

Фізіологічний журнал

ТОМ 56 № 6 2010

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Мізерна О.П., Федулова С.А., Веселовський М.С.</i> Неоднорідний розподіл і внесок Р- та Р/Q-типів кальцієвих каналів у короткочасну пластичність гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа	3
<i>Хорсвін В.І.</i> Вплив іонофоретично аплікованих L-ДОФА та кетаміну на імпульсну активність нейронів сенсомоторної кори під час виконання умовнорефлекторних рухів	12
<i>Кузнецов К.І., Маслов В.Ю., Федулова С.А., Веселовський М.С.</i> Вплив 4амінопіридинчутливого компонента калієвого струму на високочастотну тонічну імпульсацію гангліозних клітин сітківки ока шура	22
<i>Починюк О.В., Заїка О.Л., Садовий О.В., Яворська О.М., Костюк П.Г., Лук'янець О.О.</i> Участь синаптотагміну у вивільненні катехоламінів хромафінними клітинами надниркової залози шура	31
<i>Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Неццет О.П., Мойбенко О.О.</i> Вплив нового активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну на зміни вмісту глюкози в крові	39
<i>Тамарова З.А., Лиманський Ю.П., Костюк О.І., Мітрузаєва В.А., Лиманська Л.І.</i> Дія червоного поляризованого світла на точку акупунктури Е-36 підсилює протибольовий ефект корвітину	48
<i>Хаврона О.П., Фартушок Н.В., Федевич Ю.М., Сольські Я., Склярів О.Я.</i> Зміни окисно-відновних процесів і жирнокислотного складу ліпідів печінки щурів за умов стрептозотоцинового діабету	55
<i>Харчук І.В., Філінська О.М., Яблонська С.В., Рибальченко В.К.</i> Вплив похідного малеїміду на морфофункціональний стан нирок щурів за умов експериментального канцерогенезу товстої кишки	62
<i>Калініченко О.В., Мишуніна Т.М., Тронько М.Д.</i> Катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих з папілярною карциномою щитоподібної залози	70

Гаращук О.В., Цупиков О.М., Цимбалюк В.І. Вплив пізньої трансплантації фетальної нервової тканини на цитоархітекtonіку гіпокампа у віддаленому періоді після транзиторної глобальної ішемії головного мозку щурів 81

Гуріна Н.М., Корпачева-Зінич О.В., Шупрович А.А. Взаємозв'язки показників обміну сечової кислоти зі вмістом інсуліну та тестостерону в чоловіків, хворих на цукровий діабет 2-го типу 93

Недзвецкий В.С., Неруш П.О. Вплив гіпертиреозу на когнітивні процеси та стан гліальних проміжних філаментів головного мозку щурів 100

ІСТОРІЯ НАУК

Сагач В.Ф., Киенко В.М., Яценко К.В. 200 років від дня народження Миколи Івановича Пирогова 108

ДИСКУСІЯ

Атаман О.В. Сучасні виклики патофізіології як навчальній дисципліні. Куди йдемо? . . . 112

ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ

Василь Павлович Пішак (до 70-річчя з дня народження) 116

Олег Іванович Сукманський (до 80-річчя з дня народження) 119

О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

Неоднорідний розподіл і внесок P- та P/Q-типів кальцієвих каналів у короткочасну пластичність гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа

Ми досліджували чутливість ГАМКергічної короткочасної пластичності до селективного блокатора P- та P/Q-типу кальцієвих каналів ω -агатоксину-IVA. Для блокування P-типу каналів ми використали 30 нмоль/л цього токсину, а для блокування P/Q-типу – 200 нмоль/л. Щоб реєструвати викликані гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС) застосовували методики фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» та позаклітинної локальної електричної стимуляції аксона пресинаптичного нейрона. З'ясовано, що внесок P-типу каналів у ГАМКергічну синаптичну передачу між культивованими нейронами гіпокампа становить приблизно 30 % від загального, а P/Q-типу – 45 %. Показано, що опосередкований внесок цих каналів в амплітуду вГПСС досліджених нами нейронів є різним для кожного з них, тобто їх розподіл у пресинаптичній мембрані є неоднорідним. Для дослідження короткочасної пластичності гальмівної синаптичної передачі аксон пресинаптичної клітини стимулювався парами імпульсів струму з інтервалом у 150 мс між ними. Досліджені нами нейрони демонстрували як депресію, так і полегшення. Аплікація 30 нмоль/л блокатора зменшувала депресію та збільшувала полегшення на 8 %, а аплікація 200 нмоль/л – на 11 %. Також з'ясовано, що у здійсненні синаптичної передачі після другого стимулу опосередкований внесок P- та P/Q-типу кальцієвих каналів у вивільнення нейромедіатора на 4 % менший, ніж після першого. Отже, блокування цих каналів може змінювати ефективність синаптичної передачі, наразі – полегшує її проведення, зменшуючи депресію або збільшуючи полегшення. Отримані результати підтверджують, що P- і P/Q-типи кальцієвих каналів відіграють дуже важливу роль у проведенні синаптичної передачі і безпосередньо беруть участь у регуляції короткочасної пластичності ГАМКергічної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа.

Ключові слова: P- та P/Q-типи кальцієвих каналів, ω -агатоксин-IVA, ГАМКергічна синаптична передача, короткочасна пластичність.

ВСТУП

Вивільнення нейромедіатора відбувається через 200 мкс після поширення потенціалу дії в нервові закінчення [14]. Для екзоцитозу синаптичних везикул необхідна висока локальна концентрація кальцію біля місць вивільнення нейромедіатора, приблизно від 100 мкмоль/л до 50 ммоль/л [30]. Нано- чи мікродомени високої концентрації в пресинаптичній нервовій терміналі формуються завдяки входу іонів кальцію через потен-

ціалкервані кальцієві канали [12, 15, 33, 34]. Синаптична передача в ЦНС ссавців є результатом одночасної активації різних типів високопорогових кальцієвих каналів, які різняться фармакологічними і біофізичними характеристиками: L, N, P, Q і R [8, 4]. Проте участь у регуляції швидкої синаптичної передачі беруть тільки N, P, Q і R-типи пресинаптичних кальцієвих каналів [16, 35, 25, 19]. В гіпокампі швидка синаптична передача є результатом активації переважно тільки N- та P- і Q-типів. Хоча

© О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

R-тип кальцієвих каналів бере участь у регуляції швидкої збудливої синаптичної передачі між нейронами гіпокампа [10], його внесок у вивільнення медіатора на відміну від N- та P- і Q-типів дуже малий [8, 24, 42, 43, 5]. Відомо, що в пресинаптичній терміналі нейронів CA3-CA1 зони гіпокампа наявні принаймні три фармакологічно різні компоненти кальцієвого струму: N-тип, P - і Q -типи [40, 41].

Важливою і невід'ємною властивістю хімічних синапсів у ЦНС є пластичність, тобто здатність їх до функціональних і морфологічних змін у процесі активності. Саме завдяки цій властивості синапси виконують багато різноманітних фізіологічних функцій в організмі. Для дослідження короточасної пластичності синаптичної передачі (триває від секунди до кількох хвилин) використовують протокол стимуляції парою імпульсів. Пластичність при парній стимуляції – це зміна ефективності синаптичної передачі за рахунок попередньої активності, тобто зміна амплітуди другого постсинаптичного струму у порівнянні з амплітудою першого [29, 32, 39]. У результаті такої стимуляції спостерігається полегшення до депресії при парній стимуляції.

Дослідження, що були проведені на центральних синапсах ссавців, визначили, що пресинаптичні кальцієві канали відіграють важливу роль у регуляції короточасної синаптичної пластичності [44]. Роль N- типу кальцієвих каналів у регуляції ГАМКергічної пластичності при парній стимуляції було досліджено в попередніх роботах [2], тому зараз ми зосередили увагу виключно на P - і Q -типах.

Поріг активації кальцієвих струмів, що проходять через P-канали, знаходиться в діапазоні -60 – -40 мВ. Струми P-типу характеризуються потенціалзалежною інактивацією. Q-тип кальцієвих каналів має поріг активації струму приблизно -50 мВ. ω -Агатоксин-IVA – пептид, виділений із

отрути паука *Agelenopsis aperta* [3], вважається специфічним блокатором P- і Q-типів кальцієвих каналів, однак, якщо P-тип чуттєвий до наномолярних концентрацій цього токсину (20–30 нмоль/л), то для блокування Q-типу необхідна концентрація в 10–100 разів більша [18].

МЕТОДИКА

Приготування культури дисоційованих нейронів гіпокампа. Для отримання культури використовували новонароджених щурів лінії Вістар. Тварин декапітували, головний мозок вмішували в мінімальне середовище Ігла («Sigma», США) з додаванням 20 ммоль/л буфера HEPES, 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну та 25 мкг/мл сульфату стрептоміцину. Гіпокамп відокремлювали за допомогою скальпеля та нарізали на поперечні смужки завтовшки 1–2 мм. Ферментативну обробку здійснювали 0,05%-м розчином трипсину (тип II, «Sigma», США) при кімнатній температурі (23–25 °C) протягом 7 хв. Потім тканину двічі промивали розчином для культивування такого складу: мінімальне середовище Ігла, кінська сироватка – 10 %, інсулін – 6 мкг/мл, бікарбонатний буфер NaHCO_3 – 2,3 мг/мл, натрієва сіль бензилпеніциліну – 25 од/мл і сульфат стрептоміцину – 25 мкг/мл. Суспензію клітин отримували за допомогою механічної дисоціації набором пастерівських піпеток з діаметрами кінчиків, які послідовно зменшувалися. Клітини висаджували в чашку Петрі, яка була попередньо оброблена полі-L-орнітином. У скляне кільце діаметром 6 мм, яке обмежувало площу посадки, наливали 200 мкл суспензії. Чашки Петрі з суспензією вмішували в інкубатор («Jouan», Франція) з контрольованими вмістом двоокису вуглецю (5 % CO_2) в повітряно-газовій суміші і температурним режимом (37 °C) та постійним пасивним зволоженням. На 3-тю добу культивування для пригнічення проліферації

гліальних клітин у середовище додавали цитозин-в-Д-арабіно-фуранозид (5 мкмоль/л). Режим обробки культури за допомогою останнього підбирали, щоб пригнітити проліферацію гліальних клітин на такій стадії, коли кількість астроцитів була достатньою для утворення гліального моношару. Повторну повну заміну розчину для культивування проводили через 24 год.

Електрофізіологічні методи. Для вимірювання викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС), які відводили від культивованих нейронів гіпокампа, було застосовано метод фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина». Експериментальна установка для реєстрації іонних струмів була зібрана на базі інвертованого мікроскопа Axiovert 35 («Carl Zeiss», Німеччина). Використовували також підсилювач електричних сигналів Axopatch-1D («Axon Instruments», США), який давав можливість вимірювати постсинаптичні струми у режимі фіксації потенціалу та визначати природний потенціал спокою нейронів в режимі фіксації струму. Підтримуваний потенціал в експериментах становив – 50 мВ. Потенціал спокою всіх клітин знаходився у межах від – 50 до – 60 мВ.

Електричні сигнали, які відводили від нервових клітин, піддавали фільтрації за допомогою апаратного високочастотного фільтра Бесселя з частотою зрізу 2 кГц. Оцифровку результатів під час експерименту здійснювали аналого-цифровим перетворювачем TL-1 («Axon Instruments», США) з частотою дискретизації 10 кГц. Для подальшої обробки та аналізу ГПСС використовувався програмний пакет pClamp 9.0 («Axon Instruments», США).

Локальну електричну стимуляцію проводили за допомогою приладу з ізольованим виходом ISO-Flex («AMPI», Ізраїль). Стимуляційну мікропіпетку з діаметром отвору близько 2 мкм, яку виготовляли за технологією аналогічно піпеткам для реєстрації струмів, заповнювали стандарт-

ним зовнішньоклітинним сольовим розчином і з'єднували з виходом стимулятора. Опір піпетки, заповненої таким розчином, становив 7–9 МОм. Постсинаптичні струми були викликані подразненням аксона пресинаптичної клітини прямокутними імпульсами струму негативної полярності тривалістю 0,4 мс. Частота стимуляції становила 0,5 Гц, а інтервал між імпульсами в парі – 150 мс, оскільки така тривалість міжімпульсного інтервалу є оптимальною для дослідження депресії вГПСС [11].

У дослідах використовували зовнішньоклітинний розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, глюкозу – 30, HEPES – 20; pH 7,4 (NaOH); до цього розчину додавали також блокатори збуджувальної нейропередачі D_L-2-аміно-5-фосфоновалеріанову кислоту і 6,7-динітрохіноксалін-2,3-діон у концентрації 20 мкмоль/л. Розчин для заповнення реєструвальної скляної піпетки містив (ммоль/л): глюконат калію – 155, MgCl₂ – 2, EGTA – 10, HEPES – 20; pH 7,4 (KOH).

Для аплікації фармакологічних речовин було застосовано методику швидкої локальної суперфузії, розробленої спеціально для роботи з моношаровою культурою клітин [37]. Результати в тексті представлені у вигляді «середнє значення» ± «середньоквадратична похибка середнього (S.E.M.)». Для визначення статистичної достовірності різниці між середніми значеннями двох груп даних було використано критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Основним гальмівним нейромедіатором у головному мозку ссавців є γ -аміномасляна кислота (ГАМК), яка активує різні типи ГАМК-рецепторів [9]. Оскільки канали ГАМК_A-рецепторів є проникними для іонів хлору, ефект активації цих рецепторів буде залежати від електрохімічного градієнта

для іонів хлору на постсинаптичній мембрані [17]. Використовуючи стимуляцію аксона пресинаптичної клітини прямокутними імпульсами струму при різних значеннях підтримуваного потенціалу були зареєстровані (вГПСС), для яких побудовано вольт-амперні характеристики. Приклад такої кривої наведено у попередній роботі [1]. З графіка було визначено величину потенціалу реверсії, який практично відповідав розрахованому рівноважному потенціалу для Cl^- . Це вказує на те, що отримані вГПСС опосередковані через ГАМК_A-рецептори, які розташовані на постсинаптичній мембрані.

У експериментах, проведених на нейронах гіпокампа, з використанням селективних блокаторів кальцієвих каналів, було показано, що P- і Q-типи кальцієвих каналів є домінуючими у регуляції вивільненні нейромедіатора як у збудливих, так і в гальмівних синапсах [7, 16, 23, 31, 35, 38, 40]. У нашій роботі, для того щоб дослідити внесок P- і Q-типів кальцієвих каналів у ГАМКергічну синаптичну передачу між культивованими нейронами гіпокампа ми використали блокатор цих каналів. Пептид ω -агатоксин-IVA є специфічним блокатором P- і Q-типів кальцієвих каналів [3]. Для блокування P- і Q-типу каналів ми використали 30 і 200 нмоль/л цього токсину відповідно. Оскільки при дії Q-типу щ-агатоксину блокується і P-тип, загальноприйнято позначати ефект такої концентрації токсину як блокування P/Q – типу кальцієвих каналів. Аплікація агатоксину дозозалежно зменшувала амплітуду вГПСС (див. рис. 1,а,в). На тлі змін амплітуди досліджуваних струмів кінетичні показники не змінювалися (рис. 1,б,г). У серії цих експериментів було визначено, що усереднена амплітуда після блокування P-типу кальцієвих каналів становила приблизно 70 % від такої у контролі, а після блокування P/Q-типу кальцієвих каналів – 55 %. Тобто аплікація 30 нмоль/л агатоксину достовірно

пригнічувала амплітуду вГПСС на 30 % \pm 4 %, а 200 нмоль/л – на 45 % \pm 4 %. Отже, можна зробити висновок, що внесок P-типу каналів у ГАМКергічну синаптичну передачу між культивованими нейронами гіпокампа становить приблизно 30 % від загального, а P/Q-типу – 45 %. Наші результати узгоджуються із даними, отриманими раніше на культивованих нейронах гіпокампа при використанні 100 нмоль/л агатоксину. В цій роботі внесок P/Q-типу кальцієвих каналів в ГАМКергічну синаптичну передачу був визначений як 36 % [23]. Із досліджень, проведених на поодиноких бутонах пірамідальних нейронів зони CA1 гіпокампа, відомо, що аплікація 300 мкмоль/л агатоксину зменшувала амплітуду фокально викликаного ГПСС на 83 % [21].

Відомо, що пресинаптичні терміналі одного й того самого нейрона дуже відрізняються за внеском різних типів кальцієвих каналів у вивільнення нейромедіатора, в одних домінують P-, P/Q- типи, в інших – N-типи, а є й такі, що мають однаковий внесок їх усіх [20, 26]. У культурі нейронів гіпокампа показано, що розподіл потенціалкероаних пресинаптичних кальцієвих каналів теж є неоднорідним [27, 28], особливою неоднорідністю відзначаються ГАМКергічні нейрони [21]. На рис.1,е представлена гістограма, що показує розподіл опосередкованого внеску P- і P/Q-типів кальцієвих каналів у амплітуду вГПСС в усіх досліджених нами нейронах. Внесок кальцію, що проходить через P-тип каналів у вивільнення ГАМК у культурі нейронів гіпокампа може становити від 5 до 65 %, а через P/Q-тип – від 25 до 65 %. Ці результати підтверджують неоднорідність розподілу P- і P/Q-типів каналів у культурі нейронів гіпокампа.

Після визначення ролі кожного типу високопорогових кальцієвих каналів у регуляції гальмівної синаптичної передачі було досліджено пластичність синаптичної

передачі при стимуляції парами імпульсів. Із досліджень, проведених на нейронах культури гіпокампа було показано, що пластичність регулюється пресинаптичними механізмами, які пов'язані зі входом кальцію у пресинаптичну терміналь [45]. Відомо, що в механізмах вивільнення нейромедіатора та формування синаптичної пластичності вхід Ca^{2+} в пресинаптичну терміналь саме через потенціалкеровані кальцієві канали відіграє вирішальну роль.

Тому в наступній серії експериментів ми досліджували роль P- і P/Q-типів кальцієвих каналів у регуляції короточасної пластичності гальмівної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа.

Парні постсинаптичні струми були викликані подразненням аксона пресинаптичної клітини прямокутними імпульсами струму з інтервалом у 150 мс між ними. При аплікації агаатоксину амплітуда обох парних вГПСС достовірно дозозалежно зменшувалась (рис. 2,а,б). Це може свідчити про те що кальцій, який входить у пресинаптичне закінчення через ці типи кальцієвих каналів бере участь у вивільненні ГАМК як після першого, так і після другого стимулу. Проте амплітуда першого вГПСС

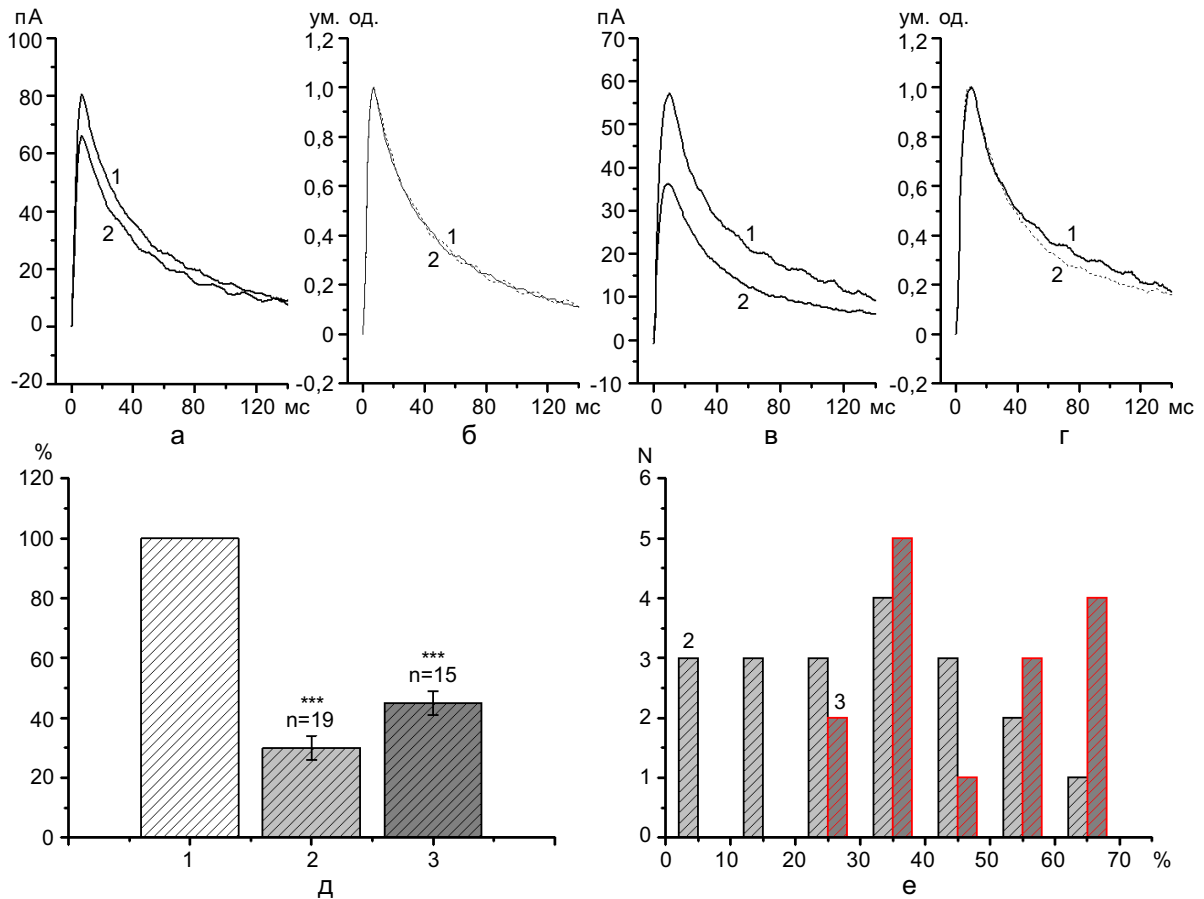


Рис.1. Дія ω -агаатоксину на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС) між культивованими нейронами гіпокампа. а, в – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі та при аплікації ω -агаатоксину, б, г – нормовані усереднені вГПСС: 1 – контроль, 2, 3 – дія 30 і 200 нмоль/л ω -агаатоксину відповідно; д – гістограма, що показує нормоване усереднене значення опосередкованого внеску P- та P/Q-типу кальцієвих каналів у амплітуду вГПСС. За 100 % прийнято значення у контролі; е – гістограма, що показує розподіл внеску P- та P/Q-типу кальцієвих каналів у гальмівну синаптичну передачу досліджених нейронів. На д, е: 1 – контроль, 2, 3 – внесок P- і P/Q-типу відповідно кальцієвих каналів. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

зменшувалася на 4 % більше порівняно з другим. Отже, можна зробити висновок, що після другого стимулу, опосередкований внесок P- і P/Q-типу кальцієвих каналів у вивільнення нейромедіатора на 4 % менший, ніж після першого стимулу.

Як кількісну міру синаптичної пластичності нами було обрано коефіцієнт парної стимуляції (КПС), який обчислювали як відношення амплітуди другого вГПСС у парі до першого. Досліджені нами нейрони демонстрували як депресію, так і полегшення при парній стимуляції. У ГАМКергічних синапсах вже було охарактеризовано

депресію [5] і полегшення при парній стимуляції [22, 36]. Оскільки нейронів, які б демонстрували полегшення (n = 3) було набагато менше, ніж тих, що демонстрували депресію (n = 19), тому їх не розділяли на дві групи. Отже, більш правильним є представляти КПС через відносні величини. Підраховані значення КПС ми представили нормованими відносно контролю. Аплікація блокаторів кальцієвих каналів достовірно збільшувала усередненні нормовані значення КПС. При аплікації 30 нмоль/л агатоксину КПС збільшився на 8 % ± 3 %, а при аплікації 200 нмоль/л – на

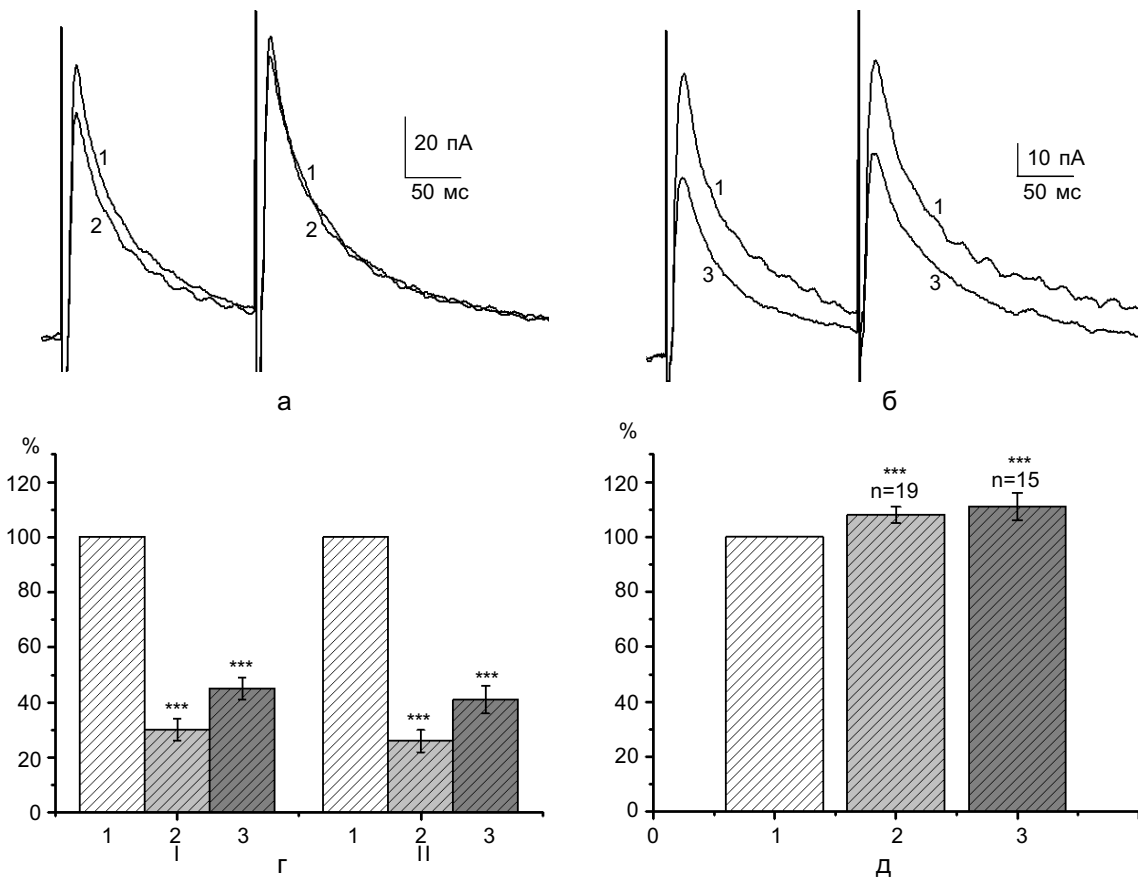


Рис.2. Вплив ω-агатоксину на пластичність гальмівної синаптичної передачі між культивованими нейронами гіпокампа. а, б – приклад реєстрації усереднених викликаних парою імпульсів гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) у контролі та при аплікації ω-агатоксину. На а, б, г: 1 – контроль, 2, 3 – дія 30 і 200 нмоль/л ω-агатоксину відповідно, в – гістограма, що показує нормоване усереднене значення опосередкованого внеску P- та P/Q-типу кальцієвих каналів в амплітуду першого та другого вГПСС у парі. На в: 1 – контроль, 2, 3 – внесок P- і P/Q-типу кальцієвих каналів: I, II – 1-й і 2-й вГПСС у парі відповідно, г – гістограма, що показує збільшення нормованих усереднених значень коефіцієнта парної стимуляції при аплікації ω-агатоксину. За 100 % прийнято значення у контролі. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001

11 % ± 5 %. Отже, блокування як P-, так і P/Q-типу кальцієвих каналів може змінювати ефективність синаптичної передачі, наразі – полегшує її проведення, зменшуючи депресію або збільшуючи полегшення. Наші результати узгоджуються із даними, отриманими на більшості синапсах ЦНС [13, 45].

Отримані результати підтверджують, що P- і P/Q-типи кальцієвих каналів відіграють дуже важливу роль у проведенні синаптичної передачі і безпосередньо беруть участь у регуляції короткочасної пластичності ГАМКергічної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. За допомогою блокатора продемонстрована наявність цих каналів в аксоні кожного дослідженого пресинаптичного нейрона культури гіпокампа. Була підтверджена неоднорідність розподілу P- і P/Q-типів каналів у культурі нейронів гіпокампа.

О.П. Мизерна, С.А. Федулова,
Н.С. Веселовский

НЕОДНОРОДНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ВКЛАД P- И P/Q-ТИПОВ Кальциевых КАНАЛОВ В КРАТКОВРЕМЕННУЮ ПЛАСТИЧНОСТЬ ТОРМОЗНОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ МЕЖДУ НЕЙРОНАМИ КУЛЬТУРЫ ГИППОКАМПА

Мы исследовали чувствительность ГАМКергической кратковременной пластичности к селективному блокатору P- и P/Q-типа кальциевых каналов ω -агатоксину-IVA. Для блокирования P-типа каналов мы использовали 30 нмоль/л этого токсина, а для блокирования P/Q-типа – 200 нмоль/л. Для измерения вызванных тормозных постсинаптических токов (вТПСТ) были использованы методики фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» и внклеточной локальной электрической парной стимуляции аксона пресинаптического нейрона. Было выяснено, что вклад P-типа каналов в ГАМКергическую синаптическую передачу между культивированными нейронами гиппокампа составляет приблизительно 30 % от общего, а вклад P/Q-типа – 45 %. Показано, что опосредованный вклад этих каналов в амплитуду вТПСТ исследованных нами нейронов являются разным для каждого из них, т. е. их распределение неоднородно. Для исследования кратковременной пластичности тормозной синаптической передачи аксон пресинаптической клетки стимулировался парами им-

пульсов тока с интервалом в 150 мс между ними. Исследованные нами нейроны демонстрировали как депрессию, так и облегчение. Апликация 30 нмоль/л блокатора уменьшала депрессию и усиливала облегчение на 8 %, а апликация 200 нмоль/л – на 11 %. Также определено, что в проведении синаптической передачи после второго стимула, опосредованный вклад P- и P/Q-типа кальциевых каналов в освобождение нейромедиатора на 4 % меньше, чем после первого стимула. Следовательно, блокирование как P- так и P/Q-типа кальциевых каналов может изменять эффективность синаптической передачи, в данному случае – облегчать ее проведение, уменьшая депрессию или усиливая облегчение. Полученные результаты подтверждают, что P- и P/Q-типы кальциевых каналов играют очень важную роль в проведении синаптической передачи и непосредственно принимает участие в регуляции кратковременной пластичности ГАМКергической синаптической передачи между нейронами культуры гиппокампа.

Ключевые слова: P- и P/Q-типы кальциевых каналов, ω -агатоксин-IVA, ГАМКергическая синаптическая передача, кратковременная пластичность.

O.P. Mizerna, S.A. Fedulova, N.S. Veselovsky

NONUNIFORM DISTRIBUTION AND CONTRIBUTION OF THE P- AND P/Q-TYPES CALCIUM CHANNELS TO SHORT-TERM INHIBITORY SYNAPTIC PLASTICITY IN CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

In the present study, we investigated the sensitivity of GABAergic short-term plasticity to the selective P- and P/Q-type calcium channels blocker omega-agatoxin-IVA. To block the P-type channels we used 30 nM of this toxin and 200 nM of the toxin was used to block the P/Q channel types. The evoked inhibitory postsynaptic currents (eIPSC) were studied using patch-clamp technique in whole-cell configuration in postsynaptic neuron and local extracellular stimulation of single presynaptic axon by rectangular pulse. The present data show that the contribution of P- and P/Q-types channels to GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons are 30% and 45%, respectively. It was shown that the mediate contribution of the P- and P/Q-types channels to the amplitudes of eIPSC is different to every discovered neuron. It means that distribution of these channels is non-uniform. To study the short-term plasticity of inhibitory synaptic transmission, axons of presynaptic neurons were paired-pulse stimulated with the interpulse interval of 150 ms. Neurons demonstrated both the depression and facilitation. The application of 30 nM and 200nM of the blocker decreased the depression and increased facilitation to 8% and 11%, respectively. In addition, we found that the mediate contribution of the P- and P/Q-types channels to realization of synaptic transmission after the second stimuli is 4% less compared to that after the first one. Therefore, blocking of both P- and P/Q-types calcium

channels can change the efficiency of synaptic transmission. In this instance it facilitates realization of the transmission via decreased depression or increased facilitation. These results confirm that the P- and P/Q-types calcium channels are involved in regulation of the short-term inhibitory synaptic plasticity in cultured hippocampal neurons.

Key words: P- and P/Q-types calcium channels, omega-agatoxin-IVA, GABAergic synaptic transmission, short-term plasticity.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мізерна О.П., Федулова С.А., Веселовський М.С. Вплив тапсигаргіну на гальмівну синаптичну передачу в культурі нейронів гіпокампа щура// *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2007. – **39**, №4/5. – P. 374–376.
2. Мізерна О.П., Федулова С.А., Веселовський М.С. Участь N-типу потенціалкерованих кальцієвих каналів в регуляції пластичності гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа// *Фізіол. журн.* – 2009. – **55**, № 4. – P. 17–23.
3. Adams M.E., Myers R.A., Imperial J.S., Olivera B.M. Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms // *Biochemistry*. – 1993. – **32**. – P. 12566–12570.
4. Borst J.G., Sakmann B. Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse// *Nature*. – 1996. – **383**. – P. 431–434.
5. Davies C.H., Davies S.N., Collingridge G.L. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus// *Neuron*. – 1990. – **424**. – P. 513–531.
6. Dietrich D., Kirschstein T., Kukley M., von der Pererzev ABC, Schneider T., Beck H. Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca²⁺ channels// *Neuron*. – 2003. – **39**. – P. 483–496.
7. Doze V.A., Cohen G.A., Madison D.V. Calcium channel involvement in GABA_B receptor-mediated inhibition of GABA release in area CA1 of the rat hippocampus// *J. Neurophysiol.* – 1995. – **74**. – P. 43–53.
8. Dunlap K., Luebke J.I., Turner T.J. Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons// *Trends Neurosci.* – 1995. – **18**. – P. 89–98.
9. Fagg G.E. Foster A.C. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system// *Neuroscience*. – 1983. – **9**. – P. 701–719.
10. Gasparini S, Kasyanov A.M., Pietrobon D., Voronin L.L., Cherubini E. Presynaptic R-type calcium channels contribute to fast excitatory synaptic transmission in the rat hippocampus// *J. Neurosci.* – 2001. – **21**. – P. 8715–8721.
11. Jensen K., Lambert J.D., Jensen M.S. Activity-dependent depression of GABAergic IPSCs in cultured hippocampal neurons// *J. Neurophysiol.* – 1999. – **82**. – P. 42–49.
12. Katz B. Miledi R. The role of calcium in neuromuscular facilitation// *J. Physiol.* – 1968. – **195**. – P. 481–492.
13. Liu S., Friel D.D. Impact of the leaner P/Q-type Ca²⁺ channel mutation on excitatory synaptic transmission in cerebellar Purkinje cells// *Ibid.* – 2008. – **586**. – P. 4501–4515.
14. Llinas R., Steinberg I.Z., Walton K. Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse// *Biochem. J.* – 1981. – **33**. – P. 323–351.
15. Llinas R., Sugimori M., Silver R.B. Presynaptic calcium concentration microdomains and transmitter release// *J. Physiol. Paris* – 1992. – **86**. – P. 135–138.
16. Luebke J.I., Dunlap K., Turner T.J. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus// *Neuron*. – 1993. – **11**. – P. 895–902.
17. Macdonald R. L., Olsen R. W. GABA receptor channels// *Annu. Rev. Neurosci.* – 1994. – **17**. – P. 569–602.
18. Mintz I.M. Block of Ca channels in rat central neurons by the spider toxin omega-Aga-III// *J. Neurosci.* – 1994. – **14**. – P. 2844–2853.
19. Mintz I.M., Sabatini B.L., Regehr W.G. Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse// *Neuron*. – 1995. – **15**. – P. 675–688.
20. Miyazaki K., Ishizuka T., Yawo H. Synapse-to-synapse variation of calcium channel subtype contributions in large mossy fiber terminals of mouse hippocampus// *Neuroscience*. – 2005. – **136**. – P. 1003–1014.
21. Murakami N., Ishibashi H., Katsurabayashi S., Akaike N. Calcium channel subtypes on single GABAergic presynaptic terminal projecting to rat hippocampal neurons// *Brain Res.* – 2002. – **951**. – P. 121–129.
22. Nathan T., Lambert J.D. Depression of the fast IPSP underlies paired-pulse facilitation in area CA1 of the rat hippocampus// *J. Neurophysiol.* – 1991. – **66**. – P. 1704–1715.
23. Ohno-Shosaku T., Hirata K., Sawada S., Yamamoto C. Contributions of multiple calcium channel types to GABAergic transmission in rat cultured hippocampal neurons// *Neurosci. Lett.* – 1994. – **181**. – P. 145–148.
24. Olivera B.M., Miljanich G.P., Ramachandran J., Adams M.E. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins// *Ann. Rev. Biochem.* – 1994. – **63**. – P. 823–867.
25. Regehr W.G., Mintz I.M. Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje cell synapses// *Neuron*. – 1994. – **12**. – P. 605–613.
26. Reid C.A., Clements J.D., Bekkers J.M. Nonuniform distribution of Ca²⁺ channel subtypes on presynaptic terminals of excitatory synapses in hippocampal cultures// *J. Neurosci.* – 1997. – **15**. – P. 2738–2745.
27. Reid C.A., Bekkers J.M., Clements J.D. N- and P/Q-Type Ca²⁺ channels mediate transmitter release with a similar cooperativity at rat hippocampal autapses// *Ibid.* –

1998. – **18**. – P. 2849–2855.
28. Reuter H. Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by Ca(2+)-channel blockers//Neuron. – 1995. – **14**. – P. 773–779.
29. Rosato-Siri M., Grandolfo M., Ballerini L. Activity-dependent modulation of GABAergic synapses in developing rat spinal networks in vitro//Eur. J. Neurosci. – 2002. – **16**. – P. 2123–2135.
30. Schneggenburger R., Neher E. Presynaptic calcium and control of vesicle fusion// Curr. Opin. Neurobiol. – 2005. – **15**. – P. 266–274.
31. Scholz K.P., Miller R.J. Presynaptic inhibition at excitatory hippocampal synapses: development and role of presynaptic Ca²⁺ channels// J. Neurophysiol. – 1996. – **76**. – P. 39–46.
32. Shen K.Z., Zhu Z.T., Munhall A. and Johnson S.W. Synaptic plasticity in rat subthalamic nucleus induced by high-frequency stimulation// Synapse. – 2003. – **50**. – P. 314–319.
33. Smith S.J., Buchanan J., Osses L.R., Charlton M.P., Augustine G.J. The spatial distribution of calcium signals in squid presynaptic terminals// J. Physiol. – 1993. – **472**. – P. 573–593.
34. Stanley E.F. The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face// Trends Neurosci. – 1997. – **20**. – P.404–409.
35. Takahashi T., Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission// Nature. – 1993. – **366**. – P.156–158.
36. Tanabe M., Kaneko T. Paired pulse facilitation of GABAergic IPSCs in ventral horn neurons in neonatal rat spinal cord// Brain Res. – 1996. – **716**. – P.101–106.
37. Veselovsky N.S., Engert F., Lux H.D. Fast local superfusion technique// Pflug. Arch. – 1996. – **432**. – P. 351–354.
38. Wheeler D.B., Randall A., Tsien R.W. Changes in action potential duration alter reliance of excitatory synaptic transmission on multiple types of Ca²⁺ channels in rat hippocampus// J. Neurosci. – 1996. – **16**. – P. 2226–2237.
39. Wilcox K.S., Dichter M.A. Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA autoreceptor activation// Ibid. – 1994. – **14**. – P. 1775–1788.
40. Wu L.G., Saggau P. Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus// Ibid. – P. 5613–5622.
41. Wu L.G., Saggau P. Block of multiple presynaptic calcium channel types by omega-conotoxin-MVIIIC at hippocampal CA3 to CA1 synapses// J. Neurophysiol. – 1995. – **73**. – P. 1965–1972.
42. Wu L.G., Borst J.G., Sakmann B. R-type Ca²⁺ currents evoke transmitter release at a rat central synapse// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – **95**. – P. 4720–4727.
43. Wu L.G., Borst J.G. The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression// Neuron. – 1999. – **23**. – P. 821–832.
44. Xu J., He L., Wu L.G. Role of Ca(2+) channels in short-term synaptic plasticity// Curr. Opin. Neurobiol. – 2007. – **17**. – P. 352–359.
45. Zucker R.S., Regehr W.G. Short-term synaptic plasticity// Annu. Rev. Physiol. – 2002. – **64**. – P. 355–405.

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

Матеріал надійшов до редакції 12.07.2010

В.І. Хорєвін

Вплив іонофоретично аплікованих L-ДОФА та кетаміну на імпульсну активність нейронів соматомоторної кори під час виконання умовнорефлекторних рухів

Взаємодію нейрональних NMDA-глутаматних і дофамінових рецепторів було досліджено при іонофоретичній аплікації L-ДОФА та кетаміну до 19 поодиноких нейронів соматомоторної ділянки кори мозку котів, які виконували оперантний рефлекс постанови передньої кінцівки на підпору. L-ДОФА спричиняв генерацію 8–12 імпульсів, що призводило до вірогідного збільшення загальної кількості імпульсів, пов'язаних з рухами, і невірогідно зменшував потужність або середню кількість імпульсів в умовній реакції. Ефекти кетаміну на викликану імпульсну активність були різноспрямованими, призводячи у більшості випадків (16 спостережень) до вірогідного збільшення потужностей відповідей, а у трьох клітин – до пригнічення розрядів, пов'язаних з рухами. Передбачається, що полегшення умовних відповідей пов'язано з блокуванням NMDA-глутаматергічної передачі до гальмівних внутрішньокіркових клітин, тоді як пригнічення умовних відповідей кіркових клітин зумовлено блокуванням NMDA-глутаматергічної передачі до пірамідальних нейронів. Загальна кількість імпульсів, пов'язаних з виконанням рухів, при сумісній аплікації двох речовин була вірогідно більшою порівняно з ефектами лише L-ДОФА. Наведені результати свідчать, що NMDA-глутаматергічна передача, яка відіграє важливу роль у формуванні відповідей кіркових нейронів при виконанні поведінкових реакцій, може модулюватися L-ДОФА.

Ключові слова: нейрон, кора головного мозку, імпульсна активність, L-ДОФА, кетамін, кондиціонування.

ВСТУП

Взаємодія збудження та гальмування – основа всіх поведінкових актів. Передбачається, що під час виконання поведінкових актів у нейронних ланцюгах головного мозку відбуваються пластичні перебудови, які формують нейрофізіологічний базис пам'яті та навчання. Основу таких пластичних процесів складають зміни в глутаматних синапсах, які забезпечують передачу збудження у головному мозку ссавців, передусім у NMDA-глутаматних рецепторах [7, 20]. Разом з тим значну роль у формуванні поведінкових актів відіграють моноамінергічні системи мозку, серед яких

дофамінергічним системам приділяють значну увагу [1, 3, 26]. Це зумовлено можливою причетністю цих моноамінергічних систем до так званої підкріплювальної системи мозку [31] та нейронних механізмів формування уваги [4, 12]. Але механізми взаємодії глутаматергічної та дофамінергічної систем мозку в нейронах соматомоторної кори при виконанні поведінкових актів досліджено недостатньо. L-ДОФА, який є природним попередником дофаміну та одним з розповсюджених препаратів для лікування хвороби Паркінсона, може взаємодіяти з глутаматними рецепторами [16]. Показано, що системне використання неконкурентних антагоністів глутаматних

© В.І. Хорєвін

NMDA-рецепторів і L-ДОФА зменшує акінезію у мишей з пошкодженою нейротоксином метил-феніл-тетрогідроперидином (МФТП) дофамінергічною системою [11].

Мета роботи – з'ясувати вплив мікроіонофоретично аплікованого L-ДОФА на розряди, пов'язані з виконанням умовно-рефлекторних рухів, а також при іонофорезі кетаміну, який є неконкурентним антагоністом глутаматних NMDA-рецепторів.

МЕТОДИКА

Робота виконана на п'яти кішках масою 2,5–4,0 кг. Вироблення умовного рефлексу постанови передньої контралатеральної до місця реєстрації кінцівки на підпору, оперативна підготовка тварин, особливості відведення імпульсної активності та аплікації фізіологічно активних речовин до поодиноких кіркових нейронів у кішок, що виконували умовно-рефлекторний рух у відповідь на звукове клацання, а також особливості аналізу отриманих результатів наведені в попередніх працях [3, 23, 26]. Після вироблення інструментального рефлексу постанови передньої кінцівки на підпору у відповідь на звукове клацання під нембуталовим (40 мг/кг, внутрішньоочеревинно) або кетаміновим (80 мг/кг, внутрішньоочеревинно) наркозом в трепанаційному отворі над кірковою проекцією передньої кінцівки в контралатеральній соматомоторній зоні кори головного мозку (поле 4) протакрилом фіксували канюлю для мікроманіпулятора. Через 10–12 діб після хірургічного втручання починали реєстрацію імпульсної активності від поодиноких нейронів соматомоторної кори за допомогою тристовбурних скляних мікропіпеток з загальним діаметром кінчика 5 мкм. Стовбур для реєстрації заповнювали 3 М NaCl, а два інших, які використовували для мікроаплікації фармакологічних речовин іонофорезіум, заповнювали L-ДОФА (0,5 моль/л, рН 4,0) та кетаміном (0,18 моль/л, рН 5,0) відповідно. В обох випадках ці

фармакологічні препарати виводили як катіони струмом іонофорезу позитивної полярності (+20 нА). Для запобігання витоку фармакологічних речовин з обох стовбурів у вихідному стані та в перервах між сесіями іонофорезу до них постійно прикладали так званий струм підпору, який мав зворотний напрямок (-10 нА) відносно струму іонофорезу. Протокол вивчення впливу фармакологічних речовин на імпульсну активність кіркових нейронів складався з семи серій. У кожній серії реєстрували 10–12 реалізацій тривалістю 30 с кожна. Перша, третя, п'ята та сьома серії були контрольними, а речовини аплікували в другій, четвертій і шостій серіях протягом 4 с через 2 с після початку реалізації, а саме L-ДОФА – в другій серії, кетамін – в четвертій, L-ДОФА та кетамін – у шостій. Аналіз впливу зазначених фармакологічних агентів на імпульсну активність поодиноких нейронів здійснювали на підставі змін у таких показниках, як середня частота фонові імпульсної активності, потужність умовної реакції та загальна кількість імпульсів, пов'язаних з виконанням умовних рухів. Середня частота фонові імпульсної активності кіркових клітин була оцінена протягом перших 2 с кожної реалізації, тобто тоді, коли не було іонофоретичного виведення досліджуваних речовин. Потужність умовної реакції дорівнювала середньому значенню кількості імпульсів в умовній відповіді, яке перевищувало середнє значення фонові імпульсної активності на подвоєне значення її дисперсії. Це статично доводило відмінність фонові та викликані імпульсних активностей. Загальна кількість імпульсів, пов'язаних з виконанням умовних рухів, дорівнювала середньому значенню кількості імпульсів, які генерували кіркові нейрони протягом 50–3000 мс після звукового подразника. Ефект речовин оцінювали порівнянням середніх значень указаних показників імпульсної активності, а також латентних періодів і тривалостей імпульсних реакцій у вихід-

ному стані та при дії речовин з використанням парного двовибіркового критерію t Стьюдента. Різницю між експериментальними результатами вважали статистично значущою при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Вплив мікроіонофоретичної аплікації як L-ДОФА, так і кетаміну на імпульсну активність було досліджено у 19 нейронів соматомоторної кори ненаркотизованих кішок, які перебували у стані активного неспання та виконували постанову контралатеральної до місця реєстрації передньої кінцівки на підпору у відповідь на умовний подразник. Для аналізу були відібрані тільки фоново активні клітини, які протягом усієї процедури дослідження (70–80 хв) генерували потенціали дії позитивно-негативної полярності з відносно постійною їх амплітудою не менше ніж 200–300 мкВ.

Аплікація L-ДОФА у окремо взятих кіркових нейронів викликала значні зміни фонової імпульсної активності у вигляді збільшення частоти розрядів, на що вказують інші автори [24]. Середня частота розрядів фонової імпульсної активності всіх досліджених нейронів при дії L-ДОФА збільшувалася на 18 %, з $9,2 \pm 1,7$ до $11,0$ імп./с $\pm 1,6$ імп./с ($P > 0,05$). У половини клітин спостерігали генерацію груп імпульсів з 8–12 потенціалів дії (бурстів), особливо в останніх реалізаціях іонофорезу L-ДОФА та протягом перших 3–5 хв після закінчення цієї процедури. Це призводило до того, що в контрольній серії після аплікації L-ДОФА збільшувалася середня частота розрядів фонової імпульсної активності на 42 % відносно вихідного стану до $13,1$ імп./с $\pm 2,4$ імп./с ($P > 0,05$). В цей час нейрони часто втрачали здатність генерувати розряди, пов'язані з умовнорефлекторними рухами, і розряджалися у своєму власному ритмі у вигляді бурстів. Це могло бути результатом генерації групи потенціалів дії, яка складалася з 8–12 імпульсів і

протягом перших 2 с реалізації спричиняла збільшення варіабельності фонової імпульсної активності, що за нашим критерієм визначення нейронної відповіді призводило до зменшення потужності відповідей. Загалом для всієї сукупності клітин під дією L-ДОФА потужність відповідей, тобто середня кількість імпульсів в одній відповіді на звукове клацання, зменшилася на 20 % з $10,7 \pm 1,9$ до $8,6$ імп. $\pm 1,3$ імп. ($P > 0,05$). Водночас загальна кількість імпульсів, пов'язаних з умовнорефлекторними рухами, вірогідно збільшувалася ($P < 0,05$) як при дії L-ДОФА з $18,6 \pm 2,5$ до $20,4$ імп. $\pm 3,0$ імп., так і в контрольній серії ($24,2$ імп. $\pm 2,9$ імп.) за 10 хв після закінчення аплікації цього агента відносно вихідного стану ($P < 0,01$). Не виявлено вірогідних відмінностей при дії L-ДОФА в середніх значеннях латентних періодів імпульсних реакцій і їх тривалості.

При дії кетаміну, на відміну від аплікації L-ДОФА, не спостерігали генерації групових розрядів. Середня частота розрядів фонової імпульсної активності $14,0$ імп./с $\pm 2,5$ імп./с у всіх 19 клітин при іонофорезі кетаміну практично ($P > 0,05$) не відрізнялася від подібного значення імпульсної активності в попередній серії, тобто в контролі за 10 хв після закінчення аплікації L-ДОФА ($13,1$ імп./с $\pm 2,4$ імп./с).

Однак характеристики розрядів, пов'язаних з виконанням умовних рухів, при іонофорезі кетаміну були відмінними у двох групах нейронів. В одній групі, яка складалася з 16 нейронів, спостерігали збільшення потужності відповідей, яка для цієї сукупності становила 149 % порівняно з контролем за 10 хв після закінчення іонофорезу L-ДОФА, в другій групі нейронів (три спостереження) кетамін спричиняв або повне пригнічення інтенсивності відповідей, або зменшення в 20 разів загальної кількості імпульсів. Тому інші характеристики імпульсних реакцій цих двох груп клітин розглянуті окремо. Репрезентативні приклади перистимульних гістограм умовних реакцій у контролі та при дії фармако-

логічних агентів для кожної групи нейронів наведені на рис. 1, I та II відповідно.

Фонова імпульсна активність нейронів, де кетамін збільшував потужність умовних відповідей, у вихідному стані ($9,1 \text{ імп./с} \pm 2,1 \text{ імп./с}$) і контрольних серіях була майже вдвічі меншою порівняно з відповідним показником у трьох нейронів, де спостерігали пригнічувальний ефект кетаміну, у яких середнє значення фонові імпульсної активності у вихідному стані було $15,9 \text{ імп./с} \pm 6,1 \text{ імп./с}$ (рис. 2, I, а та 2, II, а).

У клітин зі збільшенням відповідей їх потужність при дії кетаміну вірогідно збільшувалася ($P < 0,05$) до $20,1 \pm 2,6$ порівняно з $13,5 \text{ імп.} \pm 2,5 \text{ імп.}$ у контрольній серії (див. рис. 2, I, б). Достовірна різниця встановлена між значеннями потужностей відповідей при іонофорезі кетаміну і L-ДОФА ($P > 0,01$), а також при сумісному іонофорезі L-ДОФА і кетаміну та L-ДОФА ($P > 0,01$; див. рис. 2, I, б).

Загальна кількість імпульсів в умовній реакції при цьому протоколі аплікації

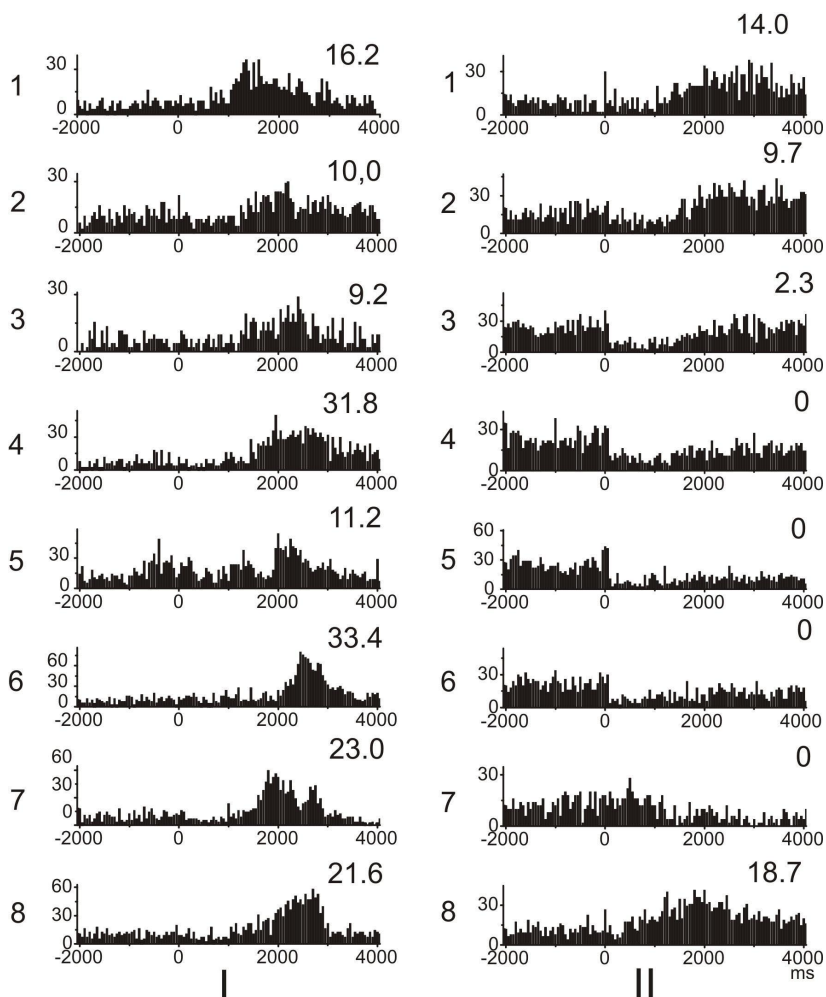


Рис. 1. Імпульсна активність двох нейронів соматомоторної кори котів під час виконання умовних рухів з полегшувальними (I) та пригнічувальними (II) ефектами іонофоретично аплікованих L-ДОФА та кетаміну на умовні відповіді: 1 – контроль, 2 – L-ДОФА, 3 – контроль після L-ДОФА, 4 – кетамін, 5 – контроль після кетаміну, 6 – L-ДОФА та кетамін, 7 та 8 на I – контроль після аплікації L-ДОФА та кетаміну через 5 та 10 хв, на II – контроль через 10 та 45 хв. Цифри в кінці кожної гістограми – кількість імпульсів в умовній реакції нейрона. За віссю ординат – кількість імпульсів, за віссю абсцис – час. Нуль на осі абсцис відповідає моменту умовного звукового клацання

фармакологічних речовин у клітин з полегшувальним ефектом кетаміну шаблеподібно зростала з $18,4 \text{ імп.} \pm 2,8 \text{ імп.}$ у вихідному стані до $30,2 \pm 3,6$ при сумісній дії двох речовин (див. рис. 2, I,в) і до значень $22,4 \pm 3,3$ у контрольній серії після одночасного прикладання двох агентів. Вірогідну відмінність ($P < 0,05$) між значеннями попереднього контролю та ефектом аплікації була відзначено тільки для

L-ДОФА, тоді як при аплікації кетаміну та одночасного іонофорезу двох речовин достовірної різниці не встановлено відносно попереднього контролю. Знайдені вірогідні відмінності ($P > 0,01$) між загальною кількістю імпульсів в умовній реакції в першій контрольній серії та наступними серіями з третьої по шосту, крім останньої контрольної серії. Таке поступове збільшення загальної кількості імпульсів в умовній

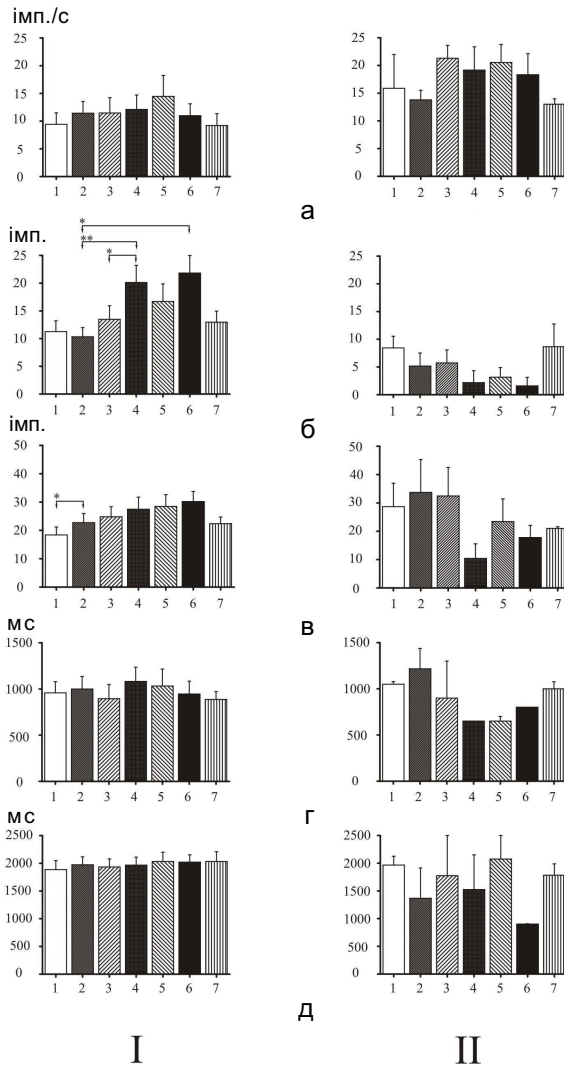


Рис. 2. Сумарні середні значення умовних реакцій з похибкою середнього у двох груп нейронів соматомоторної кори котів с полегшувальними (I) та пригнічувальними (II) ефектами кетаміну на потужність умовних відповідей: а – середня частота фонові імпульсної активності, б – потужність умовної нейронної реакції, в – загальна кількість імпульсів, пов’язаних з виконанням руху передньої кінцівки до підпори, г – латентний період умовної нейронної реакції, д – тривалість умовної нейронної реакції; 1 – контроль, 2 – L-ДОФА, 3 – контроль після L-ДОФА, 4 – кетамін, 5 – контроль після кетаміну, 6 – L-ДОФА та кетамін, 7 – контроль після L-ДОФА та кетаміну. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

реакції під час аплікації L-ДОФА, кетаміну й одночасного використання двох речовин може свідчити про тривалі слідові ефекти зазначених агентів на збудливість кіркових нейронів при виконанні умовних рухів. Вірогідних відмінностей середніх значень латентних періодів і тривалостей умовних відповідей не встановлено (див. рис. 2, I, г, д).

У групі з трьох клітин, де кетамін зменшував потужність відповідей, не виявлено вірогідних відмінностей між середніми значеннями показників імпульсної активності в контролі та при дії речовин, що зумовлено малою кількістю спостережень (див. рис. 2, II). Однак імпульсна активність окремих клітин значно змінювалася під впливом іонофорезу кетаміну та L-ДОФА. Зменшення потужності відповідей для цих клітин спостерігали вже під час дії L-ДОФА з $8,4 \text{ імп.} \pm 2,1 \text{ імп.}$ у попередній контрольній серії до $5,2 \text{ імп.} \pm 2,4 \text{ імп.}$ і в контролі після її закінчення (див. рис. 2, I, б), хоча загальна кількість імпульсів, пов'язаних з виконанням умовних рухів в цих серіях навіть дещо збільшувалася (див. рис. 2, I, в). Однак при іонофорезі кетаміну спостерігали зменшення потужності умовних відповідей до $2,2 \pm 2,2$ порівняно з $5,7 \text{ імп.} \pm 2,3 \text{ імп.}$ у контролі та загальної кількості імпульсів, пов'язаних з умовними рухами, з $32,4 \text{ імп.} \pm 10,1 \text{ імп.}$ у контролі до $10,4 \text{ імп.} \pm 5,2 \text{ імп.}$ при дії кетаміну. Сумісна дія L-ДОФА та кетаміну призводила в порівнянні з кетаміном до ще більшого зменшення потужності відповідей (див. рис. 2, II, б) і до зменшення загальної кількості імпульсів, пов'язаних з умовними рухами (див. рис. 2, II, в). Поновлення значень імпульсної активності після закінчення серій іонофорезу у цих трьох нейронів було повільнішим порівняно з більшістю клітин, де кетамін полегшував умовні відповіді, і потребувало близько 45 хв.

У розглянутій групі з трьох клітин під час іонофорезу та після нього збуджувальна

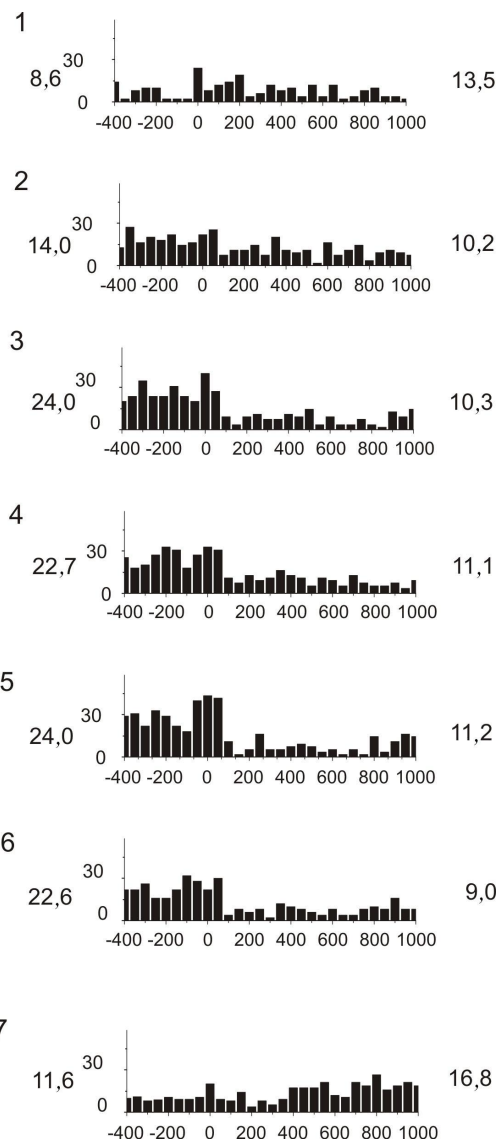


Рис. 3. Імпульсна активність одного нейрона соматомоторної кори кішки під час виконання умовних рухів з пригнічувальним ефектом іонофоретично аплікованих L-ДОФА та кетаміну на умовні відповіді. Використані результати з рис. 1, II з меншою епохою аналізу відносно відповідей, побудовані від умовного подразника (звукове клацання): 1 – контроль, 2 – L-ДОФА, 3 – контроль після L-ДОФА, 4 – кетамін, 5 – контроль після кетаміну, 6 – L-ДОФА та кетамін, 7 – контроль через 45 хв після закінчення іонофорезу двох агентів. Цифри на початку гістограм – середнє значення фонові імпульсної активності в цій серії, а цифри в кінці гістограм – середнє значення імпульсної активності за перші 1000 мс після звукового клацання. За віссю ординат – кількість імпульсів, за віссю абсцис – час. Нуль на осі абсцис відповідає моменту умовного звукового клацання

реакція поступово перетворювалася на гальмівну, що продемонстровано на прикладі однієї з цих клітин (рис. 3). Частота розрядів за першу секунду після умовного подразника, починаючи з другої серії під час аплікації L-ДОФА (див. рис. 3, 2) і в наступних серіях поступово ставала меншою порівняно з частотою фонові імпульсної активності, яка більше ніж удвічі збільшувалася відносно її значення в першій серії. Одночасно з цим зникало збудження та виникало пригнічення розрядів, яке мало таку саму латентність (100 мс), як і збудження в першій серії (див. рис. 3, 4-6). У контрольній серії через 45 хв після закінчення сесій іонофорезу частота розрядів за першу секунду після умовного подразника ставала більшою порівняно з частотою фонові імпульсної активності (див. рис. 3, 7) і починалось поновлення розрядів, пов'язаних з виконанням умовних рухів.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Відомо, що мікроіонофорез L-ДОФА до поодиноких нейронів соматомоторної кори в умовах, подібних до використаної в цій роботі експериментальної процедури, може спричиняти як полегшувальний, так і пригнічувальний ефекти [24]. Подібна різноспрямованість була встановлена і в дослідженій сукупності кіркових нейронів. Так, 14 з 19 клітин зменшували потужність відповідей під час іонофорезу L-ДОФА, тоді як у решти клітин – кількість розрядів у умовній відповіді збільшувалася.

Суперечливість у поглядах щодо дії дофаміну та L-ДОФА на збудливість нейронів головного мозку, давно існує в літературі. Повідомляється, що дофамін може як збільшувати [6, 18, 21, 22], так і зменшувати збудливість нейронів кіркових і підкіркових структур головного мозку [9, 10]. Подібні протиріччя існують в літературі і щодо ефектів дофаміну, які спостерігали в дослідах, виконаних *in vivo* на

нейронах переднього мозку при іонофоретичній його аплікації. При застосуванні іонофоретичної аплікації дофаміну одні автори встановили збільшення збудливості кіркових і стріатних нейронів [5], тоді як інші автори доводять протилежне [19]. Це пов'язують з тим, що дофамін може діяти як безпосередньо на певну клітину, так і опосередковано на інші нервові клітини, переважно через ГАМК-ергічні гальмівні нейрони [9, 19, 25].

Зазначена строкатість в ефектах дофаміну може бути пов'язаною з наявністю двох основних типів дофамінових D_1 - і D_2 -рецепторів, які локалізовані як на пре-, так і на постсинаптичних нейронах, а також протилежними впливами цих рецепторів на нейронну збудливість [13]. Зміни імпульсної активності під час іонофорезу L-ДОФА можливо зумовлені також дією цього природного агента як нейротрансмітера безпосередньо на катехоламінові рецептори. Таке припущення обговорюється в літературі [14, 15] і базується на даних щодо полегшення виділення норадреналіну та дофаміну в зрізах стріатума у щурів при аплікації L-ДОФА в наномолярних концентраціях в умовах блокади активності ароматичної L-декарбоксилази, яка перетворює L-ДОФА в дофамін. Цей *in vivo*-ефект L-ДОФА блокувався антагоністом L-ДОФА L-ДОФА-метил-ефіром [16].

Наявність діаметрально протилежних ефектів кетаміну щодо його впливу на умовну відповідь у двох груп кіркових нейронів можна пояснити різним місцем дії цього неконкурентного антагоніста NMDA-глютаматергічної передачі. В одному випадку, коли у більшості клітин при іонофорезі кетаміну полегшувалися умовні відповіді, цей блокатор, можливо, діяв переважно на гальмівні проміжні нейрони, зменшуючи їх вплив на клітину, імпульсну активність якої реєстрували. Це призводило до підвищення збудливості нейронів у вигляді збільшення як потужностей умовних відповідей, так і загальної кількості

розрядів, пов'язаних з виконанням умовних рухів. Наведені результати щодо полегшувального впливу кетаміну на нейронні умовні відповіді збігаються з літературними даними щодо полегшувальних ефектів цього блокатора NMDA-глутаматергічної передачі на відповіді кіркових нейронів *in vivo* [2] та збуджувальну дію таких агентів на нейрони енторінальної кори *in vitro* [28]. Водночас гальмівний ефект кетаміну на досліджувальний нейрон, можливо, був мінімальним через те, що кінчик стовбура мікропіпетки для реєстрації імпульсної активності був досить далеко від нього. На користь цього припущення свідчить те, що амплітуда потенціалів дії, які відводилися від нейронів з полегшувальними ефектами кетаміну, становила 250–400 мкВ і була відносно стабільною протягом усього досліду. Домінування кількості клітин з полегшувальними ефектами кетаміну (16 спостережень з 19 обстежених клітин) також свідчить на користь того, що кетамін діяв переважно в просторі навколо нейрона, а не безпосередньо на нього. Деяке підсилення полегшувального ефекту кетаміну при одночасній аплікації його з L-ДОФА, можливо, є результатом взаємодії між глутаматними та дофаміновими рецепторами, що відповідає літературним даним щодо підсилення дофаміном відповідей, які викликані NMDA в нейронах V шару префронтальної кори [27, 30].

Пригнічувальні ефекти кетаміну на умовні відповіді у незначній кількості нейронів (3 з 19) пов'язані, можливо, з його безпосередньою блокувальною дією як антагоніста NMDA-глутаматергічних рецепторів на збуджувальну глутаматергічну передачу з пресинаптичних аферентів до досліджувального нейрона. На користь цього свідчить значна амплітуда потенціалів дії (більше ніж 1,5 мВ) у таких нейронів, що може вказувати на близьке розташування кінчика мікропіпетки відносно досліджувального нейрона.

Розщеплення умовної відповіді кіркових нейронів при дії кетаміну, тобто зникнення збуджувального компонента відповіді при розвитку гальмівного, може свідчити про існування різних NMDA-глутаматергічних шляхів до пірамідальних і гальмівних нейронів в соматомоторній корі. Це може вказувати на те, що у експериментальних тварин, які перебувають у стані активного неспання, імпульсація через NMDA-глутаматергічні аференти надходить окремо до дендритів пірамідального нейрона [7] та гальмівних клітин, які оточують цей нейрон.

Наведені результати свідчать, що NMDA-глутаматергічна передача, яка відіграє важливу роль у формуванні відповідей нейронів соматомоторної кори при виконанні поведінкових реакцій, може модулюватися при дії на дофамінові рецептори.

В.И. Хоревин

ВЛИЯНИЕ ИОНОФОРЕТИЧЕСКИ АППЛИЦИРОВАННЫХ L-ДОФА И КЕТАМИНА НА ИМПУЛЬСНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ СОМАТОМОТОРНОЙ КОРЫ ВО ВРЕМЯ ВЫПОЛНЕНИЯ УСЛОВНОФЛЕКТОРНЫХ ДВИЖЕНИЙ

Взаимодействие NMDA-глутаматных и дофаминовых нейронных рецепторов было исследовано при ионофоретической аппликации L-ДОФА и кетамина к 19 одиночным корковым нейронам соматомоторной коры кошек, выполнявших оперантный рефлекс постановки передней контралатеральной лапы на опору. L-ДОФА, вызывая генерацию 8–12 импульсов, приводила в исследованных нейронах к достоверному увеличению общего количества импульсов, связанных с движениями, и недостоверно уменьшала мощность или среднее количество импульсов в условной реакции. Эффекты кетамина на вызванную импульсную активность были разнонаправленным, приводя в большинстве случаев (16 наблюдений) к достоверному увеличению мощностей ответов, а у трех клеток – к угнетению разрядов, связанных с движением. Предполагается, что облегчение условных ответов корковых клеток при ионофоретической аппликации кетамина связано с блокированием NMDA-глутаматергической передачи к тормозным внутрикорковым нейронам, тогда как угнетение условных ответов корковых

клеток обусловлено блокированием NMDA-глутаматергической передачи к этим нейронам. Общее количество импульсов, связанных с выполнением движения, при совместной аппликации двух веществ была достоверно большей по сравнению с эффектами одной L-ДОФА. Приведенные данные свидетельствуют, что NMDA-глутаматергическая передача, которая играет важную роль в формировании ответов корковых нейронов при выполнении поведенческих реакций, может модулироваться L-ДОФА.

Ключевые слова: нейрон, кора головного мозга, импульсная активность, L-ДОФА, кетамин, кондиционирование.

V. I. Khorevin

INFLUENCE OF IONOTOPHORETICALLY APPLIED L-DOPA AND KETAMIN ON THE IMPULSE ACTIVITY OF THE SOMATOMOTOR CORTEX NEURONS DURING THE CONDITIONED PLACING MOVEMENTS

Interactions between the neuronal dopamine and NMDA glutamate receptors were investigated by iontophoresis of L-DOPA and ketamin to 19 single cortical neurons of the somatomotor cortex neurons in cats performing the operant reflex. L-DOPA producing bursts of 8-12 impulses that led to the significant increase of the total number of spikes related to the movements and insignificant decreased the power or the average number of spikes in a conditional response. Effects of ketamin on impulse activity were multidirectional resulting in most cases (16 cells) in the significant increase of the response power and in other three cells producing the suppression of discharges related to movements. It is supposed that following the ketamin iontophoresis the facilitation of conditional responses was caused by the blocking of the NMDA-glutamatergic transmission to intracortical inhibitory neurons, whereas inhibition of conditioned responses of other cortical cells was produced by blocking NMDA-glutamatergic transmission to pyramidal neurons. The total number of spikes associated with the performance of movements following the joint application of L-DOPA and ketamin was significantly higher compared with the effect of the isolated L-DOPA iontophoresis. These data indicate the NMDA-glutamatergic transmission, which plays an important role in shaping the cortical neuron responses in the performance of behavioral reactions may be modulated by L-DOPA.

Key words: neuron, cerebral cortex, the impulse activity, L-DOPA, ketamin, conditioning.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Раевский К. С., Сотникова Т. Д., Гайнетдинов Р. Р. Дофаминергические системы мозга: рецепторная гетерогенность, функциональная роль, фармакологи-

гическая регуляция // Успехи физиол. наук. – 1996 – 27, № 4. – С. 3-29.

2. Сторожук В. М., Хоревин В. И., Разумна Н. Н., Вилла А. Е., Титко И. В. Эффекты активации глутаматных ионотропных связей нейронов сенсомоторной коры при условном рефлексе // Журн. высш. нервн. деятельности. – 2002. – 52, № 3. – С. 292 - 301.
3. Сторожук В.М. Дофаминергическая модуляция нейронной активности в коре головного мозга бодрствующего животного. Киев, Наукова Думка, 2008. – 112 с.
4. Arnsten A. F. Fundamentals of attention-deficit/hyperactivity disorder: circuits and pathways // J. Clin. Psychiatry. – 2006. – 67. – Suppl. 8. – P. 7-12.
5. Bradshaw C. M., Sheridan R. D., Szabadi E. Excitatory neuronal responses to dopamine in the cerebral cortex: involvement of D2 but not D1 dopamine receptors // Br. J. Pharmacol. – 1985. – 86, № 2. – P. 483-490.
6. Ceci A., Brambilla A., Duranti P., Grauert M, Grippa N, Borsini F. Effect of antipsychotic drugs and selective dopaminergic antagonists on dopamine-induced facilitatory activity in prefrontal cortical pyramidal neurons. An in vitro study // Neuroscience. – 1999. – 93, № 1. – P. 107-115.
7. Citri A., Malenka R. C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms // Neuropsychopharmacology. – 2008. – 33, № 1. – P. 18-41.
8. Conti F. Localization of NMDA receptors in the cerebral cortex: a schematic overview // Braz. J. Med. Biol. Res. – 1997. – 30, № 5. – P. 555-560.
9. Gullledge A. T., Jaffe D. B. Dopamine decreases the excitability of layer V pyramidal cells in the rat prefrontal cortex // J. Neurosci. – 1998. – 18, № 21. – P. 9139 -9159.
10. Gullledge A.T., Jaffe D. B. Multiple effects of dopamine on layer V pyramidal cell excitability in rat prefrontal cortex // J. Neurophysiol. – 2001. – 86, № 2. – P. 586-595.
11. Fredriksson A., Gentsch C., Archer T. Synergistic interactions between NMDA-antagonists and L-Dopa on activity in MPTP-treated mice // J. Neural Transmission. – 1994. – 97, № 3. – P. 197-209.
12. Horvitz J. C. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events // Neuroscience. – 2000. – 96, № 4. – P. 651-656.
13. Missale C., Nash S.R., Robinson S. W., Jaber M., Caren M.G. Dopamine receptors: from structure to function // Physiol. Rev. – 1998. – 78, № 1. – P. 189 -225.
14. Misu Y., Goshima Y. Is L-DOPA an endogenous neurotransmitter? // Trends Pharmacol. Sci. – 1993. – 14, № 4. – P. 119-23.
15. Misu Y., Nakamura S., Goshima Y., Yue J.L., Miyamae T., Kubo T. Review on the relationship between nicotinic acetylcholine receptors and dopaminergic neurotransmission in the central nervous system-dopa is an endogenous neuroactive substance // Yakubutsu Seishin Kodo. – 1993. – 13, № 3. – P. 199-210.

16. Miyamae T., Coshima Y., Shimizu M., Shibata T., Kawashima K., Ohshima E., Suzuki F., Misu Y. Some interactions of L-DOPA and its related compounds with glutamate receptors // *Life Science*. – 1999. – **64**, №12. – P. 1045-1054.
17. Muly E.C. III, Szigeti K., Goldman-Rakic P. S. D1 receptor in interneurons of macaque prefrontal cortex: distribution and subcellular localization // *J. Neurosci.* – 1998. – **18**, № 24. – P.10553-10565.
18. Penit-Soria J., Audinat E., Crepel F. Excitation of rat prefrontal cortical neurons by dopamine: an in vitro electrophysiological study // *Brain Res.* – 1987. – **425**, № 3. –P. 263-274.
19. Pirot S., Gorbout R., Mantz J. Tassin J.P., Glowinski J., Thierry A. M. Inhibitory effects of ventral segmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for the involvement of both dopaminergic and gabaergic components // *Neuroscience*. – 1992. – **49**, № 4. – P. 857-865.
20. Rebola N., Srikumar B. N., Mulle C. Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors // *J. Physiol.* – 2010. – **588**, No. 1. – P. 93-99.
21. Sawaguchi T., Matsumura M., Kubota K. Catecholaminergic effects on neuronal activity related to a delayed response task in monkey prefrontal cortex // *J. Neurophysiol.* – 1990 – **63**, № 6. – P. 1385-1400.
22. Shi W. X., Zheng P., Liang X. F., Bunney B.S. Characterization of dopamine-induced depolarization of prefrontal cortical neurons // *Synapse*. – 1997. – **26**, № 4. – P. 415- 422.
23. Storozhuk V. M., Ivanova S. Ph., Stezhka V.V. Analysis of extrathalamic synaptic influences on reactions of sensorimotor cortical neurons during conditioning // *Neuroscience*. – 1992. – **46**, № 3. – P. 605- 615.
24. Storozhuk, V. M., Sanzharovsky, A. V., Busel, B. I. Interaction between DA and Glutamate in the sensorimotor cortex during conditioned placing reaction // *Neuroscience*. – 1998. – **85**, № 2. – P. 347-359.
25. Storozhuk V. M., Khorevin V. I., Rozumna N. N., Villa A. E., Tetko I. V. Dopamine modulation of glutamate metabotropic receptors in conditioned reaction of sensory motor cortex neurons of the cat // *Neurosci. Lett.* – 2004. – **356**, № 2. – P. 127-130.
26. Storozhuk V. M. Dopaminergic modulation of the neuron activity in the cerebral cortex of the wakeful animal // *Crit. Rev. Neurobiol.* – 2008. – **20**, № 1-3. – P.1-141.
27. Tseng K.Y., O'Donnell P. Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms // *J. Neurosci.* – 2004. – **24**, № 22. – P.5131-5139.
28. Vaisanen J., Linden A. M., Lasko M., Wong C., Heinemann U., Castr n E. Excitatory action of NMDA receptor antagonists in rat entorhinal cortex and cultured entorhinal cortical neurons // *Neuropsychopharmacology*. – 1999. – **21**, № 1. – P.137-146.
29. Yang C. R., Seamans J.K. Dopamine D1 receptor actions in layers V-VI rat prefrontal cortex neurons in vitro: modulation of dendritic-somatic signal integration // *J. Neurosci.* – 1996. – **16**, № 5, – P. 1922–1935.
30. Wirkner K., Krause T., K les L., Thummler S., Al-Khrasani M., Illes P. D1 but not D2 dopamine receptors or adrenoceptors mediate dopamine-induced potentiation of N-methyl-d-aspartate currents in the rat prefrontal cortex // *Neurosci. Lett.* – 2004. – **372**, № 1-2. – P. 89-93.
31. Wise R.A. Forebrain substrates of reward and motivation // *J. Comp. Neurol.* – 2005. – **493**, № 1. – P. 115-121.

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

Матеріал надійшов до редакції 25.05.2010

К.І. Кузнецов, В.Ю. Маслов, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

Вплив 4-амінопіридинчутливого компонента калієвого струму на високочастотну тонічну імпульсацію гангліозних клітин сітківки ока щура

Із застосуванням методу фіксації потенціалу/струму у конфігурації “ціла клітина” вивчали характеристики високочастотної імпульсної активності гангліозних клітин сітківки та роль у її генерації компонента інтегрального калієвого струму, чутливого до низьких концентрацій блокатора потенціалкерованих калієвих каналів 4-амінопіридину (4-АП). Аплікація 0,2 ммоль/л 4-АП призводила до зменшення частоти викликаної імпульсації гангліозних клітин на 62% ($n = 7$). При цьому тривалість піка окремих потенціалів дії збільшувалася на 133%, зменшувалися швидкість реполяризації на 63% та амплітуда слідової гіперполяризації на 83%. Також зменшувалась амплітуда інтегрального калієвого струму гангліозних клітин сітківки. 4-АП-чутливий компонент калієвого струму, отриманий відніманням залишкового струму після аплікації блокатора від контрольних значень ($1,61 \text{ нА} \pm 0,22 \text{ нА}$, $n = 6$), становив $0,40 \text{ нА} \pm 0,09 \text{ нА}$ ($n = 6$). Визначено, що помірне (на 25%) зменшення амплітуди калієвого струму суттєво впливає на характер імпульсної активності гангліозних нейронів. 4-АП-чутливий компонент був подібний до калієвого струму, опосередкованого каналами $Kv3.1/Kv3.2$. При цьому ймовірний вплив 4-АП на канали родини $Kv1$ виключали аплікацією специфічного блокатора цих каналів α -дендротоксину (100 нмоль/л), що не спричиняла достовірних змін ані в частоті імпульсної активності гангліозних нейронів, ані в показниках окремих потенціалів дії. Отримані результати вказують на ключову роль 4-АП-чутливого компонента калієвого струму у процесі генерації високочастотної імпульсної активності гангліозним клітинами сітківки ока щура за умов їх деполяризації, а також дають змогу припустити, що 4-АП-чутливий компонент інтегрального калієвого струму опосередковується $Kv3.1/Kv3.2$ -провідністю.

Ключові слова: гангліозні клітини сітківки, високочастотна імпульсація, 4-амінопіридин.

ВСТУП

Гангліозні клітини сітківки (ГКС) – нейрони, розташовані на внутрішній її поверхні. Функціональна активність фоторецепторів передається до ГКС через біполярні та амакринові клітини. Гангліозні нейрони відіграють важливу роль у інтегруванні, обробці, кодуванні та передачі зорової інформації до ЦНС. Тому дослідження їх функціональних властивостей є важливим для подальшого розуміння зазначених процесів. У літературі детально описано характер електричної активності та іонні

провідності ГКС у різних видів тварин [5, 10, 13]. Проте подальшого вивчення потребують механізми високочастотної тонічної генерації потенціалів дії (ПД) ГКС щурів у відповідь на деполяризувальний імпульс.

Нині загально визнаною є теза, що високочастотний характер імпульсної активності багатьох типів нейронів зумовлений експресією калієвих каналів $Kv3.1/Kv3.2$ на мембранах цих клітин [11, 12]. Вони являють собою високопорогові канали затриманого випрямлення з повільною інактивацією [1]. Кінетика активації/

© К.І. Кузнецов, В.Ю. Маслов, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

деактивації цих каналів сприяє швидкій реполяризації та короткому перебігу ПД без активації струмів, що своїм внеском збільшували б рефрактерний період [12]. Однак мало відомо щодо внеску каналів Kv3.1/Kv3.2 у формування характеру електричної активності ГКС. Зокрема, була досліджена функціональна роль калієвих каналів Kv3.1 у імпульсації ГКС форелі [5]. Але ці дані не можуть бути прямо екстрапольовані на ГКС щурів внаслідок значної різниці в електрофізіологічних властивостях і мембранних струмах ГКС різних тварин [10, 13]. Відомо, що калієві канали Kv3.1/Kv3.2 мають високу чутливість до блокатора 4-амінопіридину (4-АП; $IC_{50} = 0,029$ та $0,1$ ммоль/л відповідно) [4]. Аплікація $0,2$ ммоль/л 4-АП, має повністю блокувати Kv3.1/Kv3.2-провідність, може впливати на провідність калієвих каналів родини Kv1 та не повинна блокувати канали інших типів [1, 4]. Вивчення дії 4-АП на функціональні властивості ГКС допоможе з'ясувати роль чутливого до нього компонента інтегрального калієвого струму у високочастотній генерації ПД цими нейронами. Для оцінки внеску Kv1-провідності у реалізації високочастотного характеру імпульсації ГКС та впливу на форму окремого ПД ми використовували специфічний блокатор Kv1 каналів α -дендротоксин (α -DTX).

Мета нашої роботи полягала в дослідженні ефектів низьких концентрацій 4-АП на характер електричної активності ГКС щурів у режимі фіксації струму та на калієві струми у режимі фіксації потенціалу.

МЕТОДИКА

Експерименти були проведені на білих щурах лінії Вістар віком 4–6 тиж. Кожну тварину асфіксували за допомогою CO_2 з наступною декапітацією згідно з правилами роботи з піддослідними тваринами в установах НАН України. Очні яблука виділяли та препарували по границі *ora ser-*

rata, видаляли кришталік, після чого сітківку обережно відлущували від шару пігментного епітелію та робили переріз зорового нерва в ділянці оптичного диска. Сітківку приколювали голками діаметром 25 мкм до дна реєстраційної камери (об'ємом 1 мл), вкритого інертним покриттям Sylgard, гангліозним шаром догори. Всі маніпуляції з препарування здійснювали у зовнішньоклітинному розчині. Камеру встановлювали на предметний столик прямого мікроскопа (Olympus BX 51 WI). Візуалізація препарату відбувалася за допомогою водно-імерсійного об'єктива (Olympus LUMPlan 40X) з робочою відстанню $3,6$ мм.

Внутрішня обмежувальна мембрана, що утворена відростками мюллеровських гліальних клітин, та шар оптичних волокон обмежують доступ до сом ГКС. Ці структури видалялися за допомогою кінчика patch-піпетки, як було описано раніше [10, 13]. Після цієї процедури реєстрацію здійснювали від клітин з однорідною, гладенькою поверхнею та негранулярною цитоплазмою. Всі наведені у роботі результати були отримані при кімнатній температурі (22 °C).

Реєстраційну камеру перфузували (2 мл/хв) карбогеномізованим зовнішньоклітинним розчином, що містив (ммоль/л): NaCl – 140 , KCl – 3 , $CaCl_2$ – 2 , $MgCl_2$ – 2 , NEPES – 10 , глюкози – 12 ; pH $7,4$ (доведений NaOH). Внутрішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): K глюконату – 100 , KCl – 50 , $MgCl_2$ – 5 , EGTA – 10 , NEPES – 20 ; pH $7,4$ (доведений KOH). Необхідні концентрації блокаторів ($0,2$ ммоль/л 4-АП або 100 нмоль/л α -DTX) додавали безпосередньо у перфузійний розчин.

Реєстрації в режимі фіксації струму/потенціалу в конфігурації “ціла клітина” проводили із застосуванням підсилювача Axopatch-200B. Сигнали пропускали через низькочастотний фільтр підсилювача з частотою зрізу 5 кГц. Мембранні струми

та потенціали зберігали для подальшої обробки за допомогою перетворювача Digidata 1322A, підключеного до персонального комп'ютера з програмним забезпеченням pCLAMP 8.2 (Axon Instruments). Сигнали записували з частотою дискретизації 10 кГц та аналізували, застосовуючи програму Clampfit.

Використовували боросилікатні patch-піпетки з діаметром кінчика 1–1,5 мкм, що при наших розчинах визначало початковий електричний опір піпеток у межах 4–7 МОм. Ємнісні артефакти піпеток компенсували безпосередньо перед проривом клітинної мембрани після утворення гігаомного контакту. Клітинну ємність не компенсували, ємнісні артефакти використовували як зручний показник коректного віднімання струмів (див. нижче).

Аналізували лише клітини зі стабільним потенціалом спокою, більш негативним ніж -50 мВ. Висока амплітуда ПД ($87 \text{ мВ} \pm 4 \text{ мВ}$, $n = 12$) була додатковим критерієм реєстрації активності саме від ГКС, а не переміщених амакринових клітин (амплітуда ПД яких у середньому становить 55 мВ) [13]. Всі експерименти з фіксацією струму виконувалися при підтримуваному потенціалі -70 мВ для чого через клітину постійно пропускали відповідний гіперполяризувальний струм.

Вхідний опір, сталу часу мембрани та ємність клітини вимірювали в режимі фіксації струму за формою усередненого електротонічного потенціалу, викликаного аплікацією гіперполяризувального імпульсу малої амплітуди (10 пА).

Генерацію ПД у ГКС викликали серіями деполяризувальних прямокутних імпульсів тривалістю 500 мс та інкрементом амплітуди 5–10 пА. Надто великі струми викликали блокування генерації ПД, тому амплітуда стимулювального імпульсу не перевищувала 50–300 пА (залежно від внутрішнього опору клітини). До аналізу брали тільки тонічні нейрони – ці клітини мають здатність постійно генерувати ПД під час

перебігу деполяризувального імпульсу. Для більшості протестованих клітин миттєва частота імпульсації (1 / міжімпульсний інтервал) мала максимальне значення на початку деполяризувального імпульсу, згодом зменшувалася за експонентою та після 200–300 мс сягала сталого рівня. Як характеристику здатності клітини до високочастотної генерації нами було обрано середню частоту ПД, що вимірювалася у останні 100 мс деполяризувального імпульсу [10].

Для запобігання впливу високочастотної імпульсації на ширину окремого ПД його показники вимірювали при мінімальному надпороговому імпульсі. Для кожної клітини вимірювали поріг і амплітуду ПД, швидкість деполяризації, ширину (на напіввисоті), швидкість реполяризації та амплітуду слідової гіперполяризації.

При аналізі потенціалкерованих калієвих струмів клітини спершу тестували на тонічність у режимі фіксації струму, після чого перемикали підсилювач у режим фіксації потенціалу. Для блокади вхідних натрієвих і кальцієвих струмів використовували тетродотоксин (ТТХ, 0,001 ммоль/л) і хлорид кадмію (0,1 ммоль/л) відповідно. Підтримуваний потенціал становив -70 мВ. Безпосередньо перед аплікацією командного деполяризувального потенціалу прикладали гіперполяризувальний (до значення мембранного потенціалу -100 мВ) преімпульс тривалістю 200 мс для запобігання інактивації калієвих каналів. Інтегральні калієві струми викликали аплікацією потенціалів тривалістю 400 мс та інкрементом +10 мВ (до +40 мВ). 4-АП-чутливі струми отримували цифровим відніманням амплітуди струму за наявності блокатора від контрольного значення. Для побудови усередненого вольт-амперного графіку амплітуди струмів були вноормовані на контрольне значення струму при потенціалі +40 мВ.

У роботі було використано реактиви виробництва фірми „Sigma“ (США). Результати

тати представлені як середнє \pm стандартна похибка середнього. Для їх статистичного аналізу використовували парний критерій т Стьюдента. Різниця середніх вважалася статистично достовірною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Середній потенціал спокою ГКС шурів становив $-57 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$ ($n = 17$), що відповідає значенням, отриманим у попередніх дослідженнях [10, 13]. Вхідний опір ($0,65 \text{ ГОм} \pm 0,07 \text{ ГОм}$), стала часу мембрани ($28 \text{ мс} \pm 3 \text{ мс}$) і клітинна ємність ($47 \text{ пФ} \pm 6 \text{ пФ}$) коливалися в широких межах для різних клітин. Результати узгоджуються з раніше отриманими даними на морфологічно різних ГКС [10], що свідчить про реестрацію нами також ГКС

різних типів.

Ми спостерігали тонічний характер імпульсації у всіх 12 ГКС шурів, тобто ці клітини мали здатність постійно генерувати ПД під час перебігу деполяризувальної команди. Середня максимальна частота імпульсації, виміряна в останні 100 мс командного сигналу, становила $50 \text{ Гц} \pm 5 \text{ Гц}$ ($n = 12$). Ширина окремого ПД тонічних клітин була $1,2 \text{ мс} \pm 0,1 \text{ мс}$ ($n = 12$), поріг $-46 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$, амплітуда $87 \text{ мВ} \pm 4 \text{ мВ}$, швидкість деполяризації $154 \text{ мВ/мс} \pm 14 \text{ мВ/мс}$, швидкість реполяризації $102 \text{ мВ/мс} \pm 11 \text{ мВ/мс}$ та амплітуда слідової гіперполяризації $18 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$.

Аплікація 4-АП істотно зменшувала максимальну сталу частоту імпульсації до $19 \text{ Гц} \pm 2 \text{ Гц}$ ($n = 7$; рис. 1, а). Показники окремого ПД також суттєво змінювалися:

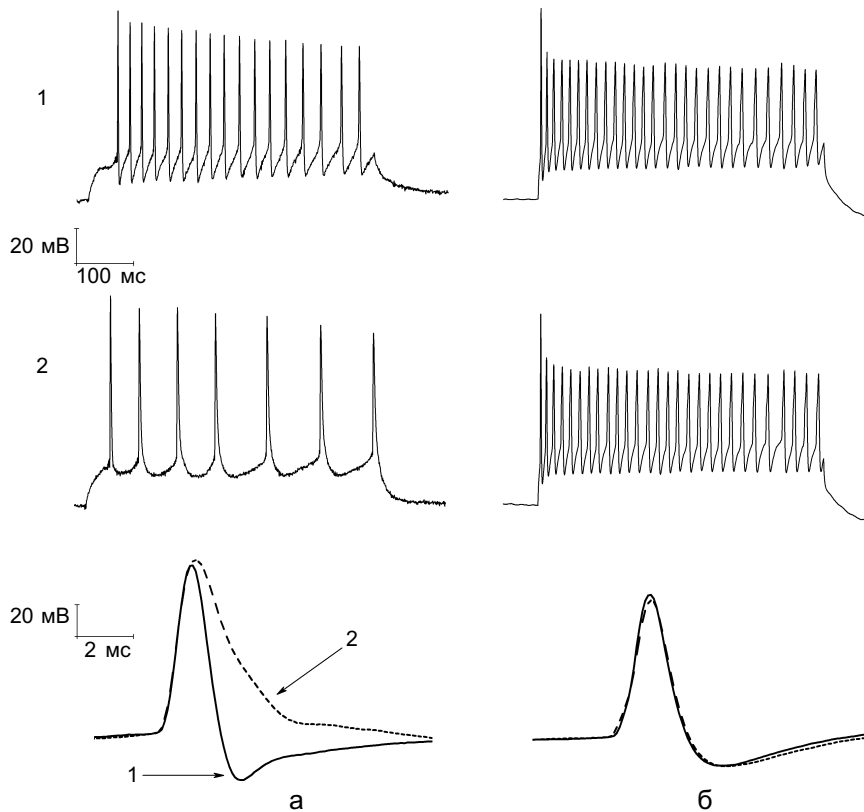


Рис. 1. Дія блокаторів калієвих каналів на характер викликаної імпульсації та форму окремого потенціалу дії у гангліозних клітинах сітківки шурів: а – 4-амінопіридин (0,2 ммоль/л), б – α -дендротоксин (100 нмоль/л); 1 – контрольні записи, 2 – реестрація за наявності відповідного блокатора. Наведені дані в стовбцях отримані з двох різних клітин

ширина становила $2,8 \text{ мс} \pm 0,3 \text{ мс}$, амплітуда слідової гіперполяризації $3 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$ і швидкість реполяризації $38 \text{ мВ/мс} \pm 7 \text{ мВ/мс}$. Разом з тим поріг, амплітуда ПД і швидкість деполяризації достовірно не змінювалися (рис. 2).

Специфічний блокатор каналів Kv1 α -DTX достовірно не впливав на частоту імпульсації ГКС і показники окремого ПД ($n = 5$; рис. 1, б; 2).

Калієві струми виділялися через блокування вхідних потенціалкерованих натрієвих і кальцієвих каналів за допомогою ТТХ

і хлориду кадмію. Деполяризувальні потенціали, позитивніші за -40 мВ , викликали вихідні струми з повільною або відсутньою інактивацією (рис. 3). Максимальна амплітуда струму (при потенціалі $+40 \text{ мВ}$) становила $1,61 \text{ нА} \pm 0,22 \text{ нА}$ ($n = 6$). Для аналізу блокувального ефекту 4-АП на калієві струми, ми використовували таку саму його концентрацію, як і в експериментах з фіксацією струму. Аплікація 4-АП спричиняла помірний (25%), проте достовірний, блок струму. Середнє значення 4-АП-чутливого струму становило $0,40 \text{ нА} \pm$

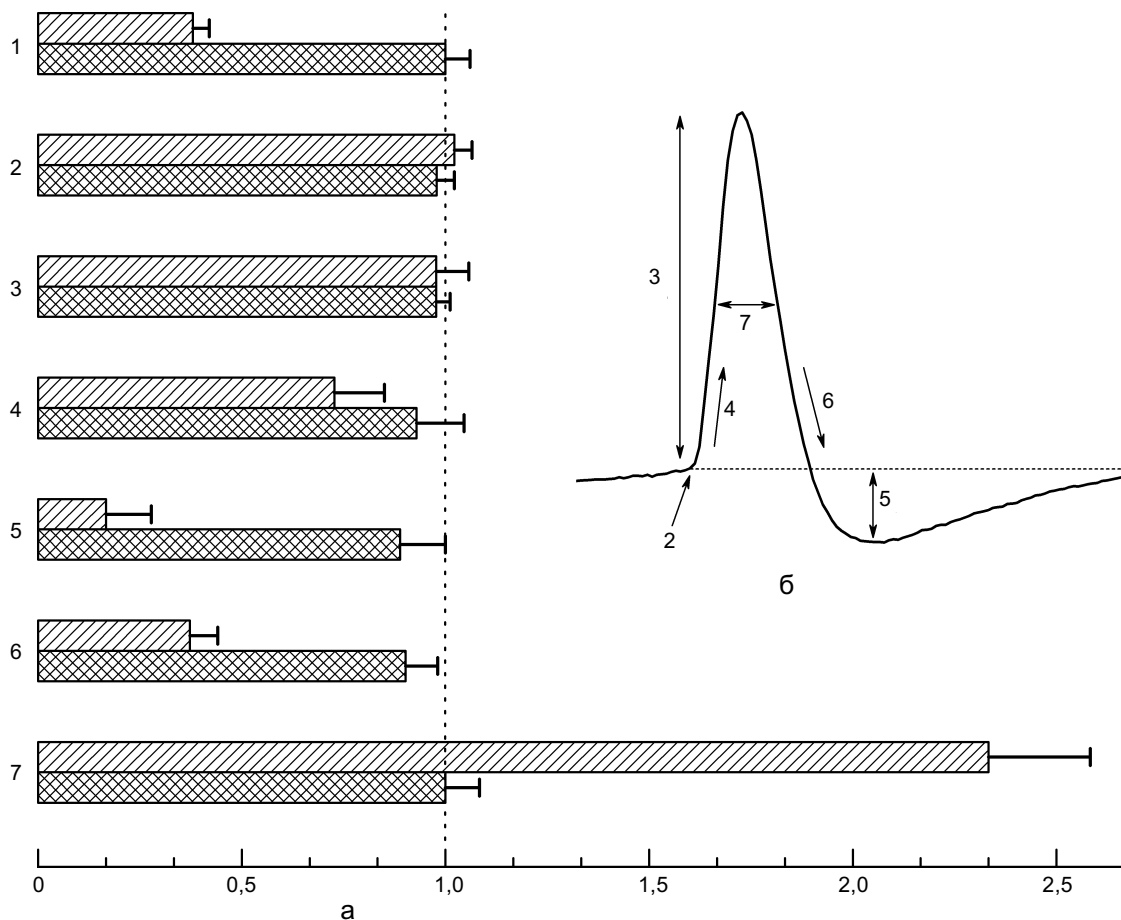


Рис. 2. Статистичне порівняння частоти імпульсації (а, 1) гангліозних клітин сітківки щурів та параметрів окремого потенціалу дії (2 – поріг виникнення, 3 – амплітуда, 4 – швидкість деполяризації, 5 – амплітуда слідової гіперполяризації, 6 – швидкість реполяризації, 7 – ширина) до і після аплікації блокаторів. Заштриховані однією похилою лінією планки – аплікація $0,2 \text{ ммоль/л}$ 4-амінопіридину, двома перехресними – аплікація 100 нмоль/л б й α -дендротоксину. Середнє значення у контролі приймали за одиницю, експериментальні дані були знормовані відносно нього. Похибка представлена як стандартна похибка середнього. б – схематичне відображення показників окремого потенціалу дії. Цифрові позначення на вставці відповідають таким для рис.2, а

0,09 нА ($n = 6$). Цей струм за властивостями (потенціал активації, повільна інактивація) був подібний до описаних раніше Kv3.1/Kv3.2-струмів, отриманих як у різних нативних нейронах [2, 3, 8, 9, 11, 12], так і в штучних експресійних системах [11, 12].

ОБГОВОРЕННЯ

За допомогою методів реєстрації в конфігурації “ціла клітина” в умовах фіксації струму/потенціалу ми досліджували мембранні властивості ГКС шурів.

ГКС ссавців відрізняються за морфологією, а також функціональними та електрофізіологічними властивостями [10]. Незважаючи на це, властивості імпульсації більшості цих клітин є схожими: вони

виявляють високочастотний характер генерації ПД у відповідь на тривалу деполяризацію [10].

За електрофізіологічними властивостями ГКС шурів подібні до центральних нейронів з високою частотою імпульсації, наприклад, інтернейронів неокортекса [3] та гіпокампа [8], нейронів *nucleus tractus solitarii* [2] та клітин Пуркінє [9]. Усі досліджені нами клітини генерували швидкі (шириною близько 1 мс) ПД із високою частотою ($50 \text{ Гц} \pm 5 \text{ Гц}$, $n = 12$).

Компонент інтегрального калієвого струму, чутливий до низьких концентрації 4-АП, відіграє ключову роль у забезпеченні характерної електричної активності ГКС шурів. Аплікація цього блокатора значно змінювала частоту генерації та показники окремого ПД та мала помірний вплив на

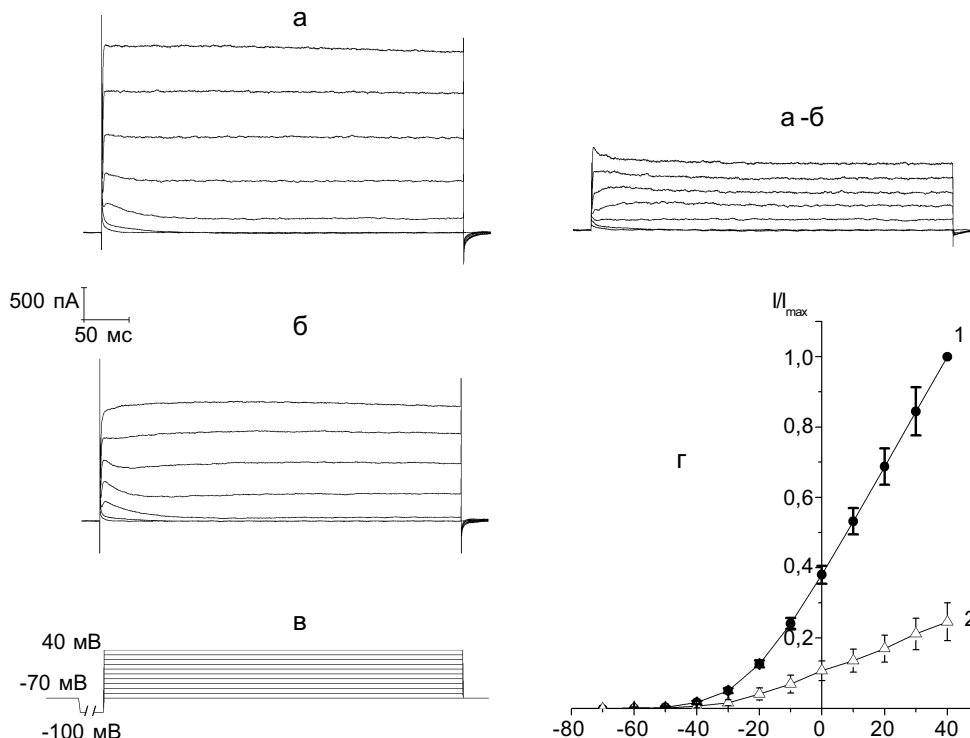


Рис. 3. Викликані деполяризацією калієві струми у гангліозних клітинах сітківки шурів, де а – контрольні записи калієвих струмів в тонічних гангліозних клітинах сітківки; б – калієві струми після аплікації 0,2 ммоль/л 4-амінопіридину; а – б) – чутливий до блокатору компонент інтегрального калієвого струму; в – форма командного сигналу; г – графік нормованої вольт-амперної характеристики усереднених контрольних записів (1) та різницевого струму (2). Значення струмів були знормовані на величину контрольного струму при команді +40 мВ (I_{max}). Похибка представлена як стандартна похибка середнього

потенціалкеровані калієві струми. Важливим є той факт, що порівняно незначне блокування інтегрального калієвого струму (на 25%) призводить до істотного зниження частоти імпульсації ГКС (на 62%), збільшення ширини окремого ПД (на 133%), зменшення швидкості реполяризації (на 63%) та амплітуди слідової гіперполяризації (на 83%). 4-АП-чутливий компонент інтегрального калієвого струму, зареєстрований в наших експериментах, є подібним до Kv3.1/Kv3.2-зумовлених струмів, що було описано в попередніх працях [2, 3, 8, 9, 11, 12].

Використана концентрація 4-АП (0,2 ммоль/л), крім блокади Kv3.1- ($IC_{50} = 0,029$ ммоль/л) та Kv3.2- ($IC_{50} = 0,1$ ммоль/л) провідностей, певною мірою впливає на канали родини Kv1 [1, 4]. Для оцінки можливої ролі каналів Kv1.1 ($IC_{50} = 0,16-1,1$ ммоль/л), Kv1.2 ($IC_{50} = 0,2-0,8$ ммоль/л) та Kv1.6 ($IC_{50} = 0,3-1,5$ ммоль/л) у реалізації процесів, що за нашим припущенням зумовлюються Kv3.1- та Kv3.2- провідностями, ми використали α -DTX (специфічний блокатор Kv1.1, $IC_{50} = 20$ нмоль/л, Kv1.2, $IC_{50} = 17$ нмоль/л, та Kv1.6, $IC_{50} = 20$ нмоль/л) [1, 4], проте, його аплікація ніколи не призводила як до істотного зменшення частоти імпульсації, так і до змін показників окремого ПД. Стала часу інактивації потенціалкерованих калієвих каналів Kv1.3 ($IC_{50} = 0,2-1,5$ ммоль/л) становила 250–600 мс [1] – 4-АП-чутливий компонент калієвого струму у наших експериментах помітно не інактивувався протягом 400 мс (див. рис. 3, а–б). Калієві канали Kv1.4 ($IC_{50} = 0,013-0,7$ ммоль/л) зумовлюють так званий “транзйентний” струм, що має швидку кінетику інактивації $\approx 20-40$ мс [1] – різницевий струм не мав у своєму складі істотного компонента з подібною кінетикою (рис. 3, а–б). Мало досліджено наявність експресії каналів Kv1.5 ($IC_{50} = 0,27-0,4$ ммоль/л) у ГКС: нам відомо принаймні дві праці, що описують експресію цих каналів у ГКС дорослих щурів [6] та її повну

відсутність [7]. В існуючих літературних даних ми не знайшли жодних свідочств щодо експресії каналів Kv1.7 ($IC_{50} = 0,15-0,25$ ммоль/л) у ГКС або інших клітинах сітківки ока щура. Також слід відмітити електричні властивості калієвих каналів родини Kv1. Для всіх їх типів потенціал активації становить близько -50 мВ [1, 4], проте, потенціал активації 4-АП-чутливого компонента калієвого струму у наших експериментах був значно позитивніший за зазначений (див. рис. 3, в). Це свідчить про відсутність внеску каналів родини Kv1 у реалізацію високочастотної імпульсної активності ГКС та у формування окремого ПД.

Отже, 4-АП-чутливий компонент інтегрального калієвого струму відіграє ключову роль у реалізації високочастотної генерації ПД у ГКС дорослих щурів. Досліджені нами клітини мають схожий характер електричної активності з ГКС інших видів тварин. Описані фармакологічні та кінетичні властивості цього компонента подібні до властивостей Kv3.1/Kv3.2-струму у ГКС і центральних нейронах різних тварин [2, 3, 8, 9, 11, 12]. Таким чином, отримані результати свідчать, що 4-АП-чутливий компонент інтегрального калієвого струму забезпечується Kv3.1- та Kv3.2-каналами, проте, для остаточного доведення цього факту бажано провести додаткові дослідження із застосуванням специфічних блокаторів каналів Kv3, методів імуноцитохімії та полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією.

К.И. Кузнецов, В.Ю. Маслов, С.А. Федулова, Н.С. Веселовский

4-АМИНОПИРИДИНЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ КОМПОНЕНТ КАЛИЕВОГО ТОКА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ВЫСОКОЧАСТОТНУЮ ТОНИЧЕСКУЮ ИМПУЛЬСАЦИЮ ГАНЛИОЗНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ КРЫС

Используя метод фиксации потенциала/тока в конфигурации “целая клетка” изучали характеристики высокочастотной импульсной активности ганглиозных клеток

сетчатки и роль в ее генерации компонента интегрального калиевого тока, чувствительного к низким концентрациям блокатора потенциалуправляемых калиевых каналов 4-аминопиридина (4-АП). Аппликация 0,2 ммоль/л 4-АП приводила к снижению частоты вызванной импульсации ганглиозных клеток на 62% ($n = 7$). При этом длительность одиночных потенциалов действия увеличивалась на 133%, уменьшались скорость реполяризации на 63% и амплитуда следовой гиперполяризации на 83%. Также снижалась амплитуда интегрального калиевого тока ганглиозных клеток сетчатки. 4-АП-чувствительный компонент калиевого тока, полученный вычитанием остаточного тока после аппликации блокатора из контрольных значений ($1,61 \text{ нА} \pm 0,22 \text{ нА}$, $n = 6$), был равен $0,40 \text{ нА} \pm 0,09 \text{ нА}$ ($n = 6$). Определено, что умеренное (на 25%) снижение амплитуды калиевого тока существенно влияет на характер импульсной активности ганглиозных нейронов. 4-АП-чувствительный компонент проявлял сходство с калиевым током, опосредованным каналами Kv3.1/Kv3.2. При этом вероятное влияние 4-АП на каналы семейства Kv1 исключалось аппликацией специфического блокатора этих каналов α -дендротоксина (100 нмоль/л), которая не имела достоверных эффектов ни на частоту импульсной активности нейронов, ни на показатели одиночных потенциалов действия. Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли 4-АП-чувствительного компонента калиевого тока в процессе генерации высокочастотной импульсной активности ганглиозными клетками сетчатки крыс при их деполяризации. Приведенные факты позволяют также предположить, что 4-АП-чувствительный компонент интегрального калиевого тока опосредован Kv3.1/Kv3.2-проводимостью.

Ключевые слова: ганглиозные клетки сетчатки, высокочастотная импульсация, 4-аминопиридин.

**K.I. Kuznetsov, V.Yu. Maslov, S.A. Fedulova,
N.S. Veselovsky**

4-AP-SENSITIVE POTASSIUM CURRENT AND ITS INFLUENCE ON HIGH FREQUENCY TONIC FIRING OF THE RAT RETINAL GANGLION CELLS

High frequency firing properties of the rat retinal ganglion cells and role of 4-AP-sensitive potassium current in firing generation were studied using whole cell patch-clamp techniques. Potassium channel blocker 4-AP (0,2 mM) reduced depolarization-evoked firing rate by 62% (from 50 ± 5 , $n = 12$ to 19 ± 2 Hz, $n = 7$). Single action potential parameters were affected: half-width was increased by 133% (from $1,2 \pm 0,1$, $n = 12$ to $2,8 \pm 0,3$ ms, $n = 7$), decay slope was decreased by 63% (from 102 ± 11 , $n = 12$ to 38 ± 7 mV/ms, $n = 7$) and afterhyperpolarization amplitude by 83% (from 18 ± 2 , $n = 12$ to 3 ± 2 mV, $n = 7$). 4-AP application (0,2 mM) reduced potassium current amplitude of the retinal neurons. 4-AP-sensitive current was obtained by digital subtraction of current that was registered in the presence of the blocker from control

current records ($1,61 \pm 0,22 \text{ нА}$, $n = 6$). 4-AP-sensitive current was equal to $0,40 \pm 0,09 \text{ нА}$ ($n = 6$). Thus, moderate (25%) reducing of potassium current amplitude leads to essential changes in firing properties of retinal neurons. 4-AP-sensitive residual current was similar to Kv3.1/Kv3.2 potassium currents that were described in literature previously. Moreover, we excluded the possibility of 4-AP influence on Kv1 channels by specific blocker α -dendrotoxin (100 nM) application. Such applications significantly affected neither firing frequency nor single action potential parameters. The data obtained suggest that 4-AP-sensitive current plays a key role in high frequency firing generation in the rat retinal ganglion cells. We assume that the 4-AP-sensitive current is mediated by Kv3.1/Kv3.2 conductance.

Keywords: retinal ganglion cell, high frequency tonic firing, 4-AP.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
International Center Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Coetzee W. A., Amarillo Y., Chiu J., Chow A., Lau D., McCormack T., Moreno H., Nadal M. S., Ozaita A., Pountney D., Saganich M., Vega-Saenz d. M., Rudy B. Molecular diversity of K⁺ channels // *Ann. N.Y.Acad.Sci.* – 1999. – **868**. – P. 233-285.
2. Dallas M. L., Atkinson L., Milligan C. J., Morris N. P., Lewis D. I., Deuchars S. A., Deuchars J. Localization and function of the Kv3.1b subunit in the rat medulla oblongata: focus on the nucleus tractus solitarii // *J.Physiol.* – 2005. – **562**, № 3. – P. 655-672.
3. Erisir A., Lau D., Rudy B., Leonard C. S. Function of specific K(+) channels in sustained high-frequency firing of fast-spiking neocortical interneurons // *J.Neurophysiol.* – 1999. – **82**, № 5. – P. 2476-2489.
4. Gutman G. A., Chandy K. G., Grissmer S., Lazdunski M., McKinnon D., Pardo L. A., Robertson G. A., Rudy B., Sanguinetti M. C., Stuhmer W., Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels // *Pharmacol.Rev.* – 2005. – **57**, № 4. – P. 473-508.
5. Henne J., Jeserich G. Maturation of spiking activity in trout retinal ganglion cells coincides with upregulation of Kv3.1- and BK-related potassium channels // *J.Neurosci.Res.* – 2004. – **75**, № 1. – P. 44-54.
6. Holtje M., Brunk I., Grosse J., Beyer E., Veh R. W., Bergmann M., Grosse G., Ahnert-Hilger G. Differential distribution of voltage-gated potassium channels Kv1.1 – Kv1.6 in the rat retina during development // *J.Neurosci.Res.* – 2007. – **85**, № 1. – P. 19-33.
7. Koeberle P. D., Wang Y., Schlichter L. C. Kv1.1 and Kv1.3 channels contribute to the degeneration of retinal ganglion cells after optic nerve transection in vivo //

- Cell Death and Diff. – 2010. – **17**, № 1. – P. 134-144.
8. Lien C. C., Jonas P. Kv3 potassium conductance is necessary and kinetically optimized for high-frequency action potential generation in hippocampal interneurons // J.Neurosci. – 2003. – **23**, № 6. – P. 2058-2068.
 9. Martina M., Metz A. E., Bean B. P. Voltage-dependent potassium currents during fast spikes of rat cerebellar Purkinje neurons: inhibition by BDS-I toxin // J.Neurophysiol. – 2007. – **97**, № 1. – P. 563-571.
 10. O'Brien B. J., Isayama T., Richardson R., Berson D. M. Intrinsic physiological properties of cat retinal ganglion cells // J.Physiol. – 2002. – **538**, № 3. – P. 787-802.
 11. Rudy B., Chow A., Lau D., Amarillo Y., Ozaita A., Saganich M., Moreno H., Nadal M. S., Hernandez-Pineda R., Hernandez-Cruz A., Erisir A., Leonard C., Vega-Saenz d. M. Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability // Ann.N.Y.Acad.Sci. – 1999. – **868**. – P. 304-343.
 12. Rudy B., McBain C. J. Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing // Trends Neurosci. – 2001. – **24**, № 9. – P. 517-526.
 13. Wang G. Y., Ratto G., Bisti S., Chalupa L. M. Functional development of intrinsic properties in ganglion cells of the mammalian retina // J.Neurophysiol. – 1997. – **78**, № 6. – P. 2895-2903.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;
Міжнар. центр молек. фізіології НАН України, Київ
E-mail: kir.kuznet@gmail.com*

*Матеріал надійшов до
редакції 27.05.2010р.*

О.В. Починюк, О.Л. Заїка, О.В. Садовий, О.М. Яворська,
П.Г. Костюк, О.О. Лук'янець

Участь синаптоагмінів у вивільненні катехоламінів хромафінними клітинами надниркової залози щура

Відомо, що екзоцитоз забезпечує такі життєвоважливі процеси, як вивільнення нейромедіаторів при синаптичній передачі або гормонів під час секреції. Головний механізм здійснення екзоцитозу відбувається за допомогою спеціалізованого білкового комплексу, який називається SNARE-комплекс. Саме завдяки його активності зливаються везикулярна та плазматична мембрани та формується фузійна пора, через яку вміст везикул вивільняється назовні. Вважається, що саме синаптоагміні, які є кальційзалежними білками, відповідальні за ініціацію кальційзалежного екзоцитозу. Синаптоагміні розташовані на мембрані везикул і здатні зв'язувати два або три іони кальцію. Вивчалася роль однієї з найбільш розповсюджених їх ізоформ – синаптоагміну-1 у процесі екзоцитозу. Щоб пригнітити функцію цього протеїну, використовували ін'єкцію антитіл до синаптоагміну-1 в ізольовані хромафінні клітини надниркової залози щура. Секрецію катехоламінів вимірювали за допомогою амперометричного методу. Наші результати показали, що пригнічення функції синаптоагміну-1 у досліджуваних клітин призводило до значного зменшення секреції. Отримані результати дають змогу зробити висновок, що синаптоагмін-1 є одним із ключових протеїнів, необхідних для забезпечення кальційзалежного екзоцитозу у хромафінних клітин.

Ключові слова: хромафінні клітини, кальцій, синаптоагмін, SNARE-комплекс, екзоцитоз, секреція, катехоламіни.

ВСТУП

Відомо, що передача інформації в нервовій системі здійснюється завдяки синаптичному процесу, при якому за допомогою спеціалізованих синаптичних везикул вивільнюється секретована сполука з клітини назовні. Такий самий механізм задіяний у нейроендокринних клітинах, в тому числі хромафінних клітинах надниркової залози. Відомо що вивільнення, або екзоцитоз, має дуже складний механізм, в якому залучені численні синаптичні протеїни [4, 12, 13]. Найголовніший сигнал, що запускає екзоцитоз – збільшення концентрації вільного кальцію в цитозолі ($[Ca^{2+}]_i$) [1, 5, 17, 19], а універсальною ланкою, що здійснює злиття везикули із плазматичною мембраною є білковий SNARE-комплекс

(від англ. soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor). SNARE-комплекс був вперше ізольований із екстрактів нервових клітин [20], він також може бути реконструйованим із рекомбінантно експресованих та очищених білків *in vitro* [7, 8]. Це велика група білків, що здійснює злиття внутрішньоклітинних транспортних везикул з клітинною мембраною (екзоцитоз) або органелами-мішенями. Нині виявлено близько 60 білків SNARE, котрі розділяють на дві функціональні групи: везикулярні білки (v-SNARE) і білки органел-мішеней або плазматичної мембрани (t-SNARE). До v-SNARE відносяться гомологи синаптобrevіну, до t-SNARE – синтаксину-1 та SNAP-25. Згідно з новою структурною класифікацією, яка базується на внеску у нульовий іонний шар в зібраному SNARE-

© О.В. Починюк, О.Л. Заїка, О.В. Садовий, О.М. Яворська, **П.Г. Костюк**, О.О. Лук'янець

комплексі, ці групи підрозділяються на R-SNARE і Q-SNARE. R-SNARE забезпечує аргініном (R) цей іонний шар, тоді як Q-SNARE забезпечує його комплементарними глутамінами (Q) [9].

Зібрання білків SNARE в “транс”-комплекс, імовірно, зникає протилежні ліпідні бішари мембран, що належать до мембрани клітини та секреторних гранул, внаслідок чого їх наближення зумовлює злиття, а також формування фузійної пори. Надходження кальцію в клітину завершує реакцію збирання в комплекс, яка відбувається за посередництва взаємодії сенсора кальцію, синаптоагміну з мембранними ліпідами і/або частково зібраним SNARE-комплексом. Згідно з однією із теорій – «змійки» (застібки, від англ. *zipping*), SNARE-комплекс формується послідовно, починаючи із дистального від мембрани регіону.

Як уже вказувалося вище, ключовою ланкою для запуску екзоцитозу є кальцій-залежний процес, для якого критичними є участь синаптоагміну-1 та комплексинів. Синаптоагмін-1 – синаптичний везикулярний білок з двома C2-доменами (C2A та C2B), які приймають подібні β -сендвіч-структури та зв’язують три та два іони кальцію відповідно за допомогою петель у верхній частині сендвіча [26, 30]. Синаптоагмін є кальцієвим сенсором, який бере участь в останніх стадіях викиду нейромедіатора в синаптичну щілину. Він зв’язується з нейрексином і SNAP-25, утримуючи секреторну везикулу біля пресинаптичної мембрани, і бере участь у викиді нейромедіатора внаслідок регуляції SNARE-комплексу при підвищенні вмісту кальцію в цитозолі. Синаптоагмін-1 зв’язується одночасно до мембрани і дію SNARE-комплексів, якщо вони закріплюються на плазматичній мембрані, в результаті чого формується четвертинний SNARE-синаптоагмін-1- Ca^{2+} -фосфоліпідний комплекс (SSCAP) [2, 6].

Мета нашої роботи – дослідження участі синаптоагміну-1 у процесі вивільнення катехоламінів із хромафінних клітин надниркових залоз при стимуляції секреції деполяризацією мембрани або активацією ацетилхолінових рецепторів плазматичної мембрани цих клітин.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на свіжоізолюваних хромафінних клітинах надниркових залоз дорослих (5–6 міс) самиць білих щурів лінії Вістар масою 18–230 г (як було описано раніше [14, 16, 22, 24, 31–34]). Клітини медули надниркової залози отримували за стандартною процедурою ферментативної ізоляції. Щура анестезували за допомогою ефіру, декапітували, виділяли надниркові залози, які промивали у розчині DPBS (фосфатний буфер Дульбекко). Далі через устя вени залозу промивали стандартним розчином DPBS, що містив колагеназу типу IA («Sigma-Aldrich», США) в концентрації 0,5 мг/мл. Під біноклюаром виділяли медулярну частину залози, розділяли на тонкі смужки товщиною 300–500 мкм. Отримані зрізи інкубували в розчині DPBS, що містив колагеназу в концентрації 0,3 мг/мл протягом 50–60 хв при 37 °С. Окремі хромафінні клітини отримували за допомогою повільного піпетування. Отриману суспензію клітин ізолювали на покривне скло, розташоване в робочій камері, в яку після прикріплення клітин до поверхні покривного скла додавали зовнішньоклітинний розчин.

Для реєстрації вивільнення катехоламінів використовували електрохімічний метод, який базується на окисненні-відновленні специфічних хімічних сполук. Коли молекули, що легко окиснюються (або відновлюються) дифундують до поверхні електрода, виникає хімічна реакція, в результаті якої утворені електрони реагують із поверхнею електрода, викликаючи

електричний струм. В наших експериментах використані електроди з карбоновими волокнами, оскільки вони мають більш стабільні електрохімічні властивості. Ми виготовляли вугільні електроди, в яких окреме карбонове волокно діаметром 10 мкм і довжиною 6–8 см розміщували всередині поліетиленової трубки. Для реєстрації квантового процесу вивільнення використовували такі розчини (ммоль/л): контрольний – NaCl – 130, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10; pH 7,3; деполяризуючий розчин – NaCl – 85, KCl – 50, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, HEPES – 10, глюкоза – 10; pH 7,3. Чашку Петрі з клітинами розташовували в полі зору інвертованого мікроскопа «Olympus IX70» (Японія) з короткофокусним об'єктивом зі збільшенням у 40 крат. Електрод з карбоновим волокном за допомогою мікроманіпулятора підводили якнайближче до досліджуваної клітини. Для реєстрації індукованих електричних струмів (I_e) використовували підсилювач ЕРС-9 («НЕКА», Німеччина). Окремі секреторні піки реєстрували в конфігурації «амперометрія», коли на електрод прикладався постійний потенціал +600 мВ. Карбонові електроди характеризували за наявності в робочій камері катехоламінів («Sigma-Aldrich», США) в концентрації 1 ммоль/л. Вихідний сигнал підсилювача фільтрували при частоті пропускання 3 кГц за допомогою трипольного фільтра Бесселя та цифрового фільтра (10 мГц).

Антитіла вводили під тиском за допомогою системи мікроін'єкції Picospritzer III («Parker Instruments», США) та мікроманіпулятора з мікроелектродом, що містив суміш антитіл та флуоресцентного декстрану, кон'югованого із FITC (флуоросцеїн ізотіоціанат), («Sigma-Aldrich», США). Інтенсивність флуоресценції вимірювали за допомогою мікроскопа «Olympus IX70» (Японія).

Вимірювання та запис результатів контролювали за допомогою комп'ютерних

програм «Pulse» та «xChart» («НЕКА», Німеччина). Для зміни зовнішньоклітинних розчинів навколо досліджуваної клітини була застосована система локальної аплікації. Швидкість зміни розчину становила 0,3 мл/хв.

Аналіз результатів здійснювали за допомогою програми «Microcal™Origin™», версія 5.0 («Microcal Software Inc.», США). Всі чисельні значення результатів дослідження обраховано у вигляді середнього значення ± стандартна похибка (SEM). Достовірність визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Вірогідними вважали розбіжності при $P < 0,05$. Досліди проводили при кімнатній температурі (23–25°C).

РЕЗУЛЬТАТИ

У хромафінних клітинах секреція катехоламінів – є кальційзалежною і тому може бути індукована процесами, що викликають підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію ($[Ca^{2+}]_i$). Серед таких можливих шляхів використовується деполяризація мембрани клітини, під час якої відкриваються її потенціалзалежні кальцієві канали, та активація ацетилхолінових рецепторів, після якої підвищується концентрація $[Ca^{2+}]_i$ внаслідок надходження Ca^{2+} через іонотропні нікотинові рецептори, або вивільнення із внутрішньоклітинних кальцієвих депо, зумовлене функціонуванням метаболічних мускаринових рецепторів.

Для встановлення ролі кальцієвих каналів ми вивчали секрецію катехоламінів, викликану деполяризацією мембрани розчином, що містив 50 ммоль/л KCl. Як можна бачити на рис. 1, І аплікація 2,5 с деполяризуючим розчином викликала значну кількість секреторних подій, які реєстрували вимірювальним карбоновим електродом у вигляді секреторних транзистів.

При цьому можна було виділити 2 фази екзоцитозу: «швидку», що тривала близько 5 с після початку стимуляції, та «повільну»,

тривалість якої була вдвічі довшою. Перша фаза характеризувалась більш інтенсивною секрецією. Для визначення ролі синаптоагміну-1 у секреції ми використовували антитіла до синаптоагміну-1 у розведенні 1:100. Для цього робили ін'єкцію через мікроелектрод, що вводився у клітину, антитіл до синаптоагміну-1 разом із флуоресцентним декстраном (декстран-FITC), який мав подібну до антитіл молекулярну масу. Використання декстрану-FITC давало змогу контролювати за допомогою флуоресцентного мікроскопа потрапляння антитіл всередину клітини.

Як показали наші експерименти, ін'єкція антитіл до синаптоагміну-1 у клітину, майже повністю пригнічувала секреторні події, викликані деполяризацією клітини, у порівнянні з контролем. Так частота появи секреторних подій зменшилась на $84\% \pm 3\%$ ($n=11$; див. рис.1, II).

У наступних експериментах ми стимулювали секрецію за допомогою агоніста ацетилхолінових рецепторів – ацетилхоліну, який додавали у зовнішньоклітинний розчин у концентрації 1 ммоль/л. І також спосте-

рігали появу секреторних транзєнтів у відповідь на аплікацію агоніста (див. рис. 1, III). Слід відмітити, що у цьому разі такий самий двофазний характер секреції був і при стимуляції секреції КСІ. На відміну від секреторних піків індукованих КСІ, при аплікації ацетилхоліну амплітуда секреторних відповідей була в 2–3 рази більшою.

У наступних експериментах ми вивчали участь синаптоагміну-1 у виникненні секреторних відповідей в ізольованих хромафінних клітинах щура. Введення антитіл до синаптоагміну-1 у ту саму клітину, яку досліджували без антитіл, суттєво пригнічувало секреторну активність клітин (див. рис. 1, IV). Частота появи секреторних подій зменшувалася у порівнянні із контрольними вимірюваннями на $81,5\% \pm 5\%$ ($n=9$).

Для того щоб оцінити можливі зміни кінетичних показників секреторних піків при пригніченні функції синаптоагміну-1, ми проаналізували амплітуду, час наростання та спаду, ширину секреторного піку (за спаданням амплітуди до 5% від максимального

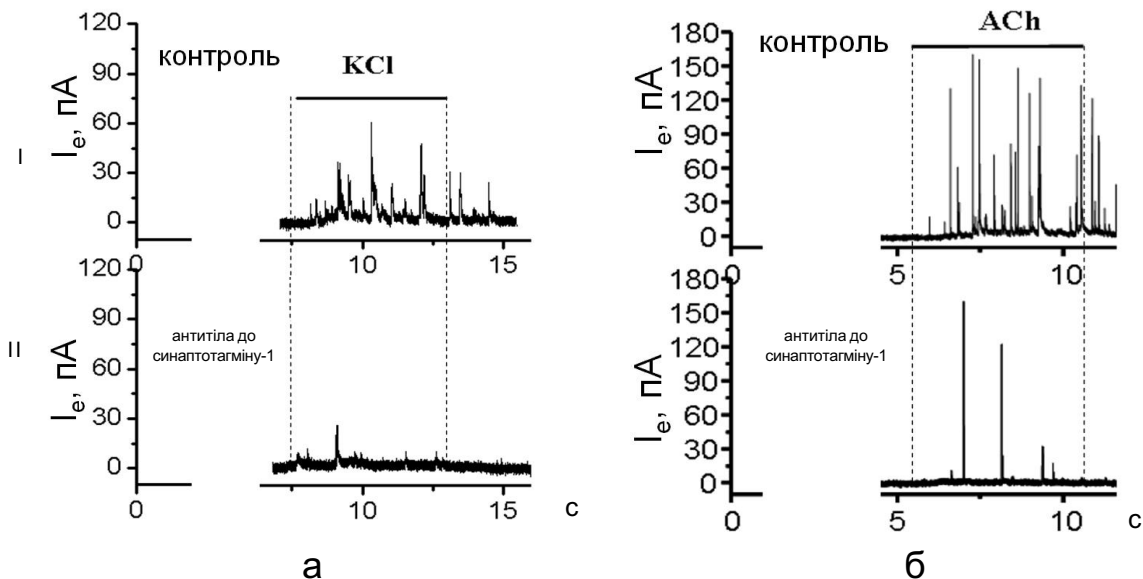


Рис. 1. Вивільнення катехоламінів від окремої хромафінної клітини при аплікації розчину, що містив 50 ммоль/л КСІ (а) та 1 ммоль/л ацетилхоліну (б) в контролі (I) та після ін'єкції в клітину антитіл до синаптоагміну-1 (II). Час аплікації однаковий для обох випадків, показано прямою лінією

значення, T_{95}), напівширину (за 50%-м спаданням, T_{50}), та його площа (рис. 2).

При обох вищеописаних типах стимуляції гістограми розподілу значень часових та амплітудних характеристик секреторних подій проявляли подібні до нормального розподілу ознаки. Значення досліджуваних параметрів при пригніченні функції синапто-тагміну-1 практично мало відрізнялися від отриманих у контрольних умовах (таблиця).

ОБГОВОРЕННЯ

Синаптотагміни це – кальційзв'язувальні білки синаптичних везикул, які беруть участь у швидкому кальційзалежному вивільненні нейротрансмітера під час синаптичної передачі. До родини синапто-тагмінів відносяться принаймні 13 білків, які залучені в мембранний транспорт [15,

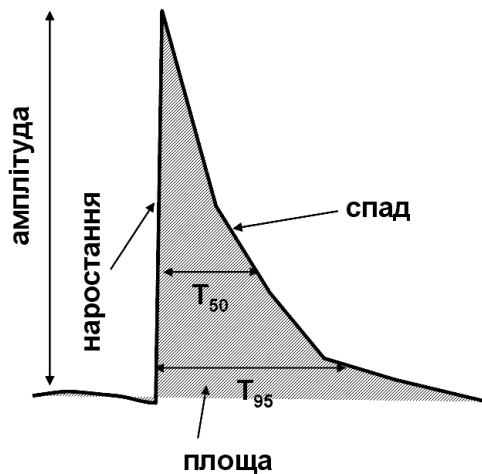


Рис. 2. Схематичне зображення секреторної події та показників, що визначалися

18, 25, 28]. Як було встановлено, всі синаптотагміни мають загальну доменну структуру, яка складається із трансмембранного N-закінчення, короткої зв'язувальної послідовності та з двох доменів C-терміналі (C_2A та C_2B). C_2 -домени більшості синаптотагмінів зв'язують два або три іони кальцію, тому їх відносять до кальцієвих сенсорів синаптотагміну [23]. Встановлено, що всі синаптотагміни головним чином експресуються в нервовій та ендокринній системах, саме там, де відбувається синаптична передача або секреція гормонів. Найбільш розповсюдженими є синаптотагміни-1 та 2, також розповсюдженим є синаптотагмін-7, тоді як інші ізоформи зустрічаються значно рідше. Синаптотагміни-1 та 2 є дуже спорідненими ізоформами і найбільш детально охарактеризовані. Було припущено, що вони розташовані на синаптичних везикулах як кальцієвої сенсори під час екзоцитозу [3, 21]. Цю ідею підтвердили експерименти із використанням мутантних мишей [11]. Крім того, дослідження на генетично модифікованих knock-in мишах показали, що мутації C_2A -домену синаптотагміну-1 зменшували кальцієву чутливість екзоцитозу [10]. Але існують також дослідження, які вказують, що не тільки синаптотагмін-1 та 2 відповідальні за кальційзалежний екзоцитоз у нейронах і нейроендокринних клітинах. Так, у PC12-клітинах [27] і нейронах гіпокампа [11] мутантних тварин, де було пригнічено функції цих синапто-тагмінів, кальційзалежний екзоцитоз спостерігався, хоча з дещо зміненими показ-

Порівняльні характеристики середніх значень показників секреторної події при різних стимуляціях секреції (M±m, n = 50)

Характеристика секреторної події	KCl, відн.од.	Ацетилхолін, відн.од.
Амплітуда	1,108±0,183	1,094±0,12
T_{50}	0,976±0,119	0,96±0,099
T_{95}	0,990,049	0,968±0,077
Площа	1,094±0,127	1,067±0,09
Час зростання	1,003±0,17	1,024±0,113
Час спаду	0,996±0,071	0,982±0,099

никами. Поясненням таких результатів досліджень є припущення, висловлене деякими авторами, що інші синаптоагміни (особливо синаптоагмін-7) можуть бути залученими до кальційзалежного екзоцитозу як основні сенсори, а синаптоагміни-1 та 2 є лише підсилювачами їх дії для забезпечення швидкісного синаптичного процесу в нервових синапсах [29].

У наших дослідженнях ми використали ін'єкцію специфічних антитіл до синаптоагміну-1 для блокування функції цього білка в процесі екзоцитозу. Такий підхід раніше не застосовувався, оскільки він є методично досить складним. Отримані нами порівняльні значення кінетичних показників секреторних піків за умов пригнічення функції синаптоагміну-1 мало відрізняються від контрольних. Цей факт вказує на те, що синаптоагмін-1 впливає не на кінетичні показники секреторних подій, а на частоту їх появи. Таким чином, результати досліджень показують, що блокування функції синаптоагміну-1 пригнічує секреторну функцію хромафінних клітин. А це свідчить про визначальну роль цього синаптичного білка в процесі кальційзалежного екзоцитозу в цих клітинах.

Робота була підтримана грантом INTAS 2001/2095. Ми дякуємо професору Р. Яхну (Макс-Планк, Інститут біофізичної хімії, Геттінген, Німеччина) за надані антитіла.

О.В. Починюк, О.Л. Заика, О.В. Садовий, Е.Н. Яворская, П.Г. Костюк, Е.А. Лукьянец

УЧАСТИЕ СИНАПТОАГМИНА В ВЫСВОБОЖДЕНИИ КАТЕХОЛАМИНОВ ХРОМАФФИННЫМИ КЛЕТКАМИ НАДПОЧЕЧНИКА КРЫСЫ

Как известно, экзоцитоз обеспечивает такие жизненно важные процессы, как высвобождение нейромедиаторов при синаптической передаче, или высвобождение гормонов во время секреции. Главный механизм осуществления процесса экзоцитоза происходит с помощью специализированного белкового комплекса, который называется SNARE-комплекс. Именно благодаря его активности происходит слияние везикулярной и плазматической

мембран и формирования фузионной поры через которую содержимое везикул высвобождается наружу. Считается, что именно синаптоагмины, которые являются кальцийзависимыми белками, ответственны за процесс инициации кальцийзависимого экзоцитоза. Синаптоагмины располагаются на мембране везикул и способны связывать 2 или 3 иона кальция. Мы изучали роль одной из самых распространенных их изоформ – синаптоагмина-1. Для этого мы использовали инъекцию антител к синаптоагмину-1 в изолированные хромаффинные клетки надпочечника крысы с целью подавить функцию этого протеина. Секрецию катехоламинов измеряли с помощью амперометрического метода. Наши результаты показали, что исключение функции синаптоагмина-1 в исследуемых клетках приводило к значительному угнетению секреции. Полученные результаты позволяют нам сделать вывод, что синаптоагмин-1 является одним из ключевых протеинов, необходимых для обеспечения кальцийзависимого экзоцитоза в хромаффинных клетках.

Ключевые слова: хромаффинная клетка, кальций, синаптоагмин, SNARE-комплекс, экзоцитоз, секреция, катехоламины.

O.V. Pochynuk, O.L. Zaika, O.V. Sadovyi, O.M. Yavorskaya, P.G. Kostyuk, E.A. Lukyanetz

PARTICIPATION OF SYNAPTOTAGMIN IN EXOCYTOSIS IN ADRENAL CHROMAFFIN CELLS OF RAT

Exocytosis is known to provide such a vital processes as the release of neurotransmitters in synaptic transmission or release of hormones during secretion. The main mechanism of exocytotic process occurs through the specialized protein complex called the SNARE-complex. Due to its activity the fusion of vesicular and plasma membrane occurs and fusion pore is formed through which a content of vesicles is released outside. It is believed that just synaptotagmins which are Ca²⁺-dependent proteins, responsible for initiation of the process of Ca²⁺-dependent exocytosis. Synaptotagmins are located at the membrane of the vesicles and can bind two or three Ca²⁺ ions. In our research, we studied the role of one of the most common isoform of synaptotagmins - synaptotagmin-1. For this we used an injection of antibodies arised to synaptotagmin-1 (anti-STg-1) into isolated rat adrenal chromaffin cells to depress the function of this protein. Catecholamine secretion was measured by amperometric method. Our results showed that an exclusion of synaptotagmin-1 function in tested cells resulted in significant suppression of secretion. These data allow us to conclude that synaptotagmin-1 is a key protein which is needed for Ca²⁺-dependent exocytosis in chromaffin cells.

Key words: Chromaffin cells, calcium, synaptotagmin, SNARE-complex, exocytosis, secretion, catecholamines.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; International Center Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Augustine G.J., Neher E. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells // *J.Physiol.(Lond)*. – 1992. – **450**. – P. 247–271.
2. Bhalla A., Chicka M.C., Tucker W.C., Chapman E.R. Ca(2+)-synaptotagmin directly regulates t-SNARE function during reconstituted membrane fusion // *Nat.Struct.Mol.Biol*. – 2006. – **13**. – P. 323–330.
3. Brose N., Petrenko A.G., Sudhof T.C., Jahn R. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface // *Science*. – 1992. – **256**. – P. 1021–1025.
4. Brunger A.T. Structural insights into the molecular mechanism of Ca(2+)-dependent exocytosis // *Curr.Opin.Neurobiol*. – 2000. – **10**. – P. 293–302.
5. Burgoyne R.D., Morgan A. Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics // *Trends Neurosci*. – 1995. – **18**. – P. 191–196.
6. Dai H., Shen N., Arac D., Rizo J. A quaternary SNARE-synaptotagmin-Ca²⁺-phospholipid complex in neurotransmitter release // *J.Mol.Biol*. – 2007. – **367**. – P. 848–863.
7. Fasshauer D., Bruns D., Shen B., Jahn R., Brunger A.T. A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25 // *J.Biol.Chem*. – 1997. – **272**. – P. 4582–4590.
8. Fasshauer D., Otto H., Eliason W.K., Jahn R., Brunger A.T. Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation // *J.Biol.Chem*. – 1997. – **272**. – P. 28036–28041.
9. Fasshauer D., Sutton R.B., Brunger A.T., Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. – 1998. – **95**. – P. 15781–15786.
10. Fernandez-Chacon R., Konigstorfer A., Gerber S.H., Garcia J., Matos M.F., Stevens C.F., Brose N., Rizo J., Rosenmund C., Sudhof T.C. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability // *Nature*. – 2001. – **410**. – P. 41–49.
11. Geppert M., Goda Y., Hammer R.E., Li C., Rosahl T.W., Stevens C.F., Sudhof T.C. Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse // *Cell*. – 1994. – **79**. – P. 717–727.
12. He B., Guo W. The exocyst complex in polarized exocytosis // *Curr.Opin.Cell Biol*. – 2009. – **21**. – P. 537–542.
13. Jena B.P. Secretory vesicles transiently dock and fuse at the porosome to discharge contents during cell secretion // *Cell Biol.Int*. – 2010. – **34**. – P. 3–12.
14. Kostyuk P.G., Pochynyuk O.M., Zaika O.L., Lukyanetz E.A. Roles of nicotinic and muscarinic receptors in calcium signaling and transmitter release // *Neurophysiology*. – 2003. – **35**. – P. 201–207.
15. Lukyanetz E.A. Role of synaptic proteins in neurotransmitter release-related vesicular trafficking // *Neurophysiology*. – 2008. – **40**. – P. 137–141.
16. Lukyanetz E.A. Calcium signaling in secretion of catecholamines in chromaffin cells // *Fiziol.Zh*. – 2009. – **55**. – P. 110–111.
17. Lukyanetz E.A., Neher E. Different types of calcium channels and secretion from bovine chromaffin cells // *Eur.J.Neurosci*. – 1999. – **11**. – P. 2865–2873.
18. Marqueze B., Berton F., Seagar M. Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? // *Biochimie*. – 2000. – **82**. – P. 409–420.
19. Neher E., Sakaba T. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release // *Neuron*. – 2008. – **59**. – P. 861–872.
20. Otto H., Hanson P.I., Jahn R. Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP.25 in the membrane of synaptic vesicles // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. – 1997. – **94**. – P. 6197–6201.
21. Perin M.S., Fried V.A., Mignery G.A., Jahn R., Sudhof T.C. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C // *Nature*. – 1990. – **345**. – P. 260–263.
22. Pochynyuk O.M., Zaika O.L., Lukyanetz E.A. Role of the mitochondria in generation of acetylcholine-induced calcium transients in rat chromaffin cells // *Neurofiziolohiya/Neurophysiology*. – 2002. – **34**. – P. 217–219.
23. Rizo J., Sudhof T.C. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain // *J.Biol.Chem*. – 1998. – **273**. – P. 15879–15882.
24. Sadovyy A.V., Yavorskaya E.N., Lukyanetz E.A. Voltammetric detection of quantal release of catecholamines from chromaffin cells // *Fiziol.Zh*. – 2009. – **55**. – P. 140.
25. Schiavo G., Osborne S.L., Sgouros J.G. Synaptotagmins: more isoforms than functions? // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 1998. – **248**. – P. 1–8.
26. Shao X., Fernandez I., Sudhof T.C., Rizo J. Solution structures of the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound C2A domain of synaptotagmin I: does Ca²⁺ induce a conformational change? // *Biochemistry*. – 1998. – **37**. – P. 16106–16115.
27. Shoji-Kasai Y., Yoshida A., Sato K., Hoshino T., Ogura A., Kondo S., Fujimoto Y., Kuwahara R., Kato R., Takahashi M. Neurotransmitter release from synaptotagmin-deficient clonal variants of PC12 cells // *Science*. – 1992. – **256**. – P. 1821–1823.
28. Sudhof T.C., Rizo J. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic // *Neuron*. – 1996. – **17**. – P. 379–388.
29. Sugita S., Han W., Butz S., Liu X., Fernandez-Chacon R., Lao Y., Sudhof T.C. Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca(2+) sensor in exocytosis // *Neuron*. – 2001. – **30**. – P. 459–473.
30. Sutton R.B., Davletov B.A., Berghuis A.M., Sudhof T.C., Sprang S.R. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid binding fold // *Cell*. – 1995. – **80**. – P. 929–938.
31. Zaika O.L., Pochiniuk O.M., Luk'ianets E.A. Electrochemical studies of induced secretion of catecholamines

- from individual vesicles of rat chromaffin cells // Ukr.Biokhim.Zh. – 2001. – **73**. – P. 69–72.
32. Zaika O.L., Pochynyuk O.M., Lukyanetz E.A. Comparative characteristics of the secretory responses of chromaffin and pheochromocytoma PC-12 cells to acetylcholine stimulation // Neurophysiology. – 2000. – **32**. – P. 174–176.
33. Zaika O.L., Pochynyuk O.M., Lukyanetz E.A. Comparative studies of calcium transients induced by acetylcholine in rat chromaffin cells // Neurophysiology. – 2002. – **34**. – P. 261–263.
34. Zaika O.L., Pochynyuk O.M., Sadovyy A.V., Kostyk P.G., Lukyanetz E.A. Involvement of the Endoplasmic Reticulum of Chromaffin Cells of the Rat Adrenal Gland in Calcium Signaling // Neurofiziologiya/ Neurophysiology. – 2009. – **41**. – P. 460–466.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 01.06.2010*

Р.Б. Струтинський, Р.А. Ровенець, О.П. Нещерет

Вплив нового активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну на зміни вмісту глюкози в крові

Досліджували in vivo вплив нового фторвмісного вітчизняного активатора АТФ-чутливих калієвих (K_{ATP}) каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран флокаліну на вміст глюкози в артеріальній крові анестезованих собак за фізіологічних умов і при ішемії (90 хв) та реперфузії (180 хв) міокарда. Показано, що внутрішньовенне введення субстанції флокаліну в дозах від 0,1 до 1,0 мг/кг практично не змінює вміст глюкози в крові. Протягом усього експерименту (5,5 год) внутрішньошлункове (за допомогою зонда) введення лікарської форми (таблетки) флокаліну в кардіопротекторній дозі (2,2 мг/кг) в експериментах з ішемією–реперфузією міокарда також не впливало на цей показник. Проте внутрішньовенне введення субстанції флокаліну в дозі 1,5 мг/кг, що перевищує кардіопротекторну дозу (0,1 мг/кг), яка використовується в експериментах з ішемією–реперфузією міокарда для відтворення фармакологічного прекодиціювання, збільшувало вміст глюкози у середньому у 1,33 раза. Слід зауважити, що це підвищення було швидкоплинним і протягом години після введення флокаліну він відновлювався практично до вихідного стану. Практично однакові зміни показників кардіогемодинаміки та вмісту глюкози в артеріальній крові при введенні ідентичних доз флокаліну на початку та в кінці експерименту можуть (сумарна доза флокаліну, що отримувала одна собака протягом дослідження, 4–5 год, становила близько 4–4,5 мг/кг) свідчити про відсутність у нього за цих умов експерименту кумулятивного ефекту. Таким чином, незначний вплив на вуглеводний обмін та низька токсичність дає змогу вважати новий вітчизняний фторвмісний активатор K_{ATP} -каналів досить перспективним для клінічного застосування.

Ключові слова: K_{ATP} -канали, вміст глюкози в артеріальній крові, флокалін, ішемія–реперфузія.

ВСТУП

Активация АТФ-чутливих калієвих (K_{ATP}) каналів клітинних мембран є одним із головних ендогенних захисних механізмів організму в відповідь на зменшення внутрішньоклітинного вмісту АТФ нижче від мілімолярних рівнів, зокрема при гіпоксії та ішемії тканини [22, 31]. Їх екзогенна активация фармакологічним шляхом запускає не менш потужні, аналогічні до ендогенних, захисні механізми, одним із яких є зменшення входу Ca^{2+} в клітину через L-тип кальцієвих каналів [20, 25], а також накопичення його в матриксі мітохондрій

внаслідок пригнічення входу через потенціалзалежний кальцієвий уніпортер [26, 29]. Основним ендогенним регулятором активності цих каналів є внутрішньоклітинна концентрація АТФ і деколи, як у панкреатичних β -клітинах, головну роль відіграє співвідношення АТФ/АДФ [22, 33]. Їх значимість в умовах фізіологічної норми для більшості тканин досі залишається невідомою, тоді як для підшлункової залози вона певним чином розкрита. K_{ATP} -канали, зв'язуючи біоенергетичний стан клітини з її мембранним потенціалом, впливають на реакцію клітини в відповідь на зміни

© Р.Б. Струтинський, Р.А. Ровенець, О.П. Нещерет

метаболізму в її цитоплазмі і середовищі, яке оточує клітину, що переважано пов'язані з гіпоксією та вмістом глюкози в крові. Збільшення вмісту АТФ від вищевказаного рівня, навпаки, призводить до закривання цих каналів [22, 30, 31]. Виходячи з того, що при фізіологічних умовах внутрішньоклітинна концентрація АТФ відповідає мілімолярним рівням (близько 3–5 ммоль/л) $K_{\text{АТФ}}$ -канали постійно повинні бути в інгібованому стані [34]. Це стосується практично всіх тканин організму, за виключенням β -клітин підшлункової залози (навіть при досить високій внутрішньоклітинній концентрації АТФ канали здатні відкриватись у відповідь на зменшення співвідношення АТФ/АДФ) – що тісно пов'язано з виробленням інсуліну, а, отже, нормальним функціонуванням всього організму [24, 33]. При зниженні вмісту глюкози в крові, зокрема до 2–3 ммоль/л, у β -клітинах підшлункової залози зменшується співвідношення АТФ/АДФ і, як наслідок, активуються $K_{\text{АТФ}}$ -канали, гіперполяризується плазматична мембрана, зменшується вхід у клітину Ca^{2+} , концентрація цитоплазматичного Ca^{2+} та секреція інсуліну [24, 33]. Підвищення вмісту глюкози в крові після прийняття їжі, насамперед вище від 5,5 ммоль/л, призводить до збільшення вмісту внутрішньоклітинного АТФ, закривання $K_{\text{АТФ}}$ -каналів і деполяризації плазматичної мембрани β -клітин підшлункової залози. При цьому активуються потенціал-залежні кальцієві канали, збільшується внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} і екзоцитоз гранул з інсуліном [24, 27, 32, 33]. Слід зауважити, що ще задовго до відкриття $K_{\text{АТФ}}$ -каналів [30] похідні сульфонілсечовини (відкриті Marcel Janbon в 1942 р.), які є потужними інгібіторами активності цих каналів, використовувались у медичній практиці як засоби, що стимулюють секрецію інсуліну у хворих на цукровий діабет 2-го типу [1, 21]. І тільки зовсім недавно дослідникам удалося визначити молекулярний механізм дії сульфонілсечовини – інгібування

$K_{\text{АТФ}}$ -каналів, збільшення надходження Ca^{2+} в β -клітину та екзоцитоз інсуліну.

Таким чином, не все те, що є попереджувальним і рятівним від ішемічних і реперфузійних пошкоджень тканин доцільне для цілого організму, але може негативно впливати на функцію окремих органів і систем, зокрема на виділення інсуліну панкреатичними β -клітинами підшлункової залози, яке прямо залежить від надходження Ca^{2+} в клітину. На відміну від ендогенної активації $K_{\text{АТФ}}$ -каналів, фармакологічні активатори безпосередньо відкривають їх, збільшують калієву трансмембранну провідність і пригнічують вхід кальцію в клітину, внаслідок чого в панкреатичних клітинах може пригнічуватися вивільнення ними інсуліну [33]. Тому до використання активаторів цих каналів у практичній медицині слід підходити з обережністю, особливо при цукровому діабеті та наявності перших ознак його розвитку.

Опираючись на дані попередніх досліджень [2, 3, 5–14, 17] цілої низки нових фторвмісних та відомих активаторів калієвих каналів, нами було визначено, що одним з найкращих за своїми кардіопротекторними властивостями та значно меншій токсичності, є флокалін. Це було підставою для створення його лікарської форми (таблетки) та проведення доклінічних досліджень.

Метою нашої роботи було вивчення впливу флокаліну – активатора $K_{\text{АТФ}}$ -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран – на вуглеводний обмін анестезованих собак за фізіологічних умов та при ішемії–реперфузії міокарда.

МЕТОДИКА

Досліди виконували на безпородних собаках різної статі масою від 17 до 23 кг ($n=14$), під хлоралозо-уретановим наркозом (0,07 та 0,7 г/кг маси, внутрішньовенно). В роботі використовували метод ретроградної катетеризації, аутоперфузії та прицільної

емболізації гілки лівої коронарної артерії, що дає змогу відтворювати локальну ішемію–реперфузію міокарда без розтину грудної порожнини та зі збереженням спонтанного дихання (детально метод описаний раніше [4]). Перфузія коронарних судин з постійним об'ємом крові давала можливість слідкувати за змінами судинного тону. Гемодинамічні показники реєстрували протягом усього дослідження за допомогою полікардіографа “Mingograph-82”, фірми “Siemens-Elma” (Швеція). Вміст глюкози в крові вимірювали глюкометром „Accu-check active” (Німеччина).

Проведено дві серії експериментів. В першій серії досліджували вплив на вміст глюкози в артеріальній крові різних доз (від 0,1 до 1,5 мг/кг) субстанції флокаліну, який вводили внутрішньовенно. Вміст глюкози вимірювали через 20 та 60 хв після введення флокаліну. В другій серії – флокалін (таблетована форма) вводили за допомогою зонда в шлунок у дозі 2,2 мг/кг (доза, яка в експериментах з ішемією–реперфузією міокарда використовується для відтворення кардіопротекторного ефекту фармакологічного прекодиціювання [3]) за 60 хв до ішемії.

Регіональна ішемія міокарда тривала 90 хв, наступна реперфузія – 180 хв. Протягом усього експерименту відбирали артеріальну кров для вимірювання вмісту глюкози. Для контролю відбирали кров в аналогічних експериментах з ішемією та реперфузією без попереднього введення флокаліну.

Отримані результати обробляли математично методом варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Origin 7,0. Достовірність результатів визначали за критерієм t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ розглядали як статистично достовірні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених експериментів було встановлено (рис. 1), що активація K_{ATP} -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран за допомогою внутрішньовенного введення флокаліну в дозах до 1 мг/кг не змінює вміст глюкози в артеріальній крові великих тварин (собак). Слід зауважити, що ця доза в 10 разів перевищує кількість флокаліну, що в експериментах з ішемією–реперфузією міокарда використовується для відтворення кардіопротек-

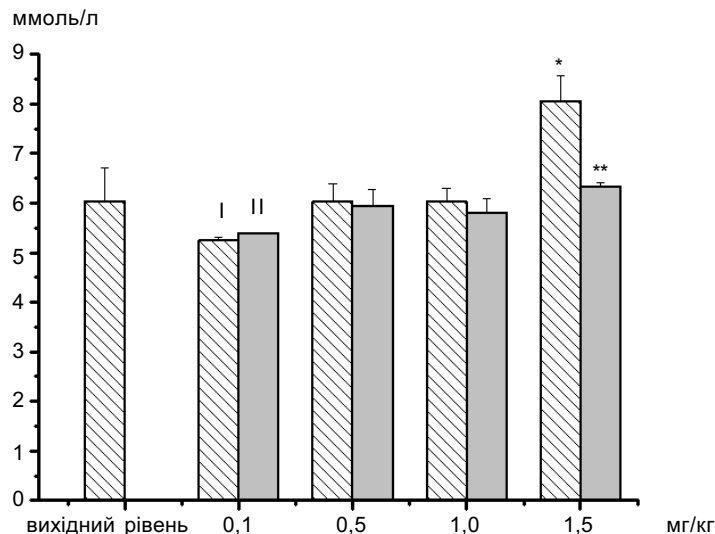


Рис.1. Зміна вмісту глюкози в артеріальній крові анестезованих собак при внутрішньовенному введенні різних доз флокаліну через 20 та 60 хв: I і II відповідно. За віссю абсцис – доза флокаліну, за віссю ординат – вміст глюкози. * $P < 0,05$ – порівняно з вихідними значеннями; ** $P < 0,05$ – порівняно зі значеннями на 20-й хвилині після введення

торного ефекту – фармакологічного прекодиціювання [14]. Не спостерігалось будь-яких достовірних змін (див. рис.1) і при повторному вимірюванні вмісту глюкози за годину після введення цих доз флокаліну. Водночас введення дози 1,5 мг/кг, що перевищує кардіопротекторну дозу в 15 разів, спричиняє збільшення цього показника до $8,1 \text{ ммоль/л} \pm 0,5 \text{ ммоль/л}$ ($P < 0,05$, $n=4$), що в 1,33 раза вище, ніж вихідний вміст глюкози – $6,0 \text{ ммоль/л} \pm 0,7 \text{ ммоль/л}$ (див. рис.1). Таким чином, при внутрішньовенному введенні субстанції флокаліну в дозах від мінімальних і до тих, що перевищують кардіопротекторну в 15 разів відсутня будь-яка дозозалежність ефекту та лише введення 1,5 мг/кг флокаліну впливає на вуглеводний обмін собак. При вимірюванні вмісту глюкози через 1 год після введення найбільшої дози флокаліну виявилось, що він знизився практично до вихідного рівня і становив у середньому – $6,3 \text{ ммоль/л} \pm 0,1 \text{ ммоль/л}$ ($P < 0,05$ відносно збільшеного вмісту глюкози на 20-й хвилині після введення та відсутність достовірних відмінностей щодо вихідного рівня, $n=4$). Це вказує на невелику тривалість змін у вуглеводному обміні та досить швидко його нормалізацію. Навіть при такій досить великій дозі флокаліну системний артеріальний тиск знижувався на $66,28 \text{ мм рт.ст.} \pm 3,15 \text{ мм рт.ст.}$ ($P < 0,05$, $n=4$) або на $56,75 \% \pm 2,68 \%$ від вихідного рівня, що не бажано при терапії. Таким чином, використання флокаліну в дозі 1,5 мг/кг, яка вже може викликати збільшення вмісту глюкози в крові, ймовірно, внаслідок пригнічення екзоцитозу інсуліну β -клітинами підшлункової залози [23, 29] у медичній практиці мало вірогідне через досить сильний вплив на показники кардіогемодинаміки.

Слід зауважити, що доза флокаліну 1,0 мг/кг, ймовірно, є певною межею щодо змін вмісту глюкози в крові, а, отже, впливу на панкреатичні β -клітини та вуглеводний обмін. Виявлено, що якщо повторно введення флокаліну в цій дозі через 70 хв також

не викликало ніяких змін вмісту глюкози, то після дози 1,5 мг/кг, у той самий час, коли цей показник в артеріальній крові протягом години вже нормалізувався, викликало його підвищення в 1,32 раза від вихідного рівня ($5,9 \text{ ммоль/л} \pm 0,3 \text{ ммоль/л}$) та становив $7,8 \text{ ммоль/л} \pm 0,3 \text{ ммоль/л}$ ($P < 0,05$, $n=3$; рис. 2). Повторне вимірювання через 1 год після введення показало, що він, як і в попередніх випадках, знижувався і становив $6,6 \text{ ммоль/л} \pm 0,2 \text{ ммоль/л}$ ($P < 0,05$ відносно до збільшеного вмісту глюкози на 20-й хвилині після введення та відсутність достовірних відмінностей відносно вихідного рівня; $n=3$), що може свідчити про швидкоплинність змін у вуглеводному обміні. Використання флокаліну в медичній практиці в дозі 1,0 мг/кг щодо захисту міокарда від ішемічних і реперфузійних пошкоджень є недоцільним, адже зменшення розміру інфаркту при внутрішньовенному введенні флокаліну в дозах від 0,1 до 1,0 мг/кг в експериментах з ішемією–реперфузією міокарда практично не відрізняються між собою (37,47 та 38,55 % відповідно) та становило $6,91 \pm 0,65$ та $6,79 \% \pm 0,7 \%$ відповідно порівняно з некротичною ділянкою у контрольних дослідах (ішемія–реперфузія без попереднього введення флокаліну), яка становила $11,05 \% \pm 0,72 \%$ від площі лівого шлуночка [18]. Проте флокалін в дозі 1,0 мг/кг, як і в випадку 1,5 мг/кг, може суттєво впливати на показники кардіогемодинаміки, що в клінічній практиці не завжди є потрібним, а інколи навіть небезпечним.

В іншій серії наших досліджень проводилися тривалі експерименти – 4–5 год, протягом яких анастезованим собакам через певні проміжки часу вводили флокалін. Сумарна доза флокаліну, що отримувала одна собака протягом експерименту була близько 4–4,5 мг/кг. Практично однакові зміни показників кардіогемодинаміки та вмісту глюкози в артеріальній крові при введенні ідентичних доз флокаліну на початку та в кінці експерименту можуть свідчити про відсутність у нього за даних

умов дослідження кумулятивного ефекту. Можливість застосовувати досить великі дози флокаліну без кумуляції його дії та досить низька токсичність додають цьому препарату певні переваги при можливому клінічному застосуванні [3, 12]. При тривалому (3 міс) введенні щурам і собакам флокаліну в дозах, які в 10 та 50 разів перевищують максимальні добові дози для людини, він не чинив суттєвої негативної дії на функціонування життєво важливих органів і систем [12]. А вивчення гострої токсичності показало, що його напівлетальна доза для білих щурів становить 2150 мг/кг – значно менше, ніж токсичність відомих активаторів K_{ATF} -каналів, зокрема для пінацидилу (відомий аналог флокаліну, що не містить атому фтору) вона становить 600 мг/кг [3, 12, 19]. Таким чином, низька токсичність і відсутність змін у вмісті глюкози при введенні терапевтичних доз флокаліну надає йому певні переваги над закордонними аналогами як можливими лікарськими засобами.

В експериментах з ішемією–реперфузією міокарда введення лікарської форми (таблетки) флокаліну в кардіопротекторній

дозі 2,2 мг/кг не спричиняло збільшення вмісту глюкози в артеріальній крові під час усього експерименту – протягом 5,5 год. Зміни цього показника під час ішемії та наступної реперфузії були подібними до таких в контрольних експериментах – ішемія–реперфузія без попереднього введення флокаліну (рис.3). Як за дії флокаліну, так і в контрольних експериментах спостерігалось його незначне зниження від вихідного рівня – близько 1 ммоль/л. Максимальні значення зменшення вмісту глюкози відбувалися протягом першої години реперфузії та становили $5,8 \text{ ммоль/л} \pm 0,8 \text{ ммоль/л}$ ($n=5$) в експериментах з флокаліном та $5,7 \text{ ммоль/л} \pm 0,3 \text{ ммоль/л}$ ($n=5$) у контролі при вихідних значеннях $7,2 \pm 1,3$ і $6,9 \text{ ммоль/л} \pm 0,3 \text{ ммоль/л}$ відповідно.

Слід зазначити, що таких результатів ми очікували. Відомо, що активатори K_{ATF} -каналів мають певну специфіку дії, яка залежить від місця взаємодії з каналними білками, а саме від ізоформи SUR-субодиниці. Цей канал складається з двох типів білків: сульфонілсечовинного рецептора – SUR (регуляторна субодиниця близько 160

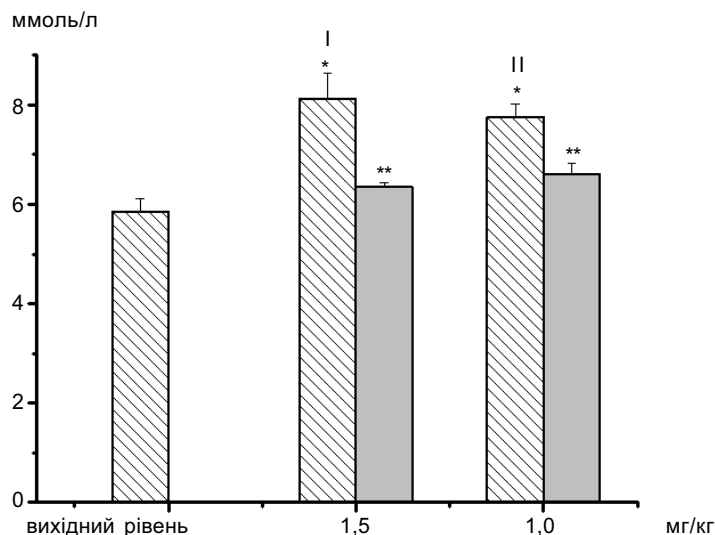


Рис.2. Зміна вмісту глюкози в артеріальній крові анестезованих собак при внутрішньовенному введенні флокаліну в дозі 1,0 мг/кг, через 70 хв після введення дози 1,5 мг/кг: I і II відповідно – вміст глюкози через 20 та 60 хв після введення флокаліну. За віссю абсцис – доза флокаліну, за віссю ординат – вміст глюкози. * $P < 0,05$ – порівняно з вихідними значеннями; ** $P < 0,05$ – порівняно зі значеннями на 20-й хвилині після введення

кДа) та меншого (близько 40 кДа) Kir6.x-білка, який відноситься до типу калієвих каналів внутрішнього випрямлення [28]. Чотири Kir6.x-субодиниці, об'єднуючись, утворюють калійселективну трансмембранну пору і разом з розташованими зовні чотирма SUR-субодиницями формують функціональний октаметричний канал: 4 Kir6.x + 4 SUR.x [15, 23, 28]. Відомо, що існує декілька підтипів Kir6.x- і SUR-субодиниць, які відрізняються між собою складом трансмембранних доменів і визначають специфічні властивості каналу в певних тканинах організму. Зараз ідентифіковано дві Kir6.x-субодиниці – Kir6.1 і Kir6.2 та три SUR-субодиниці – SUR.1 (переважно відповідає K_{ATP} -каналам нейрональних клітин і β -клітин підшлункової залози), SUR.2A і SUR.2B – м'язові ізоформи SUR-субодиниць. Виявлено, що K_{ATP} -канал у кардіоміоцитах і скелетних м'язах переважно складається з субодиниць Kir6.2 + SUR.2A, в судинних гладеньком'язових клітинах – з Kir6.1 + SUR.2B, в панкреатичних β -клітинах – з Kir6.2 + SUR.1 [15, 28, 33]. Відомо, що канали з SUR.1-субодиницею, що відповідають

K_{ATP} -каналам β -клітин підшлункової залози, переважно відкриваються активаторами, що за своєю структурою відносяться до бензотіадизинів – це діазоксид та його аналоги: NNC 55-9216, NN414 і NNC 55-0118 [28]. З одного боку, діазоксид практично не змінює активність K_{ATP} -каналів плазматичної мембрани кардіоміоцитів і гладеньком'язових клітин судин, активація в скелетних м'язах досі не виявлена, з іншого боку – два таких відомих активатора K_{ATP} -каналів як пінацидил і кромакалім, практично не відкривають калієві канали в панкреатичних β -клітинах і водночас є потужними активаторами цих каналів у кардіоміоцитах і гладеньком'язових клітинах судин, канали яких складаються відповідно з SUR.2A- і SUR.2B-субодиниць [31]. Дійсно, K_{ATP} -канали дуже чутливі як до діазоксиду, так і до пінацидилу та кромакаліму, проте два останніх в основному зменшують периферичний судинний опір та опір коронарних судин, кров'яний тиск і тривалість потенціалу дії в кардіоміоцитах, при цьому дуже мало впливають на панкреатичні β -клітини [15, 28, 33]. Відомо, що флокалін є фтор-

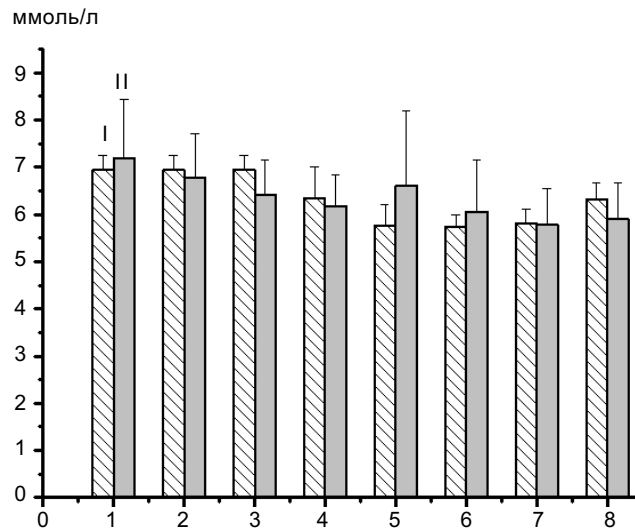


Рис.3. Зміна вмісту глюкози в артеріальній крові анестезованих собак при ішемії-реперфузії міокарда (I) та при ішемії-реперфузії з попереднім введенням лікарської форми (таблетки) флокаліну (II) внутрішлунково в дозі 2,2 мг/кг: 1 – вихідний рівень, 2 і 3 – на 30-й і 60-й хвилині після введення флокаліну відповідно; 4 і 5 – 10-й і 90-й хвилині ішемії відповідно; 6–8 – 10-й, 60-й і 120-й хвилині реперфузії відповідно

вмісним аналогом пінацидилу [19], отже, ми припускали що за своєю специфікою дії він може бути дуже схожий до нього. Потужні вазодилаторні властивості флокаліну (розширення коронарних судин, зменшення напруження ізольованих смужок аорти, зменшення системного артеріального тиску, перфузійного тиску в стегновій артерії та загального периферичного опору) були показані нами раніше як в *in vitro*, так і в *in vivo* експериментах [2, 3, 7, 11, 16]. За аналогією зі специфікою дії пінацидилу, ми припускали можливість того, що флокалін повинен мало впливати на $K_{ATФ}$ -канали панкреатичних β -клітин. Повне підтвердження цьому ми отримали в цій роботі. Тільки дуже великі дози флокаліну (які перевищують кардіопротекторні в 15 разів) трохи збільшують вміст глюкози в артеріальній крові, а отже через відкривання $K_{ATФ}$ -каналів β -клітин підшлункової залози зменшують вивільнення ними інсуліну та дещо змінюють вуглеводний обмін.

Таким чином, показано, що внутрішньовенне введення субстанції флокаліну в дозах від 0,1 до 1,0 мг/кг практично не змінює вміст глюкози в артеріальній крові. Не викликало збільшення вмісту глюкози протягом усього експерименту (5,5 год) внутрішньошлункове (за допомогою зонда) введення лікарської форми (таблетки) флокаліну в кардіопротекторній дозі – 2,2 мг/кг в експериментах з ішемією–реперфузією міокарда. Проте внутрішньовенне введення субстанції флокаліну в дозі 1,5 мг/кг, що перевищує кардіопротекторну (0,1 мг/кг – використовується в експериментах з ішемією–реперфузією міокарда для відтворення захисного ефекту – фармакологічного прекодиціювання) в 15 разів, збільшувало вміст глюкози у середньому у 1,33 раза. Слід зауважити, що це підвищення було швидкоплинним і через одну годину після введення флокаліну вміст глюкози відновлювався практично до вихідного рівня. Певним чином, для клінічної практики цей факт незначний, адже в таких дозах (в

15 разів вищих за ті, що викликають кардіопротекцію) в терапевтичних цілях його застосовувати недоцільно.

Отже, потужні кардіопротекторні властивості флокаліну [8, 9, 14, 17], відсутність змін вмісту глюкози в артеріальній крові при його використанні в кардіопротекторних і в 10 раз більших дозах, низька токсичність (в 4 рази менша, ніж у закордонного аналога пінацидилу) [3, 12, 19] робить новий вітчизняний фторвмісний активатор $K_{ATФ}$ -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран флокалін досить перспективним лікарським засобом.

Р.Б. Струтинский, Р.А. Ровенец, А.П. Нешерет

ВЛИЯНИЕ НОВОГО АКТИВАТОРА $K_{ATФ}$ -КАНАЛОВ ФЛОКАЛИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

В экспериментах на анестезированных собаках *in vivo* проводилось исследование влияния нового фторсодержащего активатора АТФ-чувствительных калиевых каналов сарколемальной и митохондриальной мембран флокалина на содержание глюкозы в артериальной крови при физиологических условиях и при ишемии (90 хв) и реперфузии (180 хв) миокарда. Показано, что внутривенное введение субстанции флокалина в дозах 0,1–1,0 мг/кг практически не изменяло содержание глюкозы в крови. Не вызывало увеличение этого показателя в течение всего эксперимента (5,5 ч) и внутрижелудочное (с помощью зонда) введение лекарственной формы (таблетки) флокалина в кардиопротекторной дозе – 2,2 мг/кг в экспериментах с ишемией–реперфузией миокарда. Однако внутривенное введение субстанции флокалина в дозе 1,5 мг/кг, что превышало кардиопротекторную дозу – 0,1 мг/кг, которая используется в экспериментах с ишемией–реперфузией миокарда с целью создания кардиопротекторного эффекта – фармакологического прекодицирования, в 15 раз, увеличивало содержание глюкозы в среднем в 1,33 раза. Следует отметить, что это увеличение не было длительным и повторное измерение этого показателя по истечении одного часа после введения флокалина показало, что его уровень восстанавливался практически к исходному. Одинаковые изменения показателей кардиогемодинамики и содержания глюкозы в артериальной крови при введении идентичных доз флокалина в начале и в конце эксперимента могут (суммарная доза флокалина, которую вводили одной собаке на протяжении эксперимента (4–5 ч) составляла около 4–4,5 мг/кг) свидетельствовать об отсутствии у флокалина в условиях эксперимента кумулятивного эффекта. Таким образом, сильные кардиопротекторные свойства, отсутствие значимых изменений в углеводородном обмене и

низкая токсичность позволяют считать новый фторсодержащий активатор K_{ATP} -каналов перспективным для клинического использования.

Ключевые слова: K_{ATP} -каналы, уровень глюкозы в артериальной крови, флокалин, ишемия–реперфузия.

**R.B. Strutynskiy, R.A. Rovenets,
O.P. Neshcheret**

THE INFLUENCE OF A NEW ACTIVATOR OF K_{ATP} CHANNELS FLOCALIN ON THE GLUCOSE LEVEL IN BLOOD

In experiments on the anaesthetized dogs we investigated the influence of a new fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels of sarcolemal and mitochondrial membranes flocalin on the level of glucose in arterial blood at physiological conditions and under ischemia (90 min) and reperfusion (180 min) of myocardium. It was shown that intravenous introduction of flocalin in doses 0,1 – 1,0 mg/kg did not change the level of glucose in blood. In experiments with ischemia-reperfusion of myocardium, flocalin also did not increase the level of glucose during all experiment (5,5 hours) after intragastric (with a help of catheter) introduction of drug form (tablets) at cardioprotective dose of 2,2 mg/kg. However, intravenous introduction of flocalin in the dose of 1,5mg/kg, which 15 times exceeded a cardioprotective dose of 0,1mg/kg increased the glucose level 1,33 fold. It should be noted that this increase was not sustained and the level of glucose restored to the initial level within 1 hour. Identical changes of indexes of cardiohemodynamic and the level of glucose in arterial blood under introduction of identical doses of flocalin at the beginning and at the end of experiment (total dose of flocalin reached 4 - 4,5 mg/kg) can testify the absence of cumulative effect of flocalin at these experimental conditions. Thus, strong cardioprotective properties, hypotoxicity and the absence of meaningful changes in a carbohydrate exchange allow to consider a new fluorine-containing opener of K_{ATP} channels of flocalin as perspective drug for clinical use.

Key words: K_{ATP} channels, the level of glucose in arterial blood, flocalin, drug form, ischemia-reperfusion

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Корпачев В.В. калиевые каналы и механизмы действия производных сульфонилмочевины // Укр. мед. часопис. – 2002. – №3. – С.16–22.
2. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А. Розробка та підготовка до впровадження нового вітчизняного кардіопротекторного препарату – фторвмісного активатора АТФ-залежних калієвих каналів Флокалін // Наука та інновації. – 2006. – 2, №4. – С.77–82.
3. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський

Л.М., Мохорт М.А., Шаламай А.С. Організація заводського виготовлення препарату Флокалін – нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора // Там само. – 2009. – 5, №1. – С.80–84.

4. Мойбенко О.О., Юзьків М.Я., Тумановська Л.В., Коцюруба А.В. Гостра ішемія–реперфузія міокарда: роль оксиду азоту // Фізіол. журн. – 2004. – 50, № 2. – С.34–42.
5. Пивовар С.М. Ендогенні механізми кардіопротекції: Роль активації мітохондріальних АТФ-чутливих калієвих каналів: Автореф. дис. ... канд.біол.наук. – 2006. – 20 с.
6. Пивовар С.М., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мойбенко О.О. Дослідження механізму дії нових фторвмісних аналогів діазоксиду на судинний тонус // Фізіол. журн. – 2004. – 50, № 2. – С.27–34.
7. Струтинський Р.Б. Вазодилаторні ефекти флокаліну – фторвмісного активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів // Там само. – 2010. – 56. – № 4. – С. 59–65.
8. Струтинський Р.Б. Кардіопротекторні ефекти лікарської форми фторвмісного активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну // Там само. – 2009. – 55, №4. – С.83–90.
9. Струтинський Р.Б., Коцюруба А.В., Нещерет О.П., Шиш А.М., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну в експериментах in vivo: вплив на біохімічні параметри крові за умов ішемії–реперфузії міокарда // Там само. – №6. – С.12–19.
10. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О. Моделювання активності АТФ-залежних калієвих каналів у аорті нормотензивних та гіпертензивних тварин // Там само. – 2000. – 46, №6. – С.54–60.
11. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. Дослідження вазомоторних ефектів нових фторвмісних синтетичних активаторів АТФ-залежних калієвих каналів // Там само. – 2000. – №4. – С.17–23.
12. Струтинський Р., Мохорт М., Ягупольський Л., Мойбенко О. Флокалін – новий вітчизняний кардіопротектор // Вісн. фармакології та фармації. – 2010. – №3. – С. 44–56.
13. Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М., Юзьків М.Я., Квочіна Л.І., Шиш А.М. Дослідження кардіопротекторних ефектів нового фторвмісного активатора АТФ –залежних калієвих каналів // Фізіол. журн. – 2001. – 47, №2. – С.16–23.
14. Струтинський Р.Б., Нещерет О.П., Тумановська Л.В., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну в експериментах in vivo: вплив на гемодинаміку та ураження міокарда за умов його ішемії–реперфузії // Там само. – 2009. – 55, №5. –С.9–16.
15. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М. АТФ-зависимые калиевые каналы и их роль как центрального звена

- кардиопротекції при ішемії–реперфузії міокарда. – В кн.: Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца // К.: Наук. думка. – 2008. – С.206–252.
16. Струтинський Р.Б., Пивовар С.Н., Ровенець Р.А., Пискун О.В., Ягупольський Л.М., Мойбенко О.О. Вплив активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну на функціонування ізольованого серця // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, № 6, С.18–24.
 17. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних та мітохондріальних аденозинтрифосфатзалежних калієвих K^+ -каналів // Там само. – 2008. – **54**, №6. – С.15–23. ^{АТФ}
 18. Струтинський Р.Б., Французова С.Б., Ровенець Р.А., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Флокалін – новий вітчизняний кардіопротектор. – В кн.: V Нац. конгрес патологіологів України з міжнар. участю «Сучасні проблеми патофізіології: від молекулярно – генетичних до інтегративних аспектів» (17–19 вересня 2008 р.). –Запоріжжя // Патологія. – 2008. – **5**, №3. – С. 22.
 19. Клебанов Б.М., І.І.Малетіна, Л.М.Ягупольський, Петко К.І., Шаваран С.С. Пат. 17071А Україна, МПК⁶ А 61 К 31/03. N-(1,2,2 –триметилпропіл)-N'ў-ціано-N'ў-арилгуанідини з фторовмісними замісниками в ароматичному ядрі, які проявляють гіпотензивну та кардіотонічну дію – № 95041977; Заяв. 26.04.95; Опубл. 31.10.97. – Промислова власність. – 1997. – №5. – С. 3.1.76.
 20. Alekseev A.E., Hodgson D.M., Karger A.B., Park S., Zingman L.V., Terzic F. 2005 ATP-sensitive K^+ channel channel/enzyme multimer: Metabolic gating in the heart // J. Mol. and Cell Cardiol. – 2005. – **38**. – P.895–905.
 21. Ashcroft F.M., Rorsman P. ATP-sensitive K^+ channels: A link between b-cell metabolism and insulin secretion // Biochem. Soc. Trans. – 1990. – №18. – P.109–111.
 22. Benndorf K., Thierfelder S., Doepfer B., Gebhardt G., Hirche H. Role of Cardiac K^+ Channels During Anoxia and Ischemia // News Physiol^{ATP} Sci. – 1997. – **12**, №4. – P.78–83.
 23. Campbell J.D., Sansom M.S., Ashcroft F.M. Potassium channel regulation // EMBO Rep. – 2003. – **4**, №11. – P. 1038–1042.
 24. Dunne M.J., Aynsley-Green A., Lindley K.J. Nature's K^+ channels knockout // News Physiol. Sci. – 1997. – **12**. – H.197–203.
 25. Flagg T.P., Nichols C.G. Sarcolemmal K^+ channels: what do we really know? // J. Mol. and Cell Cardiol. – 2005. – **39**. – P.61–70.
 26. Holmuhamedov E.L., Jovanovic S., Dzeja P.P., Jovanovic A., Terzic A. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels modulate cardiac mitochondrial function // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 1998. – **275**. – P. 1567–1576.
 27. Kawaki J., Nagashima K., Tanaka J., Miki T., Miyazaki M., Ganoi T., Mitsuhashi N., Nakajima N., Iwanaga T., Yano H., Seino S. Unresponsiveness to glibenclamide during chronic treatment induced by reduction of ATP-sensitive K^+ channels activity // Diabetes. – 1999. – **48**. – P.2001–2006.
 28. Moreau C., Prost A-L., Derand R., Vivaudou M. SUR, ABC proteins targeted by K^+ channels openers // J. Mol. and Cell Cardiol. – 2005. – **38**. – P.951–963.
 29. Murata M., Akao M., O'Rourke B., Marbán E. Mitochondrial ATP-Sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion: Possible mechanism of cardioprotection // Circulat. Res. – 2001. – **89**. – P. 891–898.
 30. Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle // Nature. – 1983. – **305**. – P.147–148.
 31. Quayle J.M., Nelson M.T., Standen N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle // Physiol. Rev. – 1997. – **77**, №4. – P.1165–1232.
 32. Trapp S., and F.M. Ashcroft. A metabolic sensor in action: news from the ATP-sensitive K^+ channel // News Physiol. Sci. – 1997. – №12. – P.255–263.
 33. Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T., Sperelakis N. ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells // Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. – 1998. – **274**. – P. 25–37.
 34. Zhang D.X., Chen Y.-F., Campbell W.B., Zou A.-P., Gross G.J., Li P.-L. Characteristics and superoxide – induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels // Circulat. Res. – 2001. – **89**(12). – P. 1177–1183.

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

Матеріал надійшов до
редакції 17.03.2010

З.А. Тамарова, Ю.П. Лиманський, О.І. Костюк, В.А. Мітрузаева, Л.І. Лиманська

Дія червоного поляризованого світла на точку акупунктури E-36 підсилює протибольовий ефект корвітину

На моделі формалінового тесту досліджували можливість посилення протибольового ефекту корвітину у мишей лінії C57BL/6J і CBA/CaLac дією червоного поляризованого світла (ПС) на точку акупунктури (ТА) E-36. Ресстрували тривалість больової поведінкової реакції (вилузування ураженої кінцівки), викликаній ін'єкцією 5%-го розчину формаліну в стопу (0,25 мкл, підшкірно) до та після системного введення корвітину (10 мг/кг, внутрішньочеревинно) або сукупного застосування корвітину і червоного ПС (10-хвилинний сеанс відразу після створення осередку болю). Установлено, що після аплікації ПС на протибольову ТА E-36 у всіх тварин достовірно підсилюється протибольовий ефект корвітину. У мишей лінії C57BL/6J застосування одного корвітину послаблювало больову реакцію на 29,7 %, а при сукупному використанні червоного ПС і корвітину – на 53,1 %. Миші лінії CBA/CaLac були менш чутливі як до корвітину, так і до ПС. Корвітин викликав у них скорочення тривалості больової реакції на 14 %, а при сполученні з червоним ПС – на 32,4 %. Нетравматичний, без побічних ефектів метод дії низькоінтенсивним ПС може бути рекомендований хворим, які приймають корвітин, для посилення його ефективності.

Ключові слова: корвітин, поляризоване світло, формаліновий тест, анальгезія, точка акупунктури E-36.

ВСТУП

Корвітин – препарат, створений на основі біофлавоноїдів, був розроблений в Україні [4, 5] для лікування хворих з ішемічними ураженнями серця, включаючи гострий інфаркт міокарда. На відміну від раніше застосованого для цих цілей кверцетину, корвітин розчиняється у воді, що дає змогу вводити його у судинну мережу та забезпечує більш швидку дію на міокард. Відомо, що поряд з кардіопротекторним ефектом корвітин має антиноцицептивну дію. Він суттєво послаблює експериментально викликаний вісцеральний [15] і соматичний біль у мишей. Пригнічення соматичного болю показано в тестах «гарячої пластини» [23] і «відсмокування хвоста» [9], а також на моделі «форма-

лінового тесту» [10, 22]. Наші недавні дослідження показали, що попередня ін'єкція корвітину (20 мг/кг, внутрішньочеревинно) статистично достовірно пригнічує больову поведінкову реакцію, викликану ін'єкцією формаліну у тильну поверхню стопи [1, 2]. У мишей лінії C57BL/6J тривалість больової поведінкової реакції скорочувалася на 26,8 %. Ми також виявили, що больову реакцію на формалін вдається послабити дією поляризованого світла (ПС) на протибольову точку акупунктури (ТА) [3, 9, 16]. При цьому було показано, що червоне ПС викликає найбільший анальгетичний ефект [24]. Можна припустити, що поєднане застосування корвітину і ПС буде більш ефективне для пригнічення тонічного больового синдрому.

Метою нашої роботи було дослідження

© З.А. Тамарова, Ю.П. Лиманський, О.І. Костюк, В.А. Мітрузаева, Л.І. Лиманська

можливості посилення протибольового ефекту корвітину у мишей двох ліній (C57BL/6J і CBA/CaLac) дією червоного ПС на ТА Е-36.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на 80 дорослих мишах-самцях ліній C57BL/6J (n=40) і CBA/CaLac (n=40) масою 22–28 г. За 2 доби до експерименту їх розсаджували по одній у клітці (вільний доступ до їжі та води), а за добу до початку експерименту клітку з мишею переносили в експериментальну кімнату і ставили біля робочого комп'ютера для адаптації. Експеримент завжди починався у 10.00. Кожну мишу використовували лише в одному експерименті. Біль викликали підшкірною ін'єкцією 25 мкл 5%-го розчину формаліну (в 0,9%-му розчині NaCl) у тильну поверхню стопи лівої задньої кінцівки. Як відомо [13, 17], формалін викликає больову реакцію (вилування осередка болю), котра має дві фази: рання фаза (гострий біль) починається практично відразу після ін'єкції і триває 5–10 хв і пізня фаза (тонічний біль) продовжується 60 хв і більше з максимумом через 20–30 хв після ін'єкції формаліну. Формаліновий тест є класичною моделлю хемогенного тонічного болю і широко застосовується в різних лабораторіях світу.

Корвітин (Борщагівський фармацевтичний завод, м. Київ, Україна) розводили в 0,9%-му розчині NaCl і вводили внутрішньоочеревинно в дозі 10 мг/кг (по 0,1 мл/10 г маси тіла) за 10 хв до ін'єкції формаліну в лапку. Контрольна група тварин замість корвітину одержувала ін'єкцію 0,9%-го розчину NaCl у тому самому об'ємі.

Як джерело ПС використовували апарат "Біоптрон-компакт" фірми «Цептер» (Швейцарія), який випромінює низькоенергетичне (40 мВт/см²) лінійно-поляризоване світло

(поляризація 95 %) з довжиною хвиль 480–3400 нм (видимий спектр). На виході апарата встановлювали червоний фільтр (виробництво тієї самої фірми). Промінь червоного ПС був спрямований на ТА Е-36. Відстань від світлофільтра до шкіри 5 см. Спеціальна світлонепроникна насадка з отвором забезпечувала діаметр світлової плями 5 мм.

Тварини кожної серії були розділені на 4 групи (по 10 у кожній): одна контрольна та три експериментальні. Миші 1-ї (контрольної) групи одержували ін'єкцію 0,9%-го розчину NaCl (внутрішньоочеревинно), а через 10 хв підшкірну ін'єкцію розчину формаліну в лапку; зразу після введення формаліну тварину розміщували в камері-трубочку. Камера мала багато отворів для вільного доступу повітря до тварини. Ліву задню лапку через спеціальний отвір виводили за межі камери і протягом 10 хв м'яко утримували за щиколотку рукою експериментатора (імітація сеансу ПС). Миші 2-ї групи одержували ін'єкцію корвітину; через 10 хв вводили формалін підшкірно в лапку; потім 10 хв миша знаходилася в камері, як описано вище (імітація сеансу ПС). Тварини 3-ї групи одержували внутрішньоочеревинно 0,9%-й розчин NaCl, через 10 хв після цього їм робили ін'єкцію формаліну в лапку, потім 10 хв мишу утримували в камері-трубочці (як описано вище) і протягом цього періоду ТА Е-36 опромінювали червоним ПС. На тваринах 4-ї групи досліджували поєднану дію корвітину та ПС на біль, викликаний формаліном. Миші цієї групи одержували ін'єкцію корвітину, через 10 хв ін'єкцію формаліну в лапку і відразу протягом 10 хв піддавалися дії червоного ПС на ТА Е-36.

Після закінчення сеансу ПС або його імітації мишу випускали в свою клітку і протягом наступних 60 хв спостерігали больову поведінкову реакцію (вилування ураженої кінцівки). За допомогою спеціально розробленої у нашому відділі комп'ю-

терної програми реєстрували початок і кінець кожного циклу вилузування. По закінченні експерименту будували гістограми тривалості больової реакції за послідовні 30-хвилинні відрізки часу і за 60 хв спостереження в цілому.

Результати оброблялися статистично з визначенням середнього по кожній групі значення і квадратичної похибки середнього. Достовірність різниці між групами оцінювали за критерієм *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Підшкірна ін'єкція формаліну в стопу викликала у всіх мишей больову поведінкову реакцію – вилузування ураженої кінцівки. Тривалість цієї реакції свідчить про інтенсивність болю. Оскільки перші 10 хв після ін'єкції формаліну в лапку всі миші знаходилися в камері-трубочці, ми не мали можливості спостерігати першу фазу

больової реакції (гострий біль) і надалі йтиметься лише про зміни тонічної фази болю.

Вплив корвітину на тонічний біль. Попередня (за 10 хв до створення джерела болю) ін'єкція корвітину скорочувала тривалість больової реакції. Уже в перші 30 хв як у мишей лінії C57BL/6J, так і лінії CBA/CaLac (рис. 1) біль послаблювався. Протибольова дія корвітину тривала і в другі 30 хв. Як показали наші попередні дослідження [1], сам корвітин не впливає суттєво на поведінку тварин у нормі (без осередку болю). Сумарні (за 60 хв спостереження) значення тривалості викликаной формаліном больової реакції наведено в таблиці. Тривалість больової реакції на фоні корвітину (група 2) у мишей лінії C57BL/6J становила 70,3 %, а у мишей лінії CBA/CaLac – 86 % від контрольного значення.

Наші результати узгоджуються з даними інших авторів. Антиноцицептивна дія

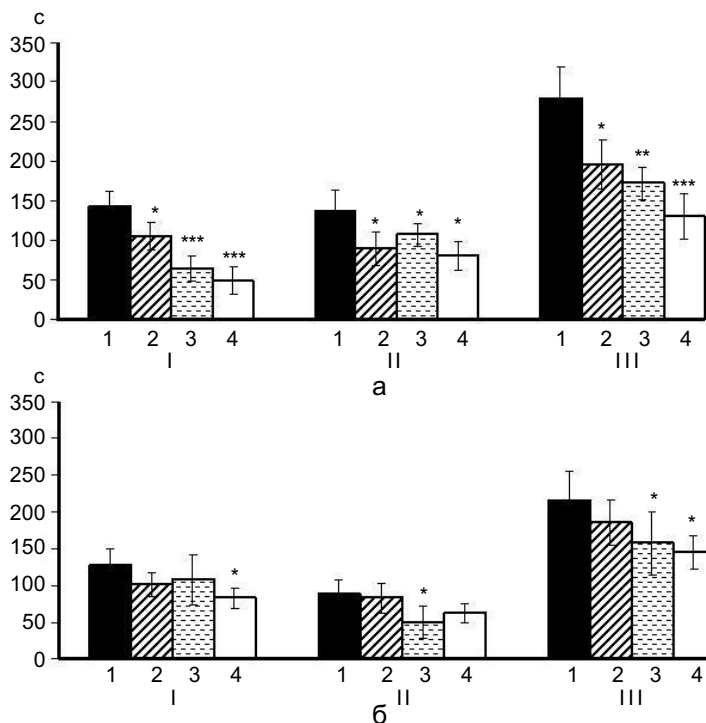


Рис. 1. Вплив корвітину, поляризованого світла і сумісного їх застосування на тривалість больової реакції у мишей лінії C57BL/6J (а) і CBA/CaLac (б) за перші 30 хв (I), за другі 30 хв (II) і за 60 хв спостереження в цілому (III): 1 – контроль; 2 – корвітин; 3 – червоне поляризоване світло на точку акупунктури (ТА) E-36; 4 – дія корвітину і поляризованого світла. * $P < 0,5$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,001$

препарату кверцетину, на основі якого створений корвітин, досліджувалася на різних поведінкових моделях соматичного та вісцерального болю. Було показано [10, 14, 22], що він дозозалежно послаблював больові поведінкові реакції у мишей, викликані підшкірною ін'єкцією формаліну, глутамату або капсаїцину, а також вісцеральну поведінкову реакцію, викликану внутрішньоочеревинним введенням розчину оцтової кислоти. Знеболювальний ефект значно послаблювався при дії парахлорфеніланіну – блокатора синтезу серотоніну, антагоністів ГАМК_A і ГАМК_B. Ці дані вказують на те, що кверцетин реалізує антиноцицептивну дію через механізми, в яких бере участь L-аргінін-NO-гуанілатциклаза, серотонінергічна і ГАМКергічна системи, але не холінергічна система. Згідно з іншими літературними даними, в антиноцицептивному ефекті кверцетину беруть участь D₂-дофамінергічні та α₂-адренорецептори [20], а також адренергічна [18] і опіоїдергічна [10, 11] системи мозку. Участь опіоїдергічної системи, однак, спростовується іншими авторами [14].

Порівняльний аналіз результатів, одержаних нами в експериментах на мишах двох генетичних груп, показав, що миші лінії C57BL/6J більш чутливі до корвітину, ніж тварини лінії CBA/CaLac. Аналогічна різниця була виявлена раніше при введенні корвітину за 20 хв до ін'єкції розчину

формаліну в лапку [1, 2]. Очевидно, ефективність анальгетичної дії корвітину визначається генетичними особливостями нейронної організації антиноцицептивних систем лінійних мишей C57BL/6J і CBA/CaLac [1].

Ефект поєднаного застосування корвітину та червоного ПС. Попередні наші дослідження на білих безпорідних мишах показали, що низькоінтенсивне ПС апарата Біоптрон при дії на протибольову ТА достовірно послаблює викликаний формаліном біль [19], причому червоне ПС було найбільш ефективне [24]. Теперішнім дослідженням було показано, що лінійні миші також чутливі до червоного ПС (див. рис. 1). Після 10-хвилинного сеансу червоного ПС на ТА Е-36 (група 3) тривалість больової реакції, викликаной формаліном, достовірно скорочувалася і у мишей лінії C57BL/6J становила 61,8 %, а у мишей лінії CBA/CaLac – 73,3 % від контрольного значення (див. таблицю). Як і у разі з корвітином, миші лінії C57BL/6J були більш чутливими до ПС, що підтверджує припущення щодо впливу генетичних факторів на функціонування протибольових систем.

У мишей, які піддавалися дії червоного ПС у поєднанні з корвітином (група 4), тривалість больової реакції на формалін була найменшою, вона становила 46,9 % (C57BL/6J) і 67,6 % (CBA/CaLac) від показника в контрольній групі. На рис. 2

Тривалість (с) больової поведінкової реакції на формалін за 60 хв спостереження у мишей лінії C57BL/6J і CBA/CaLac до і після внутрішньоочеревинної ін'єкції корвітину, після аплікації червоного поляризованого світла (ПС) на точку акупунктури Е-36 або поєднаного застосування корвітину і червоного ПС

Схема досліджу, група тварин	C57BL/6J	CBA/CaLac
Введення NaCl і імітація дії ПС (група 1)	278,9 ± 39,3 (100 % ± 14,1 %)	215,5 ± 38,7 (100 % ± 18 %)
Введення корвітину і імітація дії ПС (група 2)	196,2 ± 30,9* (70,3 % ± 11,1 %)	185,3 ± 30,2 (86 % ± 14 %)
Введення NaCl і дія ПС (група 3)	172,2 ± 20,3** (61,8 % ± 7,3 %)	157,8 ± 42,5* (73,3 % ± 19,7 %)
Введення корвітину і дія ПС (група 4)	130,9 ± 28*** (46,9 % ± 10 %)	145,6 ± 22,6* (67,6 % ± 10,5 %)

* P < 0,5, ** P < 0,05, *** P < 0,001.

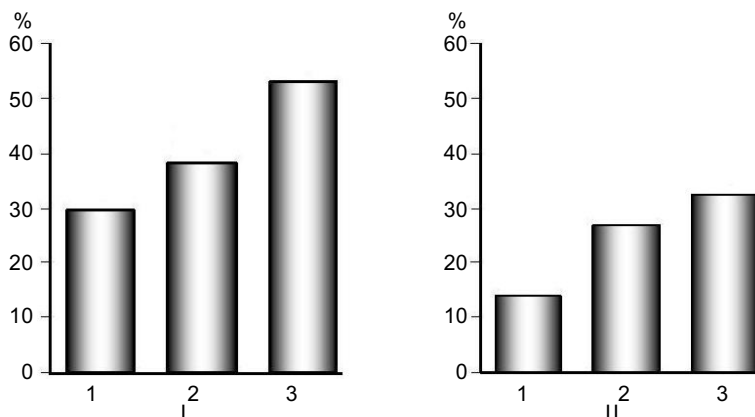


Рис. 2. Анальгетичний ефект корвітину (1), червоного поляризованого світла (2) або поєднаного їх застосування (3) у мишей ліній C57BL/6J (I) і CBA/CaLac (II)

показано анальгетичний ефект від застосування лише корвітину або лише червоного ПС і при використанні корвітину в поєднанні з червоним ПС. У мишей лінії C57BL/6J анальгезія при застосуванні корвітину становила 29,7 %, червоного ПС – 38,2 %, а у разі поєднаного застосування корвітину і ПС – 53,1 %. У мишей лінії CBA/CaLac анальгетичний ефект корвітину становив 14 %, червоного ПС – 26,7 %, а при поєднанні корвітину з червоним ПС – 32,4 %. Застосування червоного ПС збільшувало анальгетичний ефект корвітину в 1,5 раза (C57BL/6J) і в 1,3 раза (CBA/CaLac). Таким чином, нами вперше було виявлено, що дія червоного ПС на ТА Е-36 підсилює протибольовий ефект корвітину. Цей факт має велике практичне значення. Нетравматичний, без побічних ефектів, метод дії низькоінтенсивним ПС може бути рекомендований хворим, які приймають корвітин, для підсилення його ефективності.

Щодо механізмів взаємодії низькоінтенсивного ПС і корвітину, то будь-якої інформації про це в літературі нами не виявлено. Проте відомо, що низькоінтенсивні електромагнітні поля оптичного та мікрохвильового діапазону суттєво потенціюють анальгетичну дію опіоїдних і неопіоїдних анальгетиків [6, 8]. Очевидно, фармакологічні анальгетики і високочастотні низькоінтенсивні електромагнітні поля

виявляють схожу дію на больові поведінкові реакції у гризунів, використовуючи одні й ті самі антиноцицептивні системи стовбура мозку [7, 12, 21]. Ми вважаємо, що підсилення анальгетичного ефекту корвітину, коли він застосовується в комбінації з низькоінтенсивним ПС, також може бути зумовлено активацією одних і тих самих антиноцицептивних систем стовбура мозку. Однак для з'ясування механізмів такої взаємодії необхідні додаткові експериментальні дослідження.

З.А. Тамарова, Ю.П. Лиманский, О.И. Костюк, В.А. Митрузаева, Л.И. Лиманская

ДЕЙСТВИЕ КРАСНОГО ПОЛЯРИЗОВАННОГО СВЕТА НА ТОЧКУ АКУПУНКТУРЫ Е-36 УСИЛИВАЕТ ПРОТИВОБОЛЕВОЙ ЭФФЕКТ КОРВИТИНА

На модели формалинового теста исследовали возможность усиления противоболевого эффекта корвитина у мышей линий C57BL/6J и CBA/CaLac путем воздействия красного поляризованного света (ПС) на точку акупунктуры (ТА) Е-36. Регистрировали длительность болевой поведенческой реакции (лизание пораженной конечности), вызванной инъекцией 5%-го раствора формалина в стопу (0,25 мкл, подкожно) до и после системного введения корвитина (10 мг/кг, внутривенно) или совместного применения корвитина и красного ПС (10-минутный сеанс сразу после создания очага боли). Установлено, что после аппликации красного ПС на противоболевую ТА Е-36 у всех животных имеет место достоверное усиление противоболевого эффекта корвитина. У мышей линии C57BL/6J применение одного корвитина ослабляло болевую реакцию на 29,7 %,

а при совместном использовании красного ПС и корвитина – на 53,1 %. Мыши линии CBA/CaLac были менее чувствительны как к корвитину, так и к ПС. Корвитин вызывал у них сокращение длительности болевой реакции на 14 %, а при сочетании с красным ПС на 32,4 %. Нетравматический, без побочных эффектов, метод воздействия низкоинтенсивным ПС может быть рекомендован больным, принимающим корвитин, для усиления его эффективности.

**Z.A.Tamarova, Yu.P.Limansky, O.I.Kostyuk,
V.A.Mitruzaeva, L.I.Limanskaja**

**STRENGTHENING OF ANALGESIC EFFECT OF
CORVITIN BY ACTION OF RED POLARIZED
LIGHT ON THE ACUPUNCTURE POINT E-36
AT MICE OF LINES C57BL/6J AND CBA/
CALAC**

In experiments on mice of lines C57BL/6J and CBA/CaLac, the possibility of strengthening of analgesic effect of corvitin by the action of red polarized light (PL) on the acupoint (AP) E-36 was studied. The pain behavioral response (licking of the painful area) was caused by injection of 5% formalin in hind limb (0.25 µl subcutaneously). The duration of pain response was studied before and after systemic introduction of corvitin (10 mg/kg, intraperitoneal) or joint use of corvitin and red PL (10 minute session). It is established, that after application of red PL on the antinociceptive AP E-36 in all animals an authentic strengthening of antinociceptive effect of corvitin takes place. In C57BL/6J mice, application of corvitin alone weakened the pain response by 29.7% and during combined use of red PL and corvitin, it grew up to 53.1%. Mice of line CBA/CaLac were less sensitive both to corvitin, and PL. In this line, corvitin used alone reduced the duration of pain response by 14%, and by 32.4% during combined use with red PL. Non-traumatic, without side effects, the method of influence by low-intensive PL can be recommended to patients accepting corvitin for strengthening its efficiency.

Key words: corvitin, polarized light, formalin test, analgesia, acupuncture point E-36.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лиманський Ю.П., Багацька О.В., Гура О.В., Несін О.М., Сушко Б.С., Тамарова З.А. Вплив корвітину на соматичний біль у мишей різних генотипів // *Фізіол. журн.* – 2008. – **54**, №4. – С. 37–43.
2. Лиманський Ю.П., Гура О.В., Сушко Б.С., Тамарова З.А. Особливості анальгетичної дії корвітину у мишей різних генетичних ліній. – У кн.: Тези доп. IV конф. Укр. суспільства нейронаук, Донецьк–Слов'янськ, 2008. – С. 41.

3. Лиманський Ю.П., Тамарова З.А., Гуляр С.О. Дія кольорового поляризованого світла на тонічний біль у мишей. – У кн.: *Матеріали ХУП з'їзду Укр.фізіол. т-ва з міжнарод. участю, Чернівці, 18–20 травня 2006 р.* // *Фізіол. журн.* – 2006. – **52**. – №2. – С.44.
4. Максютина Н.П., Мойбенко О.О., Пархоменко О.М., Мясоедов Д.В. Використання нових лікарських форм кверцетину при ішемічних та радіаційних ушкодженнях: Метод. рекомендації. – К., 2000. – 13 с.
5. Мойбенко О.О., Досенко В.Є., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: *Наук. думка*, 2008. – 520 с.
6. Несін Е.Н., Гура Е.В. Анальгезия, индуцированная комбинированным применением трамадола и микроволнового облучения при соматической боли у мышей // *Нейрофизиология / Neurophysiology.* – 2006. – **38**, №4. – С. 314–320.
7. Несін О.М., Колбун М.Д., Гура О.В. Комбіноване застосування фармакологічних анальгетиків та мікрохвильового опромінення точки акупунктури для пригнічення вісцерального болю у мишей: роль опіоїдної та серотонінергічної систем мозку // *Там само.* – 2007. – **39**, №6. – С. 470–478.
8. Тамарова З.А., Лиманський Ю.П., Гуляр С.О. Порівняльне дослідження інтенсивності протибольової дії поляризованого світла й анальгетиків // *Фізіол. журн.* – 2005. – **51**, №2. – С.7–64.
9. Amanpreet S., Pattipati S.N., Shrinivas K.K. Quercetin, a bioflavonoid, reverses development of tolerance and dependence to morphine // *Drug Dev.Res.* – 2002. – **57**. – P. 167–172.
10. Anjane M., Chopra R.K. Reversal of lipopolysaccharide-induced thermal and behavioural hyperalgesia by quercetin // *Drug Dev.Res.* – 2003. – **58**. – P. 248–252.
11. Anjaneyulu M., Chopra K. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2003. – **27**, №6. – P.1001–1005.
12. Chuyan E.N., Dzheldubayeva Ї.R. Roles of different neurochemical systems in mechanisms underlying the antinociceptive effect of extrahigh-frequency electromagnetic radiation // *Нейрофизиология / Neurophysiology.* – 2007. – **39**, №2. – P.165–173.
13. Dubuisson D., Dennis S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats // *Pain.* – 1977. – **4**. – P.161–174.
14. Filho A.W., Filho V.C., Olinger L., de Souza M.M. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action // *Arch. Pharm. Res.* – 2008. – **31**, № 6. – P.713–21.
15. Gadotti V.M., Schmeling L.O., Machado C., Liz F.H., Cechinel F.V., Meyre S.C., Santos A.R. Antinociceptive

- action of the extract and the flavonoid quercetin isolated from *Bauhinia microstachya* leaves // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2005. – **57**. – P.1345–1351.
16. Gulyar S.A., Limansky Y.P., Tamarova Z.A. Suppression of pain by influence of bioptron-polarized light on acupoints // *Pain.* – 2006. – **10**. – P. 212.
17. Hanskaar S., Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain // *Pain.* – 1987. – **30**. – P.103–104.
18. Kaur R., Singh D., Chopra K. Participation of alpha2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin // *J. Med. Food.* – 2005. – **8**, №4. – P.529–532.
19. Limansky Y.P., Tamarova Z.A., Gulyar S.A. Suppression of pain by exposure of acupuncture points to polarized light // *Pain Research & Management.* – 2006. – **11**, №1. – P. 49–57.
20. Naidu P.S., Singh A., Joshi D., Kulkarni S.K. Possible mechanisms of action in quercetin reversal of morphine tolerance and dependence // *Addict Biol.* – 2003. – **8**, №3. – P.327–336.
21. Nesin E. Suppression of synthesis of serotonin: effect on antinociception induced by microwave irradiation and analgesic remedies // *Нейрофізіологія / Neurophysiology.* – 2006. – **38**, № 5/6. – С.498–499.
22. Ojewole J.A.O. Anti-Inflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (myrtaceae) leaf aqueous extracts in rats and mice // *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* – 2006. – **28**, №7. – P. 441.
23. Rulski M., Duriasz-Rowinska H., Rewerski W. The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test // *Acta Physiol. Pol.* – 1979. – **57**, №3. – P.385–388.
24. Tamarova Z.A., Limansky Y.P., Gulyar S.A. Antinociceptive effects of color polarized light in animal with formalin test // *Фізіол. журн.* – 2009. – 55, №3. – С.81–93.

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

Матеріал надійшов до редакції 05.10.2009

О.П. Хаврона, Н.В. Фартушок, Ю.М. Федевич, Я. Сольські, О.Я. Склярів

Зміни окисно-відновних процесів і жирнокислотного складу ліпідів печінки щурів за умов стрептозотоцинового діабету

Досліджували активність процесів ПОЛ, окиснювальну модифікацію білків, стан ензимів системи антиоксидантного захисту та жирнокислотний склад ліпідів печінки щурів за умов стрептозотоцинового діабету. Розвиток діабету супроводжувався окиснювальним стресом, в результаті якого активувалися процеси ПОЛ, зростав вміст оксиду азоту та змінювалася активність ензимів системи антиоксидантного захисту. Виявлено підвищення вмісту насичених і зниження вмісту ненасичених жирних кислот. Встановлено посилення процесів окиснення внутрішньоклітинних білків печінки, що може призвести до втрати їх біологічної активності. Ключові слова: перекисне окиснення ліпідів, окиснювальна модифікація білків, антиоксидантна система захисту, система глутатіону, жирні кислоти, оксид азоту, цукровий діабет.

ВСТУП

Численні експериментальні та клінічні дані свідчать про головне значення печінки в розвитку метаболічних ускладнень при діабеті 1-го типу, а зміна її функціонального стану безпосередньо впливає на перебіг та компенсацію цукрового діабету (ЦД). Частота ураження печінки при ЦД становить 33,0–90,0 % [4].

Печінка також відіграє ключову роль в обміні ліпідів в організмі людини, забезпечуючи їх інтенсивний біосинтез і перетворення основних груп, у тому числі і жирних кислот (ЖК). Роль мембранних ліпідів гепатоцитів у фізіологічних процесах і за умов розвитку патологічного стану, одночасно з багатьма іншими чинниками, залежить від їхнього кількісного та якісного складу. Відомо, що при багатьох патологічних процесах у клітинах печінки змінюється вміст ненасичених ЖК. При цьому істотно значення для забезпечення функціонально активного стану клітин має співвідношення насичених і ненасичених ЖК у мембранах [13]. Оскільки ненасичені

ЖК є структурними компонентами мембран і одночасно виступають основними субстратами ліпідної пероксидації, то якісні й кількісні їх зміни в мембранах гепатоцитів можуть бути певним критерієм для оцінки інтенсивності прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в тканинах організму [17].

Оксид азоту за фізіологічних умов бере участь у вазодилатації, міжклітинній комунікації та передачі сигнальної інформації. За умов гіперглікемії активується експресія індукцибельної NO-синтази (iNOS) та різко зростає вміст NO, який при взаємодії з супероксидом кисню утворює пероксинітрит, що впливає на модифікацію білків, нуклеїнові кислоти, активність ензимів [6].

При ЦД активуються процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що призводить до цілої низки відхилень, зокрема, до структурної перебудови мембран гепатоцитів, і порушення клітинного метаболізму [20]. Відомо, що одним з механізмів такої активації при ЦД є порушення енерге-

© О.П. Хаврона, Н.В. Фартушок, Ю.М. Федевич, Я. Сольські, О.Я. Склярів

тичного обміну внаслідок чого підвищується вміст ненасичених ЖК, які є субстратами ПОЛ [15]. Через свою високу реактивність активні форми кисню взаємодіють з ліпідами мембрани клітин або органел, реагуючи з поліненасиченими ЖК, не тільки пошкоджуючи їхню структурну цілісність, але й генеруючи жирнокислотні радикали, що і призводить до порушень морфологічного стану мембран – починаючи від підвищеної проникності та закінчуючи лізисом клітин.

Вільнорадикальний гомеостаз клітин і тканин забезпечується рівновагою між процесами генерації активних кисневих метаболітів і ферментативними й неферментативними системами їх знешкодження. Розвиток патологічних станів, зазвичай, пов'язаний з порушеннями між про- та антиоксидантною системами, що призводить до розвитку окиснювального стресу, який супроводжується дисбалансом між цими системами й характеризується надмірною генерацією вільних радикалів (O_2^- , OH^- , $ONOO^-$, NOH^-) і/або дефіцитом антиоксидантів [17]. Окиснювальний стрес за умов ЦД 1-го типу викликає аутоокиснення глюкози, глікозилювання білків з утворенням кінцевих продуктів глікозилювання AGEs (від англ. advanced glycated end products) та активацію поліолового циклу [4].

Метою наших досліджень було вивчення окиснювальної модифікації білків, зміни жирнокислотного складу ліпідів, вмісту оксиду азоту та L-аргініну в тканині печінки у взаємозв'язку інтенсивності процесів ПОЛ і ферментативної ланки антиоксидантного захисту (АОЗ) за умов стрептозотинного діабету в щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих білих щурах-самцях масою 150–200 г, згідно з прийнятими етичними принципами роботи з лабораторними тваринами, ухвале-

ними Першим національним конгресом України з біоетики, міжнародними угодами та національним законодавством у цій галузі [10]. Експериментальний ЦД 1-го типу викликали введенням розчину стрептозотину з розрахунку 60 мг/кг, внутрішньоочередово. Дослідження проводили на 14-ту добу розвитку патологічного стану, декапітацію виконували на тлі уретанового знебоління (1,1 мг/кг). Розвиток діабету контролювали за вмістом у крові глюкози, який визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів «Lachema» (Чехія). Критерієм розвитку захворювання був рівень глікемії 18–22 ммоль/л порівняно з контрольною групою – 7,2–8,4 ммоль/л. Контрольну групу склали 10 інтактних щурів, дослідну групу – 20 щурів. Об'єктами дослідження були гомогенати печінки, приготовані на фізіологічному розчині, при 4°C. Вміст стабільного метаболіту оксиду азоту (NO_2^-) в гомогенатах визначали з реактивом Грісса [19]. Процеси ПОЛ оцінювали за визначенням тіобарбітурової кислоти (ТБК)-реагуючих сполук [14], а також дієнових кон'югатів і дієнових кетонів [7]. Рівень SH-груп у гомогенатах печінки визначали за методом Thannhauser [23], а окисної модифікації білків (ОМБ) – за концентрацією карбонільних і основних груп [5]. Активність супероксиддисмутази (СОД) вивчали за допомогою реакції відновлення нітротетразолію синього до нітроформазау [16], каталази – з використанням реакції H_2O_2 з молібдатом амонію [9]. Концентрацію відновленого глутатіону визначали за методом Батлер [8], активність глутатіонпероксидази – Переслегіної [11], а вміст ЖК ліпідів – за допомогою газорідинної хроматографії [13], вміст L-аргініну – за кольоровою реакцією Сакагучі за наявності гіпоброміту натрію [1]. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі. Одержані результати статистично опрацьовані за критерієм t Стьюдента за допомогою програмного забезпечення ANOVA Microsoft Excel 8.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За умов експериментального ЦД 1-го типу у клітинах печінки відзначається зростання активності процесів ПОЛ (табл. 1).

При цьому у гепатоцитах відзначено активацію як початкових ланок процесів ліпопероксидації – вміст дієнових кон'югатів зростав у 2,3 рази ($P<0,05$) та дієнових кетонів – у 2 рази ($P<0,05$), так і кінцевого етапу – вміст ТБК-реагуючих продуктів підвищувався у 3,2 рази ($P<0,05$). Таке різке їх підвищення є показником завершення процесу вільнорадикального ушкодження поліненасичених ЖК і вилучення їх з біліпідного шару клітинної мембрани [15]. Паралельно підвищувався вміст нітрит-аніона на 54 % ($P<0,05$), за даними літератури, це може бути зумовлено збільшенням активності iNOS, що підтверджується зростанням внутрішньоклітинного рівня мРНК даного ензиму за умов гіперглікемії [2].

NO є оксидантом та інгібітором ферментів, що містять залізо-сірчані центри. При реакції NO з H_2O_2 утворюється пероксинітрит та інші білкові оксиданти. Взаємодіючи NO і пероксинітрит окиснюють біомолекули (протеїнів, амінокислот, ліпідів, ДНК), що проявляється підвищенням активності процесів окиснювальної модифікації білків (ОМБ), яка за значенням карбонільних груп (кОМБ) зросла у 5,9 рази ($P<0,05$), а основних груп (оОМБ) – у 16,9 рази ($P<0,01$). ОМБ призводить до зменшення або втрати їх біологічної

активності, викликає утворення антигенів і провокує імунну відповідь. Продукти розпаду модифікованих білків можуть бути причиною вторинного ушкодження інших біомолекул [18].

Результати досліджень показали, що за умов гіперглікемії знижувався вміст SH-груп на 25 % ($P<0,05$) порівняно з контрольною групою тварин, що може свідчити про зменшення редокс-потенціалу всередині клітини (див. табл. 1). Зменшення вмісту SH-груп може призводити до порушень структурно-функціональної організації білкових молекул і зниження їх реакційної здатності [20].

Серед досліджуваних вільних ЖК у тканині печінки шурів (табл. 2) при діабеті 1-го типу найбільш виражені зміни вмісту були виявлені у таких насичених ЖК: міристинова, стеаринова, пальмітинова (остання становила 21,7% від усіх ЖК), ненасичених – мононенасичених (пальмітоолеїнова та олеїнова) та поліненасичених (лінолева та арахідонова).

У тканині печінки контрольних шурів спостерігали найбільший вміст арахідонової кислоти, пальмітинової, стеаринової ЖК. Загальний вміст ненасичених ЖК у тканині був значно вищим, ніж насичених кислот і переважно представлений поліненасиченими ЖК, що підтверджується даними інших досліджень [13].

Вивчення спектра ЖК при експериментальному діабеті виявило значні зміни вмісту як ненасичених, так і насичених ЖК

Таблиця 1. Активність ліпопероксидації та окиснювальної модифікації білків у гомогенаті тканини печінки при стрептозотозинному діабеті у шурів ($M\pm m$)

Показники	Контроль (n=10)	Дослід (n=20)
ТБК-реагуючі сполуки, мкмоль/г білка	19,5±3,8	63,2±7,3*
Окисна модифікація білків карбонільних груп, λ_{370} /мг білка	7,2±1,9	42,5±5,4*
Окисна модифікація білків основних груп, λ_{430} /мг білка	1,20±0,76	20,31±3,20*
SH-групи, мкмоль/г білка	22,81±2,33	17,02±1,80*
Дієнові кетони, λ_{230} /мг білка	0,017±0,008	0,038±0,034*
Дієнові кон'югати, λ_{275} /мг білка	0,072±0,006	0,168±0,088*
NO_2^- , мкмоль/мг білка	0,485±0,029	0,751±0,046*

* $P<0,05$ – зміни вірогідні відносно значення у контролі.

у печінці тварин. Зокрема, найбільш різноспрямовані зміни спостерігалися на рівні поліненасичених ЖК. При цьому вміст лінолевої кислоти зріс у 1,3 раза ($P<0,05$), водночас вміст арахідонової ЖК знизився майже втричі ($P<0,01$). Такі метаболічні зміни можуть бути наслідком використання арахідонової кислоти як субстрату при активації ПОЛ, зростанні експресії циклооксигенази-2 та утворенні простагландинів або гальмуванні активності поліферментних систем у гепатоцитах, які беруть участь у перетворенні лінолевої кислоти в арахідонову [3]. Не менш значні зміни спостерігалися в спектрі насичених ЖК. Так, вміст пальмітинової кислоти збільшився в 1,8 раза ($P<0,05$), незначно підвищився вміст стеаринової ЖК, тоді як вміст міристинової кислоти знизився приблизно у 5 разів ($P<0,05$).

Таким чином, за умов ЦД зменшується сума ненасичених ЖК в 1,2 раза ($P<0,05$). Виявлені нами порушення жирнокислотного складу ліпідів печінки пояснює зростання вмісту ТБК-реагуючих продуктів, оскільки відомо, що саме ненасичені ЖК є субстратами для реакцій ПОЛ, внаслідок яких вони перетворюються на ліпопероксидази. Сумарний вміст насичених ЖК підвищувався внаслідок зростання вмісту стеаринової та пальмітинової ЖК. Такі зміни в жирнокислотному обміні в печінці щурів за умов гіперглікемії мають адаптивний характер і спрямовані на біосинтез більш стабільних насичених ЖК [15].

За умов оксидативного стресу, що проявляється надмірною генерацією вільних радикалів, в основному – активних форм кисню, спостерігається компенсаторна активація системи АОЗ, що пов'язано з відповідними змінами її компонентів. Ферментативний захист здійснюється за допомогою СОД, каталази та ензимів глутатіонової системи – глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та глутатіонтрансферази. Ці ензими послідовно відновлюють супероксид-радикали, H_2O_2 і органічні гідропероксидази.

З активних форм кисню первинною є супероксид-аніон, знешкодження якого відбувається за допомогою СОД, активність якої знижувалася у 1,6 раза ($P<0,05$; табл. 3). Це може відбуватися за рахунок можливості неферментативної модифікації молекули СОД як активним киснем, так і глюкозою [22].

Наступними антиоксидантними ферментами, що вступають у каскад реакцій захисту від активних форм кисню, є каталаза і глутатіонпероксидаза. У наших дослідженнях зростають активності цих ферментів – каталази в 2,4 раза ($P<0,05$), глутатіонпероксидази у 2,5 раза ($P<0,05$), що можна розцінювати як компенсаторну реакцію на збільшення активних кисневих метаболітів за інактивації СОД [22]. При стрептозотоциновому діабеті вміст відновленого глутатіону знижувався у 1,5 раза ($P<0,05$; табл. 3), ймовірно, в результаті протекторного його впливу на тіолові групи

Таблиця 2. Відсотковий вміст вільних жирних кислот у печінці щурів за умов стрептозотоцинового діабету ($M\pm m$)

Жирні кислоти	Контроль (n=10)	Дослід (n=20)
C _{14:0} міристинова	3,1±0,3	0,6±0,1*
C _{16:0} пальмітинова	21,7±1,0	34,5±1,2*
C _{16:1} пальмітоолеїнова	0,8±0,1	4,0±0,3*
C _{18:0} стеаринова	14,8±1,0	14,0±1,1*
C _{18:1} олеїнова	6,1±0,7	18,2±0,4**
C _{18:2} лінолева	10,9±0,8	13,9±0,2*
C _{20:4} арахідонова	42,6±1,5	14,8±0,5**
Сума насичених ЖК	39,6±2,0	49,1±1,6*
Сума ненасичених ЖК	60,4±2,0	50,9±1,4*

$P<0,05$, ** $P<0,01$ – зміни вірогідні відносно значення у контролі.

Таблиця 3. Зміна показників антиоксидантного захисту у печінці щурів при стрептозотоциновому діабеті (M±m)

Показники	Контроль (n=10)	Дослід (n=20)
Супероксиддисмутаза, мкмоль/хв . мг білка	146,03±18,20	88,82±12,80*
Каталаза, мкмоль/хв . мг білка	0,67±0,13	1,65±0,03*
Глутатіонпероксидаза, мкмоль/хв . мг білка	2,32±0,62	5,96±0,87*
Відновлений глутатіон, мкмоль/мг білка	2,24±0,09	1,49±0,07*
L-аргінін, мкг/мл	43,29±0,04	28,86±0,06*

*P<0,05 – зміни вірогідні відносно значення у контролі.

білків, зберігаючи їхню активність при дії вільних радикалів, а також використання його для знешкодження перекису водню і гідропероксидів. Також можливе порушення синтезу глутатіону, оскільки відомо, що за умов діабету знижується γ -глутамілцистеїнсинтазна активність [22].

Особлива роль за умов діабету належить L-аргініну. З одного боку, він є прекурсором для синтезу NO, а з іншого – його пул у цитоплазмі гепатоцитів відіграє антиоксидантну роль [12]. При експериментальному ЦД вміст L-аргініну знижувався у 1,5 раза (P<0,05). Це пов'язано насамперед із його використанням NOS. Антиоксидантний ефект у цитозолі молекула L-аргініну здатна проявляти за рахунок рухливого атома водню, зумовленого нестійким зв'язком з атомами карбону та нітрогену. Крім того, антиоксидантні властивості здатні проявлятися і внаслідок окиснення аміногрупи молекули L-аргініну. L-аргінін зв'язує супероксидний та гідроксильний радикали, регулює редокс-статус у клітині, відіграє роль у захисті від оксидативних ушкоджень. При вживанні L-аргініну в крові знижується вміст глюкози, гомоцистеїну, ЖК, тригліцеридів і підвищується чутливість до інсуліну у щурів з експериментальним діабетом [24]. При ЦД змінюється синтез і транспорт аргініну. Слід відзначити, що L-аргінін є субстратом не тільки для NOS, але і для аргінази. За умов норми співвідношення між NOS та аргіназою забезпечує в клітинах відповідний пул L-аргініну, який при ЦД зменшується, внаслідок зростання активності

NOS та зниження активності аргінази [2]. Зниження активності аргінази може сприяти утворенню пероксинітриду та інших активних кисневих метаболітів, а також ініціації процесів ПОЛ [12].

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено взаємозв'язок окисно-відновних процесів і жирнокислотного складу ліпідів у клітинах гепатоцитів та показано, що розвиток оксидативного стресу за умов стрептозотоцинового діабету супроводжується зменшенням вмісту арахідонової кислоти, посиленням процесів ліпопероксидації, вмісту оксиду азоту та зменшенням вмісту L-аргініну, посиленням процесів, що призводять до окисної модифікації білків та різкого збільшення активності більшості ферментів антиоксидантної системи, що треба враховувати при корекції перебігу ЦД.

ВИСНОВКИ

1. За умов ЦД, викликаного введенням стрептозотоцину, розвивається оксидативний стрес, про що свідчить збільшення вмісту ТБК-реагуючих продуктів, дієнових кон'югатів, дієнових кетонів та оксиду азоту у тканині печінки.

2. Виявлені порушення жирнокислотного складу ліпідів печінки в бік підвищення вмісту насичених та зниження ненасичених ЖК вказують на адаптивний характер змін і біосинтез більш стабільних ЖК за умов ЦД.

3. Збільшення вмісту ТБК-реагуючих продуктів супроводжується зменшенням вмісту арахідонової кислоти, що є свідчен-

ням посилення процесів ПОЛ у тканині печінки.

4. За умов гіперглікемії у тканині печінки підвищується активність ензимів АОЗ, а саме каталази, глутатіонпероксидази та знижується активність СОД, а також зростає вміст відновленого глутатіону та зменшується вміст L-аргініну.

5. При ЦД 1-го типу посилюються окиснення білків, що може призвести до порушення їх функціонування в гепатоцитах, утворення нових антигенів і провокації імунної відповіді.

О.П.Хаврона, Н.В.Фартушок, Ю.М.Федевич, Я.Сольски, А.Я.Скляр

ИЗМЕНЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНАВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ

Исследовали активность процессов ПОЛ, окислительную модификацию белков, состояние энзимов системы антиоксидантной защиты и жирнокислотный состав липидов печени крыс при стрептозотоциновом диабете. Развитие диабета сопровождается окислительным стрессом, в результате которого активируются процессы ПОЛ, растет содержание нитрогена оксида и повышается активность некоторых энзимов системы антиоксидантной защиты. Обнаружено повышение содержания насыщенных и снижение содержания ненасыщенных ЖК. Установлено усиление процессов окисления белков, что может привести к потере их биологической активности.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, антиоксидантная система защиты, глутатионовая система, жирные кислоты, оксид азота, сахарный диабет.

O.Khavrona, N.Fartushok, J.Fedevich, Y.Solski, A. Sklyarov

THE CHANGES OF OXIDATIVE-REDUCTIVE PROCESSES AND FATTY ACID COMPOSITION OF LIVER LIPIDS IN RATS WITH STREPTOSOTOCIN-INDUCED DIABETES

The processes of lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, the state of antioxidant protection system enzymes and fatty acid composition of liver lipids were investigated in rats with streptozotocin-induced diabetes. The development

of diabetes is accompanied by oxidative stress, which results in the activation of lipid peroxidation processes and the increase in the amount of nitrogen oxide and the activity of antioxidant protection system enzymes. The increase of the amount of saturated fatty acid and fall in the amount of unsaturated fatty acid has been detected. The rise of the processes of protein oxidation was established, which can lead to loss of their biological activity.

Key words: lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, antioxidant protection system, glutathione system, fatty acids, nitric oxide, diabetes.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University;

Lublin Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биохимии. – 1988. – 239 с.
2. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Особливості метаболізму L-аргініну в лейкоцитах крові за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2008. – 54, №1. – С. 63–68.
3. Гарник Т.П., Білоусова І.В. Жирнокислотний склад ліпідів печінки щурів при експериментальній інсулінорезистентності // Сучасна гастроентерологія. – 2007. – 34, №2. – С. 35–38.
4. Давидович Н.Я. Клініко-морфологічні зміни печінки у хворих на цукровий діабет 1 типу та їх корекція неоселеном та етимізолом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Івано-Франківськ, 2001. – 20 с.
5. Дубинина Е.Е., Коновалов П.В., Солитернова И.Б. Окислительная модификация белков плазмы крови у пожилых людей с сосудистой деменцией // Укр. биохим. журн. – 2001. – 73, №1. – С. 125–132.
6. Зозуля Ю.А., Сенько Л.Н. Мультифункциональность и метаболизм оксида азота в центральной нервной системе (обзор литературы) // Журн. АМН України. – 2000. – 6, №1. – С.3–25.
7. Камышников В.С. Определение диеновых конъюгатов и диенкетонов // Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – 2000. – 2. – С. 206.
8. Клиническая биохимия / Под ред. А.М. Горячковского. – Одесса: Астропринт, 1998. – С. 307.
9. Королюк Г.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988, № 1. – С. 16–19.
10. Перший національний конгрес з біоетики // Ежендельник АПТЕКА. – 2001. – № 37 (308) (від 24.09.2001).
11. Песлегина И.А. Метод определения активности глутатионпероксидазы // Лаб.дело. – 1989. – № 5. – С. 20–23.
12. Сагач В.Ф., Присяжна О.Д., Ткаченко М.М., Коцюруба А.В. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального

- цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, №2. – С. 3–7.
13. Сазоненко Л.В., Вітовський Я.М., Брюзгіна Т.С., Вретік Г.М. Дослідження змін жирнокислотного спектру ліпідів сироватки крові у вагітних з прееклампсією // Мед.хімія. – 2003. – №3. – С.113–115.
14. Тимирбулатов Г. А., Селезнев Е. И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. – 1981, № 4. – С. 209–211.
15. Титов В.Н., Дучин С.Ф., Дмитриева В.А., Копылов М.А. Эссенциальные полиеновые жирные кислоты и артериальное давление. Механизмы физиологического влияния // Клин. лаб. диагностика. – 2006. – №11. – С. 3–12.
16. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело. – 1991, № 10. – С. 15–19.
17. Bonnefont-Rousselot D., Bastar. J. P., Jaudon M. C. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance // Diabet. Metab. – 2003. – 26, № 3. – P. 163–176.
18. Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, Wu G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy // Biomed. Pharmacother. – 2002. – **56**. – P. 427–438.
19. Green LC., David AW. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**. – P. 131–138.
20. Mazzanti L, Rabini RA. Altered platelet membrane dynamic properties in type 1 diabetes // Diabetes. – 2005. – **46**, №12. – P. 2069–2074.
21. Mohamed AK., Bierhaus A., Schiekofer S., Tritschler H. The role of oxidative stress and NF-kappa B activation in late diabetic complications // Biofactors. – 2001. – **10**, №.2-3. – P. 157–167.
22. Pacher P., Beckman JS., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // Physiol. Rev. – 2007. – **87**. – P. 315–424.
23. Thannhauser TW., Konishi Y., Scheraga HA. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins // Analyt. Biochem. – 1984. – 138, №1. – P. 181–188.
24. Wu G., Bazer FW., Davis TA., Kim SW, Li P, Rhoads JM, Satterfield MC, Smith SB, Spencer TE, Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease // Amino Acids. – 2009. – **37**. – P. 153–168.

*Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького;
Люблін. мед. ун-т,
E-mail: sklyarov@meduniv.lviv.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 26.02.2010*

І.В. Харчук, О.М. Філінська, С.В. Яблонська, В.К. Рибальченко

Вплив похідного малеїміду на морфофункціональний стан нирок щурів за умов експериментального канцерогенезу товстої кишки

В експерименті на 60 щурах-самцях досліджено особливості впливу нового похідного малеїміду з антипроліферативними властивостями на морфофункціональний стан нирок при його тривалому застосуванні та за умов експериментального канцерогенезу товстої кишки, який моделювали введенням 1,2-диметилгідразину підшкірно в дозі 20 мг/кг один раз на тиждень протягом 20 тиж. Похідне малеїміду в дозах 0,027 та 2,7 мг/кг вводили щодобово перорально. Стан нирок оцінювали на основі морфометричних досліджень їх тканин і біохімічних досліджень вмісту сечовини, креатиніну та хлоридів у сироватці крові. Встановлено, що похідне малеїміду не викликає істотних структурно-функціональних змін у нирках щурів після щоденного 20-тижневого введення. За умов 1,2-диметилгідразиніндукованого канцерогенезу товстої кишки у нирках щурів-пухлиноносіїв підсилюється проліферативна активність епітеліоцитів дистальних канальців і зменшується висота епітелію проксимальних канальців. За умов експериментального канцерогенезу похідне малеїміду справляє протективну дію на тубулярний апарат нефронів кіркового шару нирок щурів та зменшує частоту виникнення пренеопластичних змін у ньому.

Ключові слова: похідні малеїміду, морфофункціональний стан нирок, канцерогенез товстої кишки.

ВСТУП

На сучасному етапі основною метою онкотерапії є збільшення тривалості та поліпшення якості життя хворих. Це стало можливим завдяки розвитку напрямку цілеспрямованої (таргетної) терапії з застосуванням нового класу препаратів, що вибірково діють на молекулярні мішені – ключові молекули сигнальних шляхів, які відповідають за передачу сигналу, злоякісний ангиогенез, процеси апоптозу, контроль клітинного циклу тощо [9, 11]. Нині вже доведено, що ці препарати є ефективними в комплексній терапії багатьох видів злоякісних новоутворень завдяки своїм цитостатичним властивостям і вибіркості дії [15]. Вони відрізняються від класичних цитостатичних препаратів не лише механізмом дії, але і низькою токсичністю [11,

© І.В. Харчук, О.М. Філінська, С.В. Яблонська, В.К. Рибальченко

14], а тому їх застосування значно поліпшує якість життя онкохворих. Ці речовини мають різну природу, тому їх вплив на організм потребує ретельного дослідження. Актуальними є вивчення ефективних і малотоксичних похідних малеїміду. Одне з них 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) – синтезоване за допомогою *in silico*-дизайну вченими Київського національного університету ім. Тараса Шевченка [1, 10]. На культурах клітин показана здатність MI-1 у концентраціях 10⁻⁶–10⁻⁴ моль/л пригнічувати проліферативну активність трансформованих і злоякісних клітин людини (НЕК 293, SW-260, НСТ-116, MCF7 тощо) на 80–90 % [1, 5, 18], а нормальних фібробластів і ендотеліоцитів за тих же умов – лише на 20–30 % [19]. Наступним етапом стало дослідження

MI-1 *in vivo* для встановлення його загальнотоксичного впливу на організм під дією різних доз і термінів дії, а також в умовах експериментального канцерогенезу. Відомо, що побічні ефекти цитостатичних лікарських засобів, зокрема негативний вплив на швидкопроліферуючі тканини організму та органи виділення і детоксикації, значно обмежують їх застосування. В дослідженнях *in vivo* була показана низька токсичність MI-1 відносно клітин слизової оболонки тонкої кишки [3], сперматогенного епітелію сім'яників [6] та печінки [4]. Особливої уваги заслуговує дослідження нефротоксичності MI-1, оскільки більшість відомих цитостатиків нефротоксичні, а викликані лікарськими засобами нефропатії в багатьох випадках є тяжким супутнім ускладненням первинного захворювання [2]. Було показано, що MI-1 після 10 і 30-добового впливу викликає пригнічення функціональної активності гломерулярного і тубулярного апарату нефронів нирок, порушення їх гемодинаміки та незначне запалення в інтерстиції [7]. Разом з цим пошкоджувальний вплив оксидативного стресу на нирки щурів при введенні MI-1 знижувався [8].

Метою нашої роботи було дослідити особливості впливу MI-1 на морфофункціональний стан нирок щурів при його тривалому застосуванні та за умов експериментального хімічно індукованого канцерогенезу товстої кишки.

МЕТОДИКА

Експеримент проведено на 60 білих щурах-самцях масою 130–150 г. Як канцероген застосовували 1,2-диметилгідрозин (ДМГ), який при різних режимах введення може викликати пухлини в товстій кишці [13], прямій кишці, лімфатичних вузлах, кровоносних судинах, нирках, легенях, печінці [16, 17]. У дослідженні була застосована схема введення ДМГ для моделювання

експериментального канцерогенезу товстої кишки, оскільки MI-1 *in vitro* виявив найбільший цитостатичний ефект на лініях клітин раку товстої та прямої кишки [1]. ДМГ (“Sigma-Aldrich”, Німеччина) вводили підшкірно в дозі 20 мг/кг в 0,1 мл фізіологічного розчину один раз на тиждень протягом 20 тиж [12]. Контролем для цієї групи були щури, яким щотижня підшкірно вводили 0,1 мл фізіологічного розчину (контроль 1). MI-1 в дозах 0,027 та 2,7 мг/кг (що відповідає концентрації в крові 10^{-6} та 10^{-4} моль/л відповідно) вводили в 0,1 мл соняшникової олії щоденно перорально, контролем були щури із щоденним пероральним введенням 0,1 мл соняшникової олії (контроль 2). Інші дві групи щурів отримували одночасно ДМГ та MI-1 в обох дозах за вищевказаною схемою, контролем для них були щури з щотижневим введенням фізіологічного розчину та щоденним введенням олії (контроль 3). Тварин декапітували після ефірного наркозу. В товстій кишці щурів цього експерименту було визначено кількість, розмір, локалізацію пухлин та проведено їх морфологічну класифікацію [12].

Для морфологічного дослідження ліву нирку щурів фіксували в рідині Буена, заливали у парафін. Парафінові зрізи товщиною 5–7 мкм забарвлювали гематоксилином Б'ємера з дофарбуванням еозин-оранжем. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus VX-41 та програми Image J. Стан нирок визначали, базуючись на візуальному аналізі препаратів та морфометричних вимірах. У кірковому шарі кортикостероїдної зони нирок вимірювали площу капсул Шумлянського–Боумена, судинних клубочків, вільного просвіту капсул, висоту епітелію проксимальних і дистальних каналців нефронів, а також діаметри просвітів цих каналців. Обчислювали каналцевий індекс як відношення висоти епітелію каналця до діаметра його просвіту.

У сироватці крові щурів визначали вміст сечовини та хлоридів за допомогою стандартних наборів реактивів фірми «PLIVA Lachema» (Чехія) та креатиніну фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна).

Математичну обробку морфометричних результатів проводили з використанням програм статистичного пакета Microsoft Excel для персонального комп'ютера з використанням критерію *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Установлено, що кількість і розмір пухлин у груп тварин, які отримували сумісно ДМГ і МІ-1, були менші, ніж у таких, яким вводили лише ДМГ. Відрізнялася також морфологія і локалізація пухлин: у груп щурів з введенням МІ-1 переважали аденоми, що локалізувалися переважно в дистальному та проксимальному відділі товстої кишки, а у щурів з введенням ДМГ більшість пухлин належали до аденокарцином і знаходились у дистальному відділі та в прямій кишці [12].

Показано, що МІ-1 в обох концентраціях не викликає істотних структурних змін у нирках. Судинні клубочки нефронів кіркового шару нирок утворюють сферичні помірно кровонаповнені структури. Однак спостерігається стаз крові у судинах, що

межують із деякими клубочками. Капілярні петлі таких клубочків позбавлені формених елементів крові, а біля судин відмічаються лейкоцитарні інфільтрати. Морфометричні дослідження гломерулярного апарату показали, що при дії МІ-1 у обох дозах не відбувається вірогідних, порівняно з контролем 1, змін розмірів капсул Шумлянського–Боумена, судинних клубочків і вільного простору капсул (табл. 1). У тубулярному апараті кіркового шару нирок щурів після впливу МІ-1 не відмічено істотних змін. Більшість проксимальних ниркових каналців зберігають нормальну будову, в поодиноких каналцях відбувається десквація щіткової облямівки. Просвіт каналців нерозширений. Канальцевий індекс вірогідно не змінюється (табл. 2). У переважній більшості дистальних каналців епітеліоцити та їх ядра зберігають нормальну структуру. Просвіти дистальних каналців добре виражені, не містять включень. МІ-1 в обох дозах викликає вірогідне зменшення значення канальцевого індексу в межах 10 % при майже незмінній висоті епітелію та незначному розширенні просвіту каналців (див. табл. 2). Це може свідчити про незначну затримку первинної сечі у каналцях внаслідок порушення процесів реабсорбції. В інтерстиційній тканині між каналцями

Таблиця 1. Вплив МІ-1 на гломерулярний апарат нефронів кіркового шару нирок щурів за умов 1,2-диметилгідазин (ДМГ)-індукованого канцерогенезу товстого кишечника (M±m)

Група тварин	Площа, мкм ²		
	капсули	судинного клубочка	вільного просвіту капсули
Контроль 1	7252,31±202,46	5840,8±188,43	1411,52±46,95
Введення МІ-1,			
0,027 мг/кг	6673,07±284,38	5359,77±246,41	1313,30±54,60
2,7 мг/кг	6776,76±403,78	5349,58±371,29	1427,18±58,94
Контроль 2	7007,23±371,70	5479,76±261,20	1527,47±125,79
Введення ДМГ, мг/кг	7015,97±403,30	5545,47±323,30	1470,50±108,61
Контроль 3	6918,55±328,27	5409,40±231,99	1409,15±96,59
Введення ДМГ і МІ-1 в дозі			
0,027 мг/кг	7103,11±254,98	5627,21±194,05	1332,90±94,17
2,7 мг/кг	6819,26±277,32	5474,49±148,35	1348,61±82,39

відмічається наявність лейкоцитарних інфільтратів, що є ознакою запальних процесів.

Для оцінки видільної функції нирок у тварин експериментальних груп визначали вміст хлоридів, сечовини та креатиніну у сироватці крові. Слід відмітити, що вміст хлоридів не змінюється при застосуванні обох доз МІ-1 (рис. 1, а). Вміст сечовини підвищується на 12 % під впливом МІ-1 в дозі 0,027 мг/кг ($Pd^{*}0,3$), а доза 2,7 мг/кг не викликає змін (див. рис. 1, б). Вміст креатиніну під впливом МІ-1 в дозі 0,027 мг/кг не змінюється (рис. 1, в), а в дозі 2,7 мг/кг – збільшується на 35 % ($Pd^{*}0,1$). Отже, МІ-1 не викликає істотних змін вмісту хлоридів, сечовини і креатиніну в сироватці крові щурів, що свідчить про незначне порушення видільної функції нирок.

Таким чином, щодобовий вплив МІ-1 протягом 20 тиж не викликає суттєвих структурно-функціональних змін у нирках щурів, однак порушує гемодинаміку судин мікроциркуляторного русла. В інтерстиції між канальцями спостерігаються осередки запалення. Зміни у гломерулярному та тубулярному апараті кіркових нефронів, що були викликані місячним та 10-добовим введенням МІ-1, а саме: зменшення розмі-

рів судинних клубочків і капсул Шумлянського–Боумена, дистрофічні зміни епітелію проксимальних і дистальних канальців нефронів [7], менш виражені при його тривалому застосуванні. Очевидно, за цих умов адаптаційні процеси сприяють відновленню нормального морфофункціонального стану нирок.

Під впливом канцерогену ДМГ у нирках щурів спостерігається значне порушення у системі кровопостачання. Відмічаються масивні крововиливи, тромбоз і стаз невеликих судин. Гломерулярний і тубулярний апарат зберігає свою структуру, в ньому не відмічено значних відмінностей від контролю 2. Такі показники структурно-функціонального стану гломерулярного апарату нефронів нирок щурів цієї групи, як площі капсул, судинних клубочків та вільного просвіту капсул істотно не змінюються (див. табл. 1). У тубулярному апараті нефронів більш суттєвих змін зазнають проксимальні канальці. Просвіт більшості канальців розширений, середнє значення його діаметра збільшується на 17 %, одночасно висота епітелію зменшується на 9 %. Такі зміни викликають зменшення канальцевого індексу на 22 % (див. табл. 2). У деяких канальцях відбувається

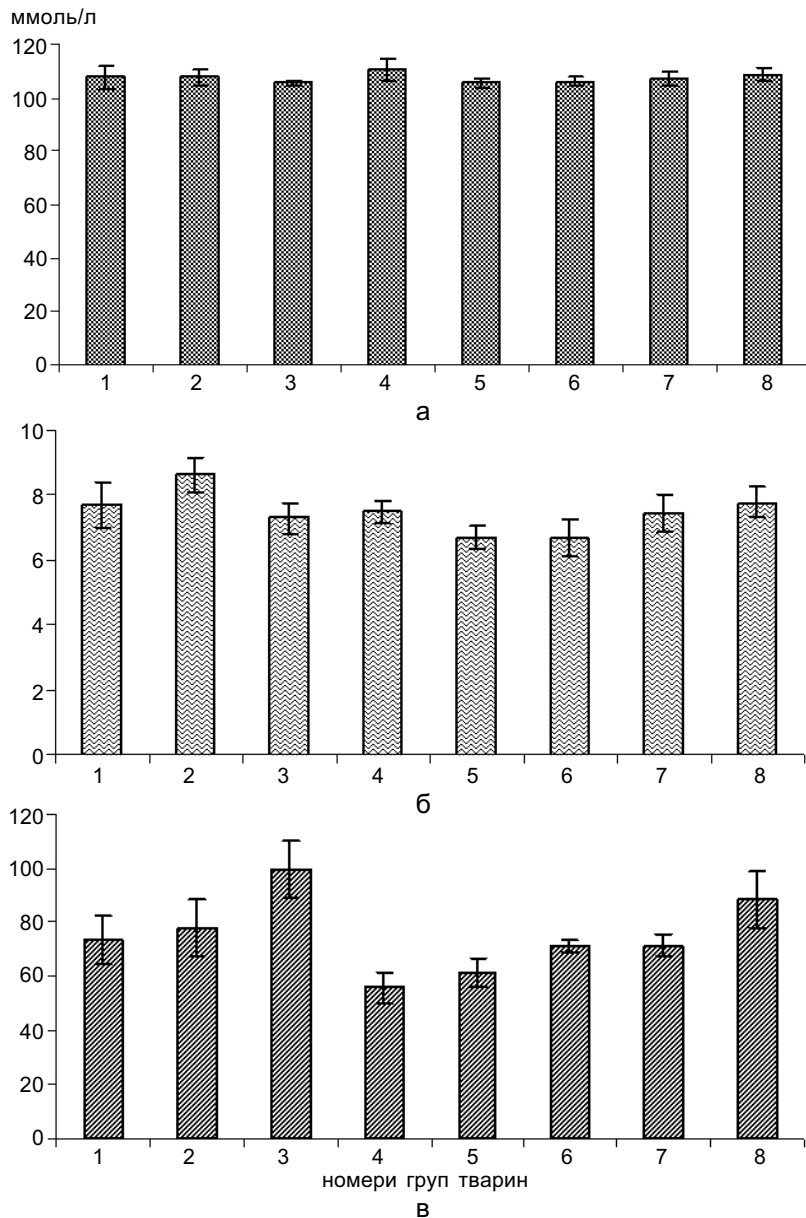
Таблиця 2. Вплив МІ-1 на тубулярний апарат нефронів кіркового шару нирок щурів за умов 1,2-диметилгідразин (ДМГ)-індукованого канцерогенезу товстої кишки ($M \pm m$)

Група тварин	Дистальні канальці			Проксимальні канальці		
	Висота епітелію, мкм	Діаметр просвіту, мкм	Канальцевий індекс	Висота епітелію, мкм	Діаметр просвіту, мкм	Канальцевий індекс
Контроль 1	7,56±0,16	11,87±0,45	0,68±0,01	10,8±0,38	11,13±0,45	1,0±0,01
Введення МІ-1, 0,027 мг/кг	7,51±0,18	12,79±0,58	0,61±0,01*	10,95±0,28	10,95±0,46	1,03±0,04
2,7 мг/кг	7,44±0,15	12,15±0,26	0,62±0,02*	11,34±0,39	11,08±0,33	1,05±0,06
Контроль 2	7,05±0,19	12,72±0,44	0,56±0,01	10,77±0,27	11,04±0,19	0,99±0,04
Введення ДМГ, мг/кг	6,98±0,19	12,36±0,29	0,58±0,02	9,85±0,3**	12,92±0,31**	0,77±0,02**
Контроль 3	7,11±0,13	12,64±0,16	0,56±0,01	11,3±0,17	11,73±0,59	0,99±0,06
Введення ДМГ і МІ-1 в дозі 0,027 мг/кг	6,97±0,13	12,25±0,31	0,58±0,02	10,18±0,19***	12,17±0,21	0,85±0,01
2,7 мг/кг	6,80±0,14	12,45±0,22	0,56±0,02	9,94±0,30***	11,31±0,59	0,90±0,04

* $Pd^{*}0,05$ відносно контролю 1, ** $Pd^{*}0,05$ – контролю 2, *** $Pd^{*}0,05$ – контролю 3.

вакуолізація цитоплазми епітеліоцитів, десквамація щіткової облямівки клітин. Більшість дистальних каналців зберігають нормальну структуру, їх епітеліоцити містять округле ядро і прозору цитоплазму, просвіт каналців нерозширений. Епітеліоцити деяких каналців мають зруйновану

апикальну частину. Відомо, що ДМГ є канцерогеном, який викликає новоутворення у нирках гризунів [16, 17] переважно з клітин проксимальних каналців. Однак у наших дослідженнях у паренхімі кіркового шару нирок серед каналців і поблизу судин було відмічено невеликі ділянки з підви-



Вміст хлоридів (а), сечовини (б) і креатиніну (в) у сироватці крові щурів після впливу MI-1 за умов 1,2-диметилгідразин (ДМГ)-індукованого канцерогенезу товстої кишки: 1 – контроль 1 – олія; 2 – MI-1 в дозі 0,027 мг/кг; 3 – MI-1 в дозі 2,7 мг/кг; 4 – контроль 2 – фізіологічний розчин; 5 – ДМГ; 6 – контроль 3 – олія і фізіологічний розчин; 7 – ДМГ і MI-1 в дозі 0,027 мг/кг; 8 – ДМГ і MI-1 в дозі 2,7 мг/кг

щеною проліферацією епітеліальних клітин дистальних каналців. При чому це спостерігалось у тварин-пухлиноносіїв, що мали найбільш прогресуючі аденокарциноми в товстій кишці [12]. Очевидно такі відмінності в дії ДМГ є результатом застосування певних умов введення: 20 мг/кг 20 тиж [12] і 8 мг/кг 5 тиж [16, 17].

Однчасне застосування ДМГ і МІ-1 в обох дозах не викликає значних змін морфометричних показників гломерулярного апарату кіркових нефронів порівняно з контролем 3 (див. табл. 1). Проте у нирках тварин цих дослідних груп потовщується базальна мембрана капсули Шумлянського–Боумена. Зберігаються також застійні явища у кровоносному руслі мікроциркуляторних судин. Крім того, у паренхімі між каналцями відмічено значні ділянки інфільтратів лейкоцитів. Часом вони розміщені поблизу судин, стінки яких потовщені. У однієї особини із групи, що отримувала ДМГ і МІ-1 в дозі 2,7 мг/кг відмічено осередки підвищеної проліферації епітеліоцитів дистальних каналців. Спостерігається незначне зменшення висоти епітелію, однак їх діаметр залишається без змін так само, як і каналцевий індекс (див. табл. 2). У проксимальних каналцях вірогідно і дозозалежно зменшується висота епітелію на 10 % при дозі 0,027 мг/кг і на 12 % при дозі 2,7 мг/кг (див. табл. 2). Діаметр просвіту залишається при цьому незмінним, а зниження каналцевого індексу несуттєвим.

Під впливом ДМГ і при сумісній його дії з МІ-1 вміст сечовини, креатиніну та хлоридів у щурів не порушується. Це говорить про відсутність суттєвих функціональних змін з боку видільної системи.

Таким чином, за умов сумісного застосування МІ-1 та канцерогену ДМГ у нирках щурів відбуваються зміни, що притаманні для дії кожного агента окремо. Так, подібно МІ-1, комбінована дія викликає тенденцію до витончення епітелію дистальних каналців, а подібно ДМГ – вірогідне зменшення

висоти епітелію проксимальних каналців. МІ-1 справляє деяку протективну дію на нирки щурів за умов експериментального канцерогенезу товстої кишки. Зокрема, при одночасному застосуванні не розширюються просвіти проксимальних каналців, що відбувалося при дії одного ДМГ. Крім того, підвищення проліферативної активності при комбінованій дії спостерігалось лише у однієї особини, тоді як для дії самого ДМГ це було типовою картиною майже для всіх тварин групи.

ВИСНОВКИ

1. Щодобове застосування МІ-1 протягом 20 тиж не викликає істотних структурно-функціональних змін у нирках щурів.

2. За умов 1,2-диметилгідразиніндуваного канцерогенезу товстої кишки у нирках щурів-пухлиноносіїв підсилюється проліферативна активність епітеліоцитів дистальних каналців і зменшується висота епітелію проксимальних каналців.

3. За умов експериментального канцерогенезу товстого кишечника МІ-1 справляє протективну дію на тубулярний апарат нефронів кіркового шару нирок щурів і зменшує частоту виникнення пренеопластичних змін у ньому.

**И.В. Харчук, Е.М. Филинская,
С.В. Яблонская, В.К. Рыбальченко**

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ

В эксперименте на 60 крысах-самцах исследовано особенности влияния нового производного малеимида с антипролиферативными свойствами на морфо-функциональное состояние почек при его длительном применении и в условиях экспериментального канцерогенеза толстого кишечника, который моделировали введением подкожно 1,2-диметилгидразина в дозе 20 мг/кг раз в неделю на протяжении 20 нед. Производное малеимида в дозах 0,027 и 2,7 мг/кг вводили ежедневно перорально. Состояние почек оценивали на основании морфометрических

исследований тканей почек и биохимических исследований содержания мочевины, креатинина и хлоридов в сыворотке крови. Установлено, что производное малеимида не вызывает существенных структурно-функциональных изменений в почках крыс после ежедневного 20-недельного введения. В условиях 1,2-диметилгидразининдуцированного канцерогенеза толстого кишечника в почках крыс-опухоленосителей происходит усиление пролиферативной активности эпителиоцитов дистальных канальцев и уменьшение высоты эпителия проксимальных канальцев. В условиях экспериментального канцерогенеза производное малеимида оказывает протективное действие на тубулярный аппарат коркового слоя почек крыс и уменьшает частоту возникновения пренеопластических изменений в нём.

Ключевые слова: производные малеимида, морфофункциональное состояние почек, канцерогенез толстого кишечника.

I.V. Kharchuk, O.M. Filinska, S.V. Yablonska, V.K. Rybalchenko

THE INFLUENCE OF MALEIMIDE DERIVATIVE ON THE MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF KIDNEY IN EXPERIMENTAL COLON CARCINOGENESIS IN RATS

The effect of long-term administration of the novel maleimide derivative with antiproliferative activity on kidney morpho-functional state in experimental (1,2-dimethylhydrazine-induced) colon carcinogenesis has been investigated on 60 male rats. 1,2-Dimethylhydrazine was injected subcutaneously in dose 20 mg/kg one time per week during 20 weeks. Maleimide derivative in dose of 0,027 and 2,7 mg/kg was given per os daily during the same time. The state of kidneys was evaluated after morphometrical investigation and measurement of urea, creatinine and chlorides levels in blood serum. It hasn't been revealed significant structure-functional changes in kidneys after daily administration during 20 weeks. The induction of proliferate activity of distal tubules epithelial cells and reducing of epithelial layer thickness in proximal tubules in kidneys in rats with experimental carcinogenesis has been observed. In experimental colon carcinogenesis, maleimide derivative displays some protective action to tubular apparatus of rat's kidney cortical nephrons and reduces the frequency of preneoplastic changes in tubules epithelial cells.

Key words: maleimide derivatives, kidney's morpho-functional state, colon carcinogenesis.

Kyiv National Shevchenko University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дубініна Г.Г., Головач С.М., Козловський В.О., Толмачов А.О., Воловенко Ю.М. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-

- (R2-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону // Журн. орг. та фармацевт. хімії. – 2007. – Вип. 5, №1. – С. 39–49.
2. Зими́на Л.Н., Галкина Г.С. Лекарственная гепатонепфропатия // *Арх. патологии.* – 1988. – **50**, вып. 5. – С. 58–65.
3. Линчак О.В., Харчук І.В., Карпезо Н.О. Островська Г.В., Рибальченко В.К. Стан слизової оболонки тонкої кишки шурів після впливу похідного малеїміду // *Збір. наук. праць «Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології».* – К.-Луганськ-Харків. – 2009. – Вип. 8 (95). – С. 52–58.
4. Линчак О.В., Харчук І.В., Островська Г.В., Карпезо Н.О., Рибальченко В.К. Дослідження впливу похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону на морфологічний стан печінки // *Збір. наук. праць «Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології».* – К.-Луганськ-Харків. – 2007. – Вип. 3–4 (78–79). – С. 34–39.
5. Островська Г.В., Ніжерадзе К.О., Дубініна Г.Г., Рибальченко В.К. Цитостатична дія похідних малеїміду на клітинах лінії НЕК293 // 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології: Збірник тез (23–26 жовтня 2007р.). – К., 2007. – С. 126.
6. Харчук І.В., Карпезо Н.О., Островська Г.В., Рибальченко Т.В., Линчак О.В., Цивінська С.М., Рибальченко В.К. Морфофункціональні зміни в сім'яниках шурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеїміду // *Совр. проблемы токсикологии.* – 2008. – №1. – С.61–65.
7. Харчук І.В., Карпезо Н.О., Островська Г.В., Рибальченко Т.В., Рибальченко В.К. Особливості морфофункціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону // *Доп. НАН України.* – 2009. – № 10. – С. 185–188.
8. Харчук І.В., Карпезо Н.О., Філінська О.М., Яблонська С.В., Линчак О.В., Рибальченко В.К. Зниження нефротоксичного впливу оксидативного стресу похідним малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діоном // *Урологія.* – 2009. №1. – С. 27–31.
9. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling / *Nature.* – 2001. – 411. – P. 355–365.
10. Dubinina G.G., Chupryna O.O., Platonov M.O., Borisko P.O., Ostrovska G.V., Tolmachov A.O., Shtil A.A. In Silico Design of Protein Kinase Inhibitors: Successes and Failures // *Anti-Cancer Agents in Med. Chemistry.* – 2007. – 7, №2. – P.171–188
11. Kim JA. Targeted therapies for the treatment of cancer / *Amer. J. Surg.* – 2003. – **86**, №3. – P. 264–268.
12. Lynchak O., Ostrovska G., Rybalchenko V. Effects of new maleimide derivate on the 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats // *Gut “GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London”.* – 2009. – **58** (Suppl. II). – P. A334.

13. Perse M., Cerar A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat – experimental colorectal carcinogenesis // *Radiol. Oncol.* – 2005. – **39**, №1. – 61–70.
14. Sathornsumetee S., Reardon D.A., Desjardins A., Quinn J.A., Vredenburgh J.J., Rich J.N. Molecularly targeted therapy for malignant glioma // *Cancer.* – 2007 – **110**, №1. – P.13–24.
15. Thaimattam R., Banerjee R., Miglani R., Iqbal J. Protein kinase inhibitors: structural insights into selectivity// *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – **13**, №27. – P. 2751–2765.
16. Toth B., Malick L., Shimizu H. Production of intestinal and other tumors by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. I. A light and transmission electron microscopic study of colonic neoplasms // *Amer. J. Pathol.* – 1976. – **84**. – P. 69–86.
17. Turusov V.S., Chemeris G.Yu. Renal Cell Tumors Induced in CBA Male Mice by 1,2-Dimethylhydrazine / *Toxicol. Pathol.* – 1992. – **20**, №.4. – P. 570–575.
18. Yablonska S., Filinska O., Ostrovska G., Linchack O., Dubinina G., Nizheradze K., Rybalchenko V. Antiproliferative properties and low hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivate // *The FEBS Journal “Biochemistry of cell regulation: 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference”.* – 2008. – **275**. – P.348.
19. Yablonska S., Lynchak O., Filinska O., Ostrovska G., Shkira N., Kharchuk I., Nizheradze K., Rybalchenko V. Antiproliferative effects and influence on liver condition after per os administration of novel cytostatic maleimide derivate // *The FEBS Journal “Life’s molecular interactions: 34th FEBS Congress”.* – 2009. – **276**. – P.352.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка
E-mail: kharchukirina@ukr.net

Матеріал надійшов до
редакції 18.03.2010

О.В. Калініченко, Т.М. Мишуніна, М.Д. Тронько

Катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих з папілярною карциномою щитоподібної залози

При вивченні катепсиноподібної активності у плазмі крові хворих з папілярною карциномою щитоподібної залози були зафіксовані особливості її змін залежно від клінічних характеристик захворювання та гістологічної будови пухлини. Для Н-катепсиноподібної активності зі зростанням категорії Т пухлини спостерігали прогресуюче її підвищення, особливо у хворих з супровідною доброякісною тиреоїдною патологією. При пухлині, що метастазує, яку не супроводжує інша тиреоїдна патологія, підвищення ферментативної активності було значно більшим, ніж у крові хворих без метастазів. В-катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих, в щитоподібній залозі яких виявлена лише карцинома, була на рівні такої у здорових осіб. У разі супроводу карциноми вузловим зобом чи аденомою В-катепсиноподібна активність підвищувалась, особливо істотно при пухлині категорії T₁. У крові хворих з карциномою, яка була діагностована на тлі іншої тиреоїдної патології, невелике підвищення L-катепсиноподібної активності жодним чином не залежало від клінічних особливостей хвороби, тоді як у разі однієї карциноми ферментативна активність залежала від категорії Т пухлини, її гістологічної будови, наявності чи відсутності оксифільноклітинної метоплазії. В роботі не отримано результатів, які б дали змогу пов'язати зміни катепсиноподібної активності у крові з процесами інтра- чи екстратиреоїдного розповсюдження пухлини, а також інвазії у лімфатичні чи кровоносні судини. Результати проведених досліджень не дають підстав вважати, що визначення катепсиноподібної активності у крові пацієнтів з папілярною карциномою щитоподібної залози може бути надійним додатковим біохімічним критерієм для диференціальної діагностики, оцінки ступеня тяжкості та інших характеристик захворювання.

Ключові слова: цистеїнові катепсини В, Н, L, папілярна карцинома, супровідна доброякісна патологія щитоподібної залози, кров.

ВСТУП

Активнація лізосомального шляху регуляції метаболізму в клітинах є суттєвою для окремих ланок патогенезу багатьох захворювань, у т. ч. онкологічних, за умов яких може порушуватись експресія, внутрішньоклітинна локалізація, механізми регуляції активності та секреції ферментів, що локалізуються у лізосомах [2, 5, 22]. Індукція змін у регуляції процесів утилізації білків відбувається ще до початку автономного росту пухлини, а підсилення при трансформації клітин продукції та секреції лізосомальних протеаз, зокрема цистеїнових

катепсинів [4], тісно пов'язана з реорганізацією метаболічних циклів, що спрямовано на забезпечення максимальної активності пластичного метаболізму [18]. Вважають, що навіть у відсутності видимих ознак пухлини підвищення вмісту активних форм цистеїнових катепсинів у плазмі крові може свідчити про значне якісне порушення катаболізму білків [6]. Зміна регуляції функції цих ферментів забезпечує феномен надходження їх у кров.

Водночас є дані, які свідчать про неоднакові за ступенем і напрямком зміни активності таких лізосомальних цистеїнових катепсинів, як В, Н та L у крові пацієнтів

© О.В. Калініченко, Т.М. Мишуніна, М.Д. Тронько

із пухлинами різної локалізації, гістологічного типу та стадії пухлинної прогресії. Слід відмітити різні висновки авторів щодо клінічної цінності визначення активності катепсинів у крові хворих з онкологічними захворюваннями. Зміни активності катепсинів, за деякими даними, є додатковою біохімічною інформацією, яку можна використати для уточнення діагнозу [19, 27, 28], вони можуть говорити про реакцію організму на пухлинну інвазію і визначати ступінь тяжкості та напрямок перебігу патологічного процесу [13, 34], дати змогу оцінити відповідь на обрану хіміотерапію [25] чи, навіть передбачити прогноз захворювання [25, 30, 34, 35]. Дехто наголошує, що зниження активності катепсинів характеризує тяжкість онкологічного процесу та метастатичний потенціал пухлини [17]. Отже, питання про значення та доцільність дослідження активності цих ферментів у крові хворих з пухлинами (різної локалізації) залишається до кінця не визначеним.

Щодо дослідження активності катепсинів В, Н і L у крові хворих з карциномами щитоподібної залози (ЩЗ), то такі праці поодинокі [10, 13, 19]. Показано, що активність катепсинів Н і В не змінювалася, тоді як катепсину L була значно підвищеною в крові хворих з карциномами ЩЗ; після оперативного втручання активність останнього ферменту різко зменшувалася до рівня, що був суттєво нижчим, ніж у здорових осіб.

Метою нашої роботи було визначення активності катепсинів В, Н і L у плазмі крові хворих з папілярною карциномою щитоподібної залози (ПКЩЗ). Зважаючи на те, що властивості цистеїнових катепсинів, що знаходяться у крові, неможливо порівняти з властивостями очищених катепсинів з тканин, коректніше говорити про Н-, В- та L-катепсиноподібну активність (Н-КПА, В-КПА та L-КПА).

МЕТОДИКА

На проведення досліджень отримано дозвіл від Комітету з біоетики Інституту. Хворі,

які перебували на лікуванні у хірургічному відділенні Інституту, були поінформовані щодо мети дослідження та дали згоду на використання їх крові.

Плазму крові отримали від 63 хворих з ПКЩЗ (вік пацієнтів $41,7 \pm 1,9$ років, 54 жінки та 9 чоловіків), 7 пацієнтів з метастазами ПКЩЗ, яка була видалена у них раніше ($46,0 \pm 6,1$ років, 5 жінок і 1 чоловік) та 12 практично здорових добровольців ($44,8 \pm 3,0$ років, 9 жінок і 3 чоловіки). Кров відбирали з ліктьової вени пацієнтів натщесерце у пробірці, що містила насичений розчин ЕДТА; плазму крові отримували загальноприйнятим способом і зберігали до використання у низькотемпературній шафі при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

В-, Н- та L-КПА визначали як описано в роботі Barret і Kirschke [21], відносно субстратів, відповідно: N_{α} -бензоіл-D,L-аргінін-4-нітроанлід, L-лейцин-4-нітроанлід та азоказеїн (6%-й розчин якого попередньо був денатурований 6 М сечовиною). В- та Н-КПА виражали у мікромолях паранітроанліну (ПНА), який відщепився від субстрату, а L-КПА – в умовних одиницях абсорбції низькомолекулярних пептидів (які не осаджуються трихлороцтовою кислотою), що утворилися за 1 год інкубації, на 1 мл плазми крові.

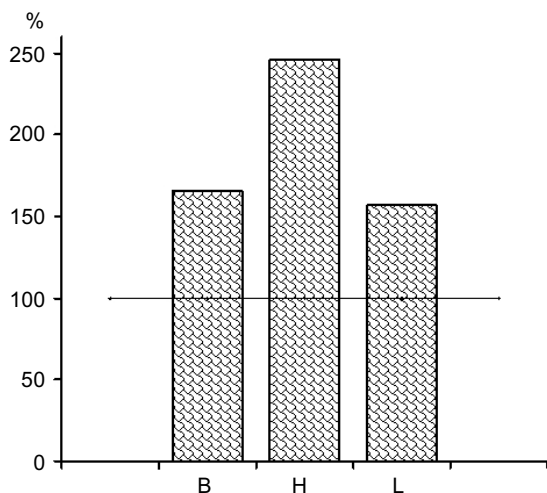
Одержані результати опрацьовані статистично з використанням критерію t Стьюдента і непараметричного критерію U Вілкоксона–Манна–Уїтні та подані в таблицях у вигляді $M \pm m$. Критичний рівень значимості приймали за 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

КПА у плазмі крові здорових осіб не залежала від їх статі (що відмічено і раніше [14]), тому хворих не поділяли за цією характеристикою. Встановлено підвищення ферментативної активності у плазмі крові хворих з ПКЩЗ, найбільше це було виражено для Н-КПА (рисунок). Показано, що існує певна різниця у ступені підвищення КПА залежно від категорії пухлини: В-КПА

була збільшеною лише у хворих з пухлиною категорії T_1 і T_2 , Н-КПА істотніше підвищувалася у хворих з пухлиною категорії T_4 , L-КПА у плазмі крові хворих з пухлиною категорії T_4 була на рівні здорових осіб, а значніше та більш закономірно вона підвищувалася лише у хворих з пухлиною категорії T_1 (табл. 1). Не відмічено суттєвої різниці у підвищенні КПА у плазмі крові хворих з ПКЩЗ при відсутності чи наявності метастазів у регіонарні лімфовузли (пухлини категорії N_0 і N_1). В-КПА була найвищою у плазмі крові хворих з ПКЩЗ типової папілярної будови, за пухлин інших підтипів зміни ферментативної активності несуттєві. Встановлено також, що найменше підвищення Н- та L-КПА спостерігали у разі фолікулярної будови ПКЩЗ (див. табл. 1). У плазмі крові пацієнтів з метастазами ПКЩЗ, видаленої раніше, В- та L-КПА зареєстрована на рівні такої у здорових осіб, а підвищення Н-КПА було виражено меншою мірою, ніж у хворих з ПКЩЗ.

Відомо, що у двох третин хворих на рак ЩЗ неопластичний процес супроводжується доброякісною тиреоїдною патологією, переважно колоїдним вузловим зобом, тиреоїдитом чи аутоімунним тиреоїдитом



Зміни В-, Н- та L-катепсиноподібної активності у плазмі крові хворих з папілярною карциномою (відсоток порівняно з активністю в плазмі крові здорових осіб)

[1, 15]. Відсоток таких хворих у цьому дослідженні становив 63. Раніше ми показали, що зміни КПА у плазмі крові хворих із різними тиреоїдними захворюваннями мають певні особливості [8], і це може маскувати зміни ферментативної активності у крові хворих з ПКЩЗ при наявності супровідних захворювань ЩЗ. Приймаючи зазначене до уваги, було проведено порівняння КПА у плазмі крові хворих з ПКЩЗ без (група 1) та з супровідною доброякісною тиреоїдною патологією (яку діагностували при патогістологічному дослідженні видаленої ЩЗ, група 2). Показано, що підвищення В-КПА у плазмі крові було лише у хворих 2-ї групи, L-КПА – закономірно лише у хворих 1-ї, для Н-КПА різниця між групами була відсутньою (див. табл. 1). При цьому В-КПА виявилася збільшеною у плазмі крові хворих при супровідній вузловій патології чи хронічному тиреоїдиті, тоді як у разі хронічного аутоімунного тиреоїдиту чи хвороби Грейвса ферментативна активність була на рівні здорових осіб. Збільшену Н-КПА спостерігали в усіх хворих з ПКЩЗ 2-ї групи за винятком пацієнтів із хворобою Грейвса. L-КПА була підвищеною у хворих з ПКЩЗ при супровідній вузловій патології, це збільшення менш виражено у хворих з хронічним тиреоїдитом, а у хворих із хворобою Грейвса активність була нижчою, ніж у плазмі крові добровольців (див. табл. 1).

Зважаючи на ці результати, аналіз виявлених змін КПА залежно від деяких гістологічних чи клінічних особливостей захворювання був проведений окремо по групах хворих. Як видно з результатів табл. 2, Н-КПА у плазмі крові пацієнтів зі зростанням категорії Т пухлини мала тенденцію до більш суттєвого підвищення, при цьому різниця між Н-КПА у хворих 2-ї групи з пухлиною категорії T_4 вірогідно вища за таку у хворих з пухлиною категорії T_1 . Крім того, у плазмі крові пацієнтів 1-ї групи з ПКЩЗ (без супровідної тиреоїдної

патології) при наявності пухлини, що метастазує, Н-КПА у 2,4 раза вища, ніж хворих без метастазів у лімфовузли (див. табл. 2). Збільшення Н-КПА у пацієнтів обох груп суттєво не залежало від особливостей гістологічної будови пухлини (див. табл. 2), об'єму залози, наявності чи відсутності капсули пухлини, оксифільноклітинної метаплазії, інвазії у кровоносні чи лімфатичні судини, інтра- чи екстра-тироїдного розповсюдження, склеротичних і/чи дистрофічних змін її строми (не показано).

В-КПА у плазмі крові хворих з ПКЩЗ 1-ї групи не залежала від категорії пухлини

(табл. 3), проте виявлена суттєва (1,7 раза) різниця у значенні ферментативної активності залежно від об'єму залози, хоча в обох групах (при незміненому чи збільшеному об'ємі залози) вона статистично значуще не відрізнялася від активності у здорових осіб: $28,8 \pm 5,30$ та $(16,3 \pm 2,63)$ мкмоль ПНА $\text{год}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$ відповідно ($P < 0,05$). Крім того, у разі ПКЩЗ фолікулярної будови В-КПА у крові трьох хворих була майже втричі нижчою, ніж у пацієнтів з пухлиною типової папілярної будови. Ферментативна активність у плазмі крові хворих з ПКЩЗ 2-ї групи була найвищою за наявності пухлини типової папілярної

Таблиця 1. В-, Н- та L-катепсиноподібна активність у плазмі крові здорових осіб і хворих із папілярною карциномою щитоподібної залози

Групи обстежених	Катепсиноподібна активність					
	В-, мкмоль паранітроаніліну · $\text{год}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$		Н-, мкмоль паранітроаніліну · $\text{год}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$		L-, ум. од. абсорбції · $\text{год}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m
Практично здорові особи	11	18,4±2,82	10	29,0±5,49	12	0,71±0,129
Хворі з папілярною карциномою: з пухлиною категорії:	54	30,4±3,55 *	59	70,6±4,42 *	53	1,13±0,094 *
T ₁	24	33,8±6,38 *	28	64,6±6,79 *	27	1,27±0,140 *
T ₂	13	39,3±6,93 *	12	65,7±4,68 *	9	0,96±0,177
T ₃	10	18,4±3,66 а, б	12	76,8±10,9 *	10	1,18±0,226
T ₄	7	20,4±4,20 б	7	95,0±12,1*б	7	0,69±0,185 а
N ₀	43	31,1±4,22 *	49	67,4±4,25 *	42	1,13±0,110 *
N ₁	11	27,4±5,14	10	88,5±16,3 *	11	1,13±0,214 *
з пухлиною будови:						
типової папілярної	19	41,7±7,08 *	19	80,8±8,48 *	18	1,25±0,279 *
фолікулярної	9	23,2±5,62 г	11	55,3±7,66 *г	10	0,89±0,241
фолікулярно-папілярної	10	23,2±3,05 г	11	71,3±9,48 *	10	1,26±0,230 *
змішаної з солідним компонентом	16	25,6±4,21 г	18	68,8±8,37 *	15	1,07±0,191
без супровідної тиреоїдної патології (група 1)	20	22,0±3,06	22	70,6±8,45 *	21	1,33±0,157 *
при супровідній тиреоїдній патології (група 2):	34	35,4±5,20 *в	37	70,6±5,05 *	32	1,00±0,114
вузлова патологія	14	43,8±10,5 *	16	75,4±6,17 *	14	1,22±0,126 *
хронічний тиреоїдит	11	35,6±7,91 *	12	68,2±9,34 *	9	1,11±0,209
хронічний аутоімунний тиреоїдит	6	24,7±3,80	6	78,7±17,7 *	6	0,64±0,036
дифузний токсичний зоб (хвороба Грейвса)	3	16,3±4,62	3	38,7±3,52	3	0,32±0,094 *
хворі з метастазами видаленої карциноми	6	20,7±5,37	7	50,3±5,84 *д	7	0,80±0,175

Примітки. Тут і в табл. 2-4 різниця вірогідна ($P < 0,05$): * – порівняно з ферментативною активністю у плазмі крові здорових осіб; а – хворих з пухлиною категорії T₁; б – хворих з пухлиною категорії T₂; в – хворих попередньої групи; г – хворих з папілярною карциномою типової папілярної будови; д – хворих з папілярною карциномою.

Таблиця 2. Н-катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих з різними за характеристиками папілярними карциномами щитоподібної залози

Групи обстежених	Без супровідної тиреоїдної патології (група 1)		При супровідній тиреоїдній патології (група 2)	
	n	M±m	n	M±m
Практично здорові особи	10	29,0±5,49		
Хворі з папілярною карциною: з пухлиною категорії:	22	70,6±8,45 *	37	70,6±5,05 *
T ₁	11	62,7±10,4 *	17	66,2±8,66 *
T ₂	3	64,0±22,0	9	65,6±5,15 *
T ₃	5	70,0±16,3 *	7	75,4±14,5 *
T ₄	3	101,0±32,0 *	4	92,0±5,19 * а
N ₀	19	63,3±6,86 *	30	70,7±5,42 *
N ₁	3	153,3±5,25 * в	7	70,0±14,1 *
з пухлиною будови:				
типової папілярної	6	78,8±19,0 *	13	81,7±9,36 *
фолікулярної	3	50,0±7,21 *	8	57,3±10,3 *
фолікулярно-папілярної	6	72,3±16,6 *	5	70,0±8,94 *
змішаної з солідним компонентом	7	70,9±16,7 *	11	67,5±9,35 *

будови, тоді як з фолікулярною, фолікулярно-папілярною чи змішаною будовою з солідними ділянками вона закономірно не відрізнялася від значень, характерних для здорових людей (див. табл. 3).

Слід також зауважити, що особливо значна різниця В-КПА в плазмі крові

хворих залежно від категорії Т пухлини виявлялася у пацієнтів з ПКЩЗ і супровідними доброякісними вузлами: 74,8±22,6, 40,2±15,2, (22,7±6,81) мкмоль ПНА · год⁻¹ · мл⁻¹ відповідно при пухлинах категорії Т₁, Т₂ і Т₃₋₄ чи хронічним тиреоїдитом: 61,0±21,0, 42,0±8,88, (14,8±3,73) мкмоль

Таблиця 3. В-катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих з різними за характеристиками папілярними карциномами щитоподібної залози

Групи обстежених	Без супровідної тиреоїдної патології (група 1)		При супровідній тиреоїдній патології (група 2)	
	n	M±m	n	M±m
Практично здорові особи	11	18,4±2,82		
Хворі з папілярною карциною: з пухлиною категорії:	20	22,0±3,06	34	35,4±5,20 *
T ₁	10	22,7±5,10	14	43,1±9,11 *
T ₂	3	22,8±1,20	10	41,7±7,90 *
T ₃	4	21,0±5,66	6	19,2±4,19 а б
T ₄	3	19,2±2,40	4	21,0±5,05 а б
N ₀	17	20,5±2,22	26	38,4±6,66 *
N ₁	3	35,2±28,8	8	25,5±3,18
з пухлиною будови:				
типової папілярної	6	27,4±7,09	13	48,3±9,29 *
фолікулярної	3	9,40±3,40 г	7	27,1±7,81
фолікулярно-папілярної	5	20,2±4,22	5	26,2±4,41 г
змішаної з солідним компонентом	6	22,2±3,85	9	28,2±7,15

ПНА . год⁻¹ . мл⁻¹. Такої залежності не відмічено у хворих, у яких ПКЩЗ супроводжували хронічний аутоімунний тиреоїдит чи хвороба Грейвса. У хворих 1-ї групи В-КПА, а 2-ї – ступінь її підвищення не залежали від таких характеристик пухлин, як відсутність чи наявність капсули, оксифільноклітинної метаплазії, інвазії у кровоносні чи лімфатичні судини, інтра- чи екстратиреоїдного розповсюдження, склеротичних і/чи дистрофічних змін строми.

Підвищення L-КПА у плазмі крові хворих з ПКЩЗ 1-ї групи також залежало від категорії Т пухлини, але зі збільшення категорії зміни ферментативної активності нівелювалися (табл. 4). L-КПА залишалася незміненою щодо значень у здорових при ПКЩЗ змішаної будови з наявністю солідних ділянок, а також, якщо у тканині пухлини спостерігали оксифільноклітинну метаплазію або склеротичні та/чи дистрофічні зміни строми. Ступінь збільшення ферментативної активності не залежав від

об'єму залози, наявності чи відсутності капсули пухлини, її метастазів у лімфатичні вузли, інвазії у кровоносні чи лімфатичні судини, а також інтра- чи екстратиреоїдного розповсюдження карциноми. У плазмі крові пацієнтів з ПКЩЗ 2-ї групи невелике підвищення L-КПА не залежало від жодної з зазначених характеристик патологічного процесу, за винятком того, що спостерігали двократну різницю між ферментативною активністю у крові при пухлинах фолікулярної будови та пухлинах інших гістологічних підтипів, зокрема типової папілярної будови (див. табл. 4).

ОБГОВОРЕННЯ

У нормі цистеїнові лізосомальні катепсини при рН > 7 швидко інактивуються, тому ресстрація суттєвої активності цих ферментів у крові, де наявні їх ендogenous інгібітори, можлива лише за інтенсивного виходу ферментів з тканин при виражених гострих

Таблиця 4. L-катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих з різними за характеристиками папілярними карциномами щитоподібної залози

Групи обстежених	Без супровідної тиреоїдної патології (група 1)		При супровідній тиреоїдній патології (група 2)	
	n	M±m	n	M±m
Практично здорові особи	12	0,71±0,129		
Хворі з папілярною карциномою: з пухлиною категорії:	21	1,33±0,157*	32	1,00±0,114
T ₁	13	1,58±0,156 *	14	0,98±0,204
T ₂	-	-	9	0,95±0,176
T ₃	5	1,10±0,353	5	1,28±0,302
T ₄	3	0,43±0,144 а	4	0,82±0,256
N ₀	18	1,27±0,160 *	24	1,02±0,140
N ₁	3	1,94±0,350 *	8	0,93±0,200
з пухлиною будови:				
типової папілярної	6	1,46±0,171 *	12	1,14±0,188
фолікулярної	3	1,78±0,246 *	7	0,50±0,186 г
фолікулярно-папілярної	5	1,54±0,351 *	5	0,97±0,215
змішаної з солідним компонентом	7	0,89±0,188 г	8	1,23±0,251
без оксифільноклітинних змін	17	1,50±0,164 *	28	1,00±0,128
з оксифільноклітинними змінами	4	0,63±0,220 в	4	1,00±0,211
без склеротичних змін	6	1,90±0,162 *	14	1,01±0,196
зі склеротичними змінами	15	1,11±0,181 в	17	0,99±0,144

запальних, некротичних чи деструктивних процесах [20]. Крім того, встановлена важлива особливість пухлинних клітин, яка стосується продукування ними цистеїнових лізосомальних пептидгідролаз зі зміненими властивостями молекули, зокрема, вони є стабільними при нейтральних і слаболужних значеннях рН [29, 31, 32]. Стабільні форми катепсинів, що зв'язалися з інгібіторами, зберігають активність відносно субстратів з невеликою масою, що дає змогу реєструвати їх активність у плазмі крові ферментативними методами. Наші результати щодо підвищення КПА у плазмі крові пацієнтів з ПКЩЗ збігається з більшістю даних, які представлені у літературі [6, 16, 25, 28]. Водночас існують свідчення і про зменшення або відсутність змін активності цистеїнових катепсинів у крові пацієнтів із онкологічними захворюваннями [17, 26].

Слід відмітити істотніше підвищення Н-КПА у плазмі крові хворих з ПКЩЗ, що майже не залежало від клінічних, гістологічних і біологічних характеристик пухлин. Ферментативна активність підвищувалася і у хворих з карциномою, яку не супроводжувала інша тиреоїдна патологія, і у хворих, яким діагностували також у ЩЗ хронічний чи хронічний аутоімунний тиреоїдит, вузловий колоїдний чи аденоматозний зоб, аденому, і лише у разі, коли карциному було виявлено у пацієнтів із хворобою Грейвса, підвищення ферментативної активності було незначним. Зважаючи на це, можна погодитися з думкою, що зміни Н-КПА у крові є неспецифічним маркером особливого стану організму, який пов'язаний з реорганізацією метаболічних циклів за наявності пухлин [6].

Зі збільшення розмірів пухлини та їх агресивності Н-КПА ще більше підвищувалася, і у хворих з пухлиною категорії T₄ вона більш ніж у 3 рази перевищувала значення, характерні для здорових. Проте збільшення цього показника у 5,3 рази спос-

терігали за наявності метастазів пухлини у лімфовузлі лише у хворих з ПКЩЗ без іншої тиреоїдної патології, воно було також вищим при наявності метастазів у раніше прооперованих пацієнтів. Отже, спостерігається певний зв'язок інтенсивності секреції катепсину Н у кров із процесами прогресії пухлинного росту у ЩЗ і метастазуванням карциноми. Літературні дані щодо пухлин іншої локалізації такий зв'язок заперечують [25]: підвищення активності катепсину Н у крові хворих з меланомою не корелював з розміром пухлини чи метастазуванням. Подібний висновок щодо розмірів пухлини був зроблений і при вивченні ферментативної активності у крові пацієнтів з плоскоклітинними карциномами в ділянці голови, водночас у прооперованих пацієнтів при наявності метастазів активність катепсину Н залишалася підвищеною [6, 16].

З іншого боку, є дані, що активність катепсину Н корелює з гістологічним типом пухлин. Це спостерігали при наявності меланому [25], пухлин легень [33], а у плазмі крові хворих з плоскоклітинними карциномами в ділянці голови активність була обернено пропорційна ступеню диференціювання пухлин [35]. У наших дослідженнях Н-КПА підвищувалася у крові хворих з ПКЩЗ різної гістологічної будови.

В-КПА у плазмі крові хворих, у ЩЗ яких виявлена лише карцинома, була на рівні такої у крові здорових осіб (що відповідає результатам інших авторів [13]) і не залежала від клінічних характеристик захворювання. Щодо пухлин іншої локалізації, то активність катепсину В у крові не мала зв'язку з клінічними характеристиками карцином підшлункової залози [27], злоякісних пухлин голови чи шиї [35], проте такий зв'язок встановлено у разі колоректальної карциноми [24], карцином печінки [28] та матки [23].

У разі наявності в ЩЗ карциноми одночасно з вузловим зобом чи фоліку-

лярною аденомою В-КПА у плазмі крові підвищувалася особливо суттєво (у 4 рази) при пухлині категорії T₁. Раніше ми показали, що у хворих з вузловим еутиреоїдним зобом чи з фолікулярною аденомою цей показник у крові збільшувався, причому саме у хворих з найменшим перевищенням об'єму залози понад вікову норму [8, 9]. Отже, обтяженість онкологічного процесу наявністю у ЩЗ іншої вузлової патології спотворює ті реальні зміни В-КПА, які можуть бути пов'язані з розвитком власне пухлини. Підтвердженням цього є той факт, що у крові хворих 1-ї групи з ПКЩЗ фолікулярної будови В-КПА значно нижча за ту, що спостерігали при іншій гістологічній будові карциноми, тоді як в крові хворих 2-ї групи найвищу ферментативну активність реєстрували при ПКЩЗ типової папілярної будови.

Наявність хронічного тиреоїдиту також підвищувала В-КПА у плазмі крові хворих з ПКЩЗ. Підвищення активності катеписину В у крові відмічено і іншими авторами при запальних процесах у підшлунковій залозі [27], печінці [28] та легенях [33]. Водночас існування аутоімунних захворювань у людей з ПКЩЗ, певно, не впливає на секрецію катеписину В у кров. У пацієнтів із діагностованим аутоімунним тиреоїдитом та хворобою Грейвса В-КПА у плазмі крові змінювалася несуттєво [8]. Отже, це пов'язано переважно з вузловою патологією ЩЗ і запальними процесами в ній. Раніше ми припустили, що збільшення В-КПА у крові хворих на вузловий зоб до певної міри є компенсаторним механізмом, необхідним для досягнення еутиреоїдного стану за допомогою активації вивільнення тироксину та трийодтироніну з тиреоглобуліну, який за цієї патології містить низьку концентрацію йоду та тиреоїдних гормонів [9].

Характер змін L-КПА у плазмі крові хворих з ПКЩЗ протилежний тому, що встановлено для В-КПА: у хворих з карци-

номою, яка була діагностована на тлі супровідної доброякісної тиреоїдної патології, деяке підвищення ферментативної активності не мало будь-якого зв'язку з клінічними особливостями хвороби, тоді як у разі ПКЩЗ без супровідної патології ступінь підвищення L-КПА у плазмі крові певним чином залежав від категорії T пухлини. Відомі дані як про збільшення активності катеписину L у крові хворих з меланою [25], злоякісними пухлинами підшлункової залози [27], печінки [28], колоректальною карциною [24], пухлинами в ділянці голови та шиї [35], мозку [12], так і про зниження її у пацієнтів зі злоякісною лімфою, особливо при 4-й стадії хвороби та при наявності метастазів [17] чи про відсутність змін активності цього катеписину у хворих із карциною шлунка або бронхів [26]. За деякими даними активність катеписину L не мала зв'язку з клінічними характеристиками хвороби [24, 27] чи гістологічним типом пухлини [35], за іншими – такий зв'язок зафіксований [12, 24, 28]. Слід також зазначити, що при „рецидиві” пухлини в ділянці голови активність катеписину L була нижчою, ніж у хворих без такого, водночас ризик виникнення рецидивів був суттєвим саме у хворих з низькою активністю цього катеписину [35]. У наших дослідженнях відсутність змін L-КПА у крові відмічено у пацієнтів з пухлиною категорії T₄, з пухлиною змішаної будови з солідними ділянками (що свідчить про зниження ступеня диференціювання пухлини), за наявності оксифільноклітинної метаплазії і при склеротичних та/чи дистрофічних змінах строми пухлини, тобто за більш несприятливих характеристик патологічного процесу.

Отже, якщо зміни В-КПА у крові пацієнтів з ПКЩЗ пов'язані переважно з доброякісною вузловою патологією, то зміни Н- та L-КПА можна пов'язати з процесами злоякісної трансформації клітин.

Проте ми не отримали результатів, які б свідчили про зв'язок модуляції КПА у крові пацієнтів із процесами інтра- чи екстратиреоїдного розповсюдження пухлини та інвазії пухлинних клітин у лімфатичні чи кровоносні судини, тоді як деякі автори наголошують на участь цистеїнових катепсинів саме у процесах інвазії та утворення метастазів у тканинах [18, 22].

На наш погляд, немає також обґрунтованих підстав пов'язувати підвищення L-КПА у крові пацієнтів з ПКЩЗ із порушенням регуляції секреції ТТГ, як це зроблено в праці Чорної та співавт. [19]. Разом із підвищенням у 3,6 раза активності катепсину L у пацієнтів з ПКЩЗ та відсутністю її змін у хворих з еутиреоїдним зобом наводяться дані про різке збільшення у крові таких хворих вмісту ТТГ і T_3 (у 7,35 раза (!?) і у 4 рази (!?) відповідно). Вузловий еутиреоїдний зоб вони чомусь вважають доброякісною пухлиною, а пацієнтів з такою патологією – онкологічними (?) [19]. Добре відомо, що вміст ТТГ у двох третин хворих з ПКЩЗ може бути дещо збільшеним, але у більшості випадків він суттєво не перевищує значень верхньої межі норми [7, 11]. Щодо змін вмісту ТТГ при ПКЩЗ різної гістологічної будови, то помірне його підвищення спостерігали у 16 % пацієнтів із пухлиною типової папілярної будови, та у 60–67 % хворих з фолікулярним чи солідним варіантом ПКЩЗ, але у певної кількості цих хворих був зниженим і вміст вільного тироксину, тобто вони були у стані субклінічного гіпотиреозу [3]. Слід відмітити, що у хворих, які знаходилися переважно у еутиреоїдному стані, підвищення L-КПА було однаковим у пацієнтів з ПКЩЗ типової папілярної, фолікулярної і фолікулярно-папілярної будови, тоді як у хворих з пухлиною змішаної будови з наявністю солідних ділянок ферментативна активність не відрізнялася від значень, характерних для здорових осіб.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про складні та неоднозначні зміни

КПА у крові хворих з ПКЩЗ, що вказує як на можливу роль катепсинів В, Н та L у регуляції функції залози за умов патології, так і в процесах злаякісної трансформації тиреоцитів. Результати досліджень не дають підстав вважати, що визначення В-, Н-, L-КПА у крові пацієнтів з ПКЩЗ може бути надійним додатковим біохімічним критерієм для диференціальної діагностики, оцінки ступеня тяжкості та інших характеристик захворювання.

**Е. В. Калиниченко, Т. М. Мишуніна,
Н. Д. Тронько**

КАТЕПСИНОПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ПАПИЛЛЯРНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

При исследовании катепсиноподобной активности в плазме крови больных с папиллярной карциномой щитовидной железы были зафиксированы особенности её изменений в зависимости от клинических характеристик заболевания и гистологического строения опухоли. Для Н-катепсиноподобной активности при увеличении категории Т опухоли наблюдали прогрессирующее её повышение, особенно у больных с сочетанной доброкачественной тиреоидной патологией. При метастазирующей опухоли, которую не сопровождала иная тиреоидная патология, повышение ферментативной активности было значительно выше, чем в крови больных без метастазов. В-катепсиноподобная активность в плазме крови больных, в щитовидной железе которых выявлена только карцинома, была на уровне такой у здоровых лиц. В случае сочетания карциномы с узловым зобом или аденомой В-катепсиноподобная активность повышалась, особенно значительно при опухоли категории T_1 . В крови больных с карциномой, которая была диагностирована на фоне другой тиреоидной патологии, небольшое повышение L-катепсиноподобной активности никак не зависело от клинических особенностей болезни, тогда как в случае одной карциномы повышение ферментативной активности определенным образом зависела от категории Т опухоли, её гистологического строения, оксифильноклеточной метаплазии. В работе не получено результатов, которые могли бы связать изменения катепсиноподобной активности в крови с процессами интра- или экстратиреоидной инвазии, а также инвазии в лимфатические или кровеносные сосуды. Результаты проведенных исследований не дают оснований считать, что определение катепсиноподобной активности в крови пациентов с папиллярной карциномой щитовидной железы может быть надёжным дополнительным биохимическим критерием для дифференциальной диагностики,

оценки степени тяжести и других характеристик заболевания.

Ключевые слова: цистеиновые катепсины В, Н, L, папиллярная карцинома, сочетанная доброкачественная патология щитовидной железы, кровь.

**O. V. Kalinichenko, T. M. Myshunina,
M. D. Tron'ko**

CATHEPSINE-LIKE ACTIVITY IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH PAPILLARY THYROID CARCINOMA

The peculiarities of the thyroid changes depending on clinical characteristics of disease and histological structure of tumor were fixed by the studies of cathepsin-like activity in blood plasma of patients with papillary thyroid carcinoma. H-cathepsin-like activity had a tendency to more significant increase especially in patients with concomitant benign thyroid disease with increasing the tumor category. In a case of metastatic tumor without other concomitant thyroid pathology, the degree of an increase in enzymatic activity was significantly higher comparing to the blood of patients without tumor metastases. B-cathepsin-like activity in blood plasma of patients only with tumor carcinoma was at the level of that of healthy subjects. B-cathepsin-like activity in blood plasma had especially significant increased under tumor T₁ category that was connected with nodular goiter or adenoma in a case concomitant carcinoma by other thyroid pathology. In patients with carcinoma that was diagnosed against a background of concomitant pathology, the insignificant increase in L-cathepsin-like activity was not dependent on clinical features of disease, while in a case of carcinoma without concomitant pathology a degree of its increase was certainly dependent on a category of tumor T, its histological structure and the presence of oxyphilic cell metaplasia. We failed to get an evidence linking the changes in cathepsin-like activity in blood with the processes of intra- or extrathyroid invasion and invasion into the lymphatic or blood vessels. The results of the studies do not provide a rationale to consider that the cathepsin-like activity in blood of patients with papillary thyroid carcinoma can be the valuable additional biochemical criterion for differential diagnosis, estimation of the severity, and other characteristics of the disease.

Key words: cathepsin B, H, L, papillary carcinoma, concomitant benign thyroid pathology, blood.

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS of Ukraine», Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Введение в радиационную тиреодологию / Под ред. Коваленко А.Н., Афанасьева Д.Е., Самойлова А.Р. – К.: Томирис-Н, 2006. – 615 с.
2. Веременко К.Н., Голобородько О.Л., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. – К.: Здоров'я,

1988 – 200 с.

3. Гриневич Ю.Я., Лобода В.Ф., Бендюг Г.Д., Югринова Л.Г., Процик В.С. Взаємозв'язок між цитологічними особливостями раку щитовидної залози та ендокринною функцією тимуса і гіпофізарно-тиреоїдної системи організму // Патологія. – 2008. – № 2. – С. 52.
4. Дилакян Э.А., Балаевская И.В., Закамалдина-Цама Т. Исследование экспрессии катепсинов D и L в процессе онкогенной трансформации фибробластов // Вопр. мед. химии. – 1994. – № 3. – С. 2–19.
5. Ефремов А.В., Руюткина Л.А., Цыганкова О.В., Бондарева З.Г. Роль лизосомальных ферментов в генезе ведущих клинико-патологических синдромов: факты и гипотезы // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2007. – № 1. – С. 18–21.
6. Жлоба А.А., Дунаевский В.А. Активность секретрируемых форм цистеиновых катепсинов в крови в качестве маркера процессов тканевого роста // Вопр. онкологии. – 1996. – № 1. – С. 70–76.
7. Иванов П.К., Казеев К.Н., Каретников Ю.П. Тиролибериновый тест в диагностике рака щитовидной железы // Пробл. эндокринологии. – 1984. – № 5. – С. 34–38.
8. Калініченко О.В., Мишуніна Т.М., Тронько М.Д. В-, Н- та L-катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих з різними захворюваннями щитовидної, парашитовидної та надниркових залоз // Укр. біохім. журн. – 2010. – № 2. – С. 45–50.
9. Калініченко О.В., Мишуніна Т.М., Тронько М.Д. В-, Н- та L-катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих з еутиреоїдним вузловим зобом і хворобою Грейвса // Ендокринологія. – 2010. – № 1. – С. 35–43.
10. Кирпиченко Л.Н., Гидранович Л.Г., Шиленок В.Н. Активность протеолитических процессов при заболеваниях щитовидной железы // Вопросы мед. химии. – 2000. – № 5. – С. 518–519.
11. Комисаренко І.В., Славнов В.М., Рибаків С.І., Марков В.В., Яковлев А.А. Радіоімунологічний аналіз у визначенні функціонального стану гіпофізарно-тиреоїдної системи у хворих на рак щитоподібної залози // Укр. радіол. журн. – 1997. – № 22. – С. 22–24.
12. Лянна О.Л., Бомбін О.В., Хворостенко М.І., Чорна В.І. Клінічні та біохімічні дослідження цистеїнових катепсинів у біологічних рідинах людини при канцерогенезі // Буковин. мед. вісн. – 2005. – № 2. – С. 155–158.
13. Лянна О.Л., Хворостенко М.І., Чорна В.І. Цистеїновий катепсин В у діагностиці онкологічних захворювань щитоподібної залози // Укр. радіол. журн. – 2008. – № 3. – С. 314–316.
14. Маврутенков В.В. Клініко-патогенетичне значення лізосомних цистеїнових катепсинів В і L при інфекційному мононуклеозі // Інфек. хвороби. – 2005. – № 3. – С. 22–26.

15. Мужичук А.В., Афанасьєва Н.И., Шевцов В.Г., Мужичук В.В. Клинико-морфологические характеристики сочетанного течения рака щитовидной железы и доброкачественной тиреоидной патологии // *Міжнарод. мед. журн.* – 2009. – № 1. – С. 91–95.
16. Попова А.Н., Жлоба А.А., Соловьев М.М. Активность катепсина Н в крови и биоптатах больных с предопухолевыми состояниями и опухолями полости рта // *Вопр. онкологии.* – 2001. – № 5. – С. 590–594.
17. Халикова Т.А., Потеряева О.Н., Поспеелова Т.И., Короленко Т.А. Цистеиновые протеазы катепсины В и L и их ингибитор цистатин С у больных гемобластомами // *Гематология и трансфузиология.* – 2004. – № 4. – С. 18–27.
18. Чорна В.І., Какадій О.Л. Лізосомні цистеїнові протеїнази при злоякісному рості // *Онкологія.* – 2005. – № 2. – С. 84–89.
19. Чорна В.І., Ляна О.Л., Хворостенко М.І., Бразалук О.В. Роль протеолізу в гормонопозі щитоподібної залози за канцерогенезу // *Вісн. Львів. ун-ту.* – 2008. – вип. 47. – С. 58–62.
20. Assfalg-Machleidt I., Jochum M., Nast-Kolb D., Siebeck M., Billing A., Joka T., Rothe G., Valet G., Zauner R., Scheuber H. Cathepsin B – indicator for the release of lysosomal cysteine proteinase in severe trauma and inflammation // *Hopple-Seyler. Physiol. Chem.* – 1990. – **371**. – S. 221–222.
21. Barret A., Kirschke H. Cathepsins B, H, and L // in: *Methods in enzymology.* Ed.: L. Lorán. New-York, London: Acad. Press. – 1981. – **80**, part C. – P. 535–561.
22. Gocheva V., Joyce J. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion // *Cell Cycle.* – 2007. – **6**. – P. 60–64.
23. Hirano T., Manabe T., Takeuchi S. Serum cathepsin B levels and urinary excretion of cathepsin D in the cancer patients with remote metastasis // *Cancer Lett.* – 1993. – **70**. – P. 41–44.
24. Kos J., Lah T. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: Target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer // *Oncol. Rep.* – 1998. – **5**. – P. 1349–1361.
25. Kos J., Stabuc B., Schweiger A., Krasovec M., Cimerman N., Kopitar-Jerala N., Vrhovec I. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients // *Clin. Cancer Res.* – 1997. – **3**. – P. 1815–1822.
26. Lószly A., Sohár I., Karócsanyi S. Activities of serum cathepsin (B, H and L) and metalloproteinase (MMP7-ase) in patients with gastrointestinal and bronchial malignant tumours // *Acta Med. Hung.* – 1990. – **47**. – P. 107–109.
27. Leto G., Tumminello F., Pizzolanti G., Montalto G., Soresi M., Carroccio A., Ippolito S., Gebbia N. Lysosomal aspartic and cysteine proteinases serum levels in patients with pancreatic cancer or pancreatitis // *Pancreas.* – 1997. – **14**. – P. 22–27.
28. Leto G., Tumminello F., Pizzolanti G., Montalto G., Soresi M., Gebbia N. Lysosomal cathepsins B and L and Stefin A blood levels in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis: potential clinical implications // *Oncology.* – 1997. – **54**. – P. 79–83.
29. Mort J., Leduc M., Recklies A. Characterization of a latent cysteine proteinase from ascetic fluid as a high molecular weight form of cathepsin B // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 1983. – **755**. – P. 369–375.
30. Nishida Y., Kohno K., Kawamata T. Increased cathepsin L levels in serum in some patients with ovarian cancer: comparison with CA125 and CA72-4 // *Gynecol. Oncol.* – 1995. – **56**. – P. 357–361.
31. Pietras R., Szego C., Mangan C., Seeler B., Burtnett M. Elevated serum cathepsin B1-like activity in women with neoplastic disease // *Ibid.* – 1979. – **7**. – P. 1–5.
32. Recklies A., Poole A., Mort J. A cysteine proteinase secreted from human breast tumors is immunologically related to cathepsin B // *Biochem. J.* – 1982. – **207**. – P. 633–636.
33. Schweiger A., Staib A., Werle B. Cysteine proteinase cathepsin H in tumours and sera of lung cancer patients: relation to prognosis and cigarette smoking // *Br. J. Cancer.* – 2000 – **82**. – P. 782–788.
34. Staack A., Koenig F., Danilchenko D., Hauptmann S., Loening S., Schnorr D., Jung K. Cathepsins B, H, and L activities in urine of patients with transitional cell carcinoma of the bladder // *Urology.* – 2002. – **59**. – P. 308–312.
35. Strojjan P., Budihna M., Smid L., Svetic B., Vrhovec I., Skrk J. Cathepsin B and L and stefin A and B levels as serum tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and neck // *Neoplasma.* – 2001. – **48**. – P. 66–71.

*ДУ “Ін-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України”, Київ
E-mail: mishunina@list.ru.*

Матеріал надійшов до редакції 04.05.2010

О.В. Гарашук, О.М. Цупиков, В.І. Цимбалюк

Вплив пізньої трансплантації фетальної нервової тканини на цитоархітектоніку гіпокампа у віддаленому періоді після транзиторної глобальної ішемії головного мозку щурів

Досліджено вплив трансплантації фетальної нервової тканини (ФНТ) на процеси відновлення структури гіпокампа щурів після ішемії. Транзиторну глобальну ішемію (ТГІ) головного мозку у щурів віком 13,2 міс \pm 2,4 міс викликали за допомогою 20-хвилинної чотирисудинної оклюзії. Суспензію ФНТ отримували з СА1-зони та зародкової зубчастої звивини гіпокампів плодів щурів 18–19-ї доби ембріонального розвитку. ФНТ трансплантували стереотаксично у СА1-зону гіпокампа тварин через 30 діб після ТГІ. Лінійну щільність пірамідальних клітин, ширину променистого шару СА1-зони, морфологію зубчастої звивини та СА4-зони вивчали на світлооптичному рівні у зрізах гіпокампів через 2, 4 та 7 міс після ТГІ і через 1, 3 та 6 міс після трансплантації ФНТ. Встановлено, що пізня трансплантація ФНТ достовірно прискорює відновлення цитоархітектоніки гіпокампа впродовж тривалого періоду після ТГІ головного мозку щурів.

Ключові слова: фетальна нервова тканина, глобальна ішемія головного мозку, стереотаксична трансплантація, гіпокамп.

ВСТУП

Широкий спектр неврологічних захворювань характеризується розладами процесів пам'яті та навчання, які об'єднуються поняттям “когнітивна функція центральної нервової системи”. До таких захворювань, зокрема, належать стареча деменція, хвороба Альцгеймера, стани після порушень мозкового кровообігу, зупинок серцевої діяльності тощо [8, 9]. Багато дослідників довели провідну роль парагіпокампально-гіпокампальної системи, що входить до складу лімбічної системи переднього мозку у забезпеченні когнітивної функції [5, 20, 26]. Встановлено, що саме пірамідальні клітини СА1-зони гіпокампа найменш стійкі до гіпоксично-ішемічного впливу, а поширеність ураження цієї зони корелює зі ступенем когнітивної дисфункції [17, 18, 28].

© О.В. Гарашук, О.М. Цупиков, В.І. Цимбалюк

Більшість експериментальних робіт у цьому напрямку виконана на щурах, у яких еквівалентом пам'яті та навчання є процес вироблення та утримання тих чи інших поведінкових реакцій. Особливого поширення у моделюванні когнітивних розладів постішемічного типу набула модель транзиторної глобальної ішемії (ТГІ) головного мозку щурів при чотирисудинній оклюзії [17]. Показано, що тимчасове припинення кровопостачання головного мозку впродовж 20 хв призводить до незворотного ураження 85–90 % пірамідальних клітин переважно у СА1-зоні гіпокампа протягом наступних 72 год [18]. Аналогічні дані отримували у разі двобічної оклюзії сонних артерій у піщанок [13, 14] та ішемічного ураження головного мозку приматів [30]. Діаметрально протилежні зміни відбуваються в іншій частині гіпокампа –

зубчастій звивині. Встановлено, що транзиторна ішемія головного мозку стимулює нейрогенез у цій ділянці внаслідок проліферації нейральних прогеніторів у субгранулярній зоні зубчастої звивини під впливом специфічних факторів росту, що екскретуються ендотеліоцитами локального мікросудинного оточення [13, 30].

У зв'язку з ключовою роллю гіпокампа у процесах консолідації та відтворення пам'яті, актуальним є пошук способів відновлення його структури та функції, зокрема найбільш уразливої СА1-зони. Особливої уваги заслуговує нейротрансплантація, в тому числі з використанням гомотопічної ембріональної нервової тканини, клітин «умовно безсмертних» ліній, ембріональних нервових стовбурових клітин/прогеніторів, або аутологічних стовбурових клітин – похідних стромальних клітин кісткового мозку [10, 12, 15, 22, 25, 27]. Після такої трансплантації спостерігали міграцію та подальшу диференціацію введених клітин у нейрони з утворенням синаптичних контактів з нейронами реципієнта як локально, в зоні трансплантації, так і з відповідними структурами контралатеральної півкулі головного мозку, що забезпечувало позитивний терапевтичний ефект [3, 10, 12, 27]. У більшості робіт трансплантацію проводили у ранній (7–14-та доба) період після травматичного чи ішемічного пошкодження головного мозку експериментальних тварин. Відомо, що в цей період мікрооточення в зоні ураження потенційного реципієнта є найбільш сприйнятливим до інтеграції трансплантата [6]. Однак перспектива клінічного застосування нейротрансплантації змушує наближати експериментальні умови до реальних. Адже часто після початку захворювання проходить тривалий час, як це спостерігається при нейродегенеративних захворюваннях і цереброваскулярній патології. При цьому в зоні ураження розвиваються незворотні процеси у вигляді формування

гліального рубця, суттєвого погіршення васкуляризації, що несприятливо відображається на міграції трансплантованих клітин до ділянки пошкодження та їх інтеграції в нейрональні ланцюги реципієнта [25]. Відомо також, що пластичність головного мозку експериментальних тварин знижується з віком [29], а, отже, і зменшується здатність до спонтанної регенерації.

Мета нашої роботи полягала в оцінці впливу більш пізньої (через 30 діб після ішемічного ураження головного мозку) трансплантації фетальної нервової тканини (ТФНТ) на структуру гіпокампа дорослих лабораторних щурів у тривалі строки після трансплантації (до 6 міс). Для ТФНТ використовували суспензію клітин СА1-зони та зубчастої звивини гіпокампа фетального мозку щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 151 самцю білих лабораторних щурів віком $13,2 \text{ міс} \pm 2,4 \text{ міс}$ і масою $417 \text{ г} \pm 34 \text{ г}$, з них 5 становили інтактний віварійний контроль. Щурів утримували по 4–6 особин у пластикових вольєрах в умовах віварію зі світловим режимом день–ніч при середній температурі $24 \text{ }^\circ\text{C}$, годували стандартним комбікормом та поїли водою без обмежень. Перед оперативними втручаннями тварин позбавляли їжі строком на 8 год. Усі маніпуляції виконували згідно з Законом України № 3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження», а також з Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою, та відповідно до принципів біоетики і норм біологічної безпеки.

ТГГ головного мозку викликали у тварин під внутрішньоочеревинним наркозом кетаміном (Каліпсовет плюс, ЗАТ „Біолік”, Україна) у дозі 70 мг/кг і ксилазином (Хула,

“Interchemie”, Нідерланди) у дозі 7,5 мг/кг, за допомогою чотирисудинної оклюзії [17]. У 65 % тварин спостерігали втрату установочного рефлексу при збереженні корнеального, що свідчило про достатнє кровопостачання стовбура головного мозку.

Для отримання суспензії клітин гіпокампа фетального мозку щурів відбирали вагітних самиць на 18–19-ту добу після спарювання. Під інтраперитонеальним наркозом кетаміном у поєднанні з ксилазином плоди виділяли з матки та плідних міхурів. Після цього плоди відділяли від плацент і переносили у розчин Хенкса, що не містив Ca^{2+} та Mg^{2+} («Sigma», США), а також 0,6 % глюкози, 10 ммоль/л HEPES. Потім плоди декапітували, відокремлювали гемісфери головного мозку, з яких поетапно виділяли CA1-зони та зародкові зубчасті звивини гіпокампа.

Отримані фрагменти тканини піддавали механічній дисоціації піпетками Пастера змінних діаметрів у об'ємі 2,0 мл. Життєздатність клітин суспензії оцінювали, підраховуючи кількість живих клітин у камері Горяєва після забарвлення розчином трипанового синього, її значення становило $70 \% \pm 8 \%$. Перед введенням суспензію ресуспендували до концентрації 10 000 живих клітин/мкл.

Стереотаксичну ТФНТ проводили через 4 тиж після ішемії. Під внутрішньоочеревинним наркозом, як описано вище, голову тварини фіксували у модифікованому стереотаксичному апараті СЕЖ-3 в положенні flat skull. Усі стереотаксичні маніпуляції виконували з використанням координат введення за атласом [16]. Стереотаксичну ТФНТ проводили в 4 точки (в міліметрах): AP (–4,3 від брегми); L ($\pm 2,0$), V (2,5) і AP (–5,3 від брегми); L ($\pm 3,5$), V (3,0). За допомогою скляного капіляра діаметром 0,3 мм, з'єданого з мікроін'єктором, протягом 3 хв у кожену точку вводили 10 мкл суспензії (100 000 клітин), для дифузії трансплантата капіляр залишали

у каналі введення на 10 хв.

ТГІ головного мозку викликали у 146 щурів методом чотирисудинної оклюзії. Інтраоклюзійна летальність становила 35 % (51 тварина), ще 5 тварин померли в ранньому післяопераційному періоді (7 діб) внаслідок генералізованого судомного синдрому. Щурів, які вижили протягом 4 тиж після ТГІ (90 тварин), розділили на 6 груп по 15 щурів у кожній, 45 тваринам виконували стереотаксичну ТФНТ. Інші 3 групи (45 тварин) були постішемичним контролем. Протягом 2–7 міс спостереження загинули ще 13 щурів (8 після ішемії, 5 після трансплантації). Тварин після ішемії виводили з експерименту через 2 міс (група ПІ1, n=14), 4 міс (група ПІ2, n=12) та 7 міс (група ПІ3, n=11) після оклюзії. Подібним чином виводили і тварин після трансплантації (із урахуванням трансплантації в 4 тиж) – через 1 міс (група ПТ1, n=15), 3 міс (група ПТ2, n=13) та 6 міс (група ПТ3, n=12).

Для аналізу цитоархітекtonіки гіпокампа забір матеріалу проводили у тварин під інгаляційним ефірним наркозом. Щурів декапітували, мозок фіксували у охолодженому 4%-му розчині параформальдегіду (ПА) на 0,1 М фосфатному буфері з рН 7,4. Виділяли гіпокампи, які заключали у парафін, і депарафіновані зрізи завтовшки 7 мкм забарвлювали розчином на основі 0,1 М фосфатного буфера, який містив 1 % толуїдинового синього, 0,5 % метиленового синього і 1 % тетраборнокислого натрію.

Реакцію астроглії вивчали імуногістохімічним методом з використанням антитіл до гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ), який є специфічним маркером астроцитів. Для цих досліджень депарафіновані зрізи гіпокампа мітили поліклональними кролячими антитілами, що специфічні до ГФКБ (1:500) («ДАКО», Данія), при 4 °С протягом 20 год і 12 год зі вторинними антикролячими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому. Для візуалізації

імуногістохімічного забарвлення використовували розчин діамінобензидину з додаванням 0,03%-го розчину перекису водню. Зрізи дофарбовували розчином на основі 0,1 моль/л фосфатного буфера, як описано вище. Після забарвлення зрізи дегідрували і заключали у полістирол («Permount», США).

Забарвлені зрізи гіпокампа вивчали за допомогою світлового мікроскопа XSP-139A-TP з цифровою камерою Canon Power Shot G-6 («NNJOI Co.Ltd», Японія–Китай). Під час подальшого морфометричного аналізу на мікрофотографіях при збільшенні в 200 крат підраховували лінійну щільність інтактних пірамідальних клітин на 1 мм довжини CA1-зони гіпокампа та ширину променистого шару у мікрометрах.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали з використанням програмного забезпечення XLSTAT 2009.4.06 («Addinsoft», США). Нормальність розподілу всіх рядів отриманих результатів перевіряли з використанням тесту Шапіро–Уїлка. Розподіл значень лінійної щільності у групах ПІ1 та ПТ1 не відповідав вимогам нормального, тому ці параметри для всіх груп наведено у вигляді «медіана [I квартиль; III квартиль]». Значення лінійної щільності порівнювали за допомогою критерію U Манна–Уїтні. Розподіл значень ширини променистого шару у групах, де його вимірювання було можливим, задовольняв вимоги нормального розподілу. Тому порівняння її значень, наведених у вигляді середнє \pm стандартне відхилення (SD), проводили з використанням критерію t Стьюдента. Різницю вважали достовірною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження мікроскопічної будови гіпокампа інтактних (контроль) тварин наведено на рис. 1, а, де чітко видно зони та шари, які описані в літературі [1,

7]. Так, у власне гіпокампі диференціювали зону CA1 із характерним для неї поділом на шари. Використана методика забарвлення давала змогу розрізнити в CA1-зоні alveus, утворений аксонами пірамідальних клітин; stratum oriens (висхідний шар) – базальними дендритами пірамідальних клітин; stratum pyramidale (пірамідальний шар), що містить тіла пірамідальних клітин; stratum radiatum (променистий шар), утворений нерозгалуженими волокнами апікальних дендритів; і stratum lacunosum-moleculare (лакунозно-молекулярний шар) – розгалуженими частинами та тонкими закінченнями апікальних дендритів пірамідальних клітин.

Нами встановлено, що пірамідальний шар складався із тіл нейронів, компактно розташованих у 3–5 рядів (див. рис. 1, б). Клітини містили оточене тонким обідком гіперхромної цитоплазми велике округле світле ядро, в якому чітко розрізнялося ядрце. Медіальну межу CA1-зони визначали за шириною пірамідального шару та наявністю променистого шару, його зникнення відповідало переходу в subiculum [7, 19]. Латеральною межею був початок зони CA3, що містить візуально більші пірамідальні клітини [19]. Лінійна щільність пірамідальних клітин CA1-зони становила 198 [182; 208] мм⁻¹. Променистий шар складався з радіально орієнтованих рівнобіжних апікальних дендритів, його ширина становила 682 мкм \pm 36 мкм. Результати отримані при морфометричному аналізі 47 полів зору.

Зубчаста звивина складалась із внутрішнього гранулярного та зовнішнього молекулярного шарів, взаємно розташованих V-подібно, у вигляді двох прямих «плечей», що обмежували ворота, в яких розташована CA4-зона гіпокампа. Гранулярний шар містив компактно розташовані у 4–6 шарів гранулярні клітини, морфологічно подібні до пірамідальних клітин CA1-зони, однак дещо менших розмірів.

Група III, 2 міс після ТПІ. Виявлені нами зміни в пірамідальному шарі СА1-зони суттєво варіювали в сенсі більшої або меншої кількості нефагоцитованих залишків пірамідальних клітин. На частині зрізів гіпокампа виявлено повну дегенерацію пірамідального шару із утворенням залишкових порожнин та поодиноких без'ядерних, різко гіперхромних компактних тіл нейронів, від яких місцями відходили теж гіперхромні короткі базальні дендрити (див.

рис. 1,в). На інших зрізах дегенерація СА1-зони мала вигляд моношару описаних гіперхромних тіл із дещо довшими дендритами. Лінійна щільність незмінених пірамідальних клітин становила $4 [3; 9] \text{ мм}^{-1}$. Променистий шар СА1-зони втратив притаманну йому будову, структура його стала гомогенною, а по всій довжині шару видно мікровакуолізацію, тому його морфометричний аналіз не проводили. В усіх випадках спостерігали інтенсивну інфільт-

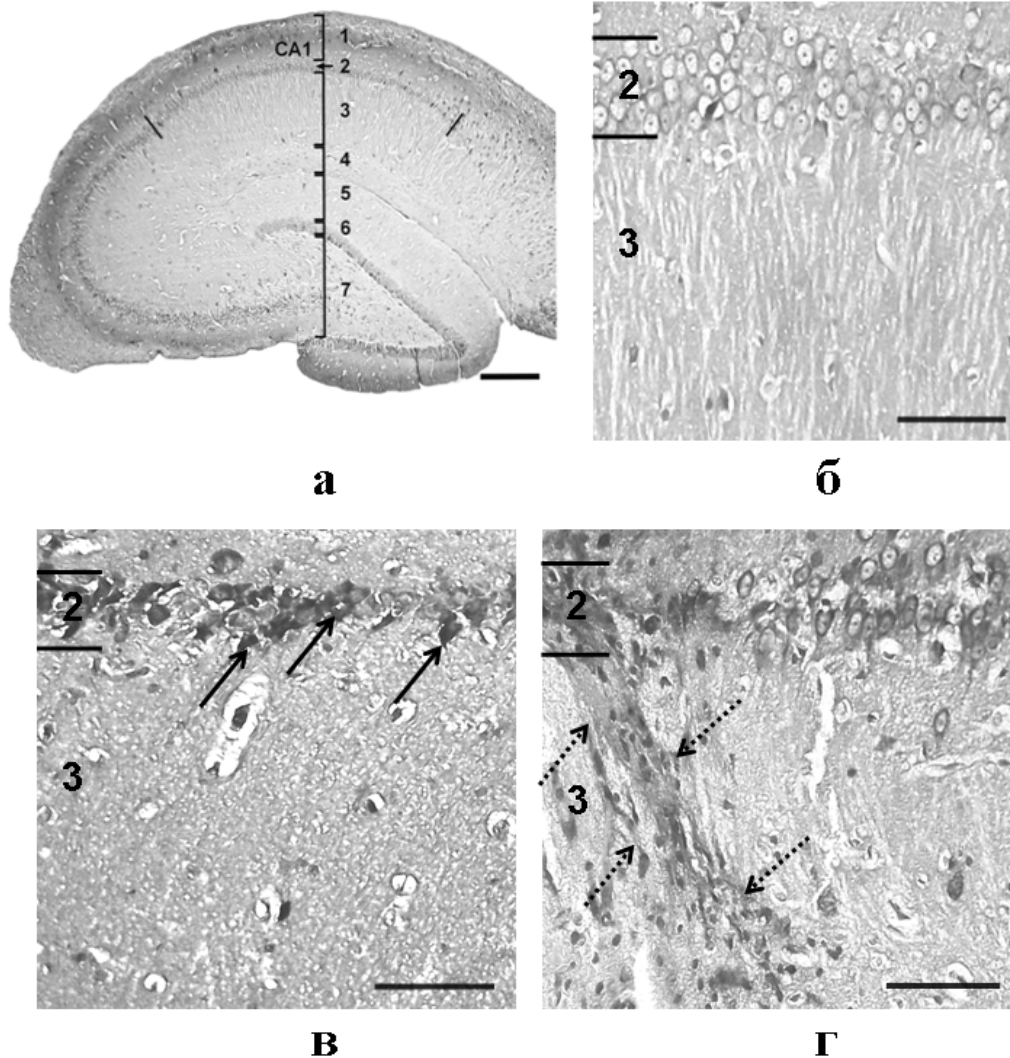


Рис. 1. Структура гіпокампа: а – інтактної тварини, СА1-зона позначена радіальними рисками; б-г – СА1-зона гіпокампа: б – віварійний контроль, в – 2 міс після ішемії, г – 1 міс після трансплантації. 1 – alveus і висхідний шар, 2 – пірамідальний шар, 3 – променистий шар, 4 – лакунозно-молекулярний шар, 5 – молекулярний шар зубчастої звивини, 6 – гранулярний шар зубчастої звивини, 7 – ворота зубчастої звивини. Стрілками вказані пошкоджені клітини. Пунктирними стрілками позначений гліально-фіброзний рубець. Шкала: а – 500 мкм, б-г – 50 мкм

рацію клітинами мікроглії пірамідального та променистого шарів СА1-зони. Цитоархітектоніка СА3-зони виглядала практично незміненою.

Зміни зубчастої звивини спостерігали переважно у внутрішньому, прилеглому до СА1-зони, плечі. Вони полягали у зменшенні в гранулярному шарі кількості рядів клітин, що супроводжувалось анізоцитозом з деяким збільшенням розміру частини клітин при збереженні типової нейрональної морфології. Будова зовнішнього плеча залишалась майже інтактною. У воротах зубчастої звивини виявлено повну дегенерацію пірамідальних клітин СА4-зони.

Група ПТ1, 1 міс після ТФНТ. На тлі вищеописаних змін пірамідального шару СА1-зони у тварин групи ПТ1, у щурів групи ПТ1 виявляли відносно більшу лінійну щільність інтактних пірамідальних клітин – 23 [13; 49] мм⁻¹ (див. рис. 1,г). При цьому власне зона трансплантації зазнала трансформації у вигляді формування гліально-фіброзного рубця, навколо якого скупчувалися клітини з морфологією, характерною для пірамідальних нейронів. У променистому шарі на тлі практично повної гомогенізації та мікровакуолізації спостерігали поодинокі ділянки нормальної волокнистої будови. Вони розташовувалися безпосередньо поруч з пірамідальним шаром, який містив морфологічно нормальні нейрони. З огляду на невелику кількість таких ділянок морфометричний аналіз променистого шару також не проводили.

У більшості тварин після трансплантації кількість рядів клітин у гранулярному шарі внутрішнього плеча зростала до 9–10 при збереженні характерної морфології нейронів. Лише у однієї тварини виявили спустошення гранулярного шару внутрішнього плеча та зменшення кількості клітин у зовнішньому плечі. Жодних ознак дегенерації пірамідального шару СА4-зони у воротах зубчастої фасції не виявляли.

Група ПТ2, 4 міс після ТГТ. У пірамі-

дальному шарі СА1-зони виявляли як поодинокі гіперхромні компактизовані некротичні тіла нейронів, так і морфологічно нормальні пірамідальні клітини з лінійною щільністю 87 [72; 98] мм⁻¹ (рис. 2,а). Розташування пірамідальних нейронів в один, і лише місцями в два ряди, хоч і нагадувало пірамідальний шар контрольних тварин, однак було досить хаотичним. Променистий шар візуалізувався значно чіткіше, ніж у тварин групи ПТ1, але порівняно з контрольними тваринами був істотно більш розрідженим. Характерну рівнобіжність апікальних дендритів спостерігали рідко, переважно їхні волокна розташовані під більшим чи меншим кутом одне до одного. Мікровакуолізована частина променистого шару менша, ніж у тварин групи ПТ1, і зміщена до лакунозно-молекулярного шару. Ширина чітко диференційованого променистого шару становила 390 мкм ± 59 мкм (результати отримано при морфометричному аналізі 31 поля зору). Суттєво меншою також була і мікрогліальна інфільтрація променистого та пірамідного шарів гіпокампа.

При аналізі зубчастої звивини у гранулярному шарі як зовнішнього, так і внутрішнього плечей спостерігали гіперхромні некротизовані тіла нейронів. Проте, якщо у зовнішньому плечі також виявляли і масивний перицелюлярний набряк навколо гранулярних клітин із компактизацією їхнього ядра, то у внутрішньому плечі більшість таких клітин мала незмінену морфологію. У пірамідальному шарі СА4-зони відмічали виражену дегенерацію при наявності лише поодиноких інтактних нейронів.

Група ПТ2, 3 міс після ТФНТ. Пірамідальний шар СА1-зони складався із чітко диференційованих одного-двох рядів нейронів з лінійною щільністю 132 [112; 154] мм⁻¹ (див. рис. 2,в). Некротизованих тіл нейронів не виявлено. У місці введення трансплантата спостерігали гліально-

рубцеві зміни, як описано для групи ПТ1. Власне зона введення капіляра мікроін'єктора не містила пірамідальних клітин, але вони розташовувалися навколо цієї зони. Променистий шар зберігав виражені ознаки розрідження та мікровакуолізації, ширина чітко диференційованого шару з характерною радіальною будовою становила $535 \text{ мкм} \pm 73 \text{ мкм}$ (70 полів зору). Мікрогліальна інфільтрація порівняно з групами ПІ1 і ПТ1 була значно меншою.

У зубчастій звивині спостерігали як збільшення кількості рядів гранулярного шару внутрішнього плеча, так і його спустошення. У воротах зубчастої звивини

виявляли незмінені пірамідальні клітини СА4-зони.

При вивченні зрізів гіпокампа, забарвлених поліклональними антитілами до ГФКБ, виявляли інтенсивну проліферацію астроцитів переважно у внутрішньому плечі зубчастої звивини з поширенням її в ділянку введення трансплантата.

Група ПІ3, 7 міс після ТПІ. Пірамідальні нейрони в СА1-зоні гіпокампа розташовані у 2–3 ряди з лінійною щільністю $134 [117; 154] \text{ мм}^{-1}$ (див. рис. 2,б). Нейропіль, зокрема в променистому шарі, містив достатньо обширні ділянки мікровакуолізації ближче до лакунозно-молекулярного

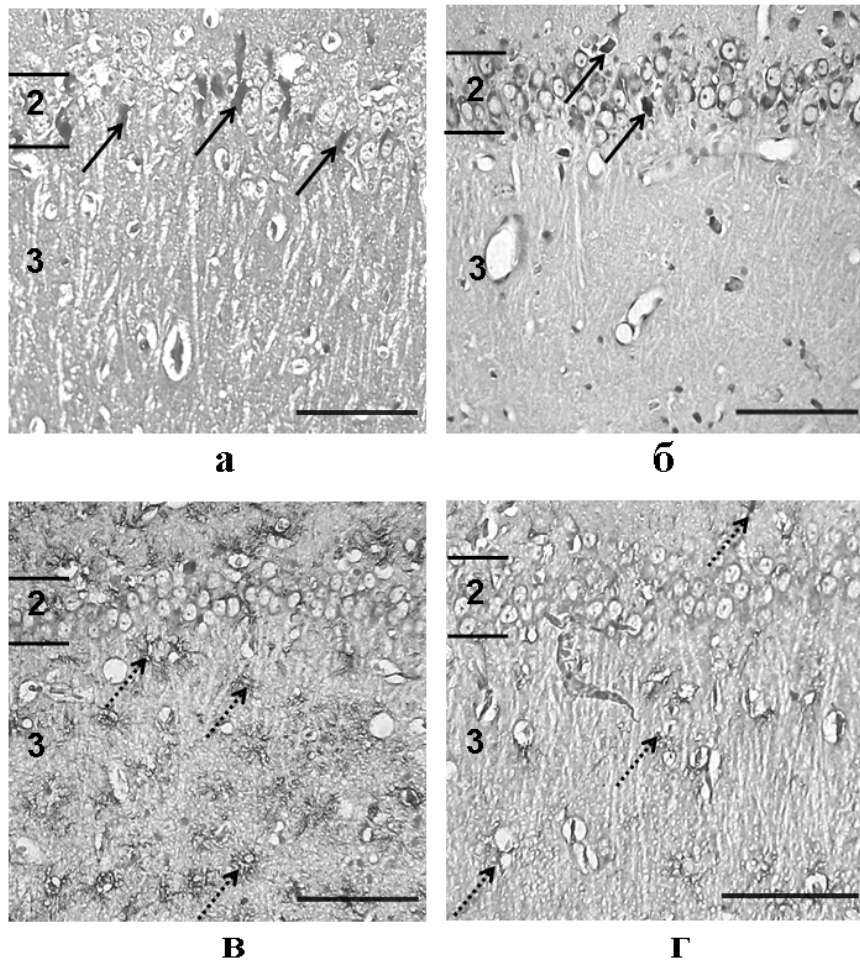


Рис. 2. СА1-зона гіпокампа: а, б – після ішемії (4 і 7 міс відповідно), в, г – після трансплантації (3 і 6 міс відповідно). 2 – пірамідальний шар, 3 – променистий шар. Стрілками вказані пошкоджені клітини. Пунктирними стрілками позначені ГФКБ-позитивні клітини. Шкала – 50 мкм

шару, однак структура променистого шару наближалася до нормальної. Ширина променистого шару становила $432 \text{ мкм} \pm 108 \text{ мкм}$ (60 полів зору). Мікрогліальна інфільтрація була невираженою. У будові зубчастої звивини та СА4-зони гіпокампа порівняно з контролем суттєвих особливостей не виявлено.

Група ПТ3, 6 міс після ТФНТ. Пірамідальний шар тварин після трансплантації містив нормальні нейрони з лінійною щільністю $150 [128; 168] \text{ мм}^{-1}$ (див. рис. 2,г). У ділянках введення трансплантата спостерігали розрідження пірамідального шару, яке повністю нівелювалося на відстані 60–70 мкм від точки трансплантації. Структура нейропіля променистого шару відповідала нормальній, зі збереженням рівнобіжності волокон, ширина його становила $582 \text{ мкм} \pm 130 \text{ мкм}$ (145 полів зору). Ділянки мікровакуолізації поодинокі, мікрогліальна інфільтрація незначна.

У зубчастій звивині більшості тварин відмічали дегенерацію гранулярного шару внутрішнього плеча при практично інтактних зовнішньому плечі та пірамідальному шарі СА4-зони.

Кількість ГФКБ-позитивних клітин порівняно з групою ПТ2 була меншою, однак також відмічались їх скупчення у дегенерованому плечі зубчастої звивини та

в зоні введення трансплантата.

Порівняльний аналіз. Отримані при морфометричному аналізі пірамідального шару СА1-зони гіпокампа ряди значень лінійної щільності у групах ПП1 і ПТ1 не задовольняли вимогам нормального розподілу. Тому для міжгрупового порівняння цих значень використовували непараметричний метод Манна–Уїтні. При попарному порівнянні відповідних груп після ішемії та після трансплантації (ПП1–ПТ1, ПП2–ПТ2 та ПП3–ПТ3) лінійна щільність пірамідальних клітин та ширина променистого шару були достовірно вищими у тварин після трансплантації (таблиця).

При порівнянні значень лінійної щільності пірамідальних клітин СА1-зони гіпокампа між групами після ішемії відмічали достовірне збільшення цього показника протягом усього часу спостереження. Так, лінійна щільність із значення 4 [3; 9] в групі ПП1 збільшувалася до 87 [72; 98] в групі ПП2 ($U = 1248, U_p = 624, P < 1 \cdot 10^{-9}$) і до 134 [117; 154] в групі ПП3 (порівняння ПП2–ПП3: $U = 52, U_p = 360, P = 1,24 \cdot 10^{-9}$). Аналогічно виявляли достовірне зростання лінійної щільності у групах тварин після трансплантації: із значення 23 [13; 49] в групі ПТ1 – до 132 [112; 154] у групі ПТ2 ($U = 206, U_p = 3960, P < 1 \cdot 10^{-9}$) і до 150 [128; 168] у групі ПТ3 (порівняння ПТ2–ПТ3: $U = 3315, U_p =$

Результати міжгрупового попарного порівняння значень лінійної щільності пірамідальних клітин та ширини променистого шару СА1-зони гіпокампа у щурів

Групи тварин	Лінійна щільність, мм^{-1}	Порівняння лінійної щільності, U-критерій Манна–Уїтні	Ширина променистого шару, мкм	Порівняння ширини променистого шару, критерій t Стьюдента
Контроль	198 [182; 208]		682±36	
ПП1	4 [3; 9]	$U = 619$		
ПТ1	23 [13; 49]	$U_p = 2860$ $P < 1 \cdot 10^{-9}$	не проводили	не проводили
ПП2	87 [72; 98]	$U = 235,$	390±59	$t = -9,75, t_{\text{крит.}} = 1,66$
ПТ2	132 [112; 154]	$U_p = 864$ $P = 4,9 \cdot 10^{-9}$	535±73	$P < 1 \cdot 10^{-9}$
ПП3	134 [117; 154]	$U = 1414$	432±108	$t = -7,88, t_{\text{крит.}} = 1,65$
ПТ3	150 [128; 168]	$U_p = 1920$ $P = 0,012$	582±130	$P < 1 \cdot 10^{-9}$

4608, $P = 5,01 \cdot 10^{-4}$). Однак навіть через 7 міс після ішемії та через 6 міс після ТФНТ значення лінійної щільності були достовірно нижчими, ніж у контрольної групи (198 [1182; 208]): ПІЗ – контроль – $U = 210$, $U_p = 105$, $P = 9,71 \cdot 10^{-8}$; ПТЗ – контроль – $U = 836$, $U_p = 448$, $P = 3,46 \cdot 10^{-6}$.

Також спостерігали достовірне збільшення ширини променистого шару у тих тварин після ТГІ, де його вимірювання було можливим. Значення цієї ширини з 390 мкм \pm 59 мкм у групі ПІ2 зростало до 432 мкм \pm 108 мкм у групі ПІЗ ($t = -1,99$, $t_{\text{крит}} = 1,66$, $p = 2,47 \cdot 10^{-2}$). У тварин після ТФНТ збільшувалося значення з 535 мкм \pm 73 мкм у групі ПТ2 до 582 мкм \pm 130 мкм у групі ПТЗ ($t = -2,82$, $t_{\text{крит}} = 1,65$, $p = 2,62 \cdot 10^{-3}$). Але в групах ПІЗ та ПТЗ вони були достовірно нижчими, ніж у контрольній (682 мкм \pm 36 мкм): ПІЗ – контроль – $t = -15,17$, $t_{\text{крит}} = 1,66$, $P < 1 \cdot 10^{-9}$; ПТЗ – контроль – $t = -5,24$, $t_{\text{крит}} = 1,65$, $P = 2,18 \cdot 10^{-7}$.

У багатьох експериментальних роботах показано, що ішемічне ураження гіпокампа призводить до повного спустошення пірамідального шару СА1-зони внаслідок фагоцитозу загинувших нейронів гліальними клітинами, що особливо чітко виражено впродовж перших 30 діб [2, 12, 18]. Проведене у нашій роботі дослідження цитоархітекτονіки гіпокампа щурів підтверджує ці результати і засвідчує, що чотирисудинна оклюзія у щурів призводить до значних порушень у різних зонах гіпокампа, які у дорослих тварин проявляються протягом тривалого часу. Через 2 міс після оклюзії спостерігали виражену дегенерацію пірамідальних клітин зон СА1 і СА4, гомогенізацію та вакуолізацію променистого шару СА1-зони. Відомо, що пірамідальні клітини зон СА3, СА4 та гранулярні клітини зубчастої звивини гіпокампа значно стійкіші до гіпоксично-ішемічного ураження, ніж пірамідальні клітини зони СА1 [14, 17, 18]. Тому, ймовірно, виявлена дегенерація в СА4-зоні відбувається у пізніші строки, ніж

загибель пірамідальних клітин СА1-зони, і не пов'язана безпосередньо з ішемією. Враховуючи відсутність подібних змін у тварин після ТФНТ, дегенерація СА4-зони, можливо, відбувається протягом 2-го місяця після ішемії.

Оцінка у більш віддалені строки свідчить про поступове спонтанне відновлення структури цих шарів гіпокампа, однак і через 7 міс такі показники, як лінійна щільність клітин у пірамідальному шарі чи ширина променистого шару не сягають рівня контролю.

Уведення суспензії клітин фетальної нервової тканини за допомогою двобічної стереотаксичної трансплантації в СА1-зону гіпокампа щурів, що перенесли ТГІ головного мозку, мало позитивний вплив на відновлення морфології ураженого гіпокампа. Через 1 міс після ТФНТ виявлено перші ознаки відновлення у вигляді клітин з нормальною структурою у пірамідальному шарі та осередків нормальної будови променистого шару. Відсутність дегенерації пірамідальних клітин СА4-зони у тварин після трансплантації свідчить про нейропротекторний ефект ТФНТ. Надалі, протягом щонайменше 6 міс, під впливом трансплантації спостерігається достовірно динамічніше зростання показників лінійної щільності і ширини променистого шару в СА1-зоні гіпокампа.

Відомо, що в період ембріогенезу пірамідальні клітини СА1-зони диференціюються на 18–19-ту добу ембріонального розвитку (E18–E19), тоді як диференціація гранулярних клітин зубчастої звивини починається на E20–E21, а закінчується після народження [4]. Показано, що саме гомотопічна ТФНТ, яка містить СА1-пірамідальні клітини, позитивно впливає на перебіг розладів оперативної пам'яті, спричинених ішемією гіпокампа [12], і що нейрони реципієнта здатні реіннервувати трансплантовані фетальні пірамідальні клітини [11]. Також було встановлено, що

субгранулярна зона зубчастої звивини ссавців навіть у дорослому віці містить нервові стовбурові клітини і є осередком нейрогенезу [24]. Окрім того, гіпокампальні нервові стовбурові клітини щурів здатні диференціюватися в умовах відповідного мікрооточення у функціональні нейрони як *in vitro*, так і *in vivo* [23].

Отримані нами результати дають змогу припустити, що вплив ТФНТ на ішемізований гіпокамп може ґрунтуватися на кількох механізмах. По-перше, може іти безпосереднє заміщення загиблених пірамідальних нейронів у СА1-зоні гіпокампа із подальшим відновленням цитоархітектоніки ураженої зони. По-друге, може відбуватися міграція та диференціація трансплантованих нервових стовбурових/прогеніторних клітин у функціональні нейрони та вбудовування їх у нейрональні ланцюги гіпокампа. Використаний у цій роботі спосіб виділення СА1-зони з фетального мозку не давав змоги відділити її від зародкової зубчастої звивини. Тому існує досить висока ймовірність того, що трансплантована суспензія фетальної нервової тканини містила як пірамідальні клітини СА1-зони, так і нервові стовбурові/прогеніторні клітини зубчастої звивини. І, по-третє, можлива стимуляція власного нейрогенезу у субгранулярній зоні гіпокампа під впливом факторів росту, які у високих концентраціях містить фетальна нервова тканина. На користь цього свідчать характерні зміни у вигляді гіперпроліферації гранулярного шару зубчастої звивини. Через 2 міс після ішемії ці зміни спостерігались у тварин як після ТГІ, так і після ТФНТ з деяким переважанням у останніх проліферативного компонента. Наші результати збігаються з даними інших авторів про стимулювальний вплив транзитornoї ішемії на нейрогенез у зубчастій звивині піщанок та приматів [13, 30]. Однак через 4 міс після ішемії ознаки стимуляції нейрогенезу явно переважали у тварин після трансплантації, що дає змогу

припускати тривалу його потенціацію під впливом ТФНТ.

Відомо, що клітини субгранулярної зони гіпокампа, здатні до проліферації та диференціювання у нейрони, експресують ГФКБ [21]. Виявлене у тварин після ТФНТ збільшення кількості ГФКБ-позитивних клітин переважно у внутрішньому плечі зубчастої звивини може свідчити як про інтенсивну проліферацію астроцитів реципієнта, так і про міграцію у цю зону трансплантованих клітин. Таким чином, донорські клітини, як і субгранулярні астроцити реципієнта можуть відновлювати популяцію нейронів внаслідок утворення нових нейронів із клітин-прогеніторів, а також активувати синаптогенез і нейрогенез продукуванням факторів росту та цитокінів. Відновлення характерної структури гіпокампа в постішемичному періоді може створювати сприятливі умови для нормальної функціональної активності його ланцюгів, а, отже, і сприяти відновленню втрачених функцій.

Таким чином, транзитorna глобальна ішемія головного мозку дорослих щурів, викликана 4-судинною оклюзією, спричиняє практично тотальну загибель пірамідальних клітин СА1-зони гіпокампа та викликає гіперпроліферацію у гранулярному шарі зубчастої звивини. Такі зміни чітко проявляються через 2 міс після ішемії. Надалі спостерігається спонтанне поступове відновлення структури СА1-зони та нормалізація стану зубчастої звивини. Проте і через 7 міс після ішемії лінійна щільність клітин у пірамідальному шарі та ширина променистого шару не сягають контрольних значень.

Пізня, через 30 діб після ішемії, трансплантація суспензії фетальної нервової тканини, що містить клітини СА1-зони та зародкової зубчастої звивини, спричиняє тривале стимулювання репаративних процесів у гіпокампі та прискорює відновлення його цитоархітектоніки.

А.В. Гарашук, О.М. Цупиков, В.И. Цымбалюк

**ВЛИЯНИЕ ПОЗДНЕЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
ФЕТАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ НА
ЦИТОАРХИТЕКТониКУ ГИППОКАМПА В
ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ
ТРАНЗИТОРНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**

Исследовано влияние трансплантации фетальной нервной ткани (ФНТ) на восстановление структуры гиппокампа ишемизированных крыс. Транзиторную глобальную ишемию (ТГИ) головного мозга крыс возрастом 13,2 мес ± 2,4 мес вызывали путем 20-минутной 4-сосудистой окклюзии. Суспензию ФНТ получали из СА1-зоны и зачаточной зубчатой извилины гиппокампов плодов крыс 18–19-х суток эмбрионального развития. ФНТ трансплантировали стереотаксически в СА1-зону гиппокампа животных через 30 сут после ТГИ. Линейную плотность пирамидальных клеток, ширину лучистого слоя СА1-зоны, морфологию зубчатой извилины и СА4-зоны изучали на светооптическом уровне в срезах гиппокампов через 2, 4 и 7 мес после ТГИ и через 1, 3 и 6 мес после трансплантации ФНТ. Установлено, что поздняя трансплантация ФНТ достоверно ускоряет восстановление цитоархитектоники гиппокампа в течение продолжительного периода после ТГИ головного мозга крыс.

Ключевые слова: фетальная нервная ткань, глобальная ишемия головного мозга, стереотаксическая трансплантация, гиппокамп.

**O.V. Garashchuk, O.M. Tsupikov,
V.I. Tsymbaliuk**

**LONG-TERM EFFECT OF FETAL NEURAL
TISSUE LATE GRAFTING ON HIPPOCAMPUS
CYTOARCHITECTURE AFTER TRANSIENT
GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS**

The effect of fetal neural tissue (FNT) grafting on regeneration of hippocampus structure has been investigated in postischemic rats. Transient global cerebral ischemia was induced by 20-min four-vessel occlusion in 13.2±2.4-month-old rats. FNT suspension was prepared from hippocampal CA1 area and primordial dentate gyrus of E18-E19 rat fetuses. 30 days after TGI, FNT was stereotactically transplanted into CA1 area of ischemic animals. Linear density of CA1 pyramidal neurons, stratum radiatum width, CA4 and dentate gyrus morphology were studied in hippocampal slices by light microscopy 2, 4 and 7 months after TGI and 1, 3 and 6 months after FNT grafting. It has been shown, that late FNT grafting provides significant and prolonged potentiation of a hippocampal cytoarchitecture recovery after TGI in rats.

Key words: fetal neural tissue, forebrain global ischemia, stereotaxic grafting, hippocampus.

O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv;

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коваль И.Н., Саркисов Г.Т., Гамбарян Л.С. Септо-гиппокампальная система и организация поведения. – Ереван: Изд-во АН АрмССР, 1986. – 127 с.
2. Скибо Г.Г., Коваленко Т.М., Осадченко І.О., Цупиков О.М., Півнева Т.А. Структурні зміни в гіпокампі при експериментальній ішемії мозку // Укр. неврол. журн. – 2006. – №1. – С. 86–92.
3. Цупиков О.М., Півнева Т.А., Поддубна А.О., Кирик В.М., Кучук О.В., Бутенко Г.М., Скибо Г.Г. Міграція та диференціація трансплантованих фетальних нейрогенних клітин у мозку ішемізованих тварин // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №4. – С. 41–49.
4. Bayer S.A. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography // J. Comp. Neurol. – 1980. – 190, №1. – P. 87–114.
5. Bird C.M., Burgess N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing // Nat. Rev. Neurosci. – 2008. – 9, №3. – P. 182–194.
6. Bjurklund A., Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders // Nat. Neurosci. – 2000. – 3, №6. – P. 537–544.
7. Blackstad T.W. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination // J. Comp. Neurol. – 1956. – 105, №3. – P. 417–537.
8. Braak H., Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. Suppl. – 1998. – 53, №1. – P. 127–140.
9. Caronna J.J., Finklestein S. Neurological syndromes after cardiac arrest // Stroke. – 1978. – №9. – P. 517–520.
10. Englund U., Bjorklund A., Wictorin K., Lindvall O., Kokaia M. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – 99, №26. – P. 17089–17094.
11. Field P.M., Seeley P.J., Frotscher M., Raisman G. Selective innervation of embryonic hippocampal transplants by adult host dentate granule cell axons // Neuroscience. – 1991. – 41, №2-3. – P. 713–727.
12. Hodges H., Sowinski P., Fleming P., Kershaw T.R., Sinden J.D., Meldrum B.S., Gray J.A. Contrasting effects of fetal CA1 and CA3 hippocampal grafts on deficits in spatial learning and working memory induced by global cerebral ischaemia in rats // Neuroscience. – 1996. – 72, №4. – P. 959–988.
13. Liu J., Solway K., Messing R.O., Sharp F.R. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils // J. Neurosci. – 1998. – 18, №19. – P. 7768–7778.
14. Nitatori T., Sato N., Waguri S., Karasawa Y., Araki H., Shibana K., Kominami E., Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis // J. Neurosci. – 1995. – 15, №2. – P. 1001–1011.

15. Olstorn H., Moe M.C., Ruiste G.K., Bueters T., Langmoen I.A.. Transplantation of stem cells from the adult human brain to the adult rat brain // *Neurosurgery*. – 2007. – **60**, №6. – P. 1089–1098.
16. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. – New York: Acad. Press, 1982. – 155 p.
17. Pulsinelli W.A., Brierley J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat // *Stroke*. – 1979. – **10**, №3. – P. 267–272.
18. Pulsinelli W.A., Brierley J.B., Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia // *Ann. Neurol.* – 1982. – **11**, №5. – P. 491–498.
19. Schwerdtfeger W. K. Structure and fiber connections of the hippocampus, a comparative study. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, vol. 83. – Berlin, New York: Springer-Verlag, 1984. – 75 p.
20. Scoville W.B., Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. – 1957. – №20. – P. 11–21.
21. Seri B., Garcha-Verdugo J.M., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus // *J. Neurosci.* – 2001. – **21**, №18. – P. 7153–7160.
22. Shetty A.K., Zaman V., Hattiangady B. Repair of the injured adult hippocampus through graft-mediated modulation of the plasticity of the dentate gyrus in a rat model of temporal lobe epilepsy // *Ibid.* – 2005. – **25**, №37. – P. 8391–8401.
23. Song H.J., Stevens C.F., Gage F.H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons // *Nat Neurosci.* – 2002. – **5**, №5. – P. 438–445.
24. Taupin P., Gage F.H. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals // *J. Neurosci. Res.* – 2002. – **69**, №6. – P. 745–749.
25. Turner D.A., Shetty A.K. Clinical prospects for neural grafting therapy for hippocampal lesions and epilepsy // *Neurosurgery*. – 2003. – **52**, №3. – P. 632–644.
26. van Strien N.M., Cappaert N.L., Witter M.P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – **10**, №4. – P. 272–282.
27. Virley D., Ridley R.M., Sinden J.D., Kershaw T.R., Harland S., Rashid T., French S., Sowinski P., Gray J.A., Lantos P.L., Hodges H. Primary CA1 and conditionally immortal MHP36 cell grafts restore conditional discrimination learning and recall in marmosets after excitotoxic lesions of the hippocampal CA1 field // *Brain*. – 1999. – **122**, №12. – P. 2321–2335.
28. Volpe B.T., Pulsinelli W.A., Tribuna J., Davis H.P. Behavioral performance of rats following transient forebrain ischemia // *Stroke*. – 1984. – **15**, №3. – P. 558–562.
29. Wagner A.P., Schmoll H., Badan I., Platt D., Kessler C. Brain plasticity: to what extent do aged animals retain the capacity to coordinate gene activity in response to acute challenges // *Exp. Gerontol.* – 2000. – **35**, №9–10. – P. 1211–1227.
30. Yamashima T., Tonchev A.B., Borlongan C.V. Differential response to ischemia in adjacent hippocampal sectors: neuronal death in CA1 versus neurogenesis in dentate gyrus // *Biotechnol. J.* – 2007. – **2**, №5. – P. 596–607.

*Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця, Київ;
Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
E-mail: Omy@bigmir.net*

*Матеріал надійшов до
редакції 20.11.2009*

Н.М. Гуріна, О.В. Корпачева-Зінич, А.А. Шупрович

Взаємозв'язки показників обміну сечової кислоти і вмісту інсуліну та тестостерону в чоловіків, хворих на цукровий діабет 2-го типу

Обстежено 95 чоловіків віком від 45 до 65 років, хворих на цукровий діабет (ЦД) 2-го типу з ознаками інсулінорезистентного синдрому (ІРС). У 37 % з них виявлено гіпоандрогенію (концентрація тестостерону менша ніж 10,4 нмоль/л), гіперурикемію (ГУ) – лише у 34 % випадків. Водночас у 70 % обстежених відзначено гіперпродукцію сечової кислоти (СК), що проявляється у збільшенні її добової екскреції порівняно з фізіологічною нормою. Оскільки рівень урикемії визначається співвідношенням процесів продукції та ниркової екскреції СК, нами виділено 2 основні типи порушення її обміну: нормоурикемічний гіперурикозуричний і гіперурикемічний. У чоловіків з нормоурикемією екскреція СК зростає паралельно зі збільшенням швидкості клубочкової фільтрації, а також збільшенням ступеня ожиріння, інсулінорезистентності, глікемії. Висока екскреція СК, яка підтримує її рівень в крові у межах фізіологічної норми, зумовлюється зниженням реабсорбції СК у ниркових каналцях, про що свідчить підвищення індексу елімінації уратів. Виявлені взаємозв'язки вказують на вплив інсуліну та тестостерону на процеси продукції, елімінації та реутилізації уратів у чоловіків з ЦД 2-го типу і ІРС.

Ключові слова: сечова кислота, обмін, діабет 2-го типу, інсулінорезистентний синдром, інсулін, тестостерон, чоловіки.

ВСТУП

У сучасній літературі традиційно приділяється багато уваги таким проявам інсулінорезистентного синдрому (ІРС), як порушення ліпідного, вуглеводного, енергетичного обміну, що сприяє розвитку серцево-судинних захворювань і цукрового діабету (ЦД). Але останнім часом накопичено дані, які свідчать про патогенетичну роль гіперурикемії (ГУ) у розвитку інсулінорезистентності, посиленні оксидативного стресу, порушенні функції ендотелію судин, стимуляції симпатичної нервової системи. Показано, що навіть помірно підвищена концентрація сечової кислоти (СК) зумовлює збільшення ризику гіпертензії, ЦД 2-го типу, фатальних серцево-судинних подій. Крім того, внаслідок поганої розчинності СК випадає у вигляді кристалів у різних

© Н.М. Гуріна, О.В. Корпачева-Зінич, А.А. Шупрович

органах, порушуючи мікроциркуляцію та викликаючи реактивне запалення в суглобах і в нирках [1, 3, 12, 20]. Продемонстровано асоціацію ГУ з високим ренальним і загальним судинним опором, що пов'язано з порушенням ендотеліальної продукції та біодоступності NO, а також зі впливом на ренін-ангіотензинову систему [30]. Всі ці дані обґрунтовують новітню концепцію про можливість патогенетичної ролі СК у розвитку ІРС [22].

Відомо що, прояви ІРС особливо розповсюджені серед людей старшої вікової групи, що пов'язують зі змінами балансу статевих гормонів. У чоловіків концентрація загального тестостерону прогресивно знижується, тоді як концентрація естрадіолу підвищується через ароматизацію тестостерону в естрадіол у жировій тканині.

Зниження вмісту біодоступного гормону зумовлюється також підвищенням концентрації тестостеронестрадіол-зв'язувального глобуліну [17, 23]. Паралельно до зниження вмісту андрогенів у чоловіків зростає кількість абдомінального (вісцерального) жиру. Відомо, що дефіцит тестостерону – сильний стимулятор росту вісцеральних адипоцитів, висока метаболічна активність яких сприяє посиленому розпаду тригліцеридів з утворенням вільних жирних кислот, які викликають інсуліно-резистентність гепатоцитів [2, 3, 12, 16]. У відповідь на це розвивається компенсаторна гіперінсулінемія, яка може призводити до розвитку гіперурикемії та гіпертензії, збільшуючи реабсорбцію СК і натрію в ниркових канальцях [25]. На початкових стадіях ЦД 2-го типу поширеним явищем є ниркова гіперфільтрація, яка супроводжується гіперурикозурією. При цьому вміст СК у крові може бути в межах норми або знижуватися, навіть до гіпоурикемії. Вважають, що посилена екскреція СК створює умови для пошкодження нирок уратами, а це знижує ниркову фільтрацію, і надалі розвивається гіперурикемія [1, 7]. Наявність ожиріння, особливо абдомінального типу, асоціюється з дисліпідемією, що значно підсилює інсулінорезистентність і продукцію СК, одночасно будучи чинником ризику розвитку гіперурикемії, гломерулосклерозу та серцево-судинних захворювань у осіб з ІРС і ЦД [1, 10–13, 28].

Природним наслідком пригнічення дії тестостерону та зниження відповіді тканин на інсуліновий сигнал в умовах інсулінорезистентності є зменшення інтенсивності анаболізму та посилення катаболічних процесів, зокрема збільшення розпаду пуринів, кінцевим продуктом якого є СК. Катаболічними компонентами субстратних циклів, котрі регулюють внутрішньоклітинний пул нуклеотидів, є ксантинооксидаза, яка окиснює ксантин і гіпоксантин до СК, а також 5'-нуклеотидази та аденозиндеза-

мінази. Діяльність цих ферментів супроводжується утворенням вільних радикалів, які є відомим чинником оксидативного стресу при ЦД.

Доведено, що на метаболізм пуринових нуклеотидів впливають статеві гормони. Показано, що кастрація самців щурів зменшує синтез нуклеотидів, а введення тестостерону відновлює ці показники [24, 29]. Levinson та співавт. виявили, що активність ксантинооксидази (ферменту, під дією якого утворюється СК) у дорослих самців щурів на 59 % вища, ніж у самиць. Досліди з кастрацією тварин та введенням статевих гормонів свідчать, що андрогени необхідні для повної експресії печінкової ксантинооксидази, а також засвідчують супресивну дію оваріальних гормонів на ксантинооксидазну активність.

Показано, що тестостерон посилює експресію таких мембранних транспортерів СК, як урат-транспортер 1 та транспортери органічних аніонів у нирках та в інших тканинах мишей і щурів, що може бути причиною більшої ниркової реабсорбції СК і вищого рівня урикемії у самців порівняно з самицями. Статєва різниця вмісту СК визначається протилежною дією андрогенів, які стимулюють експресію генів уратних транспортерів, та естрогенів, які гальмують цей процес [19, 27].

Таким чином, інсулінорезистентність, що розвивається на тлі андрогенного дефіциту та абдомінального ожиріння, сприяє посиленню пуринового обміну: з одного боку, зниженню реутилізації пуринів і збільшенню їх розпаду з утворенням СК, з іншого – активізації біосинтезу пуринів *de novo*, що компенсує втрату необхідних організму мононуклеотидів.

Метою нашої роботи є вивчення взаємозв'язків показників пуринового обміну (продукції та екскреції СК) зі вмістом андрогенів і детермінантами ІРС (інсулінорезистентністю, інсулінемією, ступенем ожиріння й абдомінального розподілу жиру)

у чоловіків з ЦД 2-го типу у період зниження андрогенної функції.

МЕТОДИКА

Обстежено 95 чоловіків віком від 45 до 65 років, що хворіють на ЦД 2-го типу від 1 міс до 20 років. У хворих визначали такі показники: індекс маси тіла (ІМТ), відношення об'ємів талії та стегон (ОТ/ОС), артеріальний тиск, глікемію натще і через 2 год після їжі. Концентрації тестостерону та імунореактивного інсуліну в сироватці крові натще визначали за допомогою наборів RIA "Immunotech" (Чехія). Розраховували індекс інсулінорезистентності НОМА-IR (від англ. homeostasis model assessment – insulin resistance) [21]. У сироватці крові та добовій сечі хворих визначали концентрацію СК (фосфорно-вольфрамовим методом) і креатиніну (підкратним методом) за допомогою наборів «Філісіт-Діагностика» (Дніпропетровськ, Україна). За цими результатами обчислювали добову екскрецію та кліренс СК і креатиніну.

Індекс елімінації уратів (ІЕУ) розраховували як відношення кліренсів СК і креатиніну та виражали у відсотках. Ця величина характеризує ступінь реабсорбції СК відносно креатиніну; в нормі вона становить 8,3 %, при подагрі знижується до 6,4 % [9]. Активність ферменту реутилізації пуринів гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферази (ГГФРТ) оцінювали за відношенням концентрацій СК і креатиніну в сечі, яке у нормі становить від 0,19 до 0,50 ммоль СК на 1 ммоль креатиніну; значення більше ніж 0,51 можна розглядати як дефіцит активності ГГФРТ [9, 14].

Критерієм для оцінки рівнів урикемії та екскреції СК у хворих були прийняті норми для чоловіків. Нормоурікемію констатували при концентрації СК у сироватці крові (СК_c) у межах від 260 до 450 мкмоль/л, гіперурікемію – при СК_c більше ніж 450

мкмоль/л, гіпоурікемію – при СК_c менше ніж 260 мкмоль/л. Нормальні значення добової екскреції СК становлять 1,18–4,43 ммоль/добу, кліренсу СК 5–7 мл/хв, креатиніну в сироватці крові 80–115 мкмоль/л кліренсу креатиніну 70–200 мл/хв [8, 9]. Наявність і тип ожиріння визначали відповідно до критеріїв ВООЗ для метаболічного синдрому: при ІМТ більше ніж 30 кг/м² відзначали загальне ожиріння; при ІМТ < 30 кг/м² – вважали, що хворі не мають ожиріння; відношення об'єму талії та стегон (ОТ/ОС) більше ніж 0,95 – критерій встановлення ожиріння абдомінального типу [26].

Обстежених з ЦД 2-го типу було розподілено на 3 групи залежно від типу обміну СК: 1-ша група (контроль) – нормоурікемія з екскрецією СК у межах норми (n=15); 2-га група – хворі з нормо- та гіпоурікемією та підвищеною екскрецією СК (n=47); 3-тя група – пацієнти з гіперурікемією (n=33). Між пацієнтами кожної з груп немає достовірної різниці за віком, тривалістю захворювання на ЦД, систолічним і діастолічним артеріальним тиском, рівнями глікемії натще та через 2 год після їжі. Це полегшує порівняння показників обміну СК, забезпеченості інсуліном і статевими гормонами для з'ясування причин його порушення.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента. Різницю показників і коефіцієнти кореляції вважали достовірними при P < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз індивідуальних показників у чоловіків з ЦД 2-го типу виявив надлишок маси тіла в 70 % хворих, при цьому абдомінальний тип розподілу жиру виявлено у 98 % усіх пацієнтів. У 67 % хворих зафіксовано стан інсулінорезистентності, тобто індекс НОМА-IR більше ніж 2,6, що вказує на порушення чутливості до інсуліну периферичних тканин, насамперед печінки [28].

Гіперінсулінемію (концентрація імунореактивного інсуліна більша ніж 22 мкОд/мл) не виявлено в жодного з пацієнтів. Підвищений артеріальний тиск (більший ніж 140/90 мм рт. ст.) зафіксовано у 50 % хворих. Таким чином, обстежені мають класичні ознаки ІРС, серед яких порушення вуглеводного обміну (ЦД 2-го типу), інсуліно-резистентність, артеріальна гіпертензія, загальне та абдомінальне ожиріння. До цього комплексу симптомів останнім часом долучають також гіпоандрогенію (концентрація тестостерону в сироватці крові менша ніж 10,41 нмоль/л, виявлена нами у 35 обстежених чоловіків, що становить 36,8 %), а також гіперурикемію, яку відзначено в 33,7 % обстежених (32 особи). Нормоурикемію встановлено в 53,7 % (51 особа), гіпоурикемію – в 12,6 % (12 осіб). Між хворими з гіпоурикемією і з нормоурикемією, за винятком рівнів урикемії та кліренсу СК, не виявлено достовірних відмінностей екскреції СК, інсулінемії, НОМА-ІР, глікемії, вмісту загального тестостерону ($P > 0,05$). При цьому для більшості з них характерні високі значення швидкості ниркової фільтрації (кліренс креатиніну більше ніж 137 мл/хв виявлено у 35 з 47 осіб). Це дало підстави об'єднати пацієнтів з нормо- і гіпоурикемією в одну групу як осіб з різним ступенем ниркової гіперфільтрації (2-га група), у яких нормальні або підвищені рівні ниркової фільтрації не забезпечують виведення надлишку СК з організму. У пацієнтів з гіперурикемією (3-тя група) частіше спостерігається зниження ниркової фільтрації (кліренс креатиніну менше ніж 93 мл/хв виявлено у 12 пацієнтів).

Добова екскреція СК з сечею, яка відображає продукцію СК в організмі, перевищувала верхню межу добової норми (4,43 ммоль/добу) у 74 % усіх пацієнтів, що рекомендують розглядати як ознаку гіперпродукції СК [9, 10]. Таким чином, у більшості чоловіків з ЦД 2-го типу пору-

шений пуриновий обмін, що проявляється у вигляді гіперпродукції СК.

Особливо виразне збільшення як добової екскреції, так і кліренсу СК спостерігається в чоловіків 2-ї групи: (8,96±0,52) ммоль/добу та (26,61±1,42) мл/хв порівняно з (3,62±0,18) ммоль/добу та (7,87±0,58) мл/хв у контролі відповідно ($P < 0,05$), тобто нормо- або гіпоурикемія на тлі підвищеної продукції СК у цих хворих підтримується внаслідок посиленого виведення СК, поєднаного з нирковою гіперфільтрацією (кліренс креатиніну 198,65 мл/хв ± 11,27 мл/хв). Це підтверджується наявністю прямого кореляційного зв'язку показників екскреції і кліренсу СК з кліренсом креатиніну ($r = 0,66; 0,37$, відповідно, $P < 0,05$). Підвищене значення ІЕУ (13,71±0,87 порівняно з 9,95 % ± 0,81 % у контролі, $P < 0,05$) вказує на зменшення реабсорбції СК (таблиця). Той факт, що в цій групі чоловіків, як і в контрольній, існує значуща зворотна кореляція СК з кліренсом СК ($r = -0,32$ та $-0,67$ відповідно, $P < 0,05$), свідчить про збереження ниркового механізму регуляції швидкості екскреції СК залежно від її концентрації в крові.

Посилення продукції СК у групі чоловіків з нормоурикемією може бути пов'язано зі стимуляцією інсуліном процесів синтезу *de novo* глюкози, тригліцеридів, пуринів, (що, як відомо, відбувається при ЦД 2-го типу) або з наявністю загального та абдомінального ожиріння, що розвивається на тлі інсулінорезистентності. На це вказують достовірні кореляційні зв'язки між показником добової екскреції СК та ІРІ /НОМА-ІР ($r = 0,25; 0,31$, $P < 0,05$); останні, в свою чергу, корелюють зі значеннями ІМТ та ОТ/ОС ($r = 0,31-0,38$, $P < 0,05$).

При гіперурикемії (3-тя група) також відзначена гіперпродукція СК (добова екскреція СК 6,75 ± 0,63 порівняно 3,62 ммоль/добу ± 0,18 ммоль/добу в контрольній групі, $P < 0,05$), проте кліренс СК суттєво знижений до (8,96±0,87) мл/хв

порівняно з (26,61±1,42) мл/хв у 2-й групі, P<0,05). Зберігається кореляція між показниками екскреції/кліренсу СК і швидкості клубочкової фільтрації (r= 0,63; 0,53, P<0,05), але немає значущої кореляції між рівнем урикемії та кліренсом СК, яка спостерігалась у попередній групі хворих, тобто у групі чоловіків з гіперурикемією можна спостерігати порушення регуляторного механізму, який забезпечує зростання елімінації уратів за умов високих концентрацій СК у крові.

Відзначене збільшення продукції СК у 2-й та 3-й групах хворих супроводжується достовірним підвищенням інсулінемії та інсулінорезистентності порівняно з контрольною групою (P<0,05). Це може свідчити про стимуляцію інсуліном утворення СК за умов інсулінорезистентності. При цьому у пацієнтів з нормоурикемією вищі, ніж у контролі, концентрації інсуліну (11,41 мкОд/мл ± 0,76 мкОд/мл), очевидно, не призводять до посилення реабсорбції СК у ниркових каналцях. На зниження реабсорбції СК вказує високе значення ІЕУ (13,71±0,87 порівняно з 9,95 % ± 0,81 % у контролі, P<0,05). У цій групі спостерігається також тенденція до підвищення показника ГГФРТ, що вказує на зниження

активності реутилізації уратів та може спричиняти посилення процесів утворення пуринів. Крім того, у хворих з нормоурикемією не виявлено кореляцій між інсулінемією та показниками ІЕУ, ГГФРТ (r = 0,09; -0,21, P>0,05).

У пацієнтів з гіперурикемією загальна ниркова фільтрація знижена та одночасно підвищений у порівнянні з контролем вміст інсуліну (13,01 мкОд/мл ± 1,00 мкОд/мл), збільшена продукція та реабсорбція СК (ІЕУ у 3-й групі становить 8,24±0,62, порівняно з 13,71 % ± 0,87 % у 2-й групі, P<0,05). Оскільки є невисока, але достовірна зворотна кореляція між вмістом інсуліну та показниками ГГФРТ, ІЕУ (r = -0,29; -0,31, P<0,05), можна припустити, що особливістю хворих на ЦД 2-го типу, в яких розвивається гіперурикемія, є прояв антиурикозуричної дії інсуліну. Також існує можливість негативної регуляції інсуліном синтезу білків ферментів ГГФРТ, або ж впливу на експресію ключових ферментів каскаду синтезу пуринів *de novo* (наприклад, фосфорибозилпірофосфатсинтетази) [14].

Вміст загального тестостерону у всіх обстежених не проявляє достовірної різниці між собою. Можна відзначити більшу

Показники обміну сечової кислоти, вміст інсуліну та тестостерону в сироватці крові чоловіків, хворих на цукровий діабет 2 типу, з різним типом обміну сечової кислоти

Показники	Контроль (1-ша група, n=15)	Нормо- і гіпоурикемія (2-га група, n=47)	Гіперурикемія (3-тя група, n=33)
Інсулін, мкОд/мл	6,74±1,00	11,41±0,76 *	13,01±1,00 *
Індекс інсулінорезистентності НОМА-IR	2,77±0,59	4,45±0,37 *	4,72±0,45 *
Тестостерон, нмоль/л	11,50±0,87	13,09±1,28	11,76±0,88
Сечова кислота сироватки крові, мкмоль/л	327,47±13,07	337,33±12,84	529,84±11,22 *, **
Креатинін сироватки крові, мкмоль/л	104,00±3,13	94,04±2,31 *	113,28±3,54 *, **
Добова екскреція сечової кислоти, ммоль	3,62±0,18	8,96±0,52 *	6,75±0,63 *, **
Кліренс сечової кислоти, мл/хв	7,87±0,58	26,61±1,42 *	8,96±0,87 **
Кліренс креатиніну, мл/хв	89,89±8,77	198,65±11,27 *	136,93±13,80*, **
Активність гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферази	0,32±0,02	0,37±0,02	0,33±0,02
Індекс елімінації уратів, %	9,95±0,81	13,71±0,87 *	8,24±0,62 **

* – достовірність різниці з хворими 1-ї групи; ** – достовірність різниці з хворими 2-ї групи (P<0,05).

частку чоловіків з його вмістом нижче від норми (10,4 нмоль/л) у групі хворих з гіперурикемією, де таких хворих 47 %, тоді як у контролі та у пацієнтів з нормоурикемією ця частка становить 33 та 31 % відповідно. Цілком вірогідно, що у 3-й групі, де найбільше виражена інсулінорезистентність, спостерігається паралельне підвищення концентрації тестостеронестрадіолзв'язувального глобуліну та відповідне зменшення вмісту фракції вільного тестостерону, який є біологічно активним і може стимулювати утворення транспортерів СК і її реабсорбцію в нирках, але це питання потребує окремих досліджень.

ВИСНОВКИ

1. У 70 % серед обстежених 95 чоловіків з ЦД 2-го типу в період зниження забезпеченості статевими стероїдами відзначено гіперпродукцію СК, що проявляється у збільшенні її добової екскреції порівняно з фізіологічною нормою. Нами виділено 2 основні типи порушення обміну СК: нормоурикемічний гіперурикозуричний, гіперурикемічний.

2. Нормоурикемія з гіперекскрецією СК у чоловіків з ЦД 2-го типу передбачає посилення продукції СК, прямо пов'язане з такими ознаками ІРС, як ожиріння, гіперглікемія, інсулінорезистентність. Екскреція СК зростає паралельно до збільшення швидкості ниркової фільтрації та зумовлюється зниженням її реабсорбції в ниркових канальцях, про що свідчить підвищення ІЕУ.

**Н.М. Гурина, О.В. Корпачева-Зинич,
А.А. Шупрович**

ВЗАИМОСВЯЗИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ И СОДЕРЖАНИЯ ИНСУЛИНА И ТЕСТОСТЕРОНА У МУЖЧИН, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

Обследовано 95 мужчин в возрасте от 45 до 65 лет, больных сахарным диабетом (СД) 2-го типа с признаками инсулино-резистентного синдрома (ИРС). У 37 % из них выявлена гипоандрогения (концентрация тестостерона менее 10,4

нмоль/л), гиперурикемия (ГУ) – только в 34 % случаев. В то же время у 74 % обследованных зафиксирована гиперпродукция мочевой кислоты (МК), о чем свидетельствует повышенная ее суточная экскреция. Поскольку уровень урикемии определяется соотношением процессов продукции МК и ее почечной экскреции, нами выделены 2 основных типа нарушения ее обмена: нормоурикемический гиперурикозурический тип и гиперурикемический. У мужчин с нормоурикемией экскреция МК возрастает параллельно с увеличением скорости клубочковой фильтрации, а также степени ожирения, инсулинорезистентности, гликемии. Высокая экскреция МК, которая поддерживает ее уровень в крови в пределах физиологической нормы, обусловлена снижением реабсорбции МК в почечных канальцах, о чем свидетельствует повышение индекса элиминации уратов. Выявленные взаимосвязи указывают на влияние инсулина и тестостерона на процессы продукции, элиминации и реутилизации уратов у мужчин с СД 2-го типа и ИРС.

Ключевые слова: мочевая кислота, обмен, диабет 2 типа, инсулинорезистентный синдром, инсулин, тестостерон, мужчины.

**N.M.Gurina, O.V.Korpacheva-Zinych,
A.A.Shuprovich**

INTERRELATIONS OF URIC ACID METABOLISM INDICES WITH INSULIN AND TESTOSTERON LEVELS IN MEN WITH TYPE 2 DIABETES

95 men aged 45-65, suffering from type 2 diabetes for 0.1-20 years (4.5±1.4) were examined. Hypoandrogenia (serum testosterone < 10,4 nmol/ml) was noted in 37 % of investigated patients. Hyperuricemia (HUA), defined by serum uric acid (UA) content more than 450 pmol/L, was detected in 34 % of subjects. In 74 % of patients there was a high level of 24h UA urine excretion ($UA_u > 4.43$ mmol), suggesting a hyperproduction of UA. Because the level of uricemia is defined by UA production and excretion, we outline two main types of alterations in UA metabolism: normouricemic, hyperuricosuric and hyperuricemic. In normouricemic and hyperuricosuric men UA excretion growth in parallel with the rate of kidney filtration, obesity, glicemia. High urate elimination index (UEI) suggests a decrease of UA reabsorption in kidney. The results allow us to suggest a significance of insulin and testosterone influence on regulation of UA metabolism in aged men with type 2 diabetes and insulin resistance syndrome.

V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of Academy of Medical Sciences, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балкаров И.М. Подагрическая (уратная) почка. – В кн: Диагностика и терапия в клинике внутренних болезней. – М.: Здоровье человека, 2004. – С.219–233.

2. Гинзбург М.М., Козупица Г.С. Синдром инсулино-резистентности // Пробл. эндокринологии. – 1997. – **43**, №1. – С.40–43.
3. Демидова Т.Ю., Аметов А.С., Титова И.О. Современные возможности коррекции инсулинорезистентности у пациентов с метаболическим синдромом // Терап. архив. – 2006. – **78**, № 10. – С. 36–40.
4. Дудинская В., Хлыничак А., Скотницкая Е., Суска М. Метаболизм пуринов в эритроцитах человека (обзор) // Биохимия. – 2006. – **71**, №5. – С. 581–591.
5. Кинев К.Г. Подагра. – М.: Медицина, 1980. – 124 с.
6. Мадянов И.В., Балаболкин М.И., Марков Д.С., Маркова Т.Н. Основные причины гиперурикемии при сахарном диабете // Терап. архив. – 2000. – №2. – С.58–60.
7. Мухин Н.А., Балкаров И.М., Бритов А.Н. Тубулоинтерстициальный нефрит и артериальная гипертензия – клиническое и популяционное значение // Там же. – 1997. – **69**, №7. – С.5–10.
8. Оранская А.Н., Мкртумян А.М. Болезнь без возраста, болезнь без времени // Здоровье Украины. – 2008. – **1**, №182. – С.36–37.
9. Руководство по клинической лабораторной диагностике / Под ред. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина, 1982. – 576 с.
10. Шамхалова М.Ш., Клефтортова И.И., Трубицына Н.П., Шестакова М.В. Поражение почек при СД 2-го типа (обзор) // Терап. архив. – 2006. – **78**, №10. – С. 27–33.
11. Шестакова М.В., Чугунова Л.А., Шамханова М.Ш. Диабетическая нефропатия: факторы риска быстрого прогрессирования почечной недостаточности // Там же. – 1999. – №6. – С.45–49.
12. Byrne C., Wareham N., Day N. Decreased non-esterified fatty acid suppression and features and of the insulin resistance syndrome occur in a sub-group of individuals with normal glucose tolerance // Diabetologia. – 1995. – **38**, № 11. – P. 1358–1366.
13. Dodesini A., Lepore G., Tiengo A. Insulin resistance as a progression promoter in diabetic nephropathy // Ibid. – 2004. – **47** (S.1), A21 (Ref. 50).
14. Fox J., Kelley W. Human phosphoribosylpyrophosphate synthetase // J.Biol. Chem. – 1972. – **247**, №7. – P. 2126–2131.
15. Gazzola C., Ferraro P., Moras M. Cytosolic high Km 5'(3')-deoxyribonucleotidase in substrate cycles involved in nucleotide metabolism // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, № 9. – P. 6185–6190.
16. Geloneze S., Tambascia M., Parejra J. Non-esterified fatty acid (NEFA) release in vivo by visceral adipose tissue in humans // Diabetologia. – 2004. – **47**, № 51, A 54, Ref. 139.
17. Harman S.M., Metter E.J., Tobin J.D. Baltimore Longitudinal Study of Aging. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging // J. Clin. Endocrinol. and Metabol. – 2001. – **86**. – P. 724–731.
18. Levinson D.J. Rat hepatic xanthine oxidase activity // Amer. J. Epidemiol. – 2008. – **23**, № 1. – P. 77–82.
19. Ljubojevic M., Herak-Kramberger C.M., Hagos Y., Bahn A., Endou H., Burckhardt G., Sabolic I. Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition // Amer. J. Physiol. Renal Physiol. 2004. – **287**. – P. F124–F138.
20. Matsumoto S., Koshiishi I., Inoguchi T. Confirmation of superoxide generation via xantine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice // Free Radic. Res. – 2003. – **37**, № 7. – P.767–772. 21.
21. Matthews D., Hosker J., Rudenski A., Naylor B., Nreacer D., Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man // Diabetologia. – 1985. – **28**. – P. 412–419.
22. Nakagawa T., Tuttle K., Short R. Johnson R. J. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome // Nat. Clin. Pract. Nephrol. – 2005. – № 1. – P. 80–86.
23. Orwoll E., Lambert L.C., Marshall L.M. Testosterone and estradiol among older men // J. Clin. Endocrinol. and Metabol. – 2006. – **91**, №4. – P. 1336–1344.
24. Pizzichini M., Leoncini R., Vannoni D., Marinello E., Pagani R. The influence of testosterone on purine nucleotide metabolism in rat liver // Life Sci. – 1995. – **57**. – P. 2127–2135.
25. Reaven G. The kidney: An unwilling accomplice in syndrome X // Amer. J. Kidney Dis. – 1997. – 30, № 6. – P. 928–931.
26. Sala-Newby G.B., Freeman N.V., Skladanowski A.C. Distinct roles for recombinant cytosolic 5'-nucleotidase-I and -II in AMP catabolism in COS-7 and H9c2 rat myoblast cell lines // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, № 16. – P. 11666–11671.
27. Sekine T., Miyazaki H., Endou H. Molecular physiology of renal organic anion transporters // Amer. J. Physiol. Renal Physiol. – 2006. – **290**. – P. F251–F261.
28. Taniguchi Y., Hayashi T., Tsumura K., Endo G., Fujii S., Okada K. Serum uric acid and risk for hypertension and type 2 diabetes in Japanese men: The Osaka Health Survey // J. Hypertens. – 2001. – **19**, № 7. – P.1209–1215.
29. Vizzotto L., Vartemati M., Marinello E., Leoncini R., Pagani R., Pizzichini M. Effect of testosterone on purine metabolism and morphometric parameters in the rat liver // Mol. Cell. Endocrinol. – 1996. – **119**. – P. 123–127.
30. Xiang G., Qi Lu, Qiao N. Intake of added sugar and sugar-sweetened drink and serum uric acid concentration in us men and women // Hypertension. – 2007. – **50**. – P. 306.

ДУ «Ін-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України», Київ
E-mail: admin@iem.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 13.12.2008

В.С. Недзвецкий, П.О. Неруш

Вплив гіпертиреозу на когнітивні процеси та стан гліальних проміжних філаментів головного мозку щурів

Досліджено вплив гіпертиреозу на показники окисного стресу, стан гліальних проміжних філаментів і пам'ять. У мозку щурів з гіпертиреозом достовірно підвищується вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів і погіршується процес запам'ятовування. Зміни поліпептидного складу виявлені в гіпокампі та корі великих півкуль. У гіпокампі щурів з гіпертиреозом збільшується інтенсивність поліпептидних зон як розчинної, так і філаментної форм гліального фібрилярного кислого білка. Отримані результати вказують на можливість реконструкції цитоскелета гліальних клітин під впливом тиреоїдних гормонів.

Ключові слова: гліальні проміжні філаменти, гіпертиреоз, когнітивні процеси.

ВСТУП

Гормони щитоподібної залози є важливими посередниками молекулярних, клітинних і фізіологічних процесів, які регулюють розвиток мозку ссавців. Диференціація клітин, їх міграція на ранніх стадіях онтогенезу, експресія деяких генів чутливі до впливу як дефіциту згаданих гормонів, так і їх надлишку [14]. Фізіологічна роль гормонів щитоподібної залози полягає в координації процесів розвитку мозку за допомогою впливу на експресію окремих генів і швидкості диференціації клітин. У літературі є дані про можливу участь тиреоїдних гормонів (ТГ) і їх рецепторів у диференціації нейронів і гліальних клітин, а також у контрольованій загибелі клітин [13]. Вплив гормону щитоподібної залози на нейрональну диференціацію може реалізуватися через регуляцію експресії генів, що відповідають за синтез структурних нервовоспецифічних білків. В останні роки відносно велика кількість тиреоїдзалежних генів були ідентифіковані в мозку ссавців [2]. Концентрація тиреотропного гормону в

© В.С. Недзвецкий, П.О. Неруш

крові не корелює з варіабельністю ознак, що спостерігаються у пацієнтів з тиреотоксикозами [23].

Досліджено ефекти гіпофункції щитоподібної залози на розвиток клітин ЦНС. Водночас залишаються нез'ясованими питання впливу надмірних концентрацій ТГ на функції нейронів і гліальних клітин. Не розкритими є також причини розвитку пізнавального дефіциту при порушеннях балансу нейрогормонів.

Незважаючи на те, що тиреоїдні гормони і їх вплив широко досліджені, вивчена лише обмежена кількість маркерів, які безпосередньо відображають дію гормону. У ролі маркерів, що адекватно відповідають на зміни концентрації ТГ, розглядаються цитоскелетні білки. Є дані про те, що ТГ регулює експресію тубуліну [24], модулює експресію важкого ланцюга міозину при денервації скелетних м'язів [18]. ТГ впливає на полімеризацію F-актину і, таким чином, контролює організацію відповідних цитоскелетних структур [17].

Білки проміжних філаментів складають одну з трьох підсистем цитоскелета

еукаріотних клітин і визнані як надійні гістоспецифічні маркери. У нервовій тканині проміжні філаменти представлені триплетом білків нейрофіламентів і гліальним фібрилярним кислим білком (ГФКБ). Існують дані про зміну структури проміжних філаментів і фізико-хімічних властивостей цитоскелетних білків при патологіях різної етіології та дії ушкоджувальних факторів [12, 26]. Велике значення має вивчення і використання проміжних філаментів як маркерів розвитку патологічних станів нервової системи. Дослідження молекулярних маркерів, характерних для тиреотоксикозів, має особливе значення у зв'язку з постійно зростаючим забрудненням навколишнього середовища чинниками, які викликають надмірну продукцію ТГ. Є дані про те, що синтез останніх істотно підвищений у дітей, опромінених під час вагітності внаслідок Чорнобильської катастрофи, а також у дітей, що проживають у районах комплексного впливу солей важких металів і малих доз радіації [1, 7].

Мета цієї роботи – вивчення показників окисного стресу, вмісту і поліпептидного складу білка гліальних проміжних філаментів ГФКБ у різних відділах головного мозку та поведінкових реакцій щурів за умов експериментального гіпертиреозу.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар обох статей віком 20–22 тиж і масою 200–230 г. Щури експериментальної групи протягом 14 діб отримували перорально тироксин. Його початкову дозу (10 мкг) збільшували на 10 мкг за добу протягом 14 діб. Для експерименту відбирали тварин з концентрацією тироксину у сироватці крові не менше ніж 17 нг/мл. Здатність до запам'ятовування оцінювали у тесті “умовної реакції пасивного уникнення”. Викликані гіпертиреозом зміни білка гліальних проміжних філаментів

оцінювали по досягненні дози 140 мкг за добу. Після декапітації вилучали головний мозок, охолоджували та розділяли на відділи. Окремо відібрані зразки 0,2 г тканини (кора великих півкуль, гіпокамп, стовбур мозку) гомогенізували в 4,0 мл 0,025 М тріс-буфері (рН 8,0), що містив (ммоль/л): ЕДТА – 2, 2-меркаптоетанол – 1, фенілметилсульфонілфториду – 0,1 та соєвого інгібітора трипсину – 10 мкг/мл. Гомогенат центрифугували при 30000 g протягом 60 хв. Супернатант (S₁) містив розчинні білки. Осад ресуспендували в 0,5 мл тієї самої буферної системи, яка додатково містила 4 М сечовину. Супернатант, який отримували після другого центрифугування (S₂), містив нерозчинні білки проміжних філаментів. Вміст загального білка в екстрактах визначали методом Лоурі в модифікації Міллера [22]. Склад поліпептидних фрагментів білка гліальних філаментів розраховували за допомогою імуноблотингу з використанням поліклональної моноспецифічної антисироватки у розведенні 1:1500, як описано раніше [5]. Кількісний аналіз ГФКБ проводили за допомогою комп'ютерної обробки сканованих результатів імуноблотингу (LabWork 4.0). Рівень перекисного окиснення ліпідів вимірювали з використанням тест-набору LPO-586 (“Oxis, Int. Inc.”, США).

Одержані результати обробляли методами математичної статистики для малих вибірок [4]. Відносний вміст ГФКБ виражали у вигляді середньої величини ± стандартна похибка середньої, достовірну різницю між групами оцінювали із застосуванням критерію t Стьюдента (P<0,05) після перевірки гіпотез про нормальність розподілення та відмінність між генеральними дисперсіями.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Однією з важливих причин функціональних ускладнень у клітинах нервової тканини вважається розвиток окисного стресу [19].

Для контролю змін показників окисно-відновного балансу в гіпокампі, корі великих півкуль і стовбурі визначали вміст ТБК-реактивних продуктів (малоновий діальдегід, 4-гідроксиалкени, дієнові кон'югати). Результати визначення кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у гомогенатах головного мозку експериментальних і контрольних щурів представлені на рис. 1. У всіх досліджених відділах мозку дослідних тварин вміст малонового діальдегіду та 4-гідроксиалкенів був достовірно підвищений відносно контрольної групи. Експериментальний гіпертиреоз викликав підвищення вмісту ТБК-реактивних продуктів у гіпокампі на 68 %, стовбурі мозку – на 49 % ($P < 0,05$) і корі великих півкуль – на 57 % ($P < 0,01$) у порівнянні з контролем (див. рис. 1). Таким чином, отримані результати свідчать про розвиток стійкого окисного стресу у нервовій тканині щурів за умов порушення балансу ТГ.

Різні за природою ушкоджувальні фактори та метаболічні розлади індукують генерацію реактивних сполук кисню у нервовій тканині і розвиток інсульту [11], можуть впливати на експресію та рециклінг

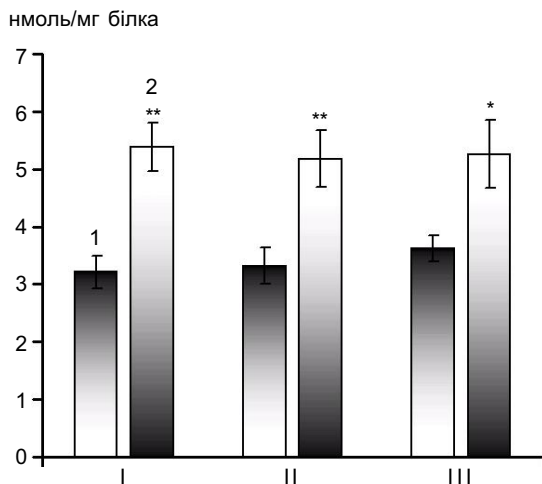


Рис. 1. Вміст тіобарбітурової кислоти (ТБК)-реактивних продуктів перекисного окиснення ліпідів у мозку щурів: 1 – контроль; 2 – щури з гіпертиреозом; I – гіпокамп, II – кора великих півкуль, III – стовбур мозку

цитоскелетних і мембранних білків [12, 9], щільність синаптичних контактів [29] і, таким чином, порушувати процеси навчання та пам'яті.

Аналіз поведінкових реакцій щурів у тесті умовного рефлексу пасивного уникання показав, що до придбання навичок усі групи тварин не відрізнялися за часом періоду очікування (латентного періоду). Час збереження пам'яті у тесті умовного рефлексу пасивного уникання був відмінним у групі щурів, які отримували тироксин у порівнянні з контролем. Зменшення періоду очікування у тесті умовного рефлексу пасивного уникання становило 67 % ($P < 0,01$) щодо контрольних значень (рис. 2). Такі значні відмінності вказують на погіршення процесу навчання і запам'ятовування у групі щурів з гіпертиреозом.

Для дослідження впливу гіпертиреозу на стан астроглії та її реактивність у гіпокампі, корі великих півкуль і стовбурі мозку визначали вміст і склад поліпептидних фрагментів ГФКБ. Достовірні відмінності вмісту астроцитарного цитоскелетного маркера ГФКБ визначені у фракціях розчинних і філаментних білків з мозку щурів експериментальної групи. Найбільш суттєве підвищення вмісту ГФКБ філаментної фракції виявлене у корі великих півкуль і гіпокампі щурів, що отримували тироксин (рис. 3). У гіпокампі тварин цієї групи виявлене збільшення вмісту ГФКБ у 1,74 раза ($P < 0,01$), корі великих півкуль – у 1,63 ($P < 0,01$) і стовбурі мозку – у 1,45 раза ($P < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою.

Експериментальний гіпертиреоз впливає також на стан гліальних проміжних філаментів. Зміни складу поліпептидних фрагментів ГФКБ виявлені у всіх досліджуваних відділах мозку. Результати імуноблотингу філаментних і розчинних фракцій білків проміжних філаментів представлені на рис. 4. У філаментних фракціях виявлено збільшення інтенсивності поліпептидної

зони 49 кДа. У цій самій фракції нерозчинних цитоскелетних білків з'являються деградовані поліпептиди ГФКБ з молекулярною масою в ділянці 46–41 кДа. У розчинній фракції стовбура мозку не виявлено помітного збільшення деградованих поліпептидів. Інтенсивність інтактного поліпептиду – 49 кДа, також як і в філаментній фракції, істотно підвищується. Не виключено, що підвищення вмісту розчинних субодиниць гліальних філаментів може відбуватися внаслідок дисоціації власне філамента під час реорганізації цитоскелетних структур. Враховуючи

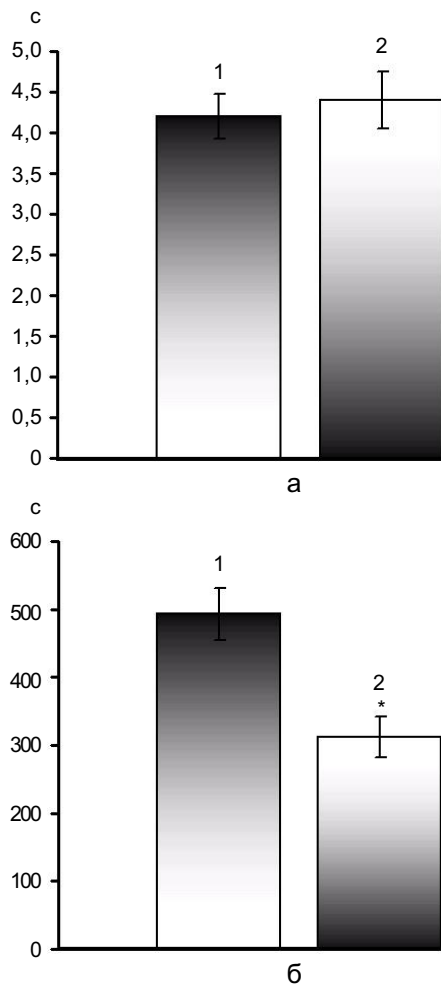


Рис. 2. Результати тесту умовного рефлексу пасивного уникання: 1 – контроль; 2 – щури з гіпертиреозом: а – час очікування до навчання; б – час очікування після навчання

результати імуноблотингу філаментної фракції, збільшення вмісту розчинного інтактного поліпептиду 49 кДа насамперед є результатом підвищеної експресії ГФКБ і лише частково внаслідок перерозподілу існуючих філаментних структур.

У сечовинній (філаментній) фракції представлені в основному субодиниці ГФКБ, що безпосередньо складають філамент. Таким чином, значне збільшення інтенсивності поліпептидної зони 49 кДа в філаментній фракції свідчить на користь того, що підвищення концентрації ТГ може бути причиною активації фібрилогенезу в гліальних клітинах і розвитку характерного процесу астрогліозу.

Розрахунок та аналіз показників виявив високий ступінь кореляції між підвищенням вмісту ГФКБ і продуктів перекисного окиснення:

гіпокамп	$0,74 \pm 0,084$; $P < 0,01$
кора великих півкуль	$0,71 \pm 0,093$; $P < 0,01$
стовбур	$0,62 \pm 0,096$; $P < 0,05$

Ці результати вказують на важливу роль окисного стресу в індукції астрогліальної реактивної відповіді за умов гіпертиреозу.

Астроцити є спеціалізованими гліальними клітинами, число яких більше ніж у 5 разів перевищує кількість нейронів у ЦНС

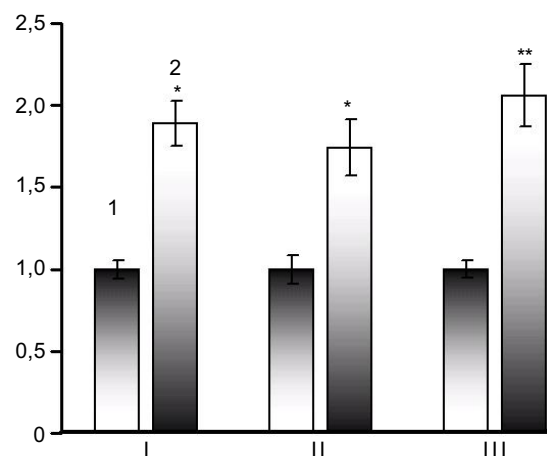


Рис. 3. Відносний вміст гліального фібрилярного кислого білка у цитоскелетній фракції з мозку щурів контрольної (1) та експериментальної (2) груп: I – гіпокамп, II – кора великих півкуль, III – стовбур мозку

[16]. Астроцити відповідають на дію ушкоджувальних факторів через посередництво астрогліозу. Астрогліоз індукується різними за природою чинниками і є ознакою патогенетичних і структурних ушкоджень ЦНС. Відомо, що астрогліоз не є просто феноменом відповіді за принципом так-ні. Цей процес є тонко відградованою послідовністю змін, що проходять у ситуаційно-залежний спосіб і регулюються як зовнішніми сигналами, так і нейронгліальною взаємодією. Зміни, якими супроводжується астрогліоз, спрямовані від зворотних змін експресії генів і клітинної гіпертрофії зі зберіганням клітинних доменів і структури тканин до довготривалого формування рубців і перебудови структури окремих ділянок мозку.

Останнім часом отримані беззаперечливі докази того, що астроцити відіграють в окремих випадках головну або значну роль у розладах ЦНС. Водночас залишається незрозумілим питання, чи можливо дисфункції астроцитів або астрогліоз представити як клінічні ознаки або механізми, що призводять до патологічних змін у ЦНС [12].

Ефекти ТГ на астрогліальні клітини реалізуються через реорганізацію їх цитоскелета, яка контролюється ступенем фосфорилування ГФКБ [30].

Роль ТГ у дозріванні астроцитів залишається не зовсім зрозумілою. Їхній вплив на дозрівання мозку реалізується також через взаємодію з ядерними рецепторами

і регуляцію генної експресії. Зниження концентрації ТГ частково блокує диференціацію астроцитів [21]. За останні 10 років був зроблений значний прогрес у розкритті механізму перетворення сигналу трийодтироніну (T_3) у клітинну відповідь. Ядерні рецептори ТГ функціонують по типу аорецепторів. Тобто вони мають активність за відсутності гормону, а стимуляція T_3 діє як репресор транскрипції окремих генів [14].

Усі ізоформи T_3 -рецепторів експресуються в мозку. Просторова і тимчасова експресія цих рецепторів може бути основою створення унікальних нейрональних ансамблів. Один із шляхів впливу на нейрональну диференціацію може реалізуватися внаслідок участі ТГ у виробленні нейротропів та їх рецепторів [13].

Клітинні рецептори ТГ залучаються до міграції клітин, синаптогенезу як у період розвитку нервової системи, так і в дорослому мозку. Експресія мутантних рецепторів ТГ у дорослих мишей індукує стійкі поведінкові зміни, синдром тривожності та морфологічні зміни у гіпокампі [15]. Це вказує на важливу регуляторну роль балансу ТГ протягом усього життя.

Є дані про вплив ТГ на стан окремих компонентів цитоскелета: мікрофіламентів, мікротрубочок і проміжних філаментів. У агрегованих культурах клітин ТГ стимулює експресію білків нейрофіламентів, а також появу обмежувальних гліальних клітин з надмірно розвиненими волокнами [28]. Адгезія астроцитів порушується при

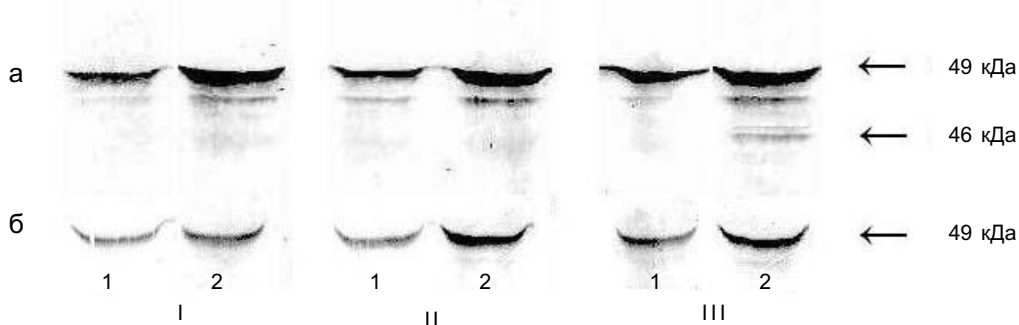


Рис. 4. Результати імуноблотингу філаментних (а) і розчинних (б) фракцій білків проміжних філаментів: 1 – контроль; 2 – щури з гіпертиреозом. I – кора великих півкуль, II – стовбур мозку, III – гіпокамп

відсутності ТГ, що впливає на нейрон-гліальні контакти [17]. Таким чином, астроцитзалежне регулювання адгезивних взаємодій забезпечує механізм, за допомогою якого ТГ може впливати на міграцію нервових клітин і формування нейрональних зв'язків.

Гіпертиреоз викликає багатофакторні метаболічні порушення, які можуть спричинити нейротрофічні, нейромодуляторні та функціональні розлади. Надмірна концентрація ТГ викликає стійкі метаболічні порушення у нервових клітинах. Тривалий метаболічний розлад у клітинах ЦНС може позначитися на функціях вищої нервової діяльності, зокрема як дефіцит пізнавальної активності.

Результати тесту умовного рефлексу пасивного уникання свідчать про можливий зв'язок між розвитком окисного стресу, надмірним і тривалим астрогліозом і пізнавальним дефіцитом у групі щурів з гіпертиреозом.

Доведено, що у щурів з гіпотиреозом мозок тривалий час залишається незрілим. Nunez J. і співавт. [24] передбачають, що ТГ забезпечує синхронізацію збільшення аксонів і дендритів. Швидкість формування мікротрубочок збільшується з віком, причому це збільшення сповільнюється при гіпотиреозі і відновлюється ТГ. Принаймні експресія 5 білків, які регулюють стан тубулінових філаментів, знаходиться під тиреоїдним контролем [25]. Зміна складу таких білків контролює кількість і довжину мікротрубочок при формуванні нейритів під час диференціації. Можливо, ТГ є одним з чинників, який визначає послідовність експресії генів, що регулюють процеси диференціації.

Показано, що в неокортексі та мозочку після стимуляції T_3 активується транскрипційна регуляція та експресія не всіх, а насамперед нервовоспецифічних білків [8]. Диференціальна регуляція експресії в клітинах нервової системи сприяє встанов-

ленню стаціонарного стану, а також адаптації клітин у відповідь на зовнішні сигнали, що опосередковані гормональною регуляцією. Механізм гормональної регуляції ТГ може бути одним із факторів мікрооточення нервових клітин і модулювати їх специфічну відповідь на дію різних стимулів. Несприятливі чинники можуть впливати на метаболізм ТГ. Порушення гормонального балансу індукує метаболічні порушення, які відображаються як на функціонуванні окремих нервових клітин, так і ЦНС у цілому.

Передбачають, що в онтогенезі мозку існує лише короткий період, протягом якого нервові клітини чутливі до дії ТГ. Незважаючи на це, існують дані про вплив гіпертиреозу на сформовану нервову систему. У ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС з патологією щитоподібної залози захворюваність нервової системи й органів чуття підвищена в 7,7 раза [3]. T_3 має множинні ефекти на нервові клітини. Є дані про те, що ТГ активує транспорт глюкози і метаболічну активність астроцитів [27]. Враховуючи цей факт, можливо передбачити, що виявлена нами інтенсифікація фібрилогенезу в гліальних клітинах зумовлена саме цим ефектом ТГ.

Раніше було показано, що проміжні філаменти схильні до протеолізу кальційзалежними протеїназами – калпаїнами [6]. У дослідах на тваринах виявлено, що при гіпертиреозі порушується гомеостаз Ca^{2+} [10]. Це дає змогу передбачити, що ТГ може також впливати на стан проміжних філаментів за допомогою модулювання активності кальційзалежних протеїназ. Цитоскелет еукаріотних клітин розглядають нині не тільки як структурний інтегратор, але і як активний модулятор багатьох клітинних процесів і функцій [16]. Таким чином, гліальні проміжні філаменти залучаються до процесів, котрі регулюються дією ТГ. Враховуючи зв'язок між астрогліальною активацією і здатністю цих клітин до міграції, можна також перед-

бачити, що ТГ впливають на розповсюдження і міграцію астроцитів у зрілій нервовій системі так само як і в період її розвитку [20].

Отримані результати вказують на тісний зв'язок між розвитком окисного стресу в нервовій тканині, реактивацією астроцитів і пізнавальним дефіцитом у щурів за умов гіпертиреозу. Виявлені зміни поліпептидного складу проміжних філаментів глії свідчать про певну пластичність астроцитарного цитоскелета в умовах гіпертиреозу. Ідентифікація мережі генів, експресія яких чутлива до регуляції гормоном щитоподібної залози в період розвитку мозку і в зрілій нервовій системі, з'ясування механізмів регуляції та фізіологічної ролі продуктів цих генів залишається головною метою майбутніх досліджень.

В.С. Недзвецкий, П.А. Неруш

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТИРЕОЗА НА КОГНИТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ И СОСТОЯНИЕ ГЛИАЛЬНЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Исследовано влияние гипертиреоза на показатели окислительного стресса, состояние глиальных промежуточных филаментов и память. В мозгу крыс с гипертиреозом выявлено достоверное увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов и ухудшение процесса запоминания. Изменения полипептидного состава обнаружены в гиппокампе и коре больших полушарий. В гиппокампе крыс с гипертиреозом отмечается увеличение интенсивности полипептидных зон как растворимой, так и филаментной форм глиального фибриллярного кислого белка. Полученные результаты указывают на возможность реконструкции цитоскелета глиальных клеток под влиянием тиреоидных гормонов. Ключевые слова: глиальные промежуточные филаменты, гипертиреоз, когнитивные процессы.

V.S. Nedzvetsky, P.A. Nerush

THE EFFECT OF HYPERTHYREOSIS ON THE LEARNING AND MEMORY PROCESSES AND THE STATE OF THE GLIAL INTERMEDIATE FILAMENTS IN RAT BRAIN

The effects of hyperthyreosis on oxidative stress, state of glial intermediate filaments and memory were investigated. We ob-

served a significant increase in lipid peroxidation products into both hippocampus and cortex and memory worsening. The changes of GFAP polypeptides was observed in hippocampus and cortex. In group of rats with hyperthyreosis, the content of GFAP in both soluble and filamentous fractions was increased in hippocampus. This data shows, that glial cytoskeleton is reconstructed under thyroid hormone effects. Key words: glial intermediate filaments, hipertireosis, cognitive processe.

Dnepropetrovsk National University; Dnepropetrovsk State Medical Academy

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Загородній М.П. Стан тиреоїдної активності та резистентності у дітей, що проживають в районах сумісної дії солей важких металів та малих доз радіації // Сум. держ. ун-т. – 1997. – 16 с. Укр. Деп. 28.07.97, № 447.
2. Кондор А.И. Современные проблемы тиреоидологии // Пробл. эндокринологии. – 1999. – **45**, № 1. – С. 3–8.
3. Кузьмина Н.С., Гаврилова Е.М., Александрова Л.М. Изучение неспецифических механизмов защиты организма и тиреоидного статуса у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС в отдаленные сроки после катастрофы // Мед. консультация. – 1998. - **1**. – С. 46–48.
4. Лапач С. Н., Губенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. Морион. – К., 2001. – 408 с.
5. Недзвецкий В.С., Березин В.А., Оберняк Т.И., Жмарева Е.Н. Характеристика специфических белков промежуточных филаментов в опухолях головного мозга человека // Биохимия. – 1986. – **51**, № 11. – С. 1843–1850.
6. Недзвецкий В.С., Ушакова Г.А., Бусыгина С.Г., Березин В.А., Дворецкий А.И. Влияние малых доз ионизирующей радиации на промежуточные филаменты и Ca^{2+} -активируемую систему протеолиза головного мозга крысы // Радиобиология. – 1991. – **31**, вып. 3. – С. 333–339.
7. Сытник С.И., Стонсаров А.Н., Воронежский Б.К. Функциональное состояние тиреоидной системы у детей, облученных внутриутробно в результате Чернобыльской катастрофы // Пробл. эндокринологии. – 1999. – **45**, № 1. – С. 26–29.
8. Andres-Barquin P.J., Fages C., Le Prince G., Rolland B., Tardy M. Thyroid hormones influence the astroglial plasticity: changes in the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding message // Neurochem. Res. – 1994. – **19**, № 1. – P. 65–69.
9. Aydin M., Yilmaz B., Alcın E., Nedzvetsky V.S., Sahin Z., Tuzcu M. Effects of letrozole on hippocampal and

- cortical catecholaminergic neurotransmitter levels, neural cell adhesion molecule expression and spatial learning and memory in female rats // *Neuroscience*. – 2008. – **151**. – P. 186–194.
10. Barber P.J., Elliott J. Study of calcium homeostasis in feline hyperthyroidism // *J. Sm. Anim. Pract.* – 1996. – **37**, № 12. – P. 575–585.
 11. Baydas G., Koz S.T., Tuzcu M., Etem E., Nedzvetsky V.S. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams // *J. Pineal. Res.* – 2007. – **43**, № 3. – P. 225–231.
 12. Baydas G., Nedzvetskii V.S., Kirichenko S.V., Nerush P.A. Astrogliosis in the hippocampus and cortex and cognitive deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes: effects of melatonin // *Neurophysiology*. – 2008. – **40**, № 2. – P. 105–111.
 13. Bernal J., Nunez J. Thyroid hormones and brain development // *Eur. J. Endocrinol.* 1995. – **133**, № 4. – P. 390–398.
 14. Bernal J. Thyroid hormones and brain development // *Vitamins and Hormones*. – 2005. – **71**. – P. 95–122.
 15. Bernal J. Thyroid hormone receptors in brain development and function // *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* – 2007. – **3**, № 3. – P. 249–259.
 16. Eng L.F., Ghirnikar R.S., Lee Y.L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000) // *Neurochem. Res.* – 2000. – **25**, № 9-10. – P. 1439–1451.
 17. Farvell K., Tranter C., Leonard J.L. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interaction in astrocytes // *Endocrinology*. – 1995. – **136**, № 9. – P. 3909–3915.
 18. Haddad F., Arnold C., Zeng M., Baldwin K. Interaction of thyroid state and denervation on skeletal myosin heavy chain expression // *Muscle and nerve*. – 1997. – **20**, № 12. – P. 1487–1496.
 19. Hattori F., Oikawa S. Peroxiredoxins in the central nervous system // *Subcell Biochem.* – 2007. – **44**. – P. 357–374.
 20. King L., Schwartz N., Domowicz M. Glial migratory streams in the developing hindbrain: A slice culture approach // *J. Neuroscience Methods*. – 2009. – **177**, № 1. – P. 30–43.
 21. Manzano J., Bernal J., Morte B. Influence of thyroid hormones on maturation of rat cerebellar astrocytes // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2007. – **25**, № 3. – P. 171–179.
 22. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – **31**, № 5. – P. 964–966.
 23. Motomura K., Brent G.A. Thyreotoxicosis // *Endocrinol. and Clin. Metabol. North Amer.* – 1998. – **27**, № 1. – P. 1–23.
 24. Nunez J., Couchie D., Aniello F., Bridoux A.M. Thyroid hormone effects on neuronal differentiation during brain development // *Acta med. Austr.* – 1992. – **19**, № 1. – P. 36–39.
 25. Aniello F., Couchie D., Gripois D., Nunez J. Regulation of five tubulin isotypes by thyroid hormone during brain development // *Neurochem.* – 1991. – **57**, № 5. – P. 1781–1786.
 26. Nedzvetskii V.S., Tuzcu M., Yasar A., Baydas G. Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats // *Biochemistry (Moscow)*. – 2006. – **71**, № 3, P. 239–244.
 27. Roeder L.M., Hopkins I.B., Kaiser J.R., Hanukoglu L., Tildon J.T. Thyroid hormone action on glucose transporter activity in astrocytes // *Biochem. and Biophys. Res.* – 1988. – **156**, № 1. – P. 275–281.
 28. Trentin A.G., De Aguiar C.B., Garcez R.C., Alvarez-Silva M. Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion // *Glia*. – 2003. – **42**, № 4. – P. 359–369.
 29. Venero C., Herrero A.I., Touyarot K., Cambon K., Lypetz-Fernández M.A., Berezin V., Bock E., Sandi C. Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – **23**, № 6. – P. 1585–1595.
 30. Zamoner A., Funchal C., Jacques-Silva M.C., Gottfried C., Barreto Silva F.R., Pessoa-Pureur R. Thyroid hormones reorganize the cytoskeleton of glial cells through Gfap phosphorylation and RhoA-dependent mechanisms // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2007. – **27**, № 7. – P. 845–865.

*Дніпропетров. нац. ун-т ім. О. Гончара;
Дніпропетров. мед. академія
E-mail : nedzvetskyvictor@ukr.net*

*Матеріал надійшов до
редакції 19.05.2010*

В.Ф. Сагач, В.М. Києнко, К.В. Яценко

200 років від дня народження Миколи Івановича Пирогова

13 листопада 1810 р. в сім'ї казначея Московського провіантного депо Івана Івановича Пирогова народилася тринадцята дитина, син Микола. Дідусь, Іван Мокійович, якому вже перевалило за сто, з усмішкою взяв немовля на руки та сказав: «Господи, помилуй! Господи, благослови!...» Так почався життєвий шлях великого лікаря, дослідника і педагога, який уперше в історії медицини застосував наркоз і гіпсову пов'язку, а також поєднав науку і віру та став прикладом для багатьох поколінь лікарів. Коли Миколі виповнилося чотирнадцять років, він вступив на медичний факультет до Московського університету. Для цього йому довелося додати собі два роки. Вчилася йому легко. Крім того, доводилося постійно підробляти, щоб допомогти родині. Нарешті Пирогову вдалося влаштуватися на посаду прозектора в анатомічному театрі. Ця робота дала молодому лікарю безцінний досвід і переконала його в тім, що він повинен стати хірургом. Отримавши диплом, ще декілька років майбутній вчений вчився за кордоном.

Історія створення М.І. Пироговим оперативної хірургії та топографічної анатомії дуже цікава. Микола Пирогов, якому виповнилося 23 роки, стажувався у відомій на той час клініці Німеччини, переймав досвід у знаменитих хірургів Європи. І, як він писав у листах до друзів, його здивувало, що прекрасні «оператори»

фактично не знали, що вони оперують. Іноді доходило до того, що професор викликав прозектора та питав у нього, який орган або структуру оперує. В пошуках дієвого методу навчання молодий вчений вирішив застосувати анатомічні дослідження на заморожених трупах. Сам Пирогов це називав “крижаною анатомією”. Вже тоді він зрозумів, слід об'єднати вивчення хірургічної майстерності та знання анатомії, але не на схоластичному рівні, абсолютно відірваному від практики, а на основі клінічної анатомії, «анатомії хірургічної». Молодий учений зайнявся створенням абсолютно нової і до того не існуючої науки, створивши оперативну хірургію та топографічну анатомію, в яких органічно злилися хірургічні навички і техніка з анатомією. Через кілька років такого вивчення анатомії Пирогов видав перший анатомічний атлас під назвою “Топографічна анатомія, ілюстрована розтинами, проведеними через заморожене тіло людини в трьох напрямках”, який став незамінним посібником для лікарів-хірургів. З того часу вони дістали можливість оперувати, завдаючи мінімальних травм хворому. Цей атлас і запропонована Пироговим методика стали основою усього подальшого розвитку оперативної хірургії.

До професорської діяльності Пирогов готувався в університеті міста Тарту, який вважався найкращим у Росії. Тут, у хірур-

© В.Ф. Сагач, В.М. Києнко, К.В. Яценко

гічній клініці, Пирогов пропрацював 5 років, захистив докторську дисертацію. У віці 26 років його обрали професором Дерптського (Тартуського) університету. Через кілька років Пирогова запросили до Петербурга, де він очолив кафедру хірургії в Медико-хірургічній академії. Одночасно Микола Іванович керував організованою ним клінікою госпітальної хірургії.

Незабаром у його житті почалися випробування: тяжка хвороба самого Пирогова, після – смерть першої дружини. Залишившись з двома малолітніми дітьми на руках, вчений відчуває гостру потребу заспокоїти схвильовану душу. «Мені потрібен був відсторонений, недосяжний високий ідеал віри. І взявшись за Євангеліє..., а мені вже було 38 років від роду, я знайшов для себе цей ідеал». Він проніс його через усе життя і втілював у свою складну роботу євангельські принципи, хоча це було робити дуже нелегко. Треба згадати, у якому стані тоді перебувала хірургія. Наркозу, гіпсу, знеболювальних препаратів не було. Різали по живому. Серед хірургів існувало негласне правило: на крики й стогони пацієнтів не звертати ніякої уваги. Уміння зберігати холонокровність було обов'язковим для хірурга тих часів. Неможливість залишатися байдужим до чужого горя спонукала М.І. Пирогова до пошуків нових методів лікування. Дію наркозу він спочатку випробує на собі. І тільки переконавшись у позитивному результаті, застосовує його при оперуванні своїх пацієнтів. Вчений у 1847 р. вперше застосував наркоз на війні при облозі аулу Салти у вигляді інгаляцій хлороформу та ректального введення ефіру. Загалом він провів близько 10 000 операцій під ефірним наркозом. Надалі він ніколи не допускав, щоб пацієнтів оперували без заспокійливого ефіру. Ефірний наркоз ознаменував початок нової епохи в розвитку воєнно-польової хірургії та значно розширив хірургічні можливості. На Кавказі Пирогов також

уперше застосував перев'язку бинтами, просоченими крохмалем. Крохмальна перев'язка виявилася зручнішою та міцнішою, ніж лубки, що застосовувалися до того.

Історія початку використання гіпсу в медичній практиці дуже цікава. Одного разу Пирогов потрапив у майстерню знайомого скульптора і побачив там гіпсові форми, з яким скульптори працюють на проміжному етапі своєї роботи. Ось воно! Те, що потрібно хірургу! У 1854 р. він першим використовував гіпсову пов'язку на театрі воєнних дій у Севастополі як засіб транспортної та лікувальної іммобілізації, що дало можливість істотно обмежити первинні ампутації, які вважалися основною операцією при вогнепальних переломах кісток і ушкодженнях суглобів. Так, гіпс потрапив у лікарні та користується популярністю до нашого часу.

М.І. Пирогов дав класичний опис травматичного шоку, що і нині цитується в підручниках як неперевершене за точністю, образністю та повного відображення клінічної картини цього важкого ускладнення вогнепальних ран.

На величезному особистому досвіді, особливо під час Кримської війни, вчений переконався, що «від адміністрації, а не від медицини залежить і те, щоб усім пораненим без виключення була надана перша допомога, що не терпить зволікання». Під лікарською адміністрацією в польових умовах він розумів насамперед організацію сортування поранених. М.І. Пирогов першим за весь час існування воєн звернув увагу на те, що на полі бою є поранені різного ступеня тяжкості. І його заслуга в тому, що він запропонував медичне сортування поранених, так званий пироговський ряд. Микола Іванович організував Хрестовоздвиженську громаду сестер милосердя і ввів принцип сортування поранених на чотири категорії. Тому він справедливо вважається засновником спеціального

напрямку в хірургії, відомого як військова хірургія. Під час Другої світової війни всі воюючі країни використовували медичне сортування поранених. Ця доктрина до цих пір збережена в організації медичної допомоги в армії.

Ще одне важливе досягнення М.І. Пирогова полягає в тому, що до нього вогнепальні рани ніхто не оперував. При пораненнях кінцівок іноді застосовували ампутації для профілактики гангрені. Микола Іванович першим запропонував усіх потерпілих з вогнепальними ранами оперувати, тобто проводити первинну хірургічну обробку рани, яка давала змогу врятувати безліч життів.

Прогрес воєнно-польової хірургії багато сторіч стримувався незнанням причин гнійних ускладнень ран, невмінням боротися з болем і значною крововтратою, попередженням ушкодження судин під час операцій. Його фундаментальні дослідження з хірургічної анатомії кровоносних судин дали в руки хірургів ключ до попередження кровотеч під час оперативних утручань.

Все це дає можливість стверджувати, що М.І. Пирогов – основоположник воєнно-польової хірургії. Свої спостереження та наукові дослідження він виклав у декількох працях: «Початки загальної і воєнно-польової хірургії» (1864), «Звіт про відвідування військово-санітарних установ у Німеччині, Лотарингії й Ельзасу» (1871), «Лікарська справа і приватна допомога на театрі війни в Болгарії й у тилу діючої армії».

Повернувшись до Петербурга, на прийомі в Олександра II М.І. Пирогов доповів про негаразди в армії. Цар не став прислухатися до нього, а навпаки Пирогов упав у немилість і був «засланий» до Одеси на посаду опікуна Одеського та Київського навчальних округів. Микола Іванович багато уваги приділяв педагогіці, більше ніж 10 років він був опікуном освіти в Одеській області, а пізніше в Києві. У

київський період його життя була написана унікальна праця «Ілюстрована топографічна анатомія розпилів, яка зроблена в трьох вимірах через заморожене людське тіло». Сучасні вчені впевнені, що цю працю можна вважати предтечею комп'ютерної томографії.

М.І. Пирогов спробував реформувати систему шкільної освіти, що тоді склалася, але його дії призвели до конфлікту з владою, і вченому довелося залишити свою посаду навіть без права на пенсію. Саме тому в 51 рік, досягнувши світової слави та визнання, він із сім'єю, у 1866 р., переселяється в садибу Вишня, де організував безкоштовну лікарню. Микола Іванович продовжував оперувати хворих, привів до ладу великий дубовий ліс, посадив дві березові діброви, побудував дві греблі, млин. Учений займався також селекцією пшениці, винограду, троянд. Він написав багато дуже цікавих праць, присвячених філософії. Наприклад, він вважав, що самі по собі чоловік або жінка неповноцінні, тільки тоді, коли є єдність між ними, досягається гармонія.

У Петербурзі та в Дерпті, Сімферополі та Києві, у Німеччині й Італії, у Кишиневі й селі Вишня Микола Іванович був доступним і простим, приходив на допомогу на перший поклик хворої людини й завжди після операції ховав руки в кишені, щоб йому не надумали платити. Мало того, він видавав наукові праці і виручені гроші переказував на користь незаможних.

Із Вишні М.І. Пирогов тричі їздив за кордон, а також на запрошення Петербурзького університету для читання лекцій (на цей час він уже був членом кількох іноземних академій). Відносно надовго вчений лише двічі покидав масток: перший раз у 1870 р. під час прусько-французької війни, будучи запрошеним на фронт від імені Міжнародного Червоного Хреста, і другий раз, у 1877–1878 рр., вже в досить літньому віці, кілька місяців працював на фронті під

час російсько-турецької війни. За 5 тижнів він оглянув 70 воєнних лазаретів. Жив у тяжких умовах. Часто спав на підлозі, їв що прийдеться, переміщався на підводах або пішки. Лікарі всіх національностей товпилися біля ліжок поранених, де зупинявся маститий хірург, щоб перейняти прогресивні методи лікування, що врятували тисячі людей. Тут само, у Вишні, Микола Пирогов і упокоївся. Останніми словами хірурга були: «Життя, ти з метою мені дано». Була 20 година 25 хвилин 23 листопада 1881 року.

Своєю самовідданою і здебільшого безкорисною працею Микола Іванович Пирогов перетворив хірургію на науку, озброївши лікарів науково обґрунтованою методикою оперативного втручання. Девізом життя великого вченого--практика був біблійний вислів: «Віра без справ мертва». У цій людині поєднувалися велич генія і надзвичайна скромність. На прохання написати автобіографію він відповів: «...Для цього я не маю ніяких матеріалів під рукою і не збирав їх, тому що ніколи не думав писати власну автобіографію, і зізнаюсь, мало нею цікавився... Правда, іноді я мріяв написати історію моїх по-

милок». На честь видатного лікаря та ученого були організовані Пироговські читання, які об'єднали вчених різних країн і поколінь для вирішення сучасних проблем медицини та медичної освіти. Ім'я Миколи Івановича назавжди залишиться в народній пам'яті і є символом великого гуманізму, милосердя, патріотизму, працездатності, неосяжної любові до науки, що пройшли через весь його життєвий шлях.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Геселевич А.М. Летопись жизни Н.И. Пирогова. – М.: Медицина, 1976. – 98 с.
2. Кульчицкий К.И., Кланца П.А., Собчук Г.С. Н.И. Пирогов в усадьбе Вишня. – К.: Здоров'я, 1981. – 101 с.
3. Максименко А.Н. Николай Иванович Пирогов: его жизнь и встречи в портретах и иллюстрациях. – Л.: Медгиз, 1961. – 210 с.
4. Сімеон (Архієпископ Вінницький та Могилів-Подільський). Духовний шлях Пирогова // Молодий медик. – 2010. – № 5–6. – С. 1–12.
5. Федоров В. О. Он внес нравственные начала в русскую хирургию // Мед. газета. – 2010, 5 мая.
6. Шевченко Ю.Л., Козовенко М.Н. Духовное наследие Пирогова: докл. на IV Международ. Пирогов. чтениях, посвящ. 200-летнему юбилею со дня рождения Н.И. Пирогова. – Винница: Нац. медико-хирург. центр им. Н.И. Пирогова, 2010. – 20 с.

ДИСКУСІЯ

О.В.Атаман

Сучасні виклики патофізіології як навчальній дисципліні. Куди йдемо?

Серед навчальних дисциплін, що викладаються у сучасній вітчизняній медичній вищій школі, патофізіологія посідає особливе місце. І не тільки тому, що вона є фундаментом медицини, теоретичною основою практичної діяльності лікаря, а й завдяки своїм історичним витокам. Адже патологічна фізіологія — це вітчизняна навчальна дисципліна, що виділилася в окрему кафедру ще в другій половині XIX ст. Саме тоді було створено перші кафедри патологічної фізіології (загальної патології) на теренах Росії (В.В.Пашутін) і в Україні (Н.А.Хржонщевський).

За кордоном розуміння того, що механізми виникнення і розвитку хвороб заслуговують на окреме від патоморфології висвітлення, прийшло значно пізніше. Лише в другій половині минулого століття почала з'являтися навчальна література під назвою "Патофізіологія", проте і до нині остаточне становлення її як самостійної дисципліни ще не відбулося.

Порівнюючи сьогодні зміст нашої традиційної патофізіології і аналогічної дисципліни на Заході, можна дійти висновку про існування двох її моделей: вітчизняної і західної.

У вітчизняній патофізіології органічно поєднуються дві складові науки: (1) власне фактологія (конкретне) і (2) узагальнення, які являють собою філософські основи медицини (абстрактне). Натомість західну патофізіологію майже на сто відсотків можна вважати фактологічною дисциплі-

ною, що не ставить перед собою мету вийти на рівень філософських узагальнень. Ілюстрацією сказаного може бути порівняння обсягу навчального матеріалу, викладеного у вітчизняних і закордонних виданнях. Так, наприклад, в останньому 7-му виданні "Pathologic Bases of Disease" Роббінса і Котрана [6] з 1552 сторінок на загальнотеоретичні питання про суть хвороби, загальну етіологію і патогенез припадає 0,8 сторінок тексту (0,05%), у підручнику "Pathophysiology" Порса [4] з 1582 сторінок — 18 (1,18%), у виданні "Pathophysiology of Disease" Макфі та співавт. [5] взагалі нема матеріалу, що стосується загального вчення про хворобу. Натомість у вітчизняних підручниках і посібниках проблемам загальної нозології надається велике значення. Так, в унікальному "Многотомном руководстве по патологической физиологии" за ред. М.М.Сиротиніна [2] 112 сторінок (5%) із 2260 загальної їх кількості (у чотирьох томах) відведено загальному вченню про хворобу, етіологію, патогенез, реактивність і резистентність. У підручнику за ред. М.Н.Зайка і Ю.В.Биця [3] на питання загальної нозології припадає 36 (5,1%) із 703 сторінок, а в посібнику О.В.Атамана [1] — 26 (5,2%) з 504 сторінок.

Наведене вище порівняння двох моделей, на нашу думку, є важливим для розуміння основної проблеми, що її порушено в цій статті — у якому напрямі має розвиватися українська патофізіологія як навчальна дисципліна.

© О.В.Атаман

Переконані, що відповідь на це питання слід шукати у площині тих викликів, які нині об'єктивно існують і на які має реагувати наша патофізіологія. Таких викликів щонайменше два: (1) стрімкий розвиток науки і (2) реформування вищої освіти в Україні. Переважна більшість дискусій у спільноті патофізіологів-викладачів ведеться сьогодні навколо того, у який спосіб адаптувати нашу дисципліну до умов болонського процесу, як оцінювати знання студентів, у яких формах слід проводити практичні заняття, чи є сенс переносити їх з лабораторій у клініку тощо. Цей аспект є безумовно важливим, проте він стосується не стільки змісту, скільки форми викладання предмету. Не зупиняючись на ньому (це має бути темою окремої ґрунтовної розмови), хочу порушити проблему змістовного наповнення сучасної української патофізіології, як вона має реагувати на виклики, що йдуть від сучасної науки. Один з них полягає в тому, що глибоке проникнення в молекулярні і молекулярно-генетичні механізми розвитку хвороб і патологічних процесів, зокрема формування і розвиток молекулярної патології, ставить на порядок денний питання про напрям, у якому має розвиватися змістове наповнення української патофізіології як навчальної дисципліни. Хочу підкреслити, що йдеться саме про українську патофізіологію, модель якої істотно відрізняється від західної (див. вище).

Нам видається, що вибір напрямку її розвитку слід шукати серед трьох можливих стратегій (шляхів): (1) консервативної; (2) прозахідної і (3) збалансованого розвитку.

Консервативна стратегія. Дехто з наших колег дотримується думки, що патофізіологія як навчальна дисципліна вже завершила своє формування (так само, як і інші дисципліни: анатомія, гістологія, біохімія, фізіологія). В основу такого твердження покладено уявлення про те, що

патофізіологія як така починається з клітинного рівня організації організму (за аналогією з фізіологією нормальною), а отже, все, що відбувається нижче нього (субклітинний і молекулярний рівні), навіть за умов патології, не є предметом нашої дисципліни. Зміст нинішньої патофізіології цілком відповідає основній меті медичного вузу – підготовці практичного лікаря. А йому не обов'язково занурюватися в молекулярні і молекулярно-генетичні механізми виникнення і розвитку хвороб. Тим паче, що це потребує фундаментальної підготовки як студента, так і викладача (а ми знаємо, у якому стані ця підготовка!), і що, можливо, найголовніше, на це просто не має ні місця в програмі, ні часу. Якщо вести мову про розвиток патофізіології, то тільки в контексті удосконалення та оптимізації форм її викладання, поступового переходу від традиційних експериментальних методів до новітніх клінічних (звідси рух у бік клінічної патофізіології), зміщення акцентів із загальнотеоретичного на прикладний аспект дисципліни тощо.

Прозахідна стратегія. Вона передбачає перехід вітчизняної моделі патофізіології до західної, тобто постійне насичення змісту дисципліни новими науковими фактами без намагань їхньої систематизації і підведення загальнотеоретичних підвалин. До цього начебто спонукає входження України у загальноєвропейський і світовий освітній простір, де існують давні традиції і діють певні стандарти. Якщо ми хочемо готувати спеціалістів західного зразка, то й маємо викладати і вчити, як на Заході. При такому підході відпадає необхідність створювати власні програми і підручники – слід взяти за основу ті, за якими вчать за кордоном, можливо, якимось чином адаптувавши їх до наших умов.

Стратегія збалансованого розвитку. Основну суть її можна передати словами Великого Кобзаря: "І чужого навчайтесь, і свого не цурайтесь..." Ідеться про те, що

патофізіологія має розвиватись одночасно у двох, здавалося б протилежних, напрямках: у бік наповнення її найвагомими здобутками сучасної науки (ріст фактологічної складової – рух до Заходу) і в бік розвитку загальнотеоретичного компоненту, що робить патофізіологію філософією медицини (збереження і примноження вітчизняних традицій). Оскільки автор сповідує саме ці принципи, то й подальший виклад буде стосуватись тільки даної стратегії і можливих шляхів її здійснення.

Напрямок перший – розвиток патофізіології як наукової основи медицини.

На наш погляд, основним завданням на цьому шляху є постійне наповнення дисципліни новими вагомими науковими фактами, здійснення їхньої систематизації.

Іншими словами, маємо дати відповідь на питання, що викладати, де викладати і як викладати? Не маємо сумнівів, що розуміння етіології і патогенезу найпоширеніших патологічних процесів і хвороб не можливе без уявлень про молекулярні і молекулярно-генетичні механізми їх виникнення і розвитку. Чи можна нині викладати патофізіологію, обминаючи молекулярні механізми ушкодження клітини і апоптозу, онкогенезу, старіння; роль клітинних рецепторів і механізмів внутрішньоклітинного передавання зовнішніх сигналів у розвитку патологічних процесів, значення систем внутрішньоклітинного протеолізу в патології; участь адгезивних білків і порушень мембранних структур в патогенезі хвороб, відтворення в експерименті патологічних процесів і хвороб на основі технології “генетичного нокауту” тощо? Хто, окрім патофізіологів, здатен сьогодні взяти на себе великий тягар і відповідальність за долучення нашого студента до найвищих досягнень сучасної науки в тих напрямках, про які йшлося? У рамках якої навчальної дисципліни мають викладатись основи молекулярної патології – медичної біології,

біохімії, фізіології? Глибоко переконані, що в нинішній системі підготовки студента молекулярна патологія має стати невід’ємним змістовним елементом саме нашої дисципліни.

Далі постає питання: де, у якому місці навчальної програми мають викладатись питання молекулярної патології. Звісно, що основи її слід подавати в розділах загальної патології.

Сьогодні ця частина навчальної дисципліни має чотири складові: (I) вчення про хворобу, етіологію і патогенез; (II) патогенна дія факторів зовнішнього середовища, роль внутрішніх факторів організму в патології; (III) типові патологічні процеси; (IV) типові порушення обміну речовин. Можливо є сенс дещо переформатувати програму, окремо виділивши розділ “загальні механізми розвитку патологічних процесів і хвороб”. Структура цього розділу мала б такий вигляд: (1) молекулярні основи патології (молекулярна патологія); (2) клітинні механізми патологічних процесів; (3) імунні механізми розвитку хвороб; (4) гуморальні механізми патологічних процесів і хвороб; (5) нервові механізми розвитку хвороб; (6) термінальні стани. Такий розділ у разі його виокремлення міг би посісти місце між нинішніми першим та другим і був би логічним містком до вивчення дії внутрішніх та зовнішніх етіологічних чинників і механізмів типових патологічних процесів. Легко бачити, що в цьому розділі новими по суті були б тільки питання молекулярної патології, весь інший матеріал уже передбачено в нинішній програмі дисципліни, тільки в різних її місцях.

Важливе значення мають не тільки питання, що саме і де викладати, а і як це робити. Враховуючи складність молекулярних механізмів і термінології, яка використовується для їх описання, слід, на наш погляд, широко застосовувати різні дидактичні методи і прийоми, аби полегшити розуміння і засвоєння навчального

матеріалу. До таких перш за все віднесемо систематизацію важливих наукових фактів, виділення основних закономірностей, які б ілюструвались окремими прикладами без глибокого проникнення в методичні і термінологічні аспекти проблеми.

Досвід кафедри патофізіології Сумського державного університету показує досить високу ефективність анімацій як дидактичного засобу на лекціях і практичних заняттях. Нині в нашому арсеналі є анімації, які ілюструють механізми апоптозу, онкогенезу, дію різних гормонів і медіаторів патологічних процесів на клітини, участь молекул адгезії у розвитку запалення тощо.

Напрямок другий – розвиток патофізіології як світоглядної основи медицини.

Цей шлях передбачає насамперед збереження традицій вітчизняної патофізіологічної школи на тлі бурхливого розвитку сучасної науки. Планку можна ставити й вище – не тільки зберігати, а й розвивати ці традиції.

Перш за все мовиться про розвиток загального вчення про хворобу, етіологію, патогенез, реактивність і резистентність – проблем, що завжди посідали центральне місце у вітчизняній патофізіології (див. вище). Про те, що на цих теренах є ще велика кількість нерозв'язаних питань, а отже і необхідність їхнього вивчення, свідчать хоча б гострі дискусії в середовищі самих патофізіологів довкола таких понять як “екзо- і ендопатогенез”, “патогенез і саногенез”, “адаптація і компенсація”, “патологічний процес і захисна реакція”, “пасивна і активна резистентність” тощо. На наш погляд, є нагальна потреба розвивати вчення і про кількісну характеристику хвороби взагалі, застосовувати математичні підходи до пошуку

“формули хвороби”.

Невід’ємним елементом у викладанні нашої дисципліни має бути шанування та об’єктивне висвітлення історії української патофізіології. Щороку наприкінці травня ми демонструємо на одній з останніх лекцій документальні фільми про Олександра Олександровича Богомольця, оцифровані копії яких нам люб’язно був подарував Ю.В.Биць. Вважаємо, що цим ми гідно завершуємо курс патофізіології і робимо свій внесок у патріотичне виховання майбутніх лікарів. Цій меті слугують також і щорічні читання ім. М.Н.Зайка, які кафедра започаткувала у 2008 р.

Патофізіологія була, є і буде надалі теоретичними підвалинами медицини. Але це її центральне місце в системі вищої медичної освіти потрібно оберігати, пропагувати і відстоювати.

Успішною ця діяльність буде тільки в тому разі, якщо наша дисципліна не стоятиме на місці, а буде розвиватися. Як і в якому напрямі – ось нагальні питання, над якими маємо думати, робити висновки і конкретні практичні кроки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Атаман О.В. Патофізіологія в запитаннях і відповідях. Видання четверте. – Вінниця: Нова книга, 2010. – 504 с.
2. Многотомное руководство по патологической физиологии / Под ред. Н.Н.Сиротинина. – М.: Медицина, 1966.
3. Патофізіологія / За ред. М.Н.Зайка і Ю.В.Биць. – К.: Медицина. – 703 с.
4. Pathophysiology. Concepts of Altered Health States / Ed. by C. M. Porth. – Philadelphia etc: Lippincott Williams and Wilkins. – 1582 p.
5. Pathophysiology of Disease / Ed. by S.J. McPhee, V.R. Lingappa, W.F. Ganong. – N.Y. etc: McGraw-Hill. – 760 p.
6. Robbins and Cotran pathologic basis of disease / Ed. by V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto. – Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. – 1522 p.

ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ



Василь Павлович Пішак (до 70-річчя з дня народження)

Василь Павлович Пішак – відомий учений, організатор науки і підготовки медичних кадрів вищої кваліфікації, член-кореспондент Академії педагогічних наук України, академік Академії наук вищої школи України, академік Національної академії наук України, доктор медичних наук, професор, заслужений працівник народної освіти України, лауреат державної премії України в галузі науки і техніки, премій ім. О.О. Богомольця НАН України та ім. Ю. Федьковича. Його наукові праці та багатогранна діяльність є значним внеском у медико-біологічні дослідження та у практику охорони здоров'я.

Народився ювіляр 3 листопада 1940 р. у селі Селище Сокирянського району Чернівецької області. Ще в далекому дитинстві він був найширішим прихильником світу ботаніки, зоології, біології. Після Селищанської семирічки подався аж до Бричан, що в сусідній Молдові, аби закінчити восьмий клас. Звідси 14-річним юнаком 1954 р. вступив до Чернівецького медичного училища.

З вересня 1960 р. Василь Пішак – студент першого курсу лікувального факультету Чернівецького медичного інституту, який блискуче закінчив у 1966 р. А в 1974 р. набуває ще один фах, закінчивши вечірнє відділення біологічного факультету Чернівецького державного університету ім. Юрія Федьковича. Він бере участь у студентських наукових конференціях Вінницького, Київського, Дніпропетровського та Донецького медичних інститутів. Перспективного молодого науковця помітили. Він щоразу повертається з нагородами з цих конференцій. Таким був початок його наукової роботи.

Закінчивши навчання в Чернівецькому медичному інституті, В.П. Пішак за рішенням Державної комісії з розподілу випускників інституту одержує направлення на наукову роботу асистентом кафедри медичної біології та генетики, де він працює і нині. Врешті, з Чернівецьким медичним інститутом пов'язане все його наступне життя. Послідовно обіймає посади асистента (1966), старшого викладача, доцента (1972), завідувача (1975) кафедри медичної біології та генетики. Наказом МОЗ України від 1998 р. кафедра медичної біології, паразитології та генетики Буковинського державного медичного університету призначена опорною і є організатором нарад завідувачів профільних кафедр медичних ВНЗ України III–IV рівнів акредитації, на яких постійно проводиться обмін передовим досвідом викладання медичної біології.

У 1971 р. В.П. Пішак захищає кандидатську дисертацію на тему: “Вміст натрію, калію, кальцію, магнію, заліза і хлоридів у біологічних середовищах при хронічному гепатиті і цирозі печінки”. У 1985 р. – докторську на тему: “Функціональні зв'язки епіфіза і нирок у хребетних”. У 1987 р. йому присвоєно вчене

звання професора. З 1973 по 1977 рр. він обіймає посаду заступника декана лікувального факультету, з 1981 по 1985 рр. – декана педіатричного факультету, з 1985 по 1993 рр. – декана лікувального факультету.

У 1993 р. Василь Павлович Пішак призначений на посаду ректора Чернівецького державного медичного інституту, яку обіймав до 2010 р. На цьому відповідальному посту розкривається непересячний талант вченого-організатора. В.П. Пішак бере активну участь у розробці та реалізації основних напрямків розвитку медичного інституту, об'єднує зусилля колективу на вирішення задач подальшого удосконалення та покращення навчально-методичної, наукової, організаторської, виховної та лікувальної роботи.

Під науковим керівництвом В.П. Пішака в Буковинському державному медичному університеті започатковані багатогранні хронобіологічні дослідження, організована одна з найбільших в Україні лабораторія з хронофізіології. Основні напрямки наукових досліджень В.П. Пішака пов'язані з питаннями нейроендокринології, а також структурної та функціональної організації хроноритмів людини і тварин. Його роботи носять новаторський характер і є частиною внеску в боротьбу з ендокринними, імунопатологічними, соматичними та іншими захворюваннями, що поширені на Буковині.

За редакцією В.П. Пішака та Ю.І. Бажори в 2004 р. видано підручник “Медична біологія” для медичних ВНЗ України III–IV рівнів акредитації, який у 2007 р. удостоєний Державної премії України в галузі науки і техніки.

Посилену увагу приділяє він вихованню наукових кадрів. Зокрема, під його керівництвом виконано 6 докторських і 18 кандидатських дисертацій. Успішно виконується ще 3 докторські та 9 кандидатських дисертацій.

За роки його керівництва покращилися показники наукової діяльності університету,

втричі зросла кількість аспірантів, магістрантів, клінічних ординаторів. Завдяки зусиллям В.П. Пішака тут створені найсприятливіші умови для молодих науковців.

З 1997 р. при науковому закладі започаткований журнал “Буковинський медичний вісник”, а в подальшому ще два фахові часописи – “Клінічна та експериментальна патологія” і “Клінічна анатомія та оперативна хірургія”, на сторінках яких постійно друкуються відомі вчені, в тому числі з близького та далекого зарубіжжя.

Василь Павлович Пішак – організатор та учасник багатьох наукових форумів з актуальних питань біології, медицини та охорони здоров'я, постійно проводить велику науково-дослідну, громадську та організаційну роботу. Він неодноразово обирався депутатом Чернівецької обласної та міської Рад народних депутатів, брав участь у роботі комісій з вивчення соціальних і медичних проблем краю, був членом наукової проблемної комісії МОЗ та АМН Радянського Союзу.

Різностороння діяльність В.П. Пішака відмічена урядовими нагородами. За заслуги в галузі охорони здоров'я він нагороджений орденом “Знак Пошани”, знаком “Відмінник охорони здоров'я”. У 1992 р. удостоєний почесного звання “Заслужений працівник народної освіти України”. У 2000 р. нагороджений відзнакою Президента України – орденом “За заслуги” III ступеня. Василь Павлович удостоєний титулу “Почесний громадянин міста Чернівці” (2000). У 2002 р. – удостоєний почесної відзнаки обласної держадміністрації “Медицина Буковини”. На засіданні Національної академії наук України (2003) В.П. Пішаку присуджено премію ім. О.О. Богомольця НАН України. У 2005 р. за вагомий внесок у розвиток медичної галузі В.П. Пішак отримав подяку від Президента України. У 2006 р. нагороджений орденом “За заслуги” II ступеня. Лауреат державної премії України в галузі

науки і техніки (2007).

Свій ювілей Василь Павлович зустрічає в розквіті творчих сил і наукових задумів. Особистість ця яскрава, цілісна, талановита, зігріта з середини світлом доброти, в якій є своя найвищість – він володіє здат-

ністю закохувати інших у те, в що залюблений сам, бо він пристрасно і безвідмовно вірний головній справі свого життя.

То ж віку Вам довгого, Професоре, снаги із сонця золотого і неба синього, добра землі і природи.



Олег Іванович Сукманський
(до 80-річчя з дня народження)

Виповнилося 80 років з дня народження і 60 років наукової та педагогічної діяльності доктора медичних наук, професора, заслуженого діяча науки і техніки України, керівника курсу патологічної фізіології Одеського державного аграрного університету, професора-консультанта Інституту стоматології АМН України Олега Івановича Сукманського.

О.І. Сукманський народився 2 січня 1931 р. у м. Дриса (нині Верхньодвинськ) Вітебської обл. Білорусії у сім'ї лікарів. У 1951 р. закінчив з відзнакою Вінницький державний медичний інститут і вступив до аспірантури при кафедрі патологічної фізіології Одеського державного медичного інституту, яку очолював відомий патофізіолог професор М.Н. Зайко. Тут він послідовно працює на посадах асистента (з 1954 р.), доцента (з 1960 р.), завідувача кафедри (з 1963 р.). У 1969 р. О.І. Сукманський захищає докторську дисертацію, у 1970 р. одержує звання професора. З 1969 по 1977 р. працює в Одеському НДІ стоматології на посаді завідувача лабораторії патофізіології і експериментального відділу. У 1977–1997 рр. завідує кафедрою

патологічної фізіології Дніпропетровського медичного інституту. У 1997 р. повертається до Одеси і очолює кафедру в Одеському сільськогосподарському інституті (з 2001 р. – Одеський державний аграрний університет), а також відділ в Одеському НДІ стоматології (з 2000 р. – Інститут стоматології АМН України.).

Науковий напрям О.І. Сукманського значною мірою сформувався під впливом його вчителя – М.Н. Зайка, під керівництвом якого він виконав кандидатську дисертацію, присвячену вивченню нервово-трофічних розладів у порожнині рота. Одним з перших у країнах СНД він застосовує метод радіоактивної індикації для вивчення мінерального обміну в тканинах зубів і виділення мінеральних речовин до слини. О.І. Сукманським та його учнями досліджено основні закономірності розвитку нейродистрофічного процесу в тканинах зубів, слинних залоз та слизової оболонки порожнини рота. Виділено інкрет слинних залоз паротин та вивчено його вплив на мінеральний обмін звапнілих тканин. Уперше в країнах СНД вивчено сіалотрофічний ефект, розроблено його оригінальні моделі та методи стимуляції продукції слинними залозами інкретів, ростових і трофічних факторів. Ці роботи започаткували новий, сіалотрофічний напрям наукових досліджень. На основі сіалотрофічної концепції розроблено метод корекції нервовотрофічних розладів, а також лікування ксеростомії та виразкової хвороби. Розроблено метод дослідження міграції лейкоцитів до порожнини рота, який застосовується у медичній практиці. В останні роки вивчено вплив фітоестрогенів (ізофлавононів) на метаболізм звапнілих тканин і можливості їх застосування для корекції остеодистрофічних процесів та експериментального пародонтиту. У двох монографіях О.І. Сукманського узагальнені дані про біологічно активні речовини слинних залоз. Ще дві монографії, написані у

співавторстві, присвячені фітоестрогенам та історії кафедри патологічної фізіології Одеського державного медичного університету. Він є співавтором підручника з патологічної фізіології за редакцією М.Н. Зайка, який витримав чотири видання кількома мовами і відзначений Державною премією України, а також членом авторського колективу підручника „Внутрішні хвороби тварин”, опублікованого в 2001 р. У співавторстві з С.І. Улизьком ним написано підручник „Ветеринарна гематологія”(2009). Йому належить низка публікацій з філософських проблем загальної патології. Всього у О.І. Сукманського понад 300 наукових і науково-популярних

публікацій. Він є автором двох винаходів. Під його керівництвом виконано 4 докторських і 12 кандидатських дисертацій.

Протягом багатьох років О.І. Сукманський очолював Одеське та Дніпропетровське товариства патофізіологів, був членом правління Всесоюзного товариства патофізіологів.

Незмінно є членом правління товариства патофізіологів України. Організував Третю конференцію патофізіологів України (1966) та Перший національний конгрес патофізіологів (1992). Є членом редколегії журналу „Вісник стоматології”.

Поздоровляємо Олега Івановича зі славним ювілеєм і бажаємо йому здоров'я, бадьорості та нових творчих звершень.