазерной доплеровской флоуметрии рекомендовала применять при исследованиях единый термин «Laser Doppler Perfusion» для описания выходного сигнала, определяемый как произведение линейной скорости эритроцитов на их концентрацию [13].

Окклюзионная проба при лазерной доплеровской флоуметрии позволяет выделить такие типы микроциркуляции: нормоциркуляторный, спастический (при снижении притока крови в микроциркуляторном русле из-за повышения тонуса микрососудов), гиперемический тип (при

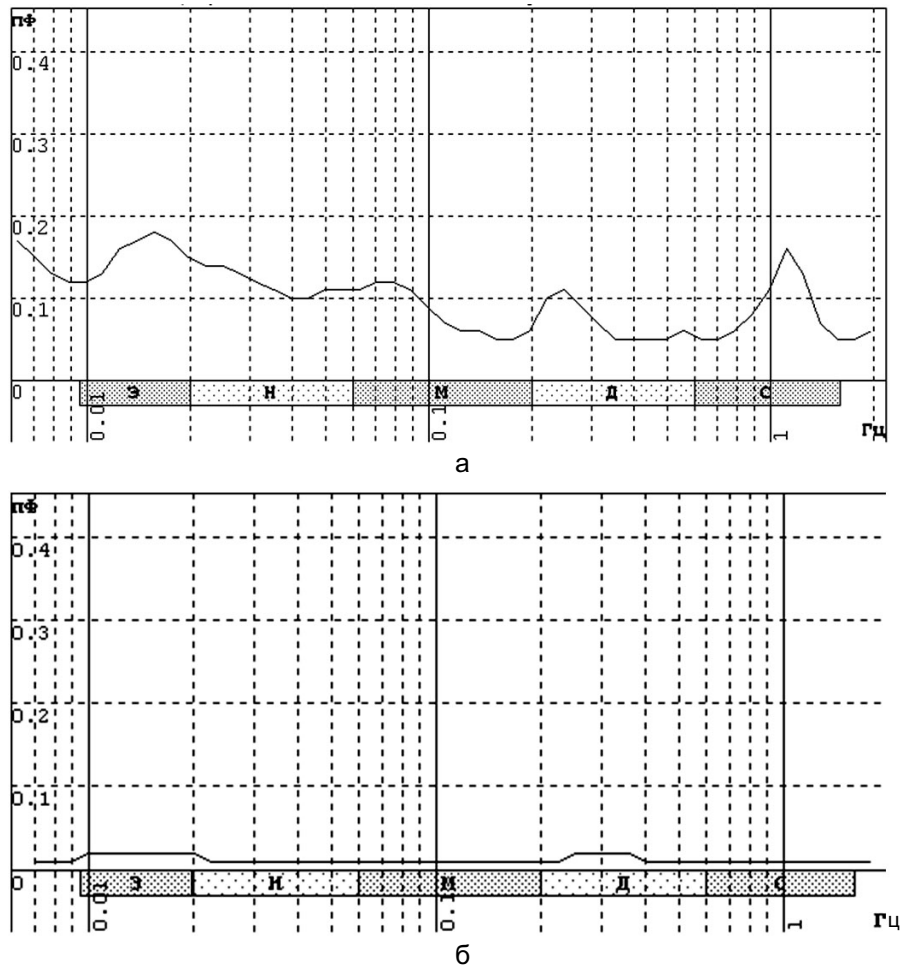


Рис. 3. График зависимости амплитуды эндотелиальных (Э), нейрогенных (Н), миогенных (М), дыхательных (Д) и сердечных (С) флуксуций от их частоты: а – здоровый волонтер, б – пациент (М.,47 лет) с хроническим вирусным гепатитом С и циррозом печени

увеличении притока крови в микроциркуляторном русле из-за дилатации сосудов притока), застойно-стазический (при парезе сосудов притока и нарушении оттока) [7, 12].

Колебательные процессы в микроциркуляторном русле при регистрации в лазерной доплеровской флоуметрии проявляются ритмическими флаксмоциями, которые зависят как от внешних пассивных воздействий на капилляры (кардиоритмы и дыхательные акты), так и связанные с активными механизмами: эндотелием капилляров, колебательными процессами нейрогенной и миогенной природы. Для оценки функционального состояния регуляторного звена микроциркуляции используют Вейвлет-анализ (рис. 3,4) [7, 12]. С – колебания стенки капилляров, обуслов-

ленные сокращением сердца, формируют пик в диапазоне частот синхронный пульсовым колебаниям (0,8–1,6 Гц), Д – в интервале частот респираторной функции колебания стенки капилляров формируют дыхательный пик (0,2–0,4 Гц). М – миогенная (0,07–0,12 Гц) и Н – (симпатическая) нейрогенная активность прекапиллярных сфинктеров выявляется максимальными частотами в диапазонах 0,02–0,052 Гц. Э – эндотелиальные (0,0095–0,02 Гц), наиболее медленные колебания в системе микроциркуляции, которые зависят от активности эндотелиоцитов, вследствие секреции ими разнообразных соединений, в частности – NO [18].

Цель нашей работы – изучить возможности методов капиллярорезистометрии,

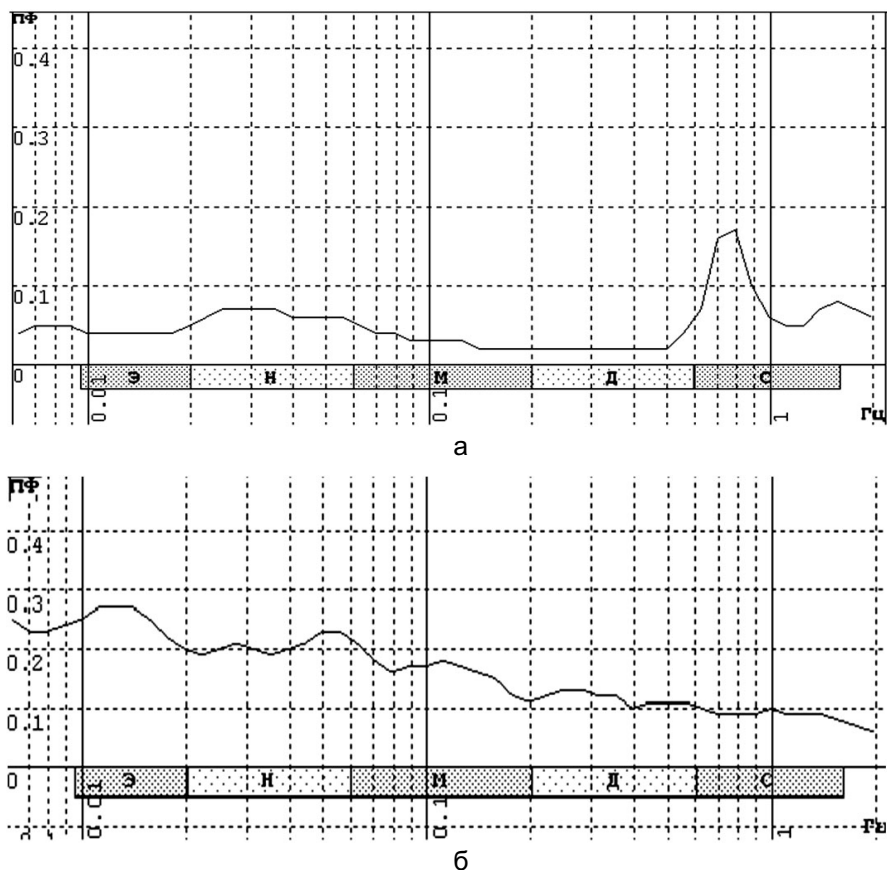


Рис. 4. График зависимости амплитуды эндотелиальных (Э), нейрогенных (Н), миогенных (М), дыхательных (Д) и сердечных (С) флаксмоций от их частоты: у пациента (Г., 65 лет) с хроническим вирусным гепатитом С до (а) и после внутривенного введения реосорблякта (б)

цифровой капилляроскопии и лазерной доплеровской флоуметрии в комплексной оценке состояния микроциркуляции кожи у здоровых лиц и у больных гепатитами различного генеза в динамике лечения реосорбилактом.

## МЕТОДИКА

В работе использованы методы: лазерной доплеровской флоуметрии, цифровой компьютерной капилляроскопии, капиллярорезистометрии. Обследованы 54 пациента: 51 мужчина и 3 женщины, среди которых 28 человек с хроническими диффузными заболеваниями печени: 5 – с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС), 8 – с алкогольным гепатитом, 8 – с неалкогольным стеатогепатитом, 7 – с хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ). Средний возраст пациентов –  $43,5 \pm 8,1$  лет. Группа контроля – 30 здоровых волонтеров 28 мужчин и 2 женщины без признаков поражения сосудистого русла и печени, средний возраст составил  $40,6 \pm 6,0$  лет. Этиологию вирусных гепатитов определяли с помощью иммуноферментного метода, а также методом амплификации с использованием полимеразной цепной реакции. ХВГВ диагностировали при наличии таких маркеров: HBsAg, HBeAg, anti-HBc IgM, anti-Hbc IgG, anti-HBe, DNA HBV. Для ХВГС определяли и HCV RNA та anti-HCV IgM. Также для верификации диагноза выполняли общие клинико-лабораторные исследования, дуплексное ультразвуковое исследование сосудов нижних конечностей, органов гепатобиллиарной зоны и спланхического кровотока на аппарате EnVisor C HD Philips.

В условиях манипуляционного кабинета стационара МНПО «Медбуд» проведено исследование эффективности препарата, влияющего на микроциркуляторное русло у больных гепатитами. Для коррекции нарушений микроциркуляции применяли

препарат реосорбилакт «Юрия-Фарм» в дозе 6–8 мл/кг внутривенного капельного введения. Реосорбилакт – плазмозамещающий раствор, оказывает реологическое, противошоковое, дезинтоксикационное действие, устраняет ацидоз. Основными фармакологическими активными веществами препарата являются сорбитол и натрия лактат. Сорбитол быстро включается в метаболизм, 80–90 % его утилизируется в печени и накапливается в виде гликогена, 5 % откладывается в тканях мозга, в миокарде и скелетных мышцах, 6–12 % выводится с мочой. В печени сорбитол вначале превращается в фруктозу, которая в дальнейшем трансформируется в глюкозу, а затем – в гликоген. Часть сорбитола расходуется для экстренных энергетических нужд, остальная – депонируется в виде гликогена. Сорбитол обладает дезагрегантным эффектом и таким образом улучшает микроциркуляцию и перфузию тканей. При введении в сосудистое русло натрия лактата высвобождается натрий,  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , образуется гидрокарбонат натрия, который приводит к увеличению щелочного резерва крови. В отличие от раствора гидрокарбоната коррекция метаболического ацидоза при использовании натрия лактата происходит постепенно по мере включения его в обмен веществ; при этом не возникает резких колебаний pH. Исследование микроциркуляции проводили перед и после введения препарата (на 25–40-й минуте инфузии). Использована доплеровская флоуметрия на аппарате ЛАКК-02 (Россия), капиллярорезистометрия и капилляроскоп нашей оригинальной конструкции на базе микроскопа «ЛОМО-5». Обследование пациентов *in situ* во время внутривенной инфузии препаратов потребовало изготовления мобильной лаборатории микроциркуляции для сочетания этих трех аппаратов на базе специального шасси с кронштейнами для фиксации исследуемой конечности пациен-

та. Информированное согласие получено предварительно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При капилляроскопии эпонихий пальцев рук пациентов с диффузными заболеваниями печени выявлена патологическая извитость капилляров у 64,3 % (n=18), расширение перикапиллярной зоны у 25 % (n=7) и стаз эритроцитов с расширением венозного отдела микроциркуляторного русла у 39,3 % (n=11).

Результаты комплексного исследования микроциркуляторного русла приведены в табл. 1 и 2.

У 92,8 % (n=26) пациентов с помощью метода капиллярорезистометрии выявлены расстройства микроциркуляции. Количество петехий в группе больных было достоверно больше, чем в контрольной на

5-й минуте пробы. После лечения реосорбилактом оно достоверно уменьшалось с  $16,3 \pm 5,1$  до  $10,7 \pm 1,8$  ( $P < 0,05$ ), хотя и превышало контроль.

При расшифровке результатов лазерной доплеровской флоуметрии микроциркуляции, а также Вейвлет-анализа отмечались достоверные отличия между показателями контрольной группы и пациентов с диффузными заболеваниями печени.

Методом лазерной доплеровской флоуметрии у 67,8 % пациентов (n=19) с диффузными заболеваниями печени выявлены разнообразные расстройства микроциркуляции. При этом у 35,7 % (n=10) преобладал застойно-стазический гемодинамический тип микроциркуляции, у 14,3 % (n=4) – гиперемический тип, у 18 % (n=5) – спастический тип. Значение показателя микроциркуляции было меньшим в группе

**Таблица 1. Динамика показателей капиллярорезистометрии у здоровых волонтеров и больных с нарушением микроциркуляции на фоне введения реосорбилакта**

Количество петехий	Контроль (n=30)	Диффузные заболевания печени (n=28)	
		до введения реосорбилакта	после введения реосорбилакта
После снятия разрежения на 1-й секунде	2,9±0,6	12,4±9,5	8,2±2,3
через 5 мин	3,7±1,5	16,3±5,1	10,7±1,8*

\* $P < 0,05$  по сравнению с показателями до инфузии.

**Таблица 2. Показатели лазерной доплеровской флоуметрии (пф.ед.) у здоровых волонтеров и больных хроническими гепатитами на фоне введения реосорбилакта**

Показатель	Контроль (n=30)	Диффузные заболевания печени (n=28)	
		до введения реосорбилакта	после введения реосорбилакта
Показатель микроциркуляции	4,51±1,50	3,12±0,20	4,45±2,01*
Максимальная амплитуда			
эндотелиальных флаксмоций	0,29±0,06	0,21±0,01*	0,28±0,03
нейрогенных флаксмоций	0,37±0,09	0,27±0,01*	0,37±0,08**
миогенных флаксмоций	0,32±0,01	0,23±0,02*	0,36±0,01**
дыхательных флаксмоций	0,24±0,02	0,19±0,03	0,18±0,04
сердечных флаксмоций	0,41±0,04	0,16±0,01*	0,2±0,014

\* $P < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; \*\* $P < 0,05$  – с показателями до инфузии реосорбилакта.



больных с диффузными заболеваниями печени, что свидетельствовало о нарушении этой системы. Максимальная амплитуда эндотелиальных флаксмоций, была достоверно меньше в группе пациентов с диффузными заболеваниями печени по сравнению с контрольной, что указывает на выраженные процессы апоптоза эндотелиоцитов при гепатитах [15]. Максимальная амплитуда флаксмоций кардиоритма (перфузионные единицы) была достоверно снижена у пациентов с диффузными заболеваниями печени – 0,16 пф.ед  $\pm$  0,01 пф. ед. по сравнению с контролем – 0,41 пф.ед.  $\pm$  0,04 пф.ед. ( $P < 0,05$ ). Это может быть связано с тем, что благодаря авторегуляции повышенный тонус прекапилляров и артериол уменьшает приток крови в микроциркуляторном русле с целью защиты его от перенаполнения (полнокровия) в ответ на выраженное затруднение веноулярного оттока. Нейро- и миогенная активность у больных была достоверно меньше, а максимальная амплитуда флаксмоций нейротонуса ниже, чем в контрольной группе ( $P < 0,05$ ). После введения реосорбилакта отмечается достоверное повышение показателя микроциркуляции ( $P < 0,05$ ), а также максимальной амплитуды флаксмоций нейротонуса и миотонуса, что свидетельствует о его достоверном влиянии на микроциркуляцию кожи у пациентов с диффузными заболеваниями печени. Таким образом, помимо влияния на реологию крови, действие реосорбилакта направлено на эндотелиальный и, в меньшей мере нейрогенный механизмы регуляции. Это приводит к снижению тонуса прекапиллярных сфинктеров в микроциркуляторном русле и улучшению региональной микроперфузии, что может быть связано с улучшением энергетического обмена в эндотелиоцитах. Подобные данные получены при использовании метода лазерной доплеровской флоуметрии с определением агрегации и вязкости крови: у пациентов пожилого возраста с ишемической болез-

нью сердца на фоне инфузионной терапии реосорбилактом отмечалось достоверное улучшение показателя микроциркуляции, а также реологических свойств крови [8]. Благодаря высокой осмолярности реосорбилакт вызывает перемещение жидкости из межклеточного пространства в сосудистое русло, что способствует улучшению микроциркуляции и перфузии тканей. Кроме того, он уменьшает локальное накопление провоспалительных агентов: фактора некроза опухолей  $\alpha$ , интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-6, ИЛ-8, тромбосана, фактора Виллебранда, эндотелинов, фибриногена, С-реактивного протеина и др., что способствует улучшению функционального состояния эндотелия [5]. По мнению Гаврисюка [4] реосорбилакт образует молекулярный слой на поверхности форменных элементов крови и эндотелия, что приводит к эффекту дезагрегации и восстановлению микроциркуляции. Форменные элементы приобретают возможность более легкого «скольжения» в просвете капилляра.

## ВЫВОДЫ

1. С помощью метода капиллярорезистометрии можно выявить поражение эндотелия у больных с хроническими диффузными заболеваниями печени и осуществить простой и надежный контроль хода лечения.

2. Метод лазерной доплеровской флоуметрии может иметь диагностическое значение для исследования состояния различных уровней регуляции микроциркуляции у пациентов с патологией печени и для динамического наблюдения за контролем эффективности назначаемого лечения.

3. Препарат реосорбилакт после внутривенной инфузии по данным лазерной доплеровской флоуметрии и капиллярорезистометрии достоверно улучшает состояние микроциркуляторного русла кожи у пациентов с диффузными заболеваниями печени.

4. Капилляроскопия позволила выявить увеличение перикапиллярной зоны и патологическую извитость капиллярных петель кожи эпонихия как ремоделирование микроциркуляторного русла при хронических диффузных заболеваниях печени.

5. Комплекс методов (капиллярорезистометрия, цифровая капилляроскопия, лазерная доплеровская флоуметрия) в клинической практике может использоваться не только для выявления структурных и функциональных нарушений системы микроциркуляции, а также служить контролем коррекции этих расстройств у пациентов с диффузными заболеваниями печени.

**O.B.Dynnyk, S.E.Mostovjy, V.A.Beresovsky**

#### **BIOPHYSICS METHODS ESTIMATIONS OF THE CONDITION MICROCIRCULATORY SYSTEM SKIN IN CLINICAL PRACTICE**

In this work has been analyzed the potential of biophysics methods in estimations of the microcirculatory system. Capillaroresistometry, Computer capillaroscopy and Laser Doppler Flowmetry can to detect of the endothelial dysfunction in the patients with chronic hepatic diseases. This instrumentals biophysics methods may be used in clinical investigations for screening early pathological conditions with dysfunction of the microcirculatory system. The methods Laser Doppler Flowmetry is important for investigations the patients with others diseases and for dynamical monitoring by quality of the treatment. The purpose of these methods an objective estimation of disorders in the microcirculatory system.

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

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Баранов В.В., Кленин С.М., Кузнецов М.И. и др. Идентификация форменных элементов крови в капиллярном русле на основе анализа видеоизображений высокого разрешения // Науч. центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН. – М., 2005. – С. 20–21.
2. Баркаган З.С. Геморрагические заболевания и синдромы. – М.: Медицина, 1988. – 96 с.
3. Дементьева И.И., Момот А.П. и др. Методы исследования тромбоцитарного гемостаза // Клинич. гемоста-

- зиология (электрон. журн.) – 2001. – №3. – С. 52–52.
4. Гаврисюк В.К. Коррекция реологических свойств крови в комплексном лечении больных с декомпенсированным хроническим легочным сердцем // Кровообіг та гемостаз. – 2005. – №3–4. – С.125–128.
5. Гуменюк Н.И. Сравнительная эффективность неогемодеза, сорбилакта и реосорбилакта в комплексной инфузионной дезинтоксикационной терапии // Сімейна медицина. – 2004. – №2. – С.68–72.
6. Динник О.Б., Мостовий С.Є. Патент на корисну модель № 19903 від 27.03.2006. и 200603203. Пристрій для визначення резистентності капілярів // Промислова власність. Винаходи. Корисні моделі. Оф. Бюл. №1. кн. 1. – С. 5.15–5.17.
7. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови / Под ред. Крупаткина А.И., Сидорова В.В.: Руководство для врачей. – М.: Медицина, 2005. – 256 с.
8. Лишневская В.Ю. Опыт применения реосорбилакта у пациентов старших возрастных групп и ИБС // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – №2. – С. 73–75.
9. Логинов Н.К. Оценка кровоснабжения жевательных мышц при ультразвуковой доплерографии : Пособие для врачей. – М.: Центр. НИИ стоматологии, 2005. – 20 с.
10. Лущик У. Б., Новицкий В.В. и др. Сучасні можливості капіляроскопії // К.: Істина, 2005. – 136 с.
11. Люсов В.А., Белоусов Ю.Б. Лечение тромбозов и геморрагия в клинике внутренних болезней. – М.: Медицина, 1976. – 150 с.
12. Микроциркуляция в кардиологии / Под ред. Маколкина В.И. – М.: Визарт, 2004. – 135 с.
13. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. – СПб.: Изд-во мед. ун-та, 2003. – 184 с.
14. Ройтберг Г.Е., Струтынский А.В. Лабораторная и инструментальная диагностика заболеваний внутренних органов. – М.: Медицина, 2001. – 337 с.
15. Руководство по гематологии / Под ред. Воробьева А.И. – М.: Медицина, 1985. – Т.2 – 201 с.
16. Трофименко О.А., Онищенко В.С. Патент на корисну модель № 21115 від 15.02.2007. Спосіб лазерної доплерівської флоуметрії для визначення особливостей васкуляризації слизової оболонки пародонта. – Промислова власність. Винаходи. Корисні моделі. Оф. Бюл. №2. кн. 1. С. 5.21–5.22.
17. Allen S. J. New conceptions of the treatment pulmonary edema // J. Clin. Anesth. Univ. Texas Med. School, Houston. – 2007. – 12(4). – P. 288–291.
18. Stefanovsca A., Klermnno H.D., Kirkeboen K.A. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-independent vasodilators // Microvascular. Res. – 1999. – May, 57(3) – P. 19–24.

*Ин-т физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев*

*E-mail: dynnyk@ultrasound.net.ua*