

# Фізіологічний журнал

ТОМ 57 № 3 2011

---

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

---

Виходить 1 раз на 2 місяці

---

## Зміст

<i>Дорофєєва Н.О., Гошовська Ю.В., Сагач В.Ф.</i> Мембранний потенціал мітохондрій серця і швидкість споживання кисню у щурів із генетично детермінованою артеріальною гіпертензією . . . . .	3
<i>Коркушко О.В., Іщук В.О., Шатило В.Б., Чижова В.П.</i> Резистентність до інсуліну та фізична працездатність людей середнього та літнього віку . . . . .	10
<i>Гарбузова В.Ю., Гур'янова В.Л., Пархоменко О.М., Досенко В.Є., Атаман О.В.</i> Частота алейних варіантів гена матричного Gla-протеїну у хворих з гострим коронарним синдромом . . . . .	16
<i>Кришталь Д.А., Падурану О.М., Болдирєв О.І., Кім О.Ю., Рекалов В.В., Шуба Я.М.</i> Зміни кальційзалежної калієвої провідності ізольованих гладеньком'язових клітин сечового міхура щурів при експериментальному діабеті . . . . .	25
<i>Макаренко М.В., Лизогуб В.С., Юхименко Л.І., Хоменко С.М.</i> Серцевий ритм у осіб з різним рівнем переробки слухової інформації . . . . .	33
<i>Горенко З.А., Карбовська Л.С., Вашека І.П., Весельський С.П.</i> Вплив кальцитоніну на зовнішньосекреторну функцію печінки у щурів . . . . .	40
<i>Коренюк І.І., Єпішкін І.В., Гамма Т.В., Хусайнов Д.Р.</i> Вплив похідних 1,5-бензодіазепіну на електричну активність нейронів <i>Helix albescens</i> Rossm . . . . .	49
<i>Сухомлин А.А., Берегова Т.В., Непорада К.С.</i> Зміни NO-ергічної системи слинних залоз в умовах омега-3-ліноєвої гіпергастрінемії . . . . .	59
<i>Володіна Т.Т., Дзвонкевич Н.Д., Петрунь Л.М., Крисюк І.П., Попова Н.М., Шандренко С.Г., Дмитренко М.П.</i> Зміни властивостей колагену, активності лізілоксидази при латиризмі . . . . .	62
<i>Лябах К.Г.</i> Оксид азоту, міоглобін і кисневий режим клітин: дослідження на математичних моделях . . . . .	70

## **ХРОНІКА**

*Maisky V.A.* My first 20 years in Neuroscience . . . . . 77

## **ІСТОРІЯ НАУК**

*Мойбенко А.А., Павлович С.И.* Научное наследие академика А.А. Богомольца  
(к 130-летию со дня рождения) . . . . . 89

Олег Олександрович Богомолець (до 100-річчя з дня народження) . . . . . 97

## **ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ**

Іван Іванович Коренюк (до 70-річчя з дня народження) . . . . . 104

## **РЕЦЕНЗІЇ**

Макарчук М.Ю. Мірошніченко М.С. До виходу навчального посібника “Основи  
молекулярної фізіології іонних каналів” Я.М. Шуби . . . . . 106

Н.О. Дорофєєва, Ю.В. Гошовська, В.Ф. Сагач

## Мембранний потенціал мітохондрій серця і швидкість споживання кисню у щурів із генетично детермінованою артеріальною гіпертензією

*У дослідженнях на щурах з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією і лінії Вістар (контроль) оцінювали ефективність функціонування мітохондрій серця за допомогою зіставлення рівня мембранного потенціалу, дихання та окисного фосфорилування. Вимірювання мембранного потенціалу і швидкості споживання кисню в суспензії мітохондрій серця здійснювали за допомогою ТРМР<sup>+</sup>-селективного електрода за методом, описаним М. Vrand. Процеси мітохондріального дихання і окисного фосфорилування досліджували за допомогою приладу «Оксиграф». Виявлено, що у щурів зі спонтанною гіпертензією мембранний потенціал мітохондрій серця становив  $-113,76 \text{ мВ} \pm 3,65 \text{ мВ}$  і був достовірно нижчим, ніж у контрольних тварин ( $-152,85 \text{ мВ} \pm 13,52 \text{ мВ}$ ,  $P < 0,01$ ), тоді як показники швидкості споживання кисню в стані відносного спокою  $V_2$  і  $V_3$  були достовірно збільшені ( $P < 0,001$ ). При одночасному зниженні (на 23,9 %;  $P < 0,05$ ) дихального контролю, який відображає ступінь спряження процесів дихання і фосфорилування. Отримані результати вказують на більш напружену роботу дихального ланцюга з пониженою енергетичною функцією мітохондрій серця тварин з гіпертензією. Зроблено висновок про функціональний зв'язок між особливостями мітохондріального енергозабезпечення і артеріальною гіпертензією.*

*Ключові слова:* мітохондрії, гіпертонія, мембранний потенціал.

### ВСТУП

Нині артеріальна гіпертензія є найбільш розповсюдженим захворюванням серцево-судинної системи. В Україні на цю патологію страждає понад третина дорослого населення [7, 12]. Артеріальна гіпертензія є чинником ризику багатьох важких серцево-судинних захворювань і у сукупності з розвиненими ускладненнями – головна причина смертності людей [12]. Проте до теперішнього часу механізм розвитку цього захворювання остаточно не з'ясований. Деякі автори пов'язують причину виникнення артеріальної гіпертензії з клітинно-тканинним дефіцитом енергії, який зумовлений порушенням процесу її перетворення в мітохондріях клітин і скороченням продукції АТФ [1–3, 9, 10]. Вста-

новлено, що у щурів із генетично детермінованою артеріальною гіпертензією знижена АТФ-синтезувальна здатність мітохондрій печінки та головного мозку [1, 3]. Автори припускають, що ці процеси можуть бути пов'язані з особливостями функціонування мембран мітохондрій [1, 3, 9, 10]. Як відомо, основними показниками ефективності функціонування мітохондрій є їх мембранний потенціал, процеси дихання і окисного фосфорилування. Однак у тварин зі спонтанною гіпертензією вони вивчені недостатньо.

Мета нашої роботи – оцінити ефективність функціонування мітохондрій серця щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією за допомогою зіставлення рівня мембранного потенціалу, дихання і окисного фосфорилування.

© Н.О. Дорофєєва, Ю.В. Гошовська, В.Ф. Сагач

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 36 білих щурах-самцях масою 250–300 г, які знаходилися на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Тварин було поділено на дві групи по 18 щурів у кожній. До контрольної групи ввійшли щури лінії Вістар, до дослідної – з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією. Експерименти проводили з дотриманням умов роботи з лабораторними тваринами. Мітохондрії серця щурів виділяли диференціальним центрифугуванням [5]. Ізольовані серця промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl, подрібнювали і гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25, ЕДТА – 1; рН 7,2–7,4. Гомогенат центрифугували при 700g 8 хв (4°C), а супернатант – повторно при 11000g 16 хв (4°C). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) суспендували в буфері (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25; рН (7,2–7,4). Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали методом Лоурі [17].

Вимірювання мембранного потенціалу мітохондрій здійснювали за методом, описаним Brand і співавт. [14, 18], який передбачає використання ліполітичного катіона - метилтрифенілфосфоніум броміду (TRMP<sup>+</sup> від англ. triphenyl-methylphosphonium bromide) і чутливого до нього електрода (TRMP<sup>+</sup>-електрод). Установка для вимірювання мембранного потенціалу в суспензії мітохондрій була створена на базі відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Вона складається з термостатованої (37°C) камери об'ємом 1 мл, TRMP<sup>+</sup>-селективного і референтного електродів, а також електрода Кларка, який дає змогу одночасно реєструвати рівень споживання кисню в суспензії мітохондрій (рис. 1). Сигнал з електродів передається через потенціометр „Sartorius” (Німеччина) і газоаналізатор BMS 3 Mk 2 (Данія) на плату

АЦП L-card і реєструється на персональному комп'ютері за допомогою програмного забезпечення, розробленого у відділі. Мітохондрії інкубували в середовищі, що містить 120 ммоль/л KCl, 25 ммоль/л тріс-НСl, 3 ммоль/л КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 5 % знежиреного бичачого сироваткового альбуміну; рН (7,2–7,4). У герметичну термостатовану камеру (37°C) з TRMP<sup>+</sup>-селективним електродом вносили мітохондрії з розрахунку 0,5 мг/мл білка. Для ініціації дихання і генерації мітохондріями мембранного потенціалу додавали в камеру 10 мкл сукцинату натрію (5 ммоль/л). Мембранний потенціал мітохондрій ( $\Delta\psi$ ) розраховували за рівнянням Нернста:

$$\Delta\psi = (RT/zF) \ln (a_{\text{out}} / a_{\text{in}}),$$

де R – універсальна газова константа, T – абсолютна температура, z – валентність і F – константа Фарадея,  $a_{\text{out}}$  і  $a_{\text{in}}$  – активність жиророзчинних іонів усередині організму і в середовищі інкубації.

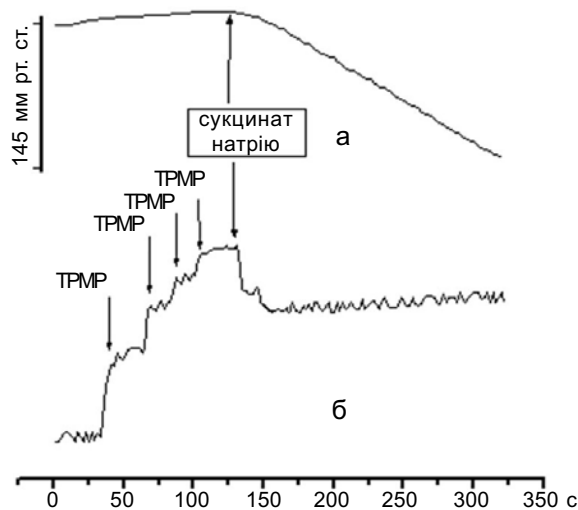


Рис. 1. Одночасна реєстрація мембранного потенціалу і швидкості споживання кисню в суспензії мітохондрій: а – полярографічна крива (зниження її свідчить про поглинання кисню суспензією мітохондрій); б – реєстрація даних з TRMP<sup>+</sup>-чутливого електрода («падіння» свідчить про напрацювання мембранного потенціалу у відповідь на введення субстрату – сукцинату натрію)

Процеси мітохондріального дихання та окисного фосфорилування досліджували полярографічним методом з використанням закритого електрода Кларка за допомогою прилада "Oxygraph" («Hansatech instruments», Великобританія). Функціональний стан мітохондрій визначали методом Чанса та Вільямса [15]. Як субстрат окиснення використовували 20 мкл сукцинату натрію (5 ммоль/л). Дихання стимулювали додаванням 200 мкмоль/л АДФ.

При дослідженні функціонального стану комплексів дихального ланцюга ізольованих мітохондрій серця розраховували наступні параметри:  $V_2$  – швидкість дихання мітохондрій у стані відносного спокою; в стані 2 за Чансом, за наявності субстрату окиснення сукцинату натрію та відсутності акцептора фосфату (АДФ);  $V_3$  – швидкість фосфорилувального дихання мітохондрій (у метаболічному стані 3 за Чансом, при високому вмісті в середовищі інкубації субстрату сукцинату натрію, та за наявності АДФ);  $V_4$  – швидкість контрольованого дихання мітохондрій (у метаболічному стані 4 за Чансом, коли закінчується АДФ, при високому вмісті в середовищі інкубації субстрату сукцинату натрію); дихальний контроль за Чансом – відношення  $V_3$  до  $V_4$ ; АДФ/О – коефіцієнт ефективності фосфорилування.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel 2003. Достовірність показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами виявлено, що мембранний потенціал мітохондрій у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією був достовірно зниженим (рис. 2).

У суспензії мітохондрій серця щурів зі спонтанною гіпертензією значення мембранного потенціалу мітохондрій становило  $-113,76 \text{ мВ} \pm 3,65 \text{ мВ}$ , а у контрольній групі –  $-152,85 \text{ мВ} \pm 13,52 \text{ мВ}$  ( $P < 0,01$ ). Враховуючи, що у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією мембранний потенціал мітохондрій зменшений, можна припустити що саме це може зумовлювати зниження АТФ-синтезувальної їх здатності.

Оскільки дихальний ланцюг взаємопов'язаний з мембранним потенціалом мітохондрій [16] одночасно ми досліджували їх дихання. Виявлено, що у щурів зі спонтанною гіпертензією швидкість споживання кисню в суспензії мітохондрій серця була на 60,0 % вищою (рис. 3), ніж в контрольній групі ( $P < 0,05$ ).

Крім того, оцінювали швидкість споживання кисню в різних функціональних станах мітохондрій за Чансом. Показано, що у щурів зі спонтанною гіпертензією швидкість споживання кисню у стані відносного спокою  $V_2$  була на 62,3 % вищою, ніж у контрольній групі ( $P < 0,001$ ). Також у них було достовірно збільшене значення АДФ-стимульованого дихання  $V_3$  ( $P < 0,05$ ). Це вказує на інтенсифікацію процесів фосфорилування, однак збільшення даного показника не супроводжувалося підвищенням ефективності фосфо-

**Показники дихання мітохондрій серця щурів зі спонтанною гіпертензією та щурів контрольної групи в різних функціональних станах мітохондрій (нмоль  $\text{O}_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка)**

Показники	Контрольна група	Щури зі спонтанною гіпертензією
$V_2$	$42,83 \pm 2,72$	$69,5 \pm 6,16^{**}$
$V_3$	$87,4 \pm 6,01$	$117,2 \pm 12,3^*$
$V_4$	$20,14 \pm 2,92$	$30,5 \pm 2,29^*$
Дихальний контроль за Чансом ( $V_3/V_4$ )	$4,57 \pm 0,34$	$3,48 \pm 0,44^*$
АДФ/О	$1,79 \pm 0,10$	$1,68 \pm 0,20$

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$

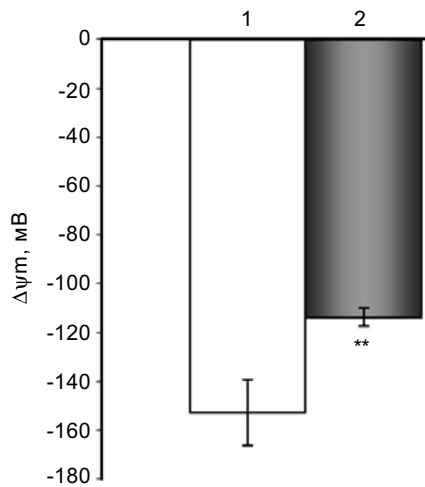


Рис. 2. Значення мембранного потенціалу мітохондрій у суспензії мітохондрій серця: 1 – контрольна група; 2 – щури з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією. \*\*P<0,01

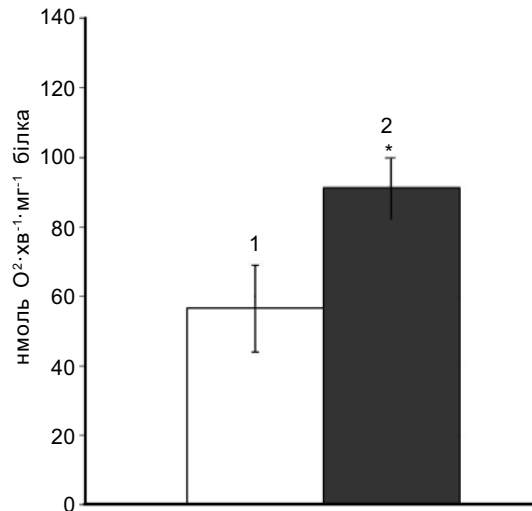


Рис. 3. Швидкість споживання кисню в суспензії мітохондрій серця: 1 – контрольна група; 2 – щури з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією. \*P<0,05

рилювання (АДФ/О). У щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією знизився на 23,9 % дихальний контроль (P<0,05), який відображає ступінь спряження процесів дихання і фосфорилування.

Отримані результати вказують на збільшення інтенсивності процесів окиснення і фосфорилування при зниженні спряження цих процесів у мітохондріях серця тварин зі спонтанною гіпертензією. Нативні криві

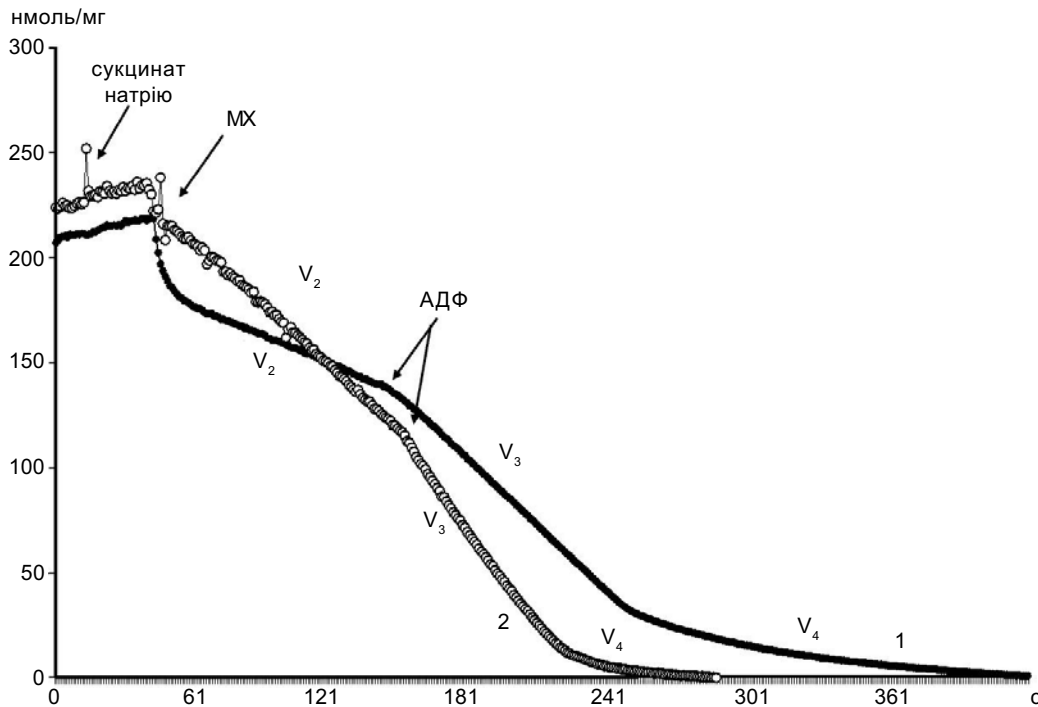


Рис. 4. Нативні криві споживання кисню у контрольних щурів (1) і щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією (2)

споживання кисню у контрольних та щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією показані на рис.4.

Відомо, що мембранний потенціал мітохондрій ( $\Delta\psi_m$ ) створюється електрохімічним градієнтом протонів по обидва боки мембрани і відіграє важливу роль у функціонуванні клітин. Він формує головний компонент електрохімічного потенціалу. Різниця електрохімічних потенціалів протонів ( $\Delta\mu_H^+$ ) є рушійною силою для роботи АТФ-синтази, оскільки електродифузійне перенесення протонів з навколишнього середовища в матрикс необхідне для обертання каталітичної субодиниці F1, і таким чином синтезується АТФ, забезпечуючи адекватне енергозабезпечення органів. За наявності субстратів і кисню в дихальному ланцюзі мітохондрій відбувається перенесення електронів, яке в точках спряження супроводжується витоком протонів через мембрану (один електрон - один протон) з матриксу в зовнішнє середовище. Цієї енергії ( $\approx 220$  мВ) досить для синтезу АТФ з АДФ і ортофосфату.

Зниження значення мембранного потенціалу мітохондрій, що ми зареєстрували у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією, може свідчити про пригнічення у них синтезу АТФ.

Це підтверджується даними літератури. В експериментальних роботах у щурів зі спонтанною гіпертензією встановлена тенденція до зниження вмісту АТФ при збільшенні АМФ, зменшенні відношення АТФ/АДФ і зниженні енергетичного заряду в тканинах серця, печінки, селезінки [8]. Крім того, дані клінічних досліджень показують зменшення вмісту АТФ в еритроцитах хворих з артеріальною гіпертензією [4, 19], а також креатинфосфату і відношення АТФ/Фн у біоптаті тканин скелетних м'язів [21].

Серце є органом дуже чутливим до енергодефіциту. Тому можна припустити, що мітохондрії у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією ви-

мушені працювати з більшим напруженням для забезпечення адекватного функціонування серця. Це підтверджує виявлене нами підвищення швидкості споживання кисню у стані  $V_3$  у щурів зі спонтанною гіпертензією. Проте таке енергозабезпечення є менш ефективним, особливо при значних навантаженнях і стресі. При стресі відбувається інтенсифікація швидкості споживання кисню мітохондріями, «гіперактивація» окиснення сукцинату натрію значно знижує роль НАД-залежних субстратів у загальному метаболічному окисненні [11]. Згідно з даними Лук'янової [6] вплив екстремальних чинників призводить до стану біоенергетичної гіпоксії. Nicholls [19] встановив, що при збільшенні швидкості споживання кисню мітохондріями менше часу електрони затримуються в критичних ділянках, в яких можливий витік протонів, необхідний для обертання каталітичної субодиниці F1 АТФ-синтази і синтезу АТФ. Нами визначено, що вихідні значення показників функціонального стану мітохондрій серця істотно відрізняються у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією і щурів контрольної групи. Достовірне зниження мембранного потенціалу мітохондрій, може пояснювати зменшення синтезу АТФ у щурів зі спонтанною гіпертензією. Про що свідчить зниження спряження процесів окиснення і фосфорилування в мітохондріях серця цих тварин.

## ВИСНОВКИ

Нами виявлені особливості функціонування мітохондрій серця у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією, які впливають на енергозабезпечення діяльності серця. Зокрема, виявлено зниження мембранного потенціалу мітохондрій, збільшення швидкості споживання кисню, підвищення показників  $V_2$  і  $V_3$ , при зниженні дихального контролю, який відображає ступінь спряження процесів окиснення і фосфорилування.

**Н. О. Дорофєєва, Ю. В. Гошовська,  
В.Ф. Сагач**

**МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ МІТОХОНДРІЙ  
СЕРЦЯ І ШВИДКІСТЬ СПОЖИВАННЯ  
КИСНЮ У ЩУРІВ З ГЕНЕТИЧНО  
ДЕТЕРМІНОВАНОЮ АРТЕРІАЛЬНОЮ  
ГІПЕРТЕНЗІЄЮ**

В исследованиях на крысах с генетически детерминированной артериальной гипертензией и линии Вистар (контроль) оценивали эффективность функционирования митохондрий сердца посредством сопоставления уровня мембранного потенциала, дыхания и окислительного фосфорилирования. Измерения мембранного потенциала и скорости потребления кислорода в суспензии митохондрий сердца осуществляли с помощью ТРМР<sup>+</sup>-селективного электрода, а также прибора "Оксиграф". Выявлено, что у крыс с генетически детерминированной артериальной гипертензией мембранный потенциал митохондрий сердца составлял  $-113,76 \text{ мВ} \pm 3,65 \text{ мВ}$  и был достоверно ниже, чем у контрольных животных ( $-152,85 \text{ мВ} \pm 13,52 \text{ мВ}$ ,  $P < 0,01$ ), тогда как скорости потребления кислорода в состоянии относительного покоя  $V_2$ , активного состояния органелл  $V_3$  были достоверно увеличены ( $P < 0,001$ ). При этом у них отмечалось снижение дыхательного контроля (на 23,9 %;  $P < 0,05$ ), отражающего степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования. Полученные результаты указывают на более напряженную работу дыхательной цепи митохондрий со сниженной энергообразующей функцией митохондрий сердца животных с генетически детерминированной артериальной гипертензией. Сделан вывод о функциональной связи между особенностями митохондриального энергообеспечения и артериальной гипертензией. Ключевые слова: митохондрии, гипертония, мембранный потенциал.

**N. Dorofeyeva, Yu. Goshovska, V.F. Sagach**

**THE MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND OXYGEN CONSUMPTION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS**

We investigated the mitochondrial membrane potential and processes of respiration and oxidative phosphorylation in suspension of cardiac mitochondria from 6 month old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar (as a control) male rats. The mitochondrial membrane potential and the speed of oxygen consumption were measured using the method described by M.Brand (1995). Processes of respiration and oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria were measured using Oxygraph (Hansatech instruments, Norfolk, England). It has been found that in SHR the mitochondrial membrane potential was lower ( $-113,76 \text{ mV} \pm 3,65 \text{ mV}$ ) compared to Wistar rats ( $\Delta\psi_m = -152,85 \text{ mV} \pm 13,52 \text{ mV}$ ,  $p < 0,01$ ). In SHR, the respiration rate in state  $V_2$  by Chance and  $V_3$  were in-

creased compared to Wistar rats ( $p < 0,001$ ). The respiration control by Chance was depressed by 23,9% in SHR compared to Wistar rats. Our data demonstrate, that SHR have some features of functioning of cardiac mitochondria which distinguish them from the Wistar rats. Our data suggest a functional link between mitochondrial energy supply and arterial hypertension.

Key words: mitochondria, hypertension, membrane potential.

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

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Будников Е.Ю., Постнов А.Ю., Дорошук А.Д., Афанасьева Г.В., Постнов Ю.В. Сниженная АТФ-синтезирующая способность митохондрий печени спонтанно гипертензивных крыс (SHR): роль кальциевой перегрузки митохондрий // Кардиология. – 2002. – № 12. – С. 47–50.
2. Гогін С.Є. Синдром артеріальної гіпертонії як ознака дезадаптаційних порушень // Клін. медицина. – 2002. – № 11. – С. 4–9.
3. Дорошук А.Д., Постнов А.Ю., Афанасьева Г.В., Будников Е.Ю., Постнов Ю.В. Сниженная АТФ-синтезирующая способность митохондрий клеток головного мозга крыс со спонтанной гипертензией (SHR) // Кардиология. – 2004. – № 3. – С. 64–65.
4. Емелина Л.П. Некоторые фосфорно-энергетические показатели крови у больных гипертонической болезнью // Врач. дело. – 1972. – №8. – С. 10–13.
5. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия // Биохимия. – 1985. – 50, №8. – С. 1350–1361.
6. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // БЭБиМ. – 1997. – 124, №9. – С.244–254.
7. Нагорная Н.В., Пшеничная Е.В., Бордюгова Е.В. Артериальная гипертензия у детей. Современные подходы к диагностике, лечению, профилактике // Тавр. мед.-биол. вестн. – 2009. – 12, №2 (46). – С.105–111.
8. Писаренко О.И., Студнева И.М., Постнов А.Ю. Особенности энергетического состояния тканей при спонтанной гипертензии крыс // Кардиология. – 1998. – 12, №37. – С. 37–40.
9. Постнов Ю.В. К развитию мембранной концепции патогенеза первичной гипертензии: нарушенная функция митохондрий и энергетический дефицит // Там же. – 2000. – № 10. – С. 4–12.
10. Постнов Ю.В., Орлов С.Н., Будников Е.Ю., Дорошук А.Д., Постнов А.Ю. Нарушение преобразования энергии в митохондриях клеток с уменьшением синтеза АТФ как причина стационарного повышения уровня системного артериального давления // Там же. – 2008. – № 8. – С. 49–59.



11. Ткаченко Г.М., Кургалюк Н. М. Вплив активатора  $K_{ATP}$ -каналів – пінацидину на функціонування мітохондрій печінки щурів із різною резистентністю до гіпоксії за стресу // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, №1. – С. 56–64.
12. Фоміна И.Г., Дьякова Т.А. Гипертрофия левого шлуночка при артериальной гипертензии и риск развития аритмий // Кардиовас. терапия и профилактика. – 2006. – №5(8). – С. 83.
13. Чернобривенко А.А. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и артериальная гипертензия // Новости медицины и фармации. – 2005. – № 16. – С.13–14.
14. Brand M.D. Measurement of mitochondrial proton-motive force. Bioenergetics: A Practical Approach, IRL Press, Oxford. – 1995. – P. 39–62.
15. Chance B., Williams G. The respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation // Adv. Enzymol. – 1956. – **17**. – P. 65–134.
16. Duchen Michael R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology // Mol. Aspects Med. – 2004. – **25**. – P. 365–451.
17. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with the Folling phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265–275.
18. Nadtochiy S.M., Tompkins A., Brookes P.S. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and precondition: implications for pathology ancardioprotection // Biochem J. – 2006. – **395**. – P. 611–618.
19. Nicholls D.G. Mitochondrial membrane potential and aging // Aging Cell. – 2004. – № 3. – P. 35–40.
20. Resnick L.M., Gupta R.K., Barbagallo M., Laragh J.H. Is the higher incidence of ischemic disease in patients with hypertension and diabetes related to intracellular depletion of high energy metabolites? // Amer. J. Med. Sci. – 1994. – **307**: Suppl 1. – P. 66–69.
21. Ronquist G., Soussi D., Frithz G. Disturbed energy balance in skeletal muscle of patients with untreated primary hypertension // J. Intern. Med. – 1995. – **238**. – P.167–174.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,  
Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 24.01.2011*

О.В. Коркушко, В.О. Ішук, В.Б. Шатило, В.П. Чижова

## Резистентність до інсуліну та фізична працездатність людей середнього та літнього віку

*У 43 людей середнього і літнього віку без ожиріння (індекс маси тіла менше ніж 30 кг/м<sup>2</sup>) вивчений зв'язок між інсулінорезистентністю (ІР) і фізичною працездатністю. Показано, що у здорових людей літнього віку ІР асоціюється з помірним підвищенням вмісту інсуліну і незначним глюкози в плазмі крові. У людей середнього віку ІР не впливає на показники фізичної працездатності. У той же час як у літніх ІР супроводжується її зниженням за рахунок менш економного гемодинамічного забезпечення навантаження і споживання кисню. Нижчу толерантність до фізичного навантаження у літніх людей без ожиріння можна розглядати не тільки як фактор ризику розвитку ІР, але і як її наслідок.*

*Ключові слова: фізична працездатність, інсулінорезистентність, середній вік, літній вік.*

### ВСТУП

Згідно з даними Reaven і співавт. [17], близько 25 % популяції може мати інсулінорезистентність (ІР). Показано, що резистентність до інсуліну є провісником розвитку метаболічного синдрому та цукрового діабету (ЦД) 2-го типу [16]. Крім того, нині з ІР пов'язують розвиток артеріальної гіпертензії (АГ), ішемічної хвороби серця (ІХС), синдрому полікістозного яєчника у жінок і еректильною дисфункції у чоловіків, хвороби Альцгеймера, хронічного запалення, ожиріння, хронічного стресу, старіння [9].

Ще в середині ХХ сторіччя вчені відмітили, що у хворих з ІХС, АГ, ЦД 2-го типу порушена фізіологічна реакція тканин на вплив інсуліну (якщо вміст глюкози в крові високий, то здоровий організм виробляє додаткову кількість інсуліну для утилізації глюкози тканинами). Однак у хворих, що страждають на перераховані вище захворювання, додаткова кількість інсуліну не призводить до утилізації глюкози, і цей стан розглядається як ІР. Згодом ендокринний апарат підшлункової залози втрачає здатність компенсувати ІР тканин за рахунок

викиду інсуліну, що спричинює порушення толерантності до вуглеводів і ЦД 2-го типу.

Взаємозв'язок фізичної активності та смертності від ЦД 2-го типу відзначено в багатьох дослідженнях [5]. Вивчення різних способів корекції ІР у дослідженні DPP показало, що інтенсивна модифікація способу життя (зниження надлишкової маси, помірної фізичної активності) призвела до зменшення частоти розвитку ЦД в осіб з порушеною толерантністю до глюкози, і цей позитивний ефект набагато перевершував ефективність медикаментозної терапії цукорзнижувальними препаратами [15]. Більше того, зниження індексу НОМА (від англ. homeostasis model assessment – оцінка гомеостатичної моделі) при тривалих фізичних тренуваннях корелює з підвищенням рівня максимального споживання кисню, що свідчить про ключову роль нормалізації вуглеводного обміну в забезпеченні фізичної працездатності [12].

Позитивний вплив фізичного навантаження при порушенні вуглеводного обміну відомий добре, що зумовлено підвищенням толерантності до вуглеводів під час м'язового навантаження, оскільки

остання здійснюється за рахунок енергії окиснення жирів і вуглеводів. Фізичні навантаження активують фізіологічні механізми, які сприяють стимулювальним регуляторним впливам кори головного мозку на всі системи організму. У здорових людей без ІР вони підвищують максимальне споживання кисню, знижують вміст тригліцеридів у сироватці крові і секрецію інсуліну у відповідь на прийом глюкози. Численними дослідженнями встановлено, що у хворих на ЦД при фізичній роботі підвищується зв'язування інсуліну еритроцитами, збільшується афінність інсулінових рецепторів моноцитів, поліпшується метаболізм, знижуються глікемія, вміст кетонів тіл, скорочується потреба в інсуліні, що свідчить про зменшення ІР [18].

При фізичному навантаженні збільшується споживання глюкози працюючими м'язами майже в 20 разів порівняно з періодом спокою. Більшість дослідників розділяють точку зору, відповідно до якої основна роль у засвоєнні глюкози працюючими м'язами належить інсулінові, але ефективність останнього залежить від глікогенолізу та швидкості окиснення жирних кислот у м'язах. Катехоламіни регулюють обидва процеси, причому невелике підвищення їхнього вмісту поліпшує процеси поглинання глюкози м'язами, тоді як їх викид у великій кількості пригнічує їх.

У здорових людей у період помірного фізичного навантаження спостерігається негативний зворотний зв'язок між утворенням глюкози печінкою і вмістом її в крові. У хворих на ЦД 2-го типу ці взаємини порушені. Утилізація глюкози в них у період фізичного навантаження знижена (але вірогідно не відрізнялася від здорових), тоді як її утворення печінкою знижено значно. Ці зміни пояснюються автором порушенням глюкорегуляторного позапанкреатичного механізму [11].

Зміни обміну речовин і секреція гормонів, що регулюють підтримку енергетичного гомеостазу в організмі, неоднакові при

короткочасному і тривалому фізичному навантаженні. У перші 5–10 хв навантаження джерелом енергії є глікоген м'язів, але його запаси незначні порівняно з жировою тканиною. При подальшому фізичному навантаженні організм переходить на енергозабезпечення внаслідок окиснення жирів, що супроводжується підвищенням вмісту вільних жирних кислот (ВЖК) у крові. При цьому підвищуються активність ліпопротеїнової ліпази в м'язах, концентрація довголанцюгової ацетил-КоА, що інгібує активність піруватдегідрогенази, і знижується окиснення глюкози, а також активність малоніл-КоА. Це сприяє підвищенню окиснення жирних кислот. Поряд зі зниженням утилізації глюкози розвивається виражена ІР і підвищується активність глікогенсинтази та відновлює запаси глікогену в м'язах, котрий був майже цілком витрачений у перший період фізичного навантаження. За рахунок цього вміст глюкози в крові, незважаючи на її підвищену утилізацію на периферії, на початку навантаження практично не змінюється. Далі він знижується. У практично здорових людей через 2–3 год інтенсивної роботи і при відсутності вживання їжі розвивається гіпоглікемія. Тривале фізичне навантаження (понад 1–2 год) супроводжується зниженням вміст інсуліну і тестостерону в сироватці крові, помірним збільшенням концентрації глюкагону, катехоламінів, кортизолу, пролактину, тиреотропного гормону і значним збільшенням вмісту соматотропного гормону.

Зниження фізичної працездатності при ожирінні в осіб з і без ІР відзначено раніше [14]. З іншого боку, цей процес асоціюється з передчасним старінням і підвищеним ризиком розвитку серцево-судинної патології [2]. Слід зазначити, що в людей молодого і середнього віку без ожиріння ІР не призводить до істотного зниження толерантності до фізичного навантаження [3]. Зміни ж параметрів фізичної працездатності в людей літнього віку без ожиріння

ріння, але з наявністю ІР практично не вивчена.

Метою нашого дослідження була порівняльна оцінка впливу стану ІР на рівень фізичної працездатності в здорових людей середнього і літнього віку.

## МЕТОДИКА

Обстежено 65 людей віком від 20 до 80 років. На підставі анамнезу й об'єктивного обстеження, у тому числі лабораторно-інструментального, у них була виключена патологія серцево-судинної, дихальної, ендокринної, сечовивідної і нервової систем. У дослідження не включали людей з індексом маси тіла (ІМТ) понад 30 кг/м<sup>2</sup> (тобто з ожирінням) і що мають метаболічний синдром за АТР-III (від англ. Adult Treatment Panel) [4, 7]. Для визначення рівня фізичної працездатності, а також для виключення патології серцево-судинної системи усім учасникам дослідження проводили тест із фізичним навантаженням на велоергометрі (за протоколом ВООЗ 25) до досягнення субмаксимальної частоти серцевих скорочень (ЧСС) з аналізом вмісту газів у вдихуваному і видихуваному повітрі апаратом «Охусон-4» (Нідерланди) для визначення споживання кисню під час навантаження. За отриманими на субмаксимальному навантаженні результатами за формулою Добельна розраховували максимальне споживання кисню [19]:

$$MCK = 1,29 \sqrt{\frac{Nk}{(F - 60)}} \times e^{-0,00884 \times A},$$

де МСК - максимальне споживання кисню, л/хв; Nk - потужність на останнього рівня навантаження (час виконання рівня не менше ніж 2 хв), кгм/хв; F - максимальна ЧСС на висоті проби, хв<sup>-1</sup>; A - вік, роки; e - експонентна функція числа.

Діагностика резистентності до інсуліну ґрунтувалася на визначенні індексу НОМА за загальноновизнаною методикою [13]. До ІР відносили пацієнтів з індексом НОМА більш ніж 2,77. Концентрацію глюкози в

цільній крові визначали глюкометром («Accu-Chek Go», Швейцарія) з перерахуванням на таку в плазмі крові (коефіцієнт 1,11) [6]. Вміст інсуліну в плазмі крові визначали імунорадіометричним методом набором Insulin(e) IRMA KIT фірми «Immupotech» (Чеська Республіка) за допомогою γ-лічильника для виміру активності <sup>125</sup>I. На етапі скринінгу в 22 молодих людей не було випадків ІР. У групу середнього віку (від 40 до 64 років) включені 22 чоловіка (по 11 осіб з і без ІР), група людей літнього віку (від 65 до 79 років) складалася з 21 чоловіка, з них 8 з ІР і 13 без ІР.

Результати представлені у виді середньої ± помилка середньої. Статистичну обробку матеріалу проводили за допомогою програми Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як впливає з табл. 1, групи людей літнього віку вірогідно не відрізнялися за основними антропометричними показниками. Слід відмітити, що ІМТ у людей середнього віку з ІР і без неї практично був однаковим. Хоча в людей з ІР (як середнього віку, так і в літніх) відзначалася тенденція до його підвищення. Цю залежність підтверджують результати кореляційного аналізу між індексом НОМА і ІМТ (r=0,37, P<0,05). Достовірне збільшення вмісту глюкози плазми крові (натще) відзначено в людей середнього віку з ІР, хоча його значення не перевищувало фізіологічну норму. У людей з ІР літнього віку порівняно з особами середнього віку спостерігалася більш висока концентрація інсуліну. Це може свідчити про те, що вікові зміни призводять до гіперінсулінемії як компенсаторної реакції на зниження чутливості тканин до гормону. Вірогідно більш низьке розрахункове МСК у людей похилого віку з ІР підтверджує зниження в них фізичної працездатності. У групі людей середнього віку з ІР абсолютне значення потужності субмаксимального фізичного навантаження

не відрізнялося від такого у людей без ІР цієї самої вікової групи, але при розрахунку показника з урахуванням маси тіла визначена тенденція до її зниження, як і більш низьке розрахункове МСК.

Зниження фізичної працездатності при формуванні метаболічного синдрому показано в декількох дослідженнях [3, 5]. Порушення чутливості м'язової тканини до інсуліну спричинює зменшення споживання глюкози під час фізичного навантаження, погіршення її енергетичного забезпечення і більш швидкої втоми [1, 8, 14]. Вікові зміни метаболізму впливають на енергетичне забезпечення фізичного навантаження. Раніше нами було показано [1], що короткочасне інтенсивне навантаження викликає більш значне зниження концентрації глюкози в крові в літньому віці порівняно з молодими. Цим пояснюється розвиток втоми і відмова від подальшого виконання навантаження людьми літнього віку. До

того ж після інтенсивного фізичного навантаження у них у період відновлення сповільнена нормалізація концентрації глюкози і ВЖК у крові [1]. Крім того, в осіб з ІР при фізичному навантаженні знижується економічність функціонування серцево-судинної системи, що пов'язано з активацією симпатичної нервової системи [10]. Нами показано, що навіть за відсутності ожиріння ІР може впливати на фізичну працездатність. Однак у середньому віці цей вплив менш виражений, чим у літньому (табл. 1). Причиною вікових відмінностей є менш економічна робота серцево-судинної системи у літніх людей з ІР при фізичному навантаженні. Так, на 2-й хвилині дозованого навантаження потужністю 50 Вт у них значно підвищується ЧСС порівняно з аналогічною віковою групою людей без ІР, а також спостерігається тенденція до більш високого споживання кисню (табл. 2). Реакція артеріального тиску на таке наван-

Таблиця 1. Характеристика груп обстежених здорових людей

Показники	Без інсулінорезистентності (n=22)		З інсулінорезистентністю (n=21)	
	середній вік (n=11)	літній вік (n=11)	середній вік (n=13)	літній вік (n=8)
Вік, роки	55,7±2,1	72,7±1,6	57,0±2,5	70,7±0,9
Зріст, см	167,3±2,3	168,0±1,9	172,2±3,0	163,4±2,6***
Маса, кг	72,4±4,2	76,2±2,6	85,1±5,2*	78,6±5,8
Індекс маси тіла, кг/м <sup>2</sup>	25,9±1,5	27,0±0,8	28,1±1,2	28,6±1,1
Обхват, см				
талії	84,3±3,7	93,8±2,7	95,9±5,9*	94,5±5,5
стегон	98,8±3,8	105,8±1,8	105,6±3,9	109,2±4,5
Інсулін, мкМО/мл	6,1±0,9	6,1±0,7	16,5±1,6*	22,5±4,8**
Глюкоза плазми крові, ммоль/л	6,1±0,2	6,0±0,1	6,8±0,3*	6,3±0,1
Індекс НОМА	1,7±0,3	1,6±0,2	5,0±0,7*	6,2±1,3**
Потужність субмаксимального навантаження, Вт	133,3±10,2	116,7±11,2	130,6±11,6	82,1±11,9***
Потужність субмаксимального навантаження в перерахунку на масу тіла, Вт/кг	1,9±0,2	1,5±0,1	1,7±0,1	1,1±0,1***
Максимальне споживання кисню за формулою Добельна, мл · хв <sup>-1</sup> · кг <sup>-1</sup>	32,3±2,7	27,3±1,8	28,0±3,1	22,9±2,1***

Примітки. Тут і в табл. 2: P < 0,05 \* порівняно з групою середнього віку без інсулінорезистентності, \*\* порівняно з групою літнього віку без інсулінорезистентності, \*\*\* порівняно з групою середнього віку з інсулінорезистентністю.

Таблиця 2. Показники гемодинаміки у здорових людей при виконанні проби з фізичним навантаженням

Показники	Без інсулінорезистентності (n=22)		З інсулінорезистентністю (n=21)	
	середній вік (n=11)	літній вік (n=11)	середній вік (n=13)	літній вік (n=8)
До проведення проби в стані спокою				
Артеріальний тиск, мм рт. ст.				
систолический	128,2±4,9	126,2±3,6	132,6±5,0	126,6±3,1
діастолічний	73,2±2,4	75,8±1,5	83,8±2,9	78,7±2,9
Частота серцевих скорочень, хв <sup>-1</sup>	70,0±3,2	73,8±3,4	68,6±2,6	76,4±2,3
Споживання кисню, мл · кг <sup>-1</sup> · хв <sup>-1</sup>	5,2±0,28	4,9±0,23	5,0±0,25	4,3±0,21***
Навантаження 50 Вт, 2 хв				
Артеріальний тиск, мм рт. ст.				
систолический	150,2±7,6	151,0±5,0	157,8±8,9	157,9±6,3
діастолічний	90,0±4,7	84,0±1,7	92,9±3,8	89,1±3,2
Частота серцевих скорочень, хв <sup>-1</sup>	97,8±2,8	97,3±9,6	96,7±4,2	111,9±5,5***.***
Споживання кисню, мл · кг <sup>-1</sup> · хв <sup>-1</sup>	13,9±0,8	14,4±0,7	12,9±0,9	15,5±0,6***
Субмаксимальне навантаження				
Артеріальний тиск, мм рт. ст.				
систолический	182,5±7,6	183,2±8,3	187,0±9,0	177,6±3,8
діастолічний	83,0±5,5	81,7±3,0	90,9±3,5	86,7±3,8
Частота серцевих скорочень, хв <sup>-1</sup>	149,6±5,4	133,6±5,2*	144,0±5,1	132,4±5,4***
Споживання кисню, мл · кг <sup>-1</sup> · хв <sup>-1</sup>	29,3±1,2	24,0±0,8*	23,2±0,8*	20,4±0,7***.***

таження між групами достовірно не відрізнялася. Знижену економічність гемодинамічного забезпечення фізичного навантаження в людей літнього віку з ІР підтверджують показники, зареєстровані на субмаксимальному фізичному навантаженні. Так, при однакових показниках гемодинаміки в обстежених з ІР більш низька потужність субмаксимального фізичного навантаження.

## ВИСНОВКИ

1. ІР у літньому віці щодо середнього характеризується більш високою концентрацією інсуліну в плазмі крові, взятої натще.

2. У людей середнього віку наявність ІР при відсутності ожиріння і метаболічного синдрому не має достовірного впливу на фізичну працездатність та її гемодинамічне забезпечення.

3. У осіб похилого віку без ожиріння, але з ІР знижується потужність субмаксимального фізичного навантаження та збіль-

шується реакція серцево-судинної системи на фізичний стрес.

**О. В. Коркушко, А. Ищук, В. Б. Шатило,  
В. П. Чижова**

## ВЛИЯНИЕ НАРУШЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ НА ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ ЛЮДЕЙ СРЕДНЕГО И ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА

У 43 людей среднего и пожилого возраста без ожирения (индекс массы тела менее 30 кг/м<sup>2</sup>) изучена связь между инсулинорезистентностью (ИР) и физической работоспособностью. Показано, что у здоровых людей пожилого возраста ИР ассоциируется с умеренным повышением содержания инсулина и незначительным ростом содержания глюкозы в плазме крови. У людей среднего возраста ИР не влияет на физическую работоспособность. В то время как у пожилых ИР сопровождается ее снижением за счет менее экономного гемодинамического обеспечения нагрузки и потребления кислорода. Низкую толерантность к физической нагрузке у пожилых людей без ожирения можно рассматривать не только как фактор риска развития ИР, но и как ее следствие.

Ключевые слова: физическая работоспособность, инсулинорезистентность, средний возраст, пожилой возраст.

**O. V. Korkushko, V. A. Ishchuk, V. B. Shatilo,  
V. P. Chizhova**

**EFFECT OF ALTERED INSULIN RESISTANCE  
ON PHYSICAL PERFORMANCE IN MIDDLE  
AGE AND ELDERLY PEOPLE**

In 43 middle age and elderly people without obesity (body mass index of less than 30 kg/m<sup>2</sup>) we studied the relationship between insulin resistance (IR) and physical performance. It is shown that in healthy elderly IR is associated with a moderate increase of insulin and a small increase in the level of glucose in the blood plasma. In the middle age people, IR has no effect on physical performance. IR in the elderly people is accompanied by the decrease in physical performance due to less economical for hemodynamic load and oxygen consumption. A lower exercise tolerance in elderly people without obesity can be considered not only as a risk factor for insulin resistance, but also as its consequence.

Key words: physical performance, insulin resistance, middle age, elderly.

*Institute of Gerontology AMS of Ukraine, Kyiv*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Коркушко О.В., Пісарук А.В., Шатило В.Б., Ярошенко Ю.Т. Особливості використання енергетичних субстратів при довготривалому фізичному навантаженні у чоловіків похилого віку // *Фізіол. журн.* – 1995. – 41, № 1–2. – С. 92–99.
2. Шатило В.Б. Механізми зниження стійкості людей літнього віку до дії стресових чинників та можливі шляхи корекції : Автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.03.03; Київ. Ін-т геронтології АМН України. – К., 2002. – 42 с.
3. Chen C.N., Chuang L.M., Wu Y.T. Clinical measures of physical fitness predict insulin resistance in people at risk for diabetes // *Phys. Ther.* – 2008. – 88. – P. 1355–1364.
4. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: Executive summary. Expert panel on the identification, evaluation, and treatment of overweight in adults // *Amer. J. Clin Nutr.* – 1998. – 68. – P. 899–917.
5. Deshpande A.D., Dodson E.A., Gorman I., Brownson R.C. Physical activity and diabetes: opportunities for prevention through policy // *Phys. Ther.* – 2008. – 88. – P. 1425–1435.
6. D'Orazio P., Burnett R.W., Fogh-Andersen N. International federation of clinical chemistry scientific division working group on selective electrodes and point of care testing. Approved IFCC recommendation on reporting results for blood glucose (abbreviated) // *Clin. Chem.* – 2005. – 51, № 9. – P. 1573–1576.
7. Grundy S.M., Cleeman J.I., Merz C.N. B. For the coordinating committee of the national cholesterol education program; national heart, lung, and blood institute; American college of cardiology foundation; American heart association. Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education program adult treatment panel III guidelines // *Circulation.* – 2004. – 10. – P. 227–239.
8. Heilbronn L.K., Gan S.K., Turner N. Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 207. – 92. – P. 1467–1473.
9. Huffman D.M., Barzilai N. Role of visceral adipose tissue in aging // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – 1790 (10). – P. 1117–1123.
10. Huggett R.J., Burns J., Mackintosh A.F., Mary D.A. Sympathetic neural activation in nondiabetic metabolic syndrome and its further augmentation by hypertension // *Hypertension.* – 2004. – 44 (6). – P. 847–852.
11. Jenkins A.B., Furler S.M., Bruce D.G., Chisholm D.J. Regulation of hepatic glucose output during moderate exercise in non-insulin-dependent diabetes // *Metabolism.* – 1988. – 37 (10). – P. 966–972.
12. Kondo N., Nomura M., Nakaya Y. Association of inflammatory marker and highly sensitive c-reactive protein with aerobic exercise capacity, maximum oxygen uptake and insulin resistance in healthy middle-aged volunteers // *Circulat. J.* – 2005. – 69. – P. 452–457.
13. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man // *Diabetologia.* – 1985. – 28. – P. 412–419.
14. Mustelin L., Pietilainen K.H., Rissanen A., Sovijarvi A.R. Acquired obesity and poor physical fitness impair expression of genes of mitochondrial oxidative phosphorylation in monozygotic twins discordant for obesity // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2008. – 295. – P. E148–E154.
15. Perreault L., Ma Y., Dagogo-Jack S. Sex differences in diabetes risk and the effect of intensive lifestyle modification in the Diabetes Prevention Program // *Diabetes. Care.* – 2008. – 31 (7). – P. 1416–1421.
16. Quinn L. Mechanisms in the development of type 2 diabetes mellitus // *J. Cardiovasc. Nurs.* – 2002. – 16. – P. 1–16.
17. Reaven G. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease // *Diabetes.* – 1988. – 37 (12). – P. 1595–1607.
18. Verity L.S., Ismail A.H. Effects of exercise on cardiovascular disease risk in women with NIDDM // *Diabetes. Res. Clin. Pract.* – 1989. – 6 (1). – P. 27–35.
19. von Döbeln W., Astrand I., Bergstrom A. An analysis of age and other factors related to maximal oxygen uptake // *J. Appl. Physiol.* – 1967. – 22. – P. 934–938.

*ДУ „Ін-т геронтології АМН України”, Київ*

*E-mail: vadishchuk@ukr.net*

*Матеріал надійшов до редакції 02.04.2010*

В.Ю. Гарбузова, В.Л. Гур'янова, О.М. Пархоменко, В.Є. Досенко, О.В. Атаман

## Частота алельних варіантів гена матричного Gla-протеїну у хворих з гострим коронарним синдромом

*Наведено результати визначення частоти алельних варіантів гена матричного-Gla-протеїну (MGP), що є одним з ключових білків-регуляторів кальцифікації, у 115 хворих з гострим коронарним синдромом (ГКС) і 110 здорових людей (контрольна група). Встановлено, що співвідношення нормальних гомозигот, гетерозигот і гомозигот із мінорним алелем при аналізі T<sup>-138</sup>→C-поліморфізму промотору гена MGP у хворих на ГКС становить: 59,8, 32,7, 7,5 % (у контролі – 58,7, 36,7, 4,6%, P > 0,05); при аналізі G<sup>-7</sup>→A-поліморфізму промотору – 42,1, 45,6 і 12,3 % та 41,8, 54,5, 3,6 % відповідно (P < 0,05 за  $\chi^2$ -критерієм); а при визначенні поліморфізму Thr<sub>83</sub>→Ala 4-го екзону – 42,6, 43,5 і 13,9 % порівняно з 43,9, 45,9, 10,2 % у контролі (P > 0,05). Одержані результати доводять, що A/A-варіант промотору гена MGP (G<sup>-7</sup>→A-поліморфізм) асоційований зі збільшенням ризику розвитку ГКС в українській популяції, а також свідчать про те, що інтенсивність кальцифікації впливає на перебіг атеросклеротичного ураження коронарних судин.*

*Ключові слова: матричний Gla-протеїн, однонуклеотидний поліморфізм, інфаркт міокарда.*

### ВСТУП

Матричний Gla-протеїн (MGP) – представник групи залежних від вітаміну К білків, що містять залишки  $\gamma$ -карбоксиглутамінової кислоти (Gla). До цієї групи належать білки, які беруть участь у коагуляції крові: протромбін, фактори VII, IX і X, протеїни C, S і Z, а також кістковий Gla-протеїн, відомий під назвою остеокальцин [1]. На відміну від специфічного для кісток остеокальцину, MGP експресується в багатьох тканинах, в тому числі в тканинах серця і стінок судин [2, 3]. Як *in vitro*, так і *in vivo* він перешкоджає відкладанню кальцію у м'яких тканинах, зокрема в артеріальній стінці [3, 5]. Цей ефект забезпечується наявністю у молекулі MGP Gla-залишків, здатних взаємодіяти з іонами кальцію та кристалами оксіапатиту. Молекула MGP (молекулярна маса 10 кДа) складається з 84 амінокислотних залишків, п'ять з яких представлено  $\gamma$ -карбоксиглутаміновою кислотою [4]. Залишки останньої утво-

рюються після посттрансляційної модифікації синтезованого в клітинах MGP, сутність якої полягає в карбоксилуванні глутамінової кислоти. Встановлено, що декарбоксильований MGP, у якому замість Gla міститься глутамінова кислота втрачає свою антикальцифікуючу активність [14].

Ген MGP у людини розташований на короткому плечі 12-ї хромосоми (12p13.1-p12.3). У ньому закодовано 84 амінокислотні залишки зрілого білка і 19 залишків трансмембранного сигнального пептиду. Довжина гена становить 3900 нуклеотидів, він складається з 4 екзонів, розділених трьома інтронами, на які припадає понад 80 % загальної його довжини [6]. Аналіз промоторної ділянки MGP-гена показав, що поряд з типовими TATA і CAT-боксами, вона містить послідовності, які, можливо, мають регуляторні властивості і є гомологічними раніше ідентифікованим елементам, що відповідають на дію гормонів і транскрипційних факторів. Зокрема, окрес-

© В.Ю. Гарбузова, В.Л. Гур'янова, О.М. Пархоменко, В.Є. Досенко, О.В. Атаман



лено дві ділянки промотору, що містять можливі сайти зв'язування з рецепторами ретиноевої кислоти і вітаміну D [6].

Серед багатьох (121 варіант) описаних однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) у гені MGP людини найкраще досліджено три: T<sup>-138</sup>→C (rs1800802), G<sup>-7</sup>→A (rs1800801) та Thr<sub>83</sub>→Ala (rs4236) [7–13]. Поліморфізми T<sup>-138</sup>→C та G<sup>-7</sup>→A знаходяться у промоторній частині гена – ділянці, яка утворює комплекси з ядерними білками і сприяє їх регуляторні впливи. Thr<sub>83</sub>→Ala-поліморфізм локалізований у четвертому екзоні, що кодує Gla-місткий домен та спричинює заміну амінокислоти в цьому протеїні.

Враховуючи можливий вплив MGP на розвиток кальцифікації артеріальних судин, що вважається однією з провідних ознак їх дегенерації, можна припустити, що генетичний поліморфізм промоторної ділянки може впливати на рівень експресії гена MGP, а варіабельність 4-го екзону – на якісні характеристики білка. Літературні дані з цього приводу неоднозначні та суперечливі [7–10, 12, 13], що спонукало нас до проведення дослідження в українській популяції, метою якого став пошук зв'язку між різними алельними варіантами гена MGP і ймовірністю розвитку гострого коронарного синдрому (ГКС).

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено із використанням венозної крові 115 хворих з ГКС (81,7 % чоловіків і 18 % жінок) віком від 40 до 83 років – середній вік (58,5 ± 0,7) роки, шпиталізованих у відділення реанімації та інтенсивної терапії Національного наукового центру “Інститут кардіології імені академіка М.Д. Стражеска” НАМН України. Кінцевий діагноз нестабільної стенокардії поставлено 33,5 % хворим, гострого інфаркту міокарда – у 66,5 % пацієнтів. На підставі результатів клінічних, електрокардіографічних і біохімічних обстежень,

відповідно до рекомендацій європейського та американського товариств кардіологів [18–20]. Контрольна група складалася з 110 практично здорових донорів, у яких відсутність серцево-судинної патології підтверджували за допомогою анамнезу, зняття електрокардіограми і вимірювання артеріального тиску. Контрольна група і група хворих не відрізнялися за віком і співвідношенням осіб різної статі (P > 0,05 за  $\chi^2$ -критерієм).

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (“Sarstedt”, Німеччина), що була антикоагулянтном. Кров заморожували і зберігали при -20°C. ДНК з неї виділяли, використовуючи набори “Изоген” (Росія). Методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів визначали T<sup>-138</sup>→C-поліморфізм промотору (rs1800802). Для цього ампліфікували ділянку промотору вказаного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5'-AAGCATACGATGGC CAAAАСТТСТGCA-3' і зворотного (anti-sense) – 5'-GAАСТAGCАТТGGAAСТТТТ СССААСС-3'. Праймери було синтезовано фірмою “Metabion” (Німеччина). Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль кожного з праймерів і 0,5 ОД Taq-полімерази (“Ферментас”, Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 (“Applied Biosystems”, США). Ампліфікація фрагмента промотору складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (30 с), гібридизація праймерів – 57°C (1 хв) і елонгація – 72°C (1 хв). Пізніше 6 мкл продукту ампліфікації фрагмента промотору інкубували при 37°C протягом 18 год

з 3 ОД рестриктази BseNI (“Ферментас”, Литва) у буфері В такого складу: 10 ммоль/л тріс-НСІ (рН 7,5), 10 ммоль/л хлориду магнію і 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в -138 позиції гена MGP містився тимін, ампліфікат, який складався з 142 пар основ, розщеплювався рестриктазою BseNI на два фрагменти – 118 і 24 пари основ. У разі заміни тиміну на цитозин сайт рестрикції для BseNI втрачався і утворювався один фрагмент розміром 142 пари основ (рис. 1,а).

Аельний поліморфізм промотору гена MGP G<sup>-7</sup>→A (rs1800801) визначали також за допомогою ампліфікації фрагмента та наступної рестрикції. Послідовність нуклеотидів у специфічних праймерах була такою: прямий (sense) – 5'-СТАG TTCAGT GCCAACCCCTCCCCACC-3', зворотний (antisense) – 5'-TAGCAGCA GTAGGGA GAGAGGCTCCCA-3'. Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази (“Ферментас”, Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента, що містив стар-

тову ділянку, складалася з 33 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с) та елонгація – 72°C (1 хв). Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 год з 2 ОД рестриктази NcoI у буфері Tango такого складу: 33 ммоль/л тріс-ацетату (рН 7,9), 10 ммоль/л ацетату магнію, 66 ммоль/л ацетату калію, 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в -7 позиції гена MGP містився гуанін, ампліфікат, який складався з 500 пар основ, розщеплювався рестриктазою NcoI на два фрагменти – 240 і 260 пар основ. У разі заміни гуаніну на аденін сайт рестрикції для NcoI втрачався та візуалізувався один фрагмент завдовжки 500 пар основ (див. рис. 1,б).

Для визначення поліморфізму 4-го екзону Thr<sub>83</sub>→Ala (rs4236) гена MGP використовували пару специфічних праймерів: прямий (sense) – 5'-ТСААТАGGGAAGC СТGTGATG-3' і зворотний (antisense) – 5'-AGGGGGАТАСААААТСАGGTG-3'. Програма ампліфікації була такою: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 64,5°C (45 с), елонгація – 72°C (1 хв), разом 33 цикли. Надалі 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 год

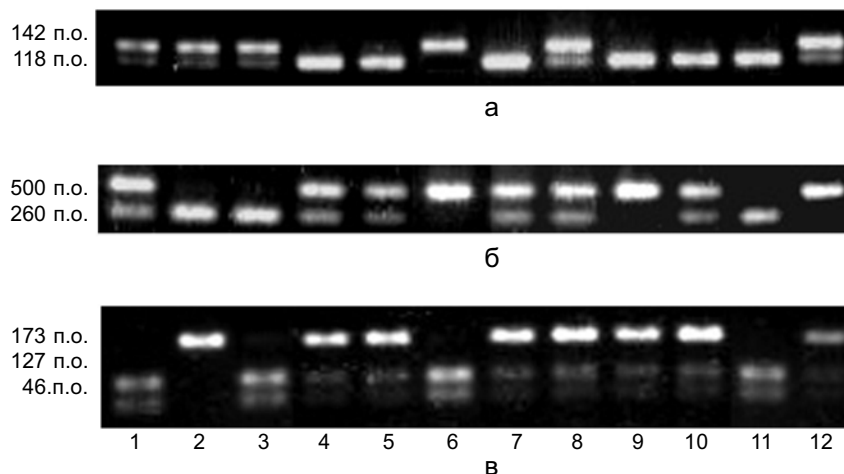


Рис. 1. Результати рестрикційного аналізу однонуклеотидних поліморфізмів гена MGP: а – T<sup>-138</sup>→C-поліморфізм (доріжки 4, 5, 7, 9, 10, 11 відповідають T/T-генотипу, 1, 2, 3, 8, 12 – T/C-генотипу, 6 - C/C-генотипу); б – G<sup>-7</sup>→A-поліморфізм (доріжки 2, 3, 11 відповідають G/G-генотипу, 1, 4, 5, 7, 8, 10 – G/A-генотипу, 6, 9, 12 – A/A-генотипу); в – Thr<sub>83</sub>→Ala-поліморфізм (доріжки 1, 3, 6, 11 відповідають Thr/Thr-варіанту, 4, 5, 7–10, 12 – Thr/Ala-варіанту, 2 – Ala/Ala-варіанту); п.о. – пара основ

з 3 ОД рестриктази Eco477 у буфері R такого складу: 10 ммоль/л тріс-НСІ (рН 8,5), 10 ммоль/л хлориду магнію, 100 ммоль/л хлориду калію і 0,1 мг/мл альбуміну. Наявність у 3748 позиції гена MGP аденіну перешкоджає рестрикції, а при заміні його на тимін рестриктаза розщеплює ампліфіковану ділянку 4-го екзону (довжина – 173 пари азотистих основ) на два фрагменти: 127 і 46 пар основ (див. рис. 1,в).

Ампліфікати всіх трьох вивчених фрагментів гена MGP після рестрикції розділяли в 2,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 25 хв ( $T^{-138} \rightarrow C$ ), 40 хв ( $G^{-7} \rightarrow A$ ) та 20 хв ( $Thr_{83} \rightarrow Ala$ ). Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Одержані результати опрацьовували статистично з використанням програми Excel 2000. При цьому достовірність відмінностей визначали за  $\chi^2$ -критерієм. Значення  $P < 0,05$  вважали достовірним.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генотипування хворих із ГКС за трьома сайтами гена MGP і порівняння одержаних результатів з такими рестрикційного аналізу в контрольній групі дало змогу встановити, що частота, з якою зустрічаються певні варіанти цього гена, є різною при  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізмі і статистично не відрізняється, коли йдеться про поліморфізми  $T^{-138} \rightarrow C$  та  $Thr_{83} \rightarrow Ala$  (рис. 2). Встановлено, що співвідношення гомозигот за мажорним алелем, гетерозигот і гомозигот за міноним алелем при аналізі  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізму промотору складало у хворих з ГКС: 59,8, 32,7, 7,5 %, а в контрольній групі – 58,7, 36,7, 4,6 % ( $P > 0,05$  за  $\chi^2$ -критерієм). Частота алейних варіантів при вивченні  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізму становила 42,1, 45,6, 12,3 % і 41,8, 54,5, 3,6 % відповідно ( $P < 0,05$ ). А при аналізі поліморфізму  $Thr_{83} \rightarrow Ala$  – 42,6,

43,5, 13,9 % і 43,9, 45,9, 10,2 % відповідно ( $P > 0,05$ ). Таким чином, достовірні відмінності при порівнянні з контрольною групою було встановлено тільки для поліморфізму в промоторі  $G^{-7} \rightarrow A$ : у хворих з ГКС міноним („патологічний”) варіант А/А вияв-

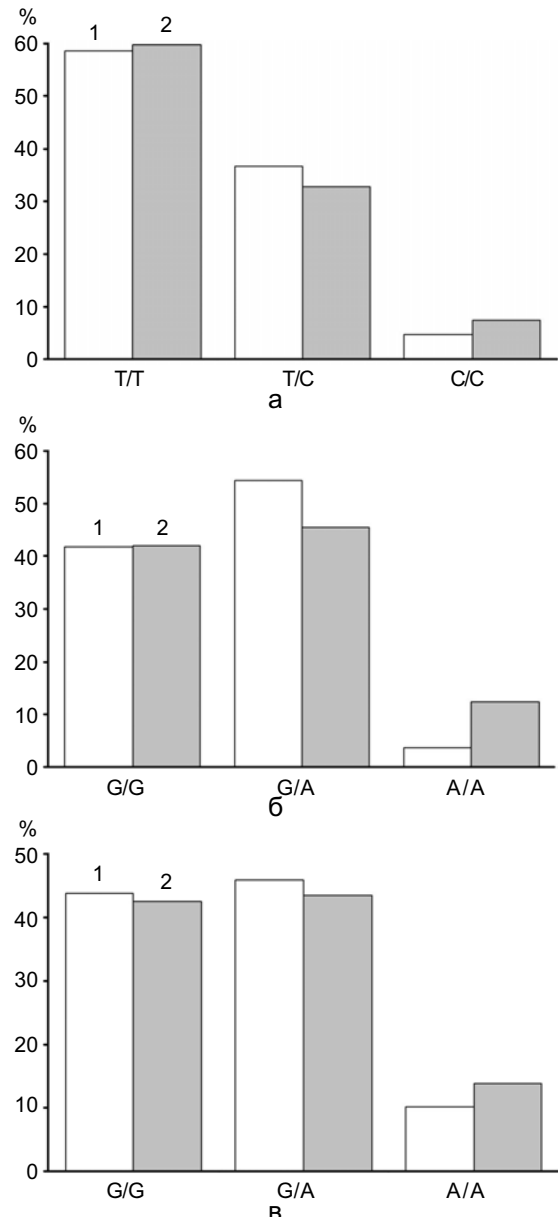


Рис. 2. Частота різних генотипів при визначенні однонуклеотидних поліморфізмів гена MGP у практично здорових індивідумів (1) та хворих із гострим коронарним синдромом (2): а –  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізм ( $P > 0,05$  за  $\chi^2$ -критерієм), б –  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізм ( $P < 0,05$  за  $\chi^2$ -критерієм), в –  $Thr_{83} \rightarrow Ala$ -поліморфізм ( $P > 0,05$  за  $\chi^2$ -критерієм)

ляли в 3,4 раза частіше, ніж у донорів.

Від часу встановлення антикальцифікуючих властивостей MGP постало питання, яку роль відіграє цей білок у розвитку кальцифікації артеріальної стінки, зокрема атеросклеротичних бляшок у людини. Досліджували два основні напрямки. З одного боку, вивчають молекулярно-генетичний вплив однонуклеотидних поліморфізмів у промоторі на ефективність транскрипції із застосування люциферазного тесту. З другого, дослідники шукають функціональне значення однонуклеотидних поліморфізмів, використовуючи на клінічний матеріал, вивчаючи зв'язок рівня MGP крові та розвитку атеросклеротичних змін [21–23], поліморфізмів у гені MGP і деяких інших показників ураження артерій [7–10, 12, 13].

Поліморфізм гена MGP та активність транскрипції. Перше дослідження із застосуванням люциферазного тесту, суть якого полягає у введенні в культивовані клітини генетичних конструкцій, що містять “нормальний” або “патологічний” варіанти промотору MGP та ген люциферази, було проведено Негтманн та співавт. [7]. Автори показали, що поліморфізм  $G^{-7} \rightarrow A$  не впливає на промоторну активність, тоді як активність промотору з мінорним алелем -138С („патологічний” варіант) порівняно з -138Т („нормальним” варіантом) була менша на 20 % у гладеньком'язових клітинах (ГМК) судин щура і на 50 % у культивованих фібробластах людини. Зовсім інші дані було отримано у дослідженні Farzaneh та співавт. [8]. Автори встановили, що промотори з поліморфізмами  $G^{-7} \rightarrow A$  і  $T^{-138} \rightarrow C$  істотно змінюють транскрипційну активність гена MGP в судинних ГМК щурів у культурі. Так, варіант промотору з мінорним алелем -7А виявляв у 1,5 раза вищу активність, ніж -7G, а варіант -138С був у 4 рази активніший за -138Т. Аналіз промотору гена MGP показав, що поліморфізм  $T^{-138} \rightarrow C$  стосується ділянки, яка є критичною

для процесів транскрипції в судинних ГМК. Саме тут, у позиції між -142 і -136, розташований елемент, що може зв'язувати активаційний протеїн-1 (AP-1). Встановлено, що при поліморфізмі  $T^{-138} \rightarrow C$  змінюється зв'язування цієї ділянки промотору з комплексом AP-1. Варіант промотору з алелем -138Т добре зв'язує комплекси AP-1, до складу яких входять c-Jun, JunB, Fra-1 і Fra-2, і активується форболовими сполуками, тим часом здатність до зв'язування AP-1 і наступної активації у промотору з алелем -138С є дуже низькою. Наведені вище результати підтверджуються Kobayashi та співавт. [9], які встановили, що варіант промотору -138Т, на відміну від -138С, здатний утворювати комплекси з ядерними білками (AP-1). Про те що стосується активності цих варіантів, то японські дослідники дійшли зовсім інших, ніж Farzaneh та співавт., висновків: при введенні промоторів гена MGP у культивовані клітини раку молочної залози людини активність промотору з алелем -138Т була набагато вищою, якщо порівнювати з алелем -138С.

Щодо другої групи робіт, то одержані в них результати теж суперечливі. Так, Graam та співавт. [21] наводять дані про те, що розвиток тяжкого атеросклерозу супроводжується збільшенням концентрації MGP у сироватці крові. Натомість Jono та співавт. [22] встановили, що цей показник в крові обернено пропорційно корелює з кальцифікацією коронарних судин. І нарешті, O'Donell та співавт. [23], показавши зв'язок між рівнем MGP крові і низкою факторів ризику атеросклерозу, не виявили кореляції між вмістом MGP і кальцифікацією коронарних артерій.

Дані про зв'язок різних видів алельного поліморфізму гена MGP з рівнем MGP крові, розвитком кальцифікації артерій (зокрема коронарних) і наслідків атеросклерозу (зокрема інфаркту міокарда) теж суперечливі.

Поліморфізм гена MGP і його вміст у крові. У праці Farzaneh та співавт. [8] не виявлено асоціації між  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізмом і вмістом MGP у сироватці крові здорових людей (Нідерланди). Водночас у цьому дослідженні встановлено статистично достовірний зв'язок між вище зазначеним показником і  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізмом: найвищі значення MGP виявляли в C/C, найменші – у T/T-гомозигот, проміжні значення були в гетерозигот (T/C). На відміну від наведеного вище, Crosier та співавт. [13], не виявили асоціації між  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізмом і рівнем MGP сироватки, натомість показано статистично достовірний зв'язок між  $G^{-7} \rightarrow A$ - і  $Thr_{83} \rightarrow Ala$ -варіантами поліморфізму у здорових чоловіків і жінок (мешканці США), з одного боку, і концентрацією MGP крові, з другого. У гомозигот за мінорним алелем концентрація MGP була найменшою, у нормальних гомозигот – найбільшою, у гетерозигот реєстрували проміжні значення цього показника.

Поліморфізм гена MGP і кальцифікація артерій. Crosier та співавт. [13] показали, що всі три SNP ( $T^{-138} \rightarrow C$ ,  $G^{-7} \rightarrow A$  та  $Thr_{83} \rightarrow Ala$ ) мають зв'язок з кальцифікацією коронарних артерій (ККА) у чоловіків як самостійно, так і в поєднанні з іншими факторами ризику атеросклерозу. Водночас статистично достовірної асоціації цих самих SNP з ККА у жінок не виявлено. Найбільш асоційованими з ККА були гомозиготи за мінорним алелем. У чоловіків з таким генотипом при всіх трьох SNP важкість ККА була достовірно нижчою, ніж у гомозигот за основним алелем. Автори дійшли висновку, що, незважаючи на виявлений зв'язок між поліморфізмом гена MGP і його вмістом у сироватці крові, з одного боку, і розвитком ККА, з другого, два останні показники між собою ніяк не пов'язані. На думку авторів, генетичні варіанти гена MGP впливають на ККА не через концентрацію MGP в сироватці крові, а в інший, ще невідомий спосіб.

Дуже слабкий зв'язок між поліморфізмом MGP і кальцифікацією артерій було виявлено при дослідженні сонних і стегнових артерій у здорових волонтерів ("АХА Study", Франція) [7]. Тільки серед тих, у кого при ультразвуковому дослідженні виявлено атеросклероз стегнових артерій з кальцифікацією бляшок, алелі -7A та Ala83 зустрічалися частіше, ніж у суб'єктів, що мали бляшки без ознак їх кальцифікації. Не встановлено жодного зв'язку між алельним поліморфізмом MGP і атеросклерозом сонних артерій.

В інших кількох дослідженнях не виявили зв'язку  $T^{-138} \rightarrow C$  поліморфізму з кальцифікацією коронарних артерій [12], а також атеросклерозом черевної аорти, кальцифікацією атеросклеротичних бляшок і артеріосклерозом Менкеберга [9].

Поліморфізм гена MGP і інфаркт міокарда. Лише в одному дослідженні (ЕСТІМ Study, Північна Ірландія, Франція) аналізували зв'язок 6 варіантів гена MGP з розвитком інфаркту міокарда [7]. Було показано, що частота алелів і розподіл генотипів за всіма видами SNP однакові у хворих на інфаркт міокарда і в контрольній групі. Тільки в одній підгрупі, у якій хворих і контрольних суб'єктів було поділено на таких, що мають високий і низький ризик розвитку ішемічної хвороби серця, встановлено, що частота мінорних алелів (-7A і Ala83) у хворих на інфаркт міокарда з низьким рівнем факторів ризику є більшою, ніж у відповідній контрольній підгрупі.

У виконаних нами дослідженнях показано, що в групі хворих з ГКС, що є найбільш небезпечною формою ішемічної хвороби серця, частота алеля -7A була вищою, ніж у контрольній групі. Це дає підстави думати, що  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізм стосується розвитку саме цієї форми ішемічної хвороби серця в українській популяції і може розглядатися як один з генетичних чинників серцево-судинної патології. Механізми реалізації цього

генетичного фактора можуть бути пов'язані не тільки зі впливом на кальцифікацію коронарних артерій, але й на згортання крові [24]. Як зазначалося вище, MGP є вітамін К-залежним протеїном з родини прокоагулянтних білків крові (протромбін, VII фактор тощо), а, отже, може впливати на згортання крові, яке має надзвичайно велике значення в патогенезі коронарного тромбозу. На антагоністичний характер взаємодії коагуляції та кальцифікації судинної стінки вказують дані літератури [25, 26], а MGP може розглядатися як сполучна ланка у цих процесах. Крім того, активний, чітко відрегульований характер кальцифікації [5, 16, 17, 27–29] може вказувати на її пристосувальне значення в патогенезі атеросклерозу. Не виключено, що обвапнення є оптимальним варіантом закінчення патологічного процесу в судинній стінці, і фактори, що затримують відкладання кальцію, мають розглядатися як фактори ризику дестабілізації атеросклеротичної бляшки. До таких факторів ми схильні зарахувати і  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізм гена MGP, що значно частіше зустрічається у хворих на ГКС.

**В.Ю. Гарбузова, В.Л. Гурьянова,  
А.Н. Пархоменко, В.Е. Досенко, А.В. Атаман**

#### **ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА МАТРИКСНОГО GLA-ПРОТЕИНА У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ**

Представлены результаты определения частоты аллельных вариантов гена матричного-Gla-протеина (MGP), который является одним из ключевых белков-регуляторов кальцификации, у 115 больных с острым коронарным синдромом (ОКС) и 110 здоровых индивидуумов (контрольная группа). Установлено, что соотношение нормальных гомозигот, гетерозигот и минорных гомозигот при анализе  $T^{-138} \rightarrow C$ -поліморфізма промотора у гена MGP у больных с ОКС по сравнению с контрольной группой составляет: 59,8, 32,7, 7,5 % (в контроле – 58,7, 36,7, 4,6 %,  $P > 0,05$ ); при анализе  $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізма промотора – 42,1, 45,6, 12,3 % и 41,8, 54,5, 3,6 % соответственно ( $P < 0,05$  по  $\chi^2$ -критерию); а при определении поліморфізма  $Thr_{83} \rightarrow Ala$  4-го экзона – 42,6, 43,5 и 13,9 % по

сравнению с 43,9, 45,9, 10,2 % – в контроле ( $P > 0,05$ ). Полученные данные позволяют утверждать, что вариант A/A промотора гена MGP ( $G^{-7} \rightarrow A$ -поліморфізм) ассоциирован с увеличением вероятности развития ОКС в украинской популяции, а также являются свидетельством того, что интенсивность процесса кальцификации влияет на течение атеросклеротического поражения коронарных сосудов.

Ключевые слова: матриксный Gla-протеин, однонуклеотидный полиморфизм, инфаркт миокарда.

**V.Yu. Garbuzova, V.L. Gurianova,  
A.N. Parkhomenko, V.E. Dosenko, A.V. Ataman**

#### **THE FREQUENCY OF ALLELIC POLYMORPHISM OF MATRIX GLA-PROTEIN GENE IN ACUTE CORONARY SYNDROME PATIENTS**

Allelic polymorphisms of matrix Gla protein (MGP) gene were determined in 115 patients with acute coronary syndrome (ACS) and in 110 practically healthy people. It was shown that interrelation of major homozygotes, heterozygotes and minor homozygotes by  $T^{-138} \rightarrow C$  MGP promoter polymorphism in patients with ACS were 59,8%, 32,7%, 7,5% and in control 58.7%, 36.7%, 4.6% ( $P > 0.05$  by  $\chi^2$ -test); by  $G^{-7} \rightarrow A$  polymorphism: 42.1%, 45.6%, 12.3% and 41.8%, 54.5%, 3.6% correspondingly ( $P < 0,05$ ); and by  $Thr_{83} \rightarrow Ala$  exon 4 polymorphism: 42.6%, 43.5%, 13.9% compared to 43.9%, 45.9%, 10.2% in control ( $P > 0.05$ ). The obtained data show that MGP A/A variant of MGP promoter  $G^{-7} \rightarrow A$  polymorphism is a risk factor of ACS in Ukrainian population. These data indicate also that the intensity of calcification influences atherosclerotic injury of coronary artery.

*Sumy State University, Sumy;*

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

*National Scientific Center "Srtazhesko Institute of Cardiology" NAMS of Ukraine, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Price P.A., Urist M.R., Otawara Y. Matrix Gla protein, a new  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1983. – **117**. – P. 765–771.
2. Fraser J.D., Price P.A. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**. – P. 11033–11036.
3. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – **20**. – P. 317–327.

4. Price P.A., Williamson M.K. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**. – P. 14971–14975.
5. Proudfoot D., Shanahan C.M. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein // *Nephrology (Carlton)*. – 2006. – **11**. – P. 455–461.
6. Cancela L., Hsieh C.-L., Francket U., Price P.A. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene // *J. Biol. Chem.* – 1990. – **265**. – P. 15040–15048.
7. Herrmann S.M., Whatling C., Brand E., Nikaud V., Garipey J., Simon A., Evans A., Ruidavets L.B., Arveiler D., Luc G., Tiret L., Henney A., Cambien F. Polymorphisms of the human matrix Gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – **20**. – P. 2386–2393.
8. Farzaneh-Far A., Davies J.D., Braam L.A., Spronk H.M., Proudfoot D., Chan S.W., O'Shaughnessy K.M., Weissberg P.L., Vermeer C., Shanahan C.M. A Polymorphism of the human matrix r-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 32466–32473.
9. Kobayashi N., Kitazawa R., Maeda S., Schurgers L.J., Kitazawa S. T-138C polymorphism of matrix Gla protein promoter alters its expression but is not directly associated with atherosclerotic vascular calcification // *Kobe J. Med. Sci.* – 2004. – **50**. – P. 69–81.
10. Brancaccio D., Biondi M.L., Gallieni M., Turri O., Galassi A., Cecchini F., Russo D., Andreucci V., Cozzolino M. Matrix GLA protein gene polymorphisms: clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients // *Amer. J. Nephrol.* – 2005. – **25**. – P. 548–552.
11. Hernandez-Pacheco G., Murguia L.E., Rodriguez-Perez J.M., Fragoso J.M., Perez-Vielma N., Martinez-Rodriguez N., Granados J., Vargas-Alarcyn G. Matrix gamma-carboxyglutamic acid protein (MGP) G-7A and T-138C gene polymorphisms in Indian (Mayo and Teenek) and Mestizo populations from Mexico // *Hum. Biol.* – 2005. – **77**. – P. 385–391.
12. Taylor B.C., Schreiner P.J., Doherty T.M., Fornage M., Carr J.J., Sidney S. Matrix Gla protein and osteopontin genetic associations with coronary artery calcification and bone density: the CARDIA study // *Hum. Genet.* – 2005. – **116**. – P. 525–528.
13. Crosier M.D., Booth S.L., Peter I., Dawson-Hughes B., Price P.A., O'Donnell C.J., Hoffmann U., Williamson M.K., Orдовas J.M. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 2009. – **55**. – P. 59–65.
14. Schurgers L.J., Teunissen K.J.F., Knapen M.H.J., Kwaijtaal M., van Diest R., Appels A., Reutelingsperger C.P., Cleutjens J.P.M., Vermeer C. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – **25**. – P. 1629–1633.
15. Stanford W. Coronary artery calcification as an indicator of preclinical coronary artery disease // *Radiographics.* – 1999. – **19**. – P. 1409–1419.
16. Shanahan C.M., Proudfoot D., Tyson K.L., Cary N. R. B., Edmonds M., Weissberg P. L. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification // *Z. Kardiol.* – 2000. – **89**, Suppl. 2. – P. II/63–II/68.
17. Giachelli C.M. Vascular calcification mechanisms // *J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2004. – **15**. – P. 2959–2964.
18. Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA, Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, De Feyter PJ, Specchia G, Ruzyllo W. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology // *Eur. Heart J.* – 2002. – **23**. – P.1809–1840.
19. Antman E.M., Hand M., Armstrong P.W., Bates E.R., Green L.A., Halasyamani L.K., Hochman J.S., Krumholz H.M., Lamas G.A., Mullany C.J., Pearle D.L., Sloan M.A., Smith S.C. Jr; 2004 Writing Committee Members, Anbe D.T., Kushner F.G., Ornato J.P., Jacobs A.K., Adams C.D., Anderson J.L., Buller C.E., Creager M.A., Ettinger S.M., Halperin J.L., Hunt S.A., Lytle B.W., Nishimura R., Page R.L., Riegel B., Tarkington L.G., Yancy C.W. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2004. – **44**. – P.E1–211.
20. Thygesen K., Alpert J.S., White H.D.; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, Jaffe A.S., Apple F.S., Galvani M., Katus H.A., Newby L.K., Ravkilde J., Chaitman B., Clemmensen P.M., Dellborg M., Hod H., Porela P., Underwood R., Bax J.J., Beller G.A., Bonow R., Van der Wall E.E., Bassand J.P., Wijns W., Ferguson T.B., Steg P.G., Uretsky B.F., Williams D.O., Armstrong P.W., Antman E.M., Fox K.A., Hamm C.W., Ohman E.M., Simoons M.L., Poole-Wilson P.A., Gurfinkel E.P., Lopez-Sendon J.L., Pais P., Mendis S., Zhu J.R., Wallentin L.C., Fernandez-Aviles F., Fox K.M., Parkhomenko A.N., Priori S.G., Tendera M., Voipio-Pulkki L.M., Vahanian A., Camm A.J., De Caterina R., Dean V., Dickstein K., Filippatos G., Funck-Brentano C., Hellemans I., Kristensen S.D., McGregor K., Sechtem U., Silber S., Tendera M., Widimsky P., Zamorano J.L., Morais J., Brener S., Harrington R., Morrow D., Lim M., Martinez-Rios M.A., Steinhubl S., Levine G.N., Gibler W.B., Goff D., Tubaro M., Dudek D., Al-Attar N. Universal definition of myocardial infarction // *European Heart J.* – 2007. – **28**. – P.2525–2538.
21. Braam L.A., Dissel P., Gijsbers B.L., Spronk H.M.H., Hamulyak K., Soute B.A.M., Debie W., Vermeer C. Assay for human matrix Gla protein in serum. Potential

- applications in the cardiovascular field // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – **20**. – P. 1257–1261.
22. Jono S., Vermeer C., Dissel P., Hasegawa K., Shioi A., Taniwaki H., Kizu A., Nishizawa Y., Saito S. Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography // *Thromb. Haemost.* – 2004. – **91**. – P. 790–794.
23. O'Donnell C.J., Kyla Shea M., Price P.A., Gagnon D.R., Wilson P.W.F., Larson M.G., Kiel D.P., Hoffmann U., Ferencik M., Clouse M.E., Williamson M.K., Cupples L.A., Dawson-Hughes B., Booth S.L. Matrix Gla protein is associated with risk factors for atherosclerosis but not with coronary artery calcification // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – **26**. – P. 2769–2774.
24. Krueger T., Westenfeld R., Schurgers L.J., Brandenburg V.M. Coagulation meets calcification: The vitamin K system // *Int. J. Artif. Organs.* – 2009. – **32**. – P. 67–74.
25. Wallin R., Schurgers L., Wajih N. Effects of the blood coagulation vitamin K as an inhibitor of arterial calcification // *Thromb. Res.* – 2008. – **122**. – P. 411–417.
26. Uotila L. The metabolic functions and mechanism of action of vitamin K // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1990. – **201**, Suppl. – P. 109–117.
27. Abedin M., Tintut Y., Demer L.L. Vascular calcification. Mechanisms and clinical ramifications // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**. – P. 1161–1170.
28. Doherty T.M., Fitzpatrick L.A., Inoue D., Qiao J.H., Fishbein M.C., Detrano R.C., Shah P.K., Rajavashisth T.B. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification // *Endocrine Rev.* – 2004. – **25**. – P. 629–672.
29. Shao J.S., Cai J., Towler D.A. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – **26**. – P. 1423–1430.

*Сум. ун-т;*

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;*

*Нац. наук. центр "Інститут кардіології імені академіка*

*М.Д. Стражеска" НАМН України, Київ*

*vikgarbuzova@yandex.ru*

*Матеріал надійшов до редакції 20.11.2010*



Д.А. Кришталь, О.М. Падурау, О.І. Болдирєв,  
О.Ю. Кіт, В.В. Рекалов Я.М. Шуба

## Зміни кальційзалежної калієвої провідності ізолюваних гладеньком'язових клітин сечового міхура щурів при експериментальному діабеті

*Активация кальційзалежних калієвих каналів великої провідності (ВК-канали) впливає на реполяризацію мембрани під час генерації потенціалу дії та на потенціал спокою гладеньком'язових клітин (ГМК) детрузора. Одним із ускладнень діабету є синдром гіперактивного сечового міхура (СГАСМ). З використанням методу patch-clamp було встановлено значне зменшення калієвого струму через ВК-канали ( $I_{BK}$ ) ізолюваних ГМК детрузора щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом порівняно з контрольними тваринами, а також пригнічення амплітуди та частоти ВК-опосередкованих спонтанних транзйентних вихідних струмів (СТВС). При діабеті густина  $I_{BK}$  викликаного деполяризацією мембрани до +50 мВ, становила  $10,0 \text{ nA/nF} \pm 0,5 \text{ nA/nF}$  (у контролі  $15,0 \text{ nA/nF} \pm 0,4 \text{ nA/nF}$ ), середні значення частоти й амплітуди СТВС при підтримуваному потенціалі -20 мВ знижувалися з  $12,0 \pm 1,5$  до  $2,4 \text{ Гц} \pm 0,6 \text{ Гц}$  та з  $0,9 \pm 0,1$  до  $0,5 \text{ nA/nF} \pm 0,1 \text{ nA/nF}$  відповідно. За допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції показано, що при діабеті збільшується експресія мРНК основної, пороформуальної  $K_{Ca}1.1$ -субодиниці ВК-каналу та зменшується – його допоміжної  $VK_{Ca}\beta 1$ -субодиниці. Зроблено висновок, що виявлені зміни у струмах через ВК-канали при діабеті можуть підвищувати збудливість ГМК детрузора та зумовлювати виникнення міогенного СГАСМ. Однак потрібні додаткові дослідження того, яким чином зниження експресії  $VK_{Ca}\beta 1$  позначається на функціональних властивостях ВК-каналу та для встановлення типу і спрямованості змін кальцієвих сигналів, що впливають на активацію цього каналу при діабеті.*

*Ключові слова:* сечовий міхур, детрузор, гладенькі м'язи, діабет, кальційзалежні калієві канали, ВК-канали.

### ВСТУП

Серед багатьох ускладнень, пов'язаних із діабетом, спонтанне сечовипускання значно погіршує якість життя хворого, що зумовлює важливість дослідження механізмів формування цього ускладнення для розробки ефективних методів його корекції. Нині добре відомим є холінергічний (парасимпатичний) механізм скорочення детрузора (гладеньком'язова тканина сечового міхура), а тому основним лікуванням спонтанного сечовипускання є застосування селективних антагоністів мускаринових

$M_3$ -холінорецепторів детрузора та ботулотоксину А, який, зв'язуючись із пресинаптичними холінергічними нервовими закінченнями, блокує вивільнення ацетилхоліну із синаптичних везикул [11]. Проте ці препарати мають значні побічні дії. Тому актуальним залишається детальне вивчення також інших механізмів активації та регуляції скорочення детрузора і пошук на їх основі нових мішеней для терапевтичного втручання. Кальційзалежні калієві канали великої провідності (ВК-канали, відомі ще як  $MaxiK$ ,  $K_{Ca}1.1$ ,  $Slo1$ ,  $KCNMA1$ ) є одним із найбільш широко представлених типів

© Д.А. Кришталь, О.М. Падурау, О.І. Болдирєв, О.Ю. Кіт, В.В. Рекалов Я.М. Шуба

калієвих каналів у мембрані гладеньком'язових клітин (ГМК) детрузора, а їх активація є основним механізмом реполяризації мембрани під час генерації потенціалу дії (ПД) [2–4]. У мишей з нокаут-ваними пороформуальною  $\alpha$ -, або допоміжною  $\beta$ -субодиницями ВК-каналів збільшені фазні скорочення детрузора та спостерігається витікання сечі [8, 10] – симптоми, схожі із синдромом гіперактивного сечового міхура (СГАСМ) і нетримання сечі людини.

Мета роботи – виявлення можливих відмінностей у активації та експресії ВК-каналів у нормальних щурів і щурів з діабетом для використання фармакологічної корекції спонтанного сечовипускання у перспективі.

## МЕТОДИКА

*Модель діабету щурів.* Усі експерименти над тваринами проводили відповідно до норм Європейської Конвенції із захисту хребетних тварин при їх використанні в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 18 березня 1986 р. ETS N 123). Лабораторних щурів лінії Вістар масою 150–200 г утримували на стандартному раціоні віварію. Діабет у тварин викликали одноразовим інтраперитоніальним введенням розчину стрептозотоцину (СТЦ) («Sigma-Aldrich», США) в 1 М цитратному буфері (рН 5,5) в дозі 45 мг/кг. Щурів використовували в експерименті через 8 тиж після ін'єкції, якщо вміст глюкози в крові перевищував 250 мг/л і при наявності інших ознак захворювання.

*Ізоляція ГМК детрузора.* Щурів анестезували пентабарбіталом (500 мг/кг) та декапітували. Після розтину черевної порожнини сечовий міхур вилучали та поміщали у безкальцієвий розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 135, KCl – 6, MgCl<sub>2</sub> – 1,2, D-глюкоза – 10, HEPES – 10; рН 7,45 (доводили за допомогою NaOH). Сечовий міхур розрізали на смужки, які механічно очищали від уротелію.

Ізольовані ГМК детрузора отримували інкубацією в 1 мл безкальцієвого розчину Кребса з додаванням 1 мг колагенази (Type XI, «Sigma-Aldrich», США) і 0,2 мг протеази («Protease Calbiochem», США). Інкубацію проводили при 36° С протягом 35 хв. Після ферментативної обробки смужки відмивали від ферментів безкальцієвим розчином Кребса, розрізали на шматочки та подрібнювали пастерівською піпеткою до отримання суспензії клітин, яку потім поміщали в холодильник.

*Електрофізіологічні дослідження.* Реєстрації іонних струмів ізольованих ГМК детрузора проводили з використанням методу patch-clamp у конфігурації “ціла клітина” в режимі фіксації потенціалу при кімнатній температурі (20–23 °С). Апаратна частина установки складалася з інвертованого мікроскопа “Olympus”, електрофізіологічного підсилювача «Axopatch 200B», інтерфейс Digidata 1300 (обидва пристрої від фірми «Axon Instruments, Inc.», США) та персонального комп'ютера. Управління експериментом та аналіз результатів забезпечувалися програмним пакетом pClamp 8.0 («Axon Instruments, Inc.», США). Відвідні мікропіпетки виготовляли із боросилікатного скла («WPI», США) на програмованій горизонтальній витяжці («Sutter Instruments», США). Опір мікропіпеток був у діапазоні 5–7 МОм при їх заповненні базовим внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): KCl – 140, HEPES – 10, EGTA – 0,3, MgATФ – 1; рН 7,3 (доводили NaOH). Зовнішньоклітинний розчин Кребса містив (ммоль/л): NaCl – 135, KCl – 6, CaCl<sub>2</sub> – 5, MgCl<sub>2</sub> – 2,5, D-глюкоза – 10, HEPES – 10; рН 7,45 (доводили NaOH).

Для усунення розбіжностей у значеннях вимірювальних струмів, пов'язаних із розміром ГМК, їх при порівнянні нормували за ємністю мембрани клітини для отримання густини струму в пікоамперах на пікофаради.

*Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) із зворотною транскрипцією.* Процедура проведення кількісної ПЛР у реальному часі не відрізнялася від описаної раніше [1]. Для зворотної транскрипції використовували сумарну РНК, виділену з очищеного від уротелію детрузора сечового міхура контрольних щурів і щурів з діабетом. З отриманої кДНК ампліфікували фрагменти, що належать кДНК основної пороформуваної  $\alpha$ -субодиниці ( $K_{Ca}1.1$ ) та допоміжної  $\beta 1$ -субодиниці ( $BK_{Ca}\beta 1$ ) BK-каналу гладеньком'язового типу, а також  $\beta$ -актину. Останній був внутрішнім контролем, до якого нормували значення всіх рівнів експресії. Ампліфікаційна суміш складалася з двократною ПЛР-суміші SYBR-Green PCR MasterMix ("Applied Biosystems", США), 5 мкмоль/л розчину суміші прямого та зворотного праймерів, 2 мкл кДНК. ПЛР здійснювали у термоциклері 7500 Fast Real-Time PCR System («Applied Biosystems», США) за програмою: 94 °C (10 с), 65 °C (60 с) протягом 45–50 циклів. У реакціях ампліфікації використовували праймери, специфічні до кДНК  $K_{Ca}1.1$  та  $BK_{Ca}\beta 1$  щура (номери доступу Генбанку (NM\_031828.1 та NM\_019273.1 відповідно), які були валідовані в попередніх дослідженнях [12]. Праймери  $K_{Ca}1.1$  мали таку послідовність:  $K_{Ca}1.1$  прямий 5'-tacttcaatgacaatactctcaccct-3',  $K_{Ca}1.1$  зворотний – 5'-ACCATAA CAACCCATCCSSTAAG-3', а  $BK_{Ca}\beta 1$ :  $BK_{Ca}\beta 1$  прямий 5'-TGAAAGCACTGCTA CTCTTCAGC-3',  $BK_{Ca}\beta 1$  зворотний 5'-GTATCASCACAGAAGACACTCGGGA-3'. Для визначення кількості  $\beta$ -актину використовували праймери: прямий 5'-catccatgccctgagtc-3', зворотний 5'-acasctcaaccactccag-3'.

Візуалізацію ампліконів після горизонтального електрофорезу у 3%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію здійснювали за допомогою трансільюмінатора ViTran («Біоком», Росія). Кількісну оцінку експресії та обробку результатів проводили з використанням програмного

забезпечення 7500 Fast System SDS Software 1.3.1 ("Applied biosystems", США). *Статистика.* Кожен експеримент проводили декілька разів. Електрофізіологічні результати обробляли за допомогою програмних пакетів pClamp 8.0 та Origin 7.0 ("Origin Lab. Corp.", США). Їх представляли як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення із позначенням у дужках кількості клітин, на яких вони були отримані. Для оцінки достовірності визначених відмінностей використовували двохсторонній, непарний t-тест; відмінності з  $P < 0,05$  вважали достовірними.

## РЕЗУЛЬТАТИ

Особливістю ГМК, ізольованих з детрузора щурів з діабетом, була значно вища ємність їх мембрани ( $34 \text{ пФ} \pm 6 \text{ пФ}$ ,  $n=10$ ) порівняно з контролем ( $27 \text{ пФ} \pm 5 \text{ пФ}$ ,  $n=10$ ), що вказує на значну гіпертрофію ГМК детрузора при діабеті.

*Вплив діабету на вихідний калієвий струм, активований деполяризацією.* Загалом струми у відповідь на деполяризацію ГМК як нормальних, так і щурів з діабетом склалися з невеликого початкового вхідного компонента, який з часом змінювався на потужний вихідний калієвий (рис. 1). Вхідний компонент струму значною мірою маскувався як досить тривалим перезарядом ємності мембрани ГМК, так і активацією протилежно спрямованого калієвого струму. Його доволі повільна кінетика (порівняно з потенціалзалежним натрієвим), невелика амплітуда та діапазон мембранних потенціалів ( $V_m$ ), в яких він найбільше проявлявся ( $-30 - 0 \text{ мВ}$ ), вказували на його кальцієву природу.

Вихідний калієвий струм прогресивно збільшувався з підвищенням деполяризації, а при сталому її значенні в діапазоні  $0 - +50 \text{ мВ}$  його амплітуда зазнавала значних флуктуацій. Відомо, що ГМК детрузора експресують низку калієвих каналів і відповідних їм струмів [3], а флуктуації

вихідного струму можуть бути зумовлені накладанням спонтанних транзйентних вихідних струмів (СТВС) внаслідок активації ВК-каналів [5]. Підтвердженням того, що ВК-канали роблять значний внесок у загальний вихідний калієвий струм ГМК детрузора як нормальних, так і щурів з діабетом був той факт, що цей струм пригнічувався на 90 % відомим блокатором ВК-каналів паксиліном (5 мкмоль/л).

Навіть поверхневе порівняння густини вихідного калієвого струму нормальних щурів і щурів з діабетом (див. рис. 1) вказувало на те, що в останніх він помітно менший. Для кількісної оцінки відмінностей використовували значення струмів у кінці деполаризувального імпульсу до +50 мВ тривалістю 200 мс. Якщо в цей момент спостерігалася генерація СТВС, то брали значення струму до їх виникнення. Виявилося, що якщо в контролі середня густина вихідного калієвого струму, який, як впливає із його чутливості до паксиліну, на 90 % переноситься через ВК-канали, становить  $15,0 \text{ пА/пФ} \pm 0,4 \text{ пА/пФ}$  ( $n=10$ ),

то при діабеті вона зменшується до  $10,0 \text{ пА/пФ} \pm 0,5 \text{ пА/пФ}$  ( $n=10$ ; рис. 2,а). Таким чином діабет призводить до зменшення струму через ВК-канали, активованого деполаризацією, приблизно на 33 %.

*Вплив діабету на СТВС.* У разі підтримуваних потенціалів ( $V_h$ ) у діапазоні -30 – 0 мВ ГМК детрузора генерували СТВС. Загалом основним механізмом їх виникнення в ГМК різних типів є спонтанні вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із підсарколемальних ділянок саркоплазматичного ретикулума (кальцієві спалахи) та активації в результаті цього кальційзалежних ВК-каналів [6]. На рис. 3 наведено приклади типових записів СТВС при  $V_h = -20$  мВ в ГМК детрузора контрольних тварин і тварин з експериментальним діабетом. Амплітуди СТВС були пронормовані до значень ємності мембрани відповідних клітин. Одразу відзначаємо відмінності як у амплітуді, так і у частоті виникнення СТВС. Кількісний аналіз експериментальних записів показав, що амплітуда СТВС зменшувалася із контрольного значення 0,9

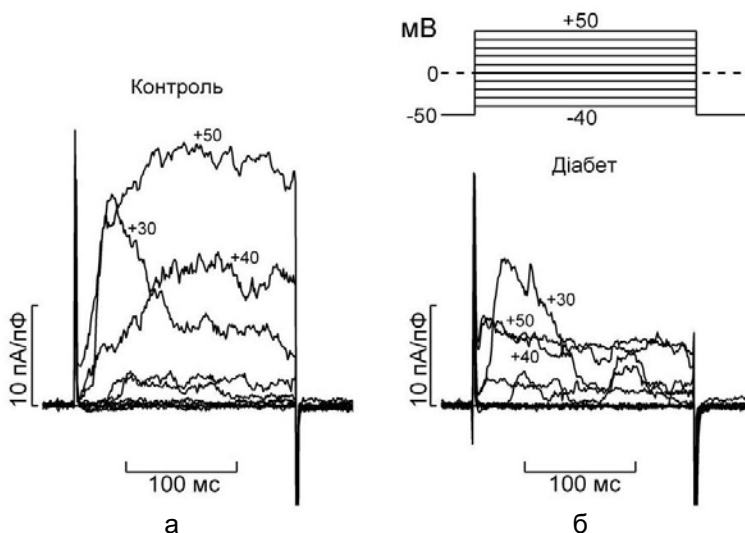


Рис. 1. Зменшення густини активованого деполаризацією загального калієвого струму ізольованих гладеньком'язових клітин (ГМК) детрузора: а – контрольні щури, б – щури з діабетом і протокол стимуляції; цифри біля записів струму відповідають мембранному потенціалу; флуктуації вихідних калієвих струмів відображають активність кальційзалежних калієвих каналів великої провідності; вертикальна калібровка подана в одиницях густини струму, щоб врахувати різницю в розмірах ГМК контрольних щурів і щурів з діабетом (ємність мембрани становить 17 та 26 пФ відповідно)

пА/пФ  $\pm 0,1$  пА/пФ (n=6) до  $0,5$  пА/пФ  $\pm 0,1$  пА/пФ (n=5) при діабеті, тоді як середня частота виникнення СВТС знижувалася з  $12,0$  Гц  $\pm 1,5$  Гц (n=6) у контролі до  $2,4$  Гц  $\pm 0,6$  Гц (n=5) при діабеті (див. рис. 2, б,в). Отже, діабет викликав майже дворазове зниження амплітуди та зменшення частоти

виникнення СВТС приблизно у 5 разів порівняно з контролем.

*Вплив діабету на експресію субодиниць ВК-каналів.* Однією з причин пригнічення струмів через ВК-канали в ГМК детрузора щурів при діабеті може бути зменшення експресії субодиниць, що утворюють ці канали. З точки зору молекулярної структури ВК-канали – це гетерооктамери, що складаються з чотирьох пороформувальних  $\alpha$ -субодиниць (позначення  $K_{Ca}1.1$ , ген  $KCNMA1$ ) і чотирьох допоміжних  $\beta$ -субодиниць, які модулюють функціональні властивості каналу [9]. З чотирьох відомих ізоформ  $\beta$ -субодиниць ( $ВК_{Ca}\beta 1-4$ , гени  $KCNMB1-4$ ) специфічною для гладеньком'язової тканини загалом і до ГМК сечового міхура зокрема є  $ВК_{Ca}\beta 1$  [9, 10]. Основна роль  $ВК_{Ca}\beta 1$ -субодиниці полягає у стабілізації відкритого стану каналу, підвищенні його потенціал- та  $Ca^{2+}$ -чутливості [7, 9], а також у регуляції поверхневої експресії [13]. Щоб визначити наскільки виявлене нами пригнічення струму через ВК-канали може бути пов'язане зі зміною в експресії субодиниць ми порівняли рівні експресії мРНК  $K_{Ca}1.1$  та  $ВК_{Ca}\beta 1$  у гладеньких м'язах детрузора нормальних щурів і щурів з діабетом за допомогою ПЛР у реальному часі. Результати виявилися доволі складними для інтерпретації, оскільки показали, що при діабеті, з одного боку, спостерігається зростання мРНК  $K_{Ca}1.1$  майже у 20 разів, а з іншого – чотириразове зменшення експресії мРНК  $ВК_{Ca}\beta 1$  (див. рис. 3, г,д). Чи зможе зниження експресії модулювальної  $\beta$ -субодиниці виявитися превалюючим за своїм негативним впливом на величину ВК-струмів порівняно зі зростанням експресії  $\alpha$ -субодиниці і таким чином пояснити пригнічення струмів через ВК-канали ГМК-детрузора при діабеті поки залишається неясним.

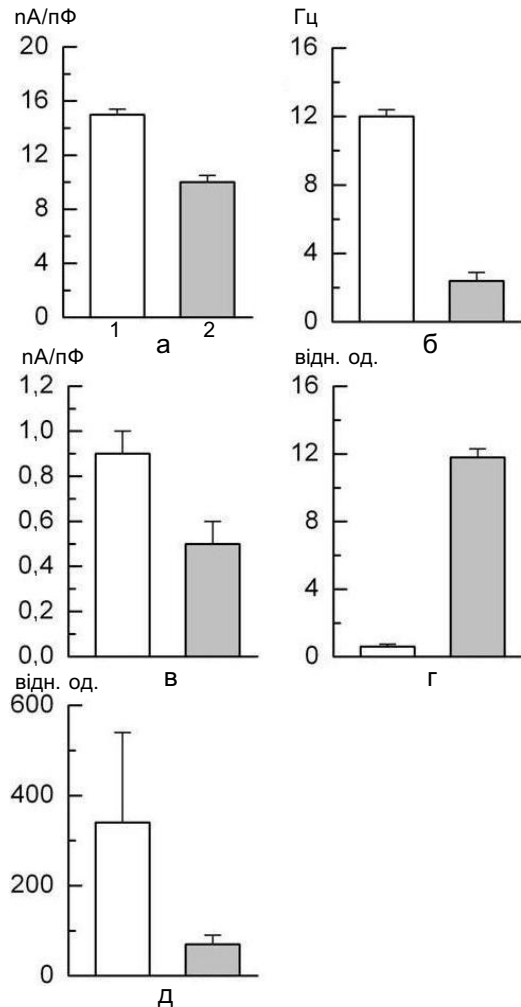


Рис. 2. Вплив діабету на струми та експресію субодиниць кальційзалежних калієвих каналів великої провідності в ізолюваних гладеньком'язових клітинах (ГМК) детрузора щура. Наведено середні значення ( $\pm$  стандартна похибка, n=4-5 для кожного дослідження) густини загального калієвого струму, активованого деполаризацією (а), частоти (б) та амплітуди (в) спонтанних транзйентних вихідних струмів, а також відносних рівнів експресії мРНК  $K_{Ca}1.1$   $\alpha$ - (г) та  $\beta$ -субодиниць (д) в ізолюваних ГМК детрузора контрольних щурів (1) та щурів з діабетом (2)

## ОБГОВОРЕННЯ

Проведені нами дослідження свідчать про суттєве пригнічення функції ВК-каналів ГМК детрузора шурів при діабеті як на рівні макрострумів, викликаних деполяризацією, так і на рівні генерації СВТС. Результатом пригнічення ВК-каналів, з одного боку, є зниження потенціалу спокою ГМК детрузора внаслідок зменшення внеску СВТС у базальну калієву провідність, а з іншого – уповільнення реполяризації ПД, що у сукупності посилює збудливість ГМК.

ВК-канал поєднує у собі властивість потенціалзалежності через наявність у його складі основної пороформувальної  $\alpha$ -субодиниці S4-сенсора потенціалу та кальцієвої залежності, що зумовлюється наявністю в С-термінальній частині  $\alpha$ -субодиниці кальційзв'язувального домену [9]. Крім того, у складі ВК-каналу є модуляторна  $\beta 1$ -субодиниця, яка стабілізує відкритий стан, підвищує потенціал- і  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливість каналу, а також впливає на його локалізацію в плазматичній мембрані [7, 9, 13]. Таким чином, в основі зменшення ВК-струму при діабеті можуть лежати принаймні три

причини: 1) зменшення експресії  $\text{K}_{\text{Ca}} 1.1 \alpha$ -субодиниці, 2) зниження ймовірності відкритого стану каналу та його мембранного скерування внаслідок зменшення експресії  $\text{K}_{\text{Ca}} \beta 1$  та/або 3) зміни в кальцієвій сигналізації ГМК детрузора, які послаблюють кальційзалежну активацію ВК-каналу. Першу причину можна відкинути, оскільки наші результати показують не зменшення, а навпаки, суттєве збільшення експресії мРНК  $\text{K}_{\text{Ca}} 1.1$  при діабеті. Однак виявлені нами протилежні зміни в експресії основної  $\text{K}_{\text{Ca}} 1.1$ - та допоміжної  $\text{K}_{\text{Ca}} \beta 1$ -субодиниці поки не дають змоги з упевненістю говорити, як остаточно вони можуть позначитися на розмірі струму. Можливо, що для оптимальної модуляції як функціональних властивостей ВК-комплексу, так і його мембранної локалізації потрібна певна пропорція  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць. У зв'язку з цим зазначимо, що за нашими результатами, якщо у нормі у ГМК детрузора спостерігається приблизно в 100 разів перевищення кількості мРНК  $\text{K}_{\text{Ca}} \beta 1$  щодо  $\text{K}_{\text{Ca}} 1.1$ , то при діабеті воно знижується приблизно до 7 разів (див. рис. 2, г,д). Ймовірно, що збільшення експресії мРНК

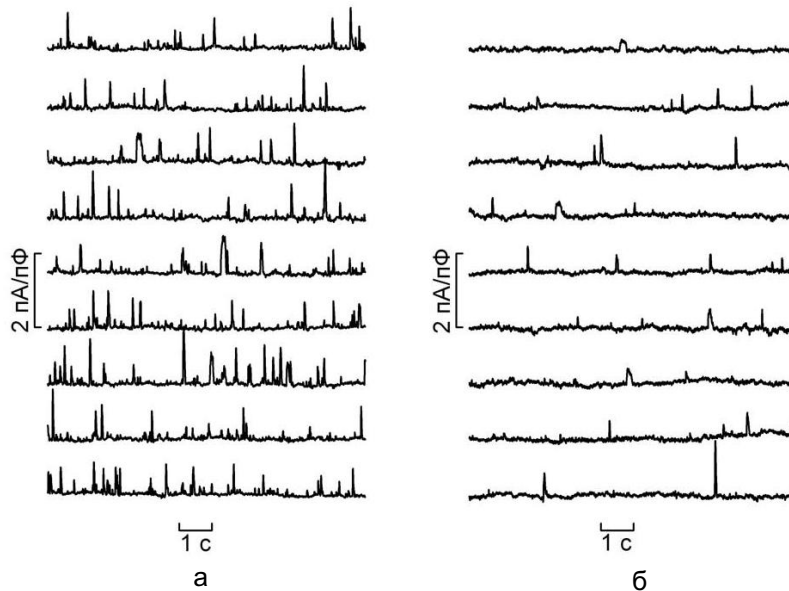


Рис. 3. Спонтанні транзйентні вихідні калієві струми в ізольованих гладеньком'язових клітинах (ГМК) детрузора шура при підтримуваному потенціалі  $-20$  мВ, контрольних шурів (а) та шурів із діабетом (б); вертикальна калібрівка – густина струму; ємність «контрольної» ГМК становить 25, а «діабетичної» – 36 пФ

пороформувальної  $K_{Ca}1.1$ -субодиниці є компенсаторною відповіддю на відсутність функціонального каналу у мембрані при діабеті. Остання може бути наслідком зменшення експресії  $BK_{Ca}\beta1$  або порушення нормальної трансляції білка, наприклад, під впливом певних мікроРНК. Необхідні додаткові дослідження для визначення, як співвідношення в експресії  $K_{Ca}1.1$  і  $BK_{Ca}\beta1$  позначається на мембранній локалізації та ймовірності відкритого стану ВК-каналу, а також для встановлення типу та спрямованості змін у кальцієвих сигналах, що впливають на активацію каналу при діабеті.

Отже, наші результати показують, що компоненти молекулярної будови та/або  $Ca^{2+}$ - і потенціалзалежної активації ВК-каналу можна розглядати як потенційні мішені для розробки лікарських засобів у лікуванні синдрому гіперзбудливого сечового міхура при діабеті.

**Д.А. Крышталь, О.Н. Падурару,  
А.И. Болдырев, О.Ю. Кот, В.В. Рекалов  
Я.М. Шуба**

### **ИЗМЕНЕНИЯ КАЛЬЦИЙЗАВИСИМОЙ КАЛИЕВОЙ ПРОВОДИМОСТИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ**

Активация кальцийзависимых калиевых каналов большой проводимости (BK-каналы) влияет на реполяризацию мембраны во время генерации потенциала действия и на потенциал покоя гладкомышечных клеток (ГМК) детрузора. Одним из осложнений диабета является синдром гиперактивного мочевого пузыря (СГАМП). С использованием метода patch-clamp было установлено значительное уменьшение калиевого тока через ВК-каналы ( $I_{BK}$ ) изолированных ГМК детрузора крыс со стрептозотининдуцированным диабетом по сравнению с контрольными животными, а также угнетение амплитуды и частоты ВК-опосредованных спонтанных транзистентных выходящих токов (СТВТ). При диабете плотность  $I_{BK}$ , вызванного деполяризацией мембраны до +50 мВ, была  $10,0 \text{ пА/пФ} \pm 0,5 \text{ пА/пФ}$  (в контроле  $15,0 \text{ пА/пФ} \pm 0,4 \text{ пА/пФ}$ ), а средние значения частоты и амплитуды СТВТ при поддерживаемом потенциале -20 мВ снижались с  $12,0 \pm 1,5$  до  $2,4 \text{ Гц} \pm 0,6 \text{ Гц}$  и с  $0,9 \pm 0,1$  до  $0,5 \text{ пА/пФ} \pm 0,1 \text{ пА/пФ}$  соответственно. При помощи количественной полимеразной цепной реакции показано, что при диабете возрастает экспрессия мРНК

основной, пороформирующей  $K_{Ca}1.1$ -субодиниці ВК-канала и уменьшается – его вспомогательной  $BK_{Ca}\beta1$ -субодиниці. Сделан вывод о том, что выявленные изменения в токах через ВК-каналы при диабете могут повышать возбудимость ГМК детрузора и обуславливать возникновение миогенного СГАМП. Однако необходимы дополнительные исследования того, каким образом снижение экспрессии  $BK_{Ca}\beta1$  сказывается на функциональных свойствах ВК-канала, а также для определения типа и направленности изменений в кальциевых сигналах, которые влияют на активацию этого канала, при диабете. Ключевые слова: мочевого пузыря, детрузор, гладкие мышцы, диабет, кальцийзависимые калиевые каналы, ВК-каналы.

**D.A. Krishtal, O.M. Paduraru, O.I. Boldyrev,  
O.Iu. Kit, V.V. Rekalov Ia.M. Shuba**

### **DIABETES-EVOKED CHANGES IN $Ca^{2+}$ - DEPENDENT POTASSIUM CONDUCTANCE OF ISOLATED SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE RAT BLADDER**

Activation of large conductance  $Ca^{2+}$ -dependent potassium channels (BK channels) influences repolarization of the action potential and the level of the resting potential of detrusor smooth muscle cells (SMC). Overactive bladder syndrome (OBS) is one of the complications of diabetes. Here using whole-cell patch clamp technique we show sizable reduction of depolarization-evoked BK current ( $I_{BK}$ ) and decrease in the amplitude and frequency of spontaneous transient outward currents (STOCs) in isolated SMC from detrusor of rats with streptozocin-induced diabetes compared to control animals. Under the diabetes  $I_{BK}$  density at step depolarization to +50 mV decreased from control value of  $15.0 \pm 0.4 \text{ pA/pF}$  to  $10.0 \pm 0.5 \text{ pA/pF}$ , whereas the mean values of the STOCs' frequency and amplitude at holding potential -20 mV were reduced from  $12.0 \pm 1.5 \text{ Hz}$  to  $2.4 \pm 0.6 \text{ Hz}$  and from  $0.9 \pm 0.1 \text{ pA/pF}$  to  $0.5 \pm 0.1 \text{ pA/pF}$ , respectively. Using real time RT-PCR it was found that the expression of mRNA for the BK-channel primary pore-forming  $K_{Ca}1.1$ -subunit increases under the diabetes, whilst that for the auxiliary  $BK_{Ca}\beta1$ -subunit decreases. It is concluded that the observed changes in the BK-channel currents can enhance excitability of the detrusor SMCs thereby promoting myogenic OBS. However, further studies are needed to determine how the decrease in  $BK_{Ca}\beta1$  expression under the diabetes impairs functional properties of BK channels and to establish possible changes in calcium signals that modulate channel activation.

Key words: bladder, detrusor, smooth muscles, diabetes mellitus, calcium dependent potassium channels, BK-channels.

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

*International Center of Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болдирев О.І., Соткіс Г.В., Кулієва Є.М., Владимиrowa Й.А., Філіппов І.Б., Скрима Р., Преварська Н., Шуба Я.М. Експресія холодового рецептора TRPM8 у гладеньких м'язах сім'явивідних протоків шурів // Фізіол. журн. – 2009. – **55**, №5. – С. 17–27.
2. Brading A.F. Spontaneous activity of lower urinary tract smooth muscles: correlation between ion channels and tissue function // J. Physiol. – 2006. – **570**. – P. 13–22.
3. Christ G.J., Hodges S. Molecular mechanisms of detrusor and corporal myocyte contraction: identifying targets for pharmacotherapy of bladder and erectile dysfunction // Brit. J. Pharmacol. – 2006. – **147**. – P. S41–S55.
4. Heppner T.J., Bonev A.D., Nelson M.T. Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels regulate action potential repolarization in urinary bladder smooth muscle // Amer. J. Physiol. – 1997. – **273**, № 1. – P. C110–C117.
5. Hristov K.L., Cui X., Brown S.M., Kellett W.F., Petkov G.V. Stimulation of beta3-adrenoceptors relaxes rat urinary bladder smooth muscle via activation of the large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels // Ibid. – 2008. – **295**, № 5. – P. C1344–C1353.
6. Jaggar J.H., Porter V.A., Lederer W.J., Nelson M.T. Calcium sparks in smooth muscle // Amer. J. Physiol. – 2000. – **278**, № 2. – P. C235–C256.
7. McManus O.B., Helms L.M., Pallanck L., Ganetzky B., Swanson R., Leonard R.J. Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels // Neuron. – 1995. – **14**. – P. 645–650.
8. Meredith A.L., Thorneloe K.S., Werner M.E., Nelson M.T., Aldrich W.T. Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**. – P. 36746–36752.
9. Orio P., Rojas P., Ferreira G., Latorre R. New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits // News Physiol. Sci. – 2002. – **17**. – P. 156–161.
10. Petkov G.V., Bonev A.D., Heppner T.J., Brenner R., Aldrich R.W., Nelson M.T. Beta 1-subunit of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle // J. Physiol. – 2001. – **537**. – P. 443–452.
11. Roxburgh C., Cook J., Dublin N. Anticholinergic drugs versus other medications for overactive bladder syndrome in adults // Cochrane Database Syst. Rev. – 2007. – **3**, № 4. – P. CD00319.
12. Soloviev A., Tishkin S., Ivanova I., Zelensky S., Dosenko V., Kyrychenko S., Moreland R.S. Functional and molecular consequences of ionizing irradiation on large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat aortic smooth muscle cells // Life Sci. – 2009. – **84**, №5–6. – P. 164–171.
13. Toro B., Cox N., Wilson R.J., Garrido-Sanabria E., Stefani E., Toro L., Zarei M.M. KCNMB1 regulates surface expression of a voltage and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel via endocytic trafficking signals // Neuroscience. – 2006. – **142**, № 3. – P. 661–669.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Міжнарод. центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ  
E-mail: yshuba@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до  
редакції 17.11.2010*



М.В. Макаренко, В.С. Лизогуб, Л.І. Юхименко, С.М. Хоменко

## Серцевий ритм у осіб з різним рівнем переробки слухової інформації

*Вивчали особливості регуляції серцевого ритму у здорових чоловіків віком від 18 до 20 років при переробці ними складної інформації з диференціювання позитивних і гальмівних слухових сигналів. Виявлено статистично значимі різниці між групами з різним рівнем переробки, що підтверджено і кореляційним аналізом, між кількістю переробленої інформації та варіаційними ( $r=0,41$ ,  $P<0,05$ ) і спектральними ( $r= -0,49$  –  $-0,56$ ,  $P<0,05$ ) характеристиками. Обстежувані з високим рівнем характеризувалися достовірно низькою сумарною потужністю спектра ( $TP=1276,2$  мс<sup>2</sup>), потужністю спектра на високій ( $HF=280,1$  мс<sup>2</sup>) та дуже низькій частотах ( $VLF=469,8$  мс<sup>2</sup>), а також низькими величинами стандартного відхилення інтервалів R-R ( $SDNN=37,4$  мс) на відміну від осіб з низьким її рівнем (5248,8; 866,7; 1937,0; 69,8 мс<sup>2</sup> відповідно). Обговорюються різні стратегії активації неспецифічних систем мозку у формуванні фізіологічних реакцій та участі регуляторних механізмів серцевого ритму у вегетативному забезпеченні переробки складної слухової інформації.*

*Ключові слова: регуляція серцевого ритму, переробка слухової інформації.*

### ВСТУП

Невід'ємною рисою сучасного життя є різке зростання інформаційних навантажень, а також наявність активної діяльності, коли слід приймати безпомилкові рішення при жорсткому обмеженні у часі [2]. Переробка слухової інформації є складовою багатьох трудових операцій, де потрібні висока точність, швидкість, безпомилковість, селекція та координація рухів. Такі умови діяльності супроводжуються у більшості людей підвищенням психофізіологічного напруження. В свою чергу це може призвести до погіршення функціонального стану і, зокрема – серцево-судинної системи, внаслідок чого слід чекати суттєвого зниження ефективності переробки інформації [6].

Відомо, що адаптація серцево-судинної системи до різноманітних інформаційних навантажень залежить від стану вегетативної нервової системи [4]. Одним із найбільш інформативних методів оцінки

стану регуляції серця є аналіз варіабельності серцевого ритму (ВСР). Він дає змогу виявити зміни у регуляторних системах різного рівня, у тому числі і надсегментарних і провести зіставлення між її ланками [1, 10]. Найбільшого значення набувають статистичні, варіаційні та спектральні характеристики ВСР, особливо при їх реєстрації під час виконання складного завдання, яким є переробка слухової інформації.

Відповідно до сучасних уявлень, робота головного мозку забезпечується тісною взаємодією інформаційних та активаційних процесів [5, 8, 11]. За цих умов приймання, переробка інформації та формування відповіді у мозку створюють функціональний стан і відповідний енергетичний фон, оптимальний для виконання напруженої роботи. Таким є стан, що дає змогу досягнути мети діяльності за умови найменших енергетичних витрат. Саме при оптимальному рівні активації в ЦНС тривалий час зберігається висока працездатність і досягається найкращий результат діяльнос-

© М.В. Макаренко, В.С. Лизогуб, Л.І. Юхименко, С.М. Хоменко

ті [4]. Розуміння найбільш сприйнятних функціонального стану або рівня активації тісно пов'язане з поняттям про його індивідуальний рівень. Тому проблема залежності розумової діяльності від індивідуального рівня переробки слухової інформації та особливості регуляції серцевого ритму за цих умов упродовж тривалого часу привертають до себе увагу науковців різних галузей.

Ми виходили з гіпотези, що механізми регуляції серцевого ритму пов'язані з індивідуальними особливостями переробки інформації. Метою роботи було з'ясування особливостей стану серцевого ритму в осіб з різним рівнем переробки слухової інформації з диференціювання позитивних і гальмівних сигналів.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 120 здорових чоловіках віком від 18 до 20 років. Слухову інформацію пред'являли в режимі «зворотного зв'язку» на комп'ютерному комплексі «Діагност-2» [7]. Обстежуваному потрібно було впродовж 5 хв якомога швидше диференціювати позитивні і так звані гальмівні слухові подразники, які подавали через навушники бінаурально. Використовували чисті тони, що описуються правильною синусоїдою. До початку дослідження обстежуваній отримував інструкцію відповідно до якої за умов появи звуку 1000 Гц (високий тон) йому потрібно швидко натиснути та відпустити пальцем правої руки праву кнопку. Поява звуку у 300 Гц (низький тон) вимагала швидкого натискання та відпускання пальцем лівої руки ліву кнопку. На звук у 600 Гц (середній тон) - гальмівний подразник – не натискати на жодну з кнопок. Експозиція першого подразника була 1000 мс. Подача кожного наступного подразника автоматично змінювалася залежно від правильності відповіді. Після правильної відповіді вона скорочувалась, а в разі помилки – подовжувалась на

20 мс. Приймалося, що чим більше подразників зміг переробити обстежуваний за 5 хв роботи, тим вище в нього рівень переробки інформації.

Реєстрацію варіаційних, статистичних і спектральних показників СР проводили на приладі «Cardiolab+» у стані спокою та під час виконання розумового навантаження. Визначали частоту серцевих скорочень (ЧСС), амплітуду моди (АМО) та стандартне відхилення інтервалів R-R у вибірці (SDNN). Спектральний аналіз СР здійснювали за показниками сумарної потужності спектра (Total Power - TP), потужності спектра на дуже низьких (VLF), низьких (LF) та високих (HF) частотах, а також визначали HF-нормалізоване та співвідношення LF/HF [1]. Результати оброблено методами непараметричної статистики за пакетом програм Excel-2010.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз результатів дослідження виявив кореляцію між кількістю переробленої інформації та показниками ВСР (рис. 1).

Від'ємний зв'язок був встановлений між кількістю інформації і TP, VLF, HF, SDNN. Коефіцієнт кореляції знаходився у межах - 0,49 – - 0,56, ( $P < 0,05$ ). Позитивна кореляція на рівні  $r = 0,41$  ( $P < 0,05$ ) була виявлена з АМО. Зв'язку між кількістю переробленої інформації з ЧСС знайдено не було ( $P > 0,05$ ).

Отримані експериментальні результати можуть бути доказом того, що кількість переробленої слухової інформації пов'язана з варіаційними, статистичними та спектральними характеристиками СР. У переважній кількості випадків чим більше інформації переробляв обстежуваний, тим нижчою була потужність TP, VLF, HF та SDNN і вищою АМО. І навпаки, низькі значення частіше збігалися з високими характеристиками TP, VLF, HF та SDNN і низьким АМО. Наявність кореляції між показниками ВСР і кількістю розумового

навантаження свідчить на користь того, що виконання такого завдання відбувається за умов виражених змін регуляції ВСР. У літературі відносно лабільності СР у різних умовах діяльності немає одностайної думки [1, 10]. Особливості регуляції серцево-судинної системи можуть бути пов'язаними як з абсолютним збільшенням симпатичної активності, так і зі зменшенням усіх вегетативних впливів на серце [4]. Можливо, виявлені зв'язки між кількістю переробленої слухової інформації та показниками вегетативної регуляції серця відображають особливості індивідуальної стратегії пристосування серцево-судинної системи до конкретної діяльності.

Для уточнення результатів кореляції ми провели розподіл обстежуваних за індивідуальним показником кількості переробленої слухової інформації на групи. Було встановлено, що у всіх тестованих він знаходився у межах від 351,1 до 603,5 подразників. На гістограмі розподілу обстежуваних спостерігали один виражений локальний пік чисельності, що відповідав середнім значенням ( $457,83 \pm 17,5$ ) і два значно менші: з відносно низьким ( $356 \pm 21,4$ ) і високим ( $552,5 \pm 16,2$ ) рівнем.

З огляду на значну девіантність індивідуальних значень статистичних, варіаційних і спектральних характеристик СР обраховували медіану та визначали верхній (75%) і нижній (25%) квантілі. Оцінку досліджуваних показників ВСР здійснювали у трьох групах у стані спокою та під час виконання роботи.

У стані спокою між характеристиками СР у групах з високим, середнім і низьким рівнем достовірних різниць виявлено не було ( $P > 0,05$ ). Такий факт, на нашу думку, можна пояснити тим, що у здорових людей механізми регуляції серцевого ритму достатньо збалансовані відповідно до низьких потреб поточного стану спокою, так що різниці у вегетативній нервовій системі можуть компенсуватися досконалими автономними регуляторними механізмами.

Порівняння показників ВСР при виконанні завдання у групах свідчить про наявність статистично значимих різниць, які проявились у істотно нижчих медіанах, спектральних TP, VLF, HF і варіаційних SDNN показників у обстежуваних з високим рівнем порівняно з низьким ( $P < 0,05$ ; рис. 2). Показники ВСР обстежуваних з середнім рівнем у більшості випадків

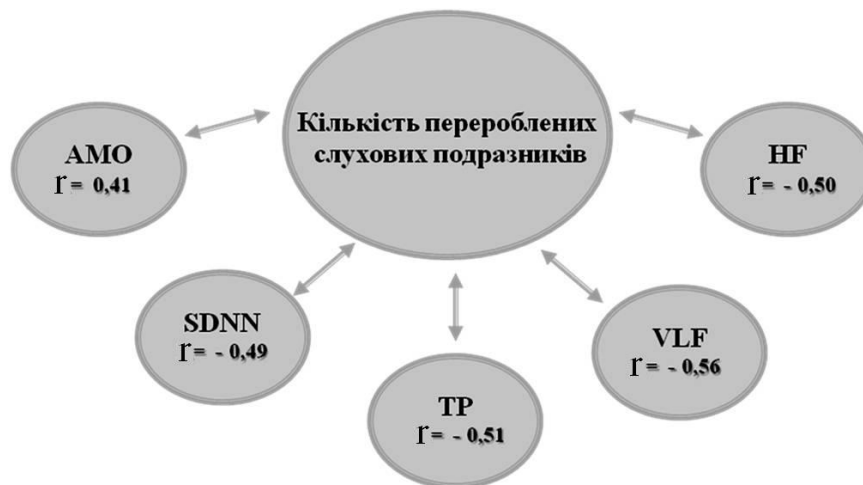


Рис. 1. Кореляції між кількістю перероблених слухових подразників і характеристиками серцевого ритму ( $P < 0,05$ ): AMO – амплітуда моди, SDNN – стандартне відхилення інтервалів R-R ЕКГ, TP- сумарна потужність спектра, VLF – потужність спектра на дуже низьких частотах, HF – потужність спектра на високих частотах

займали проміжне положення.

Надалі для дослідження того, наскільки змінився рівень функціонування серцево-судинної системи під час диференціювання слухових подразників у осіб з різним рівнем переробки слухової інформації, ми порівняли

медіану потужності показників ВСР до та під час слухомоторної діяльності. Результати такого порівняння (різницю) ми представили у відсотках, де за 100 % були взяті значення показників ВСР у спокої перед виконанням розумового навантаження (рис. 3).

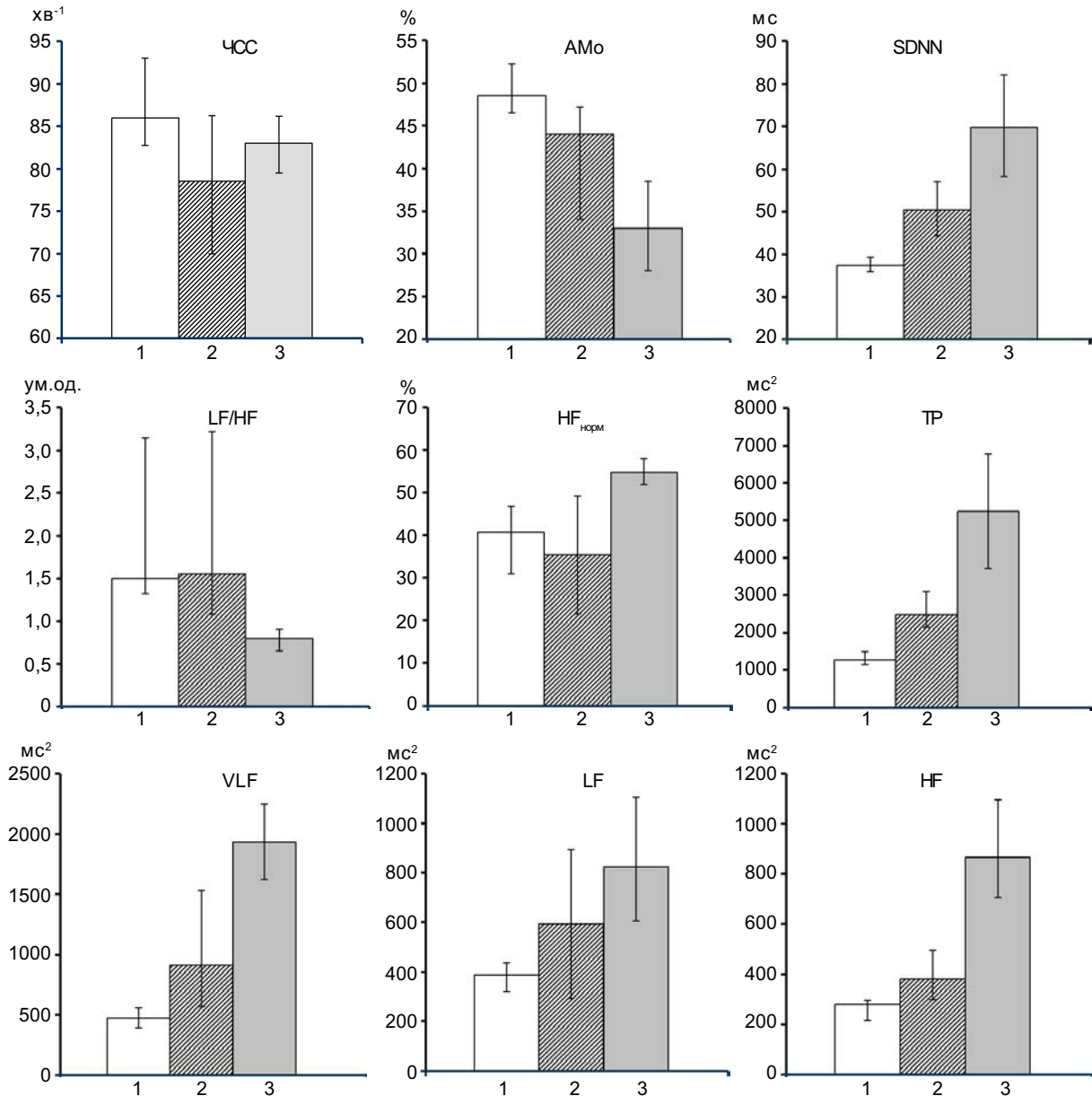


Рис. 2. Показники серцевого ритму під час переробки слухової інформації: 1 – з високим, 2 – середнім, 3 – низьким рівнем; \* вірогідність різниць ( $P < 0,05$ ) показників між групами осіб з високим і низьким рівнем. ЧСС – частота серцевих скорочень, AMo – амплітуда моди, SDNN – стандартне відхилення інтервалів R – R ЕКГ, LF/HF – співвідношення спектра низьких частот до високих, HF норм. – потужність спектра на високих частотах нормалізована, TP – сумарна потужність спектра, VLF – потужність спектра на дуже низьких, LF – низьких та HF – високих частотах

Встановлено, що у осіб з високим рівнем переробки інформації знижувалися потужності всіх спектральних показників (TP, VLF, LF та HF), а також співвідношення LF/HF, HF-норм. і SDNN на відміну від групи обстежуваних з низьким рівнем, у яких спостерігали зниження лише потужності хвиль LF, співвідношення LF/HF та АМО ( $P < 0,05$ ). Одночасно підвищувалися всі інші статистичні та спектральні характеристики ВСР ( $P < 0,05$ ).

З отриманих результатів видно, що виконання завдання з переробки інформації викликало у механізмах регуляції серцевого ритму протилежні зміни. При цьому, якщо у групі осіб з високим рівнем слухомоторного реагування ці зміни проявились у низьких значеннях загальної потужності спектра (TP), пригніченні дихальної (HF), судинної (LF) і гуморально-метаболічної

(VLF) модуляції, то у групі осіб з низьким рівнем – у посиленні потужності спектра, що, слід вважати, спричинено пригніченням судинної модуляції. Такі результати дають змогу стверджувати, що у осіб з низьким рівнем переробки слухової інформації у механізмах вегетативного забезпечення ВСР переважає тип реакції, що характеризується підвищенням психофізіологічної ціни напруженої діяльності, а значить і перевагою симпатичної активності.

Вірогідно, що в умовах сприйняття та диференціювання гальмівних і збудливих слухових подразників задіяний вищий кірковий рівень передачі інформації, який і формує комплекс фізіологічних реакцій, у тому числі і участь механізмів регуляції СР [7, 9]. У осіб з високим рівнем переробки інформації низькі значення статистичних, варіаційних і спектральних характеристик

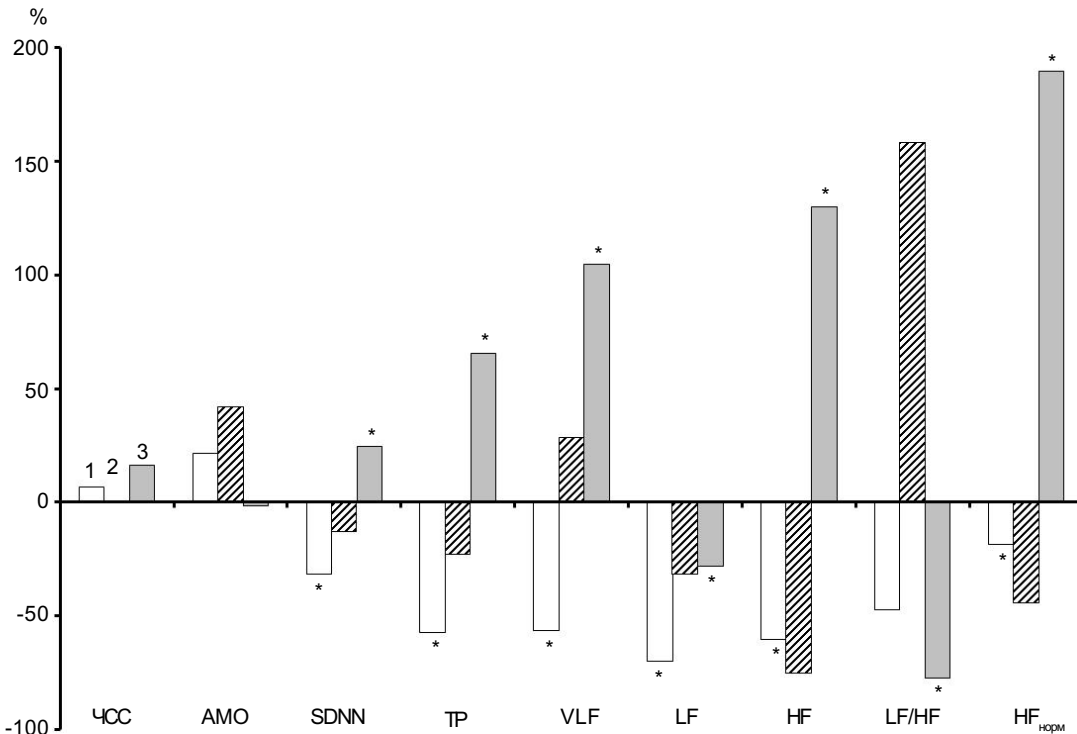


Рис. 3. Зміни показників серцевого ритму у осіб з різним рівнем переробки слухової інформації відносно фонових значень: 1 – високий, 2 – середній, 3 – низький; \* вірогідність різниць ( $P < 0,05$ ) відносно показників у стані спокою. ЧСС – частота серцевих скорочень, АМО – амплітуда моди, SDNN – стандартне відхилення інтервалів R – R ЕКГ, LF/HF – співвідношення спектра низьких частот до високих, HF норм. – потужність спектра на високих частотах нормалізована, TP – сумарна потужність спектра, VLF – потужність спектра на дуже низьких, LF – низьких та HF – високих частотах

СР, імовірно, зумовлені більш досконалою функціональною організацією систем і підвищенням ступеня локальної активації неокортекса і їх зв'язків з іншими відділами мозку, в тому числі, і вегетативними центрами. А у осіб з низьким рівнем спостерігалася генералізована реакція кіркових зон і неспецифічних систем мозку і більш виражена участь симпатичного відділу ВНС у механізмах регуляції СР. Окрім того, більш виражені фізіологічні зміни ВСР у відповідь на напружену слухомоторну діяльність у них пов'язані з менш досконалими механізмами переробки та оцінки інформації [3]. Такий спосіб вегетативного забезпечення надзвичайно не економний, оскільки характеризується підвищенням непродуктивної активації модульовальної системи мозку, збільшенням вкладу підсистеми емоційної компоненти, що і викликає генералізовану фізіологічну реакцію, швидке вичерпання резервів і тому не може забезпечувати ефективну реалізацію інтенсивної розумової діяльності впродовж тривалого часу [12]. У осіб з високим рівнем слухомоторного реагування модульовальна система мозку при напруженій роботі включає продуктивну, регіонарно-специфічну активацію переробки інформації, що проявилось у менш виражених змінах статистичних, варіаційних і спектральних характеристиках серцевого ритму. Такий спосіб обробки інформації може забезпечувати ефективну реалізацію напруженої розумової діяльності протягом тривалого часу.

Таким чином, складна слухомоторна діяльність людини з переробки інформації супроводжується різними змінами СР: 1) особи з високим рівнем характеризуються достовірно нижчими значеннями ТР, потужності спектра на високій HF і VLF частотах, а також SDNN; 2) у осіб з низьким рівнем переробки інформації таке саме розумове навантаження викликає більш виражені зміни у вегетативній регуляції, що проявляється у високих значеннях ритму серця; 3)

кореляційним аналізом між варіаційними та статистичними характеристиками СР, з одного боку, та кількістю переробки інформації – з іншого, підтверджено вірогідні відмінності між різними групами обстежуваних.

**Н.В. Макаренко, В.С. Лизогуб,  
Л.И. Юхименко, С.Н. Хоменко**

### **СЕРДЕЧНЫЙ РИТМ У ЛЮДЕЙ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ПЕРЕРАБОТКИ СЛУХОВОЙ ИНФОРМАЦИИ**

Исследовали особенности регуляции сердечного ритма во время переработки слуховой информации. Установили статистически достоверные отличия характеристик сердечного ритма в группах с разным уровнем реагирования. Обследуемые с высоким уровнем характеризовались достоверно низкой общей мощностью спектра ( $TP=1276,2 \text{ мс}^2$ , мощностью спектра на высоких ( $HF=280,1 \text{ мс}^2$ ) и очень низких частотах ( $VLF=469,8 \text{ мс}^2$ ), а также величиной стандартного отклонения R-R интервалов ( $SDNN=37,4 \text{ мс}$ ) в отличие от лиц с низким ее уровнем ( $5248,8; 866,7; 1937,0; 69,8 \text{ мс}^2$  соответственно). Корреляционный анализ подтвердил наличие различий между групп испытуемых с разным количеством переработанной слуховой информации и вариационными ( $r=0,41, P<0,05$ ), а также спектральными характеристиками сердечного ритма ( $r=-0,49 - -0,56, P<0,05$ ). Обсуждаются различные стратегии активации неспецифических систем мозга в формировании психофизиологических реакций и участия регуляторных механизмов сердечного ритма в вегетативном обеспечении переработки слуховой информации. Ключевые слова: регуляция сердечного ритма, переработка слуховой информации.

**M.V. Makarenko, V.S. Lyzogub,  
L.I. Yukhymenko, S.M. Khomenko**

### **HEART RHYTHM REGULATION IN HUMANS WITH DIFFERENT PROCESSING LEVELS OF ACOUSTIC INFORMATION**

The peculiarities of the heart rhythm regulation were investigated in humans during the processing of acoustic information. Statistically significant differences were found in individuals with different levels of auditory-motor reactions according to the heart rhythm characteristics. Individuals with the high level of reactions were characterized by significantly lower total power spectrum ( $TP=1276,2 \text{ ms}^2$ ), by the power spectrum of high ( $HL=280,1 \text{ ms}^2$ ) and very low frequencies ( $VLF=469,8 \text{ ms}^2$ ), as well as by low indexes of standard deviation of R-R intervals ( $SDNN=37,4 \text{ ms}$ ), when compared with the persons with the low level of reactions ( $5248,8; 866,7; 1937,0; 69,8 \text{ ms}^2$ ). The correlation analysis confirmed the dif-

ferences between the groups of persons with different number of processed information and variable ( $r=0,41$ ,  $P<0,05$ ) and spectral characteristics of heart rate ( $r=-0,49$  –  $-0,56$ ,  $P<0,05$ ). Different strategies of activation of non-specific brain systems in formation of psycho-physiological reactions and participation of heart rhythm regulatory mechanisms in vegetative support of auditory information processing are discussed. Key words: heart rhythm regulation, auditory information processing.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баевский Р.М., Иванов Г.Г. Анализ вариабельности ритма сердца при использовании различных электрокардиографических систем (методические рекомендации) // Вестн. аритмологии. – 2001. – №24. – С. 65–87.
2. Бодров В.А. Психологический стресс: развитие и преодоление. – М.: ПЕР СЭ, 2006. – 528 с.
3. Безруких М.М., Сонькин В.Д., Фарбер Д.А. Возрастная физиология (Физиология развития). – М.: Издат. центр “Академия”, 2003. – 416 с.
4. Данилова Н.Н. Психофизиология. – М.: Аспект Пресс, 1998. – 324 с.
5. Иваницкий А.М. Мозговая основа субъективных переживаний: гипотеза информационного синтеза // Журн. высш. нервн. деятельности. им. И.П. Павлова. – 1996. – 46, № 2. – С. 241–252.
6. Медведев В.И., Леонова А.Б. Функциональные состояния человека // Физиология трудовых процессов. – СПб.: Наука, 1993. – 225 с.
7. Макаренко М.В., Лизогуб В.С., Галка М.С., Юхименко Л.І., Хоменко С.М. Спосіб оцінки психофізіологічного стану слухового аналізатору // Заявка № А 201002225 на патент про винахід від 1.03.2010 р.
8. Мэгун Г. Бодрствующий мозг. – М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1961. – 112 с.
9. Котельников С.А., Ноздрачев А.Д., Одинак М.М., Шустов Е.Б., Коваленко И.Ю., Давыденко В.Ю. Вариабельность ритма сердца: представления о механизмах // Физиология человека. – 2002. – 28, № 1. – С. 130–143.
10. Ноздрачев А.Д., Котельников С.А., Мажара Ю.П., Наумов К.М. Один из взглядов на управление сердечным ритмом: интракардиальная регуляция // Там же. – 2005. – 31, №2. – С. 116–129.
11. Симонов П. В. Эмоциональный мозг (физиология, нейроанатомия, психология эмоций). – М.: Наука, 1981. – 211 с.
12. Фарбер Д.А., Безруких М.М. Методологические аспекты изучения физиологии развития ребенка // Физиология человека. – 2001. – 27, № 5. – С. 8–19.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольца НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до редакції 06.01.2011*

З.А. Горенко, Л.С. Карбовська, І.П. Вашека, С.П. Весельський

## Вплив кальцитоніну на зовнішньосекреторну функцію печінки у щурів

*У гострих дослідях на щурах з канюльованою загальною жовчною протокою вивчено вплив кальцитоніну на рівень холерезу та спектр жовчних кислот у жовчі. Впродовж 3 год досліді вимірювали інтенсивність секреції жовчі та вміст у ній кон'югованих і вільних жовчних кислот методом тонкошарової хроматографії. Показано, що синтетичний кальцитонін лосося, введений внутрішньом'язово у дозі 200 нг/кг, збільшує об'єм секретованої жовчі та вміст у ній кон'югованих жовчних кислот. У цілому об'єм виділеної жовчі під впливом кальцитоніну збільшився на 17,4 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем, дебіт тауротригідроксихолатів – на 58,3 % ( $P < 0,001$ ), тауродигідроксихолатів – на 68,5 % ( $P < 0,01$ ), глікодигідроксихолатів – на 120,8 % ( $P < 0,01$ ), тоді як загальний вміст вільних жовчних кислот практично не відрізнявся від контрольних значень. Встановлено, що під впливом гормону перерозподіляється жовчнокислотний спектр і частка кон'югованих холатів збільшується, а вільних – зменшується. Отримані результати свідчать, що під впливом кальцитоніну в гепатоцитах посилюються процеси кон'югації жовчних кислот з амінокислотами гліцином і таурином та каналікулярної секреції, що покращує сольобілізувальні властивості жовчі, її здатність утримувати холестерин у розчиненому стані та запобігає утворенню конкрементів у жовчовивідних шляхах. Ключові слова: кальцитонін, жовчоутворення, таурохолати, глікохолати, вільні жовчні кислоти.*

### ВСТУП

Нині в літературі накопичений значний матеріал, який свідчить про важливу роль гормонів щитоподібної залози у регуляції зовнішньосекреторної функції печінки. Проте основна частина праць присвячена ефектам тироксину та трийодтироніну, і практично немає відомостей про вплив на жовчоутворення кальцитоніну – гормону, котрий секретується парафолікулярними клітинами щитоподібної залози. Існує велика міжвидова варіабельність в амінокислотній послідовності кальцитонінів людини та хребетних тварин, але, незважаючи на розбіжності, вони проявляють перехресно-видову біологічну активність. Найбільш активним у біологічному сенсі є кальцитонін лососевих риб. Це пов'язано з тривалішим періодом напіврозпаду та ча-

сом існуванням гормон-рецепторного комплексу [2, 12, 23]. Кальцитонін є одним з гормонів, котрі забезпечують кальцієвий гомеостаз в організмі людини і тварин. Його основна фізіологічна функція полягає у регуляції вмісту кальцію в крові через посилення екскреції  $\text{Ca}^{2+}$  нирками [7, 30] та зменшенні резорбції кісткової речовини остеобластами, тому кальцитонін використовують у медичній практиці при лікуванні хвороб, пов'язаних з метаболічною перебудовою та травматичними ураженнями кісток, пародонтозі [15, 21], а також як знеболювальний засіб при онкологічних захворюваннях опорно-рухового апарату [28]. Причому результати клінічних спостережень свідчать, що анагетична дія кальцитоніну триває довше, ніж гіпокальцемічна, що може свідчити про залучення як центральних (взаємодія з катехоламін-



та серотонінергічною системами, а також зі специфічними рецепторами в центральній нервовій системі), так і периферичних механізмів (посилення вивільнення  $\beta$ -ендорфінів, пригнічення синтезу простагландинів та інших медіаторів запалення) [3]. Крім того, кальцитонін впливає на продукцію та секрецію деяких нейротрансмітерів, а також на функції клітин інших органів, зокрема базальних епітеліальних клітин простати, лакотрофів аденогіпофіза, ендометрія матки [10, 26], до того ж він пригнічує апетит і зменшує кількість спожитої їжі [4, 9, 20]. В останні десятиліття з'явилися праці, які свідчать про участь кальцитоніну у регуляції дозрівання фолікулів у яєчниках [16] та процесу імплантації ембріона на стадії бластоцисти [19]. Іншими важливими властивостями його є вплив на діяльність органів шлунково-кишкового тракту. Так, показано, що він протективно впливає на слизову оболонку шлунка [8], пригнічує шлункову секрецію та секрецію ацинарних клітин підшлункової залози [13], при цьому гальмівна дія гормону не пов'язана зі зменшенням концентрації внутрішньоклітинного кальцію в тканині підшлункової залози. На противагу цьому в кишечнику кальцитонін стимулює секрецію води та іонів натрію, калію, хлору [13]. Однак поодинокі праці, присвячені впливу кальцитоніну на окремі ланки холесекреторного процесу, містять суперечливі дані [14, 31], котрі не дають можливості повною мірою оцінити його роль у жовчоутворенні.

Мета нашої роботи – дослідити вплив кальцитоніну на зовнішньосекреторну функцію печінки у шурів.

## МЕТОДИКА

Гострі досліди проведені на самцях білих лабораторних шурів масою 200–250 г. Тварини знаходилися на звичайному харчовому раціоні віварію, а перед дослідом голодували (18–20 год) з вільним доступом

до води. Щоб уникнути похибок в оцінці отриманих результатів, пов'язаних із впливом добового обмінного ритму на холерез, спроби проводили в один і той самий час доби (10.00–15.00). Оперативне втручання здійснювали під тіопенталовим наркозом (75 мг/кг маси тіла тварини в 1 мл фізіологічного розчину, внутрішньоочеревинно), під час якого у відпрепаровану загальну жовчну протоку вводили тонку канюлю, з'єднану з мікропіпеткою, в яку збирали жовч. Тваринам дослідної групи внутрішньом'язово вводили синтетичний кальцитонін лосося (Міакальчик, «Новартіс Фарма АГ», Швейцарія) в дозі 200 нг/кг, розчинений у фізіологічному розчині з розрахунку об'єму 1 мл/кг маси тіла. Контролем були спроби із внутрішньом'язовим введенням тваринам відповідного об'єму фізіологічного розчину. Впродовж дослідів збирали 6 півгодинних порцій жовчі, враховуючи її об'єм (в мікролітрах). У кожній відібраній пробі методом тонкошарової хроматографії та денситометра ДО-1М визначали концентрації вільних (холева – ХК, хенодезоксихолева – ХДХК і дезоксихолева – ДХК) та кон'югованих (таурохолева – ТХК, таурохенодезоксихолева – ТХДХК, тауродезоксихолева – ТДХК, глікохолева – ГХК, глікохенодезоксихолева – ГХДХК та глікодезоксихолева – ГДХК) жовчних кислот [1] з подальшим розрахунком їх дебітів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета прикладних програм Statistica 6.0, використовуючи критерій t Стьюдента, оскільки вони мали нормальний розподіл при перевірці їх за тестом Шапіро–Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності між контролем і дослідом при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати наших досліджень показали, що після внутрішньом'язового введення кальцитоніну рівень холерезу впродовж перших

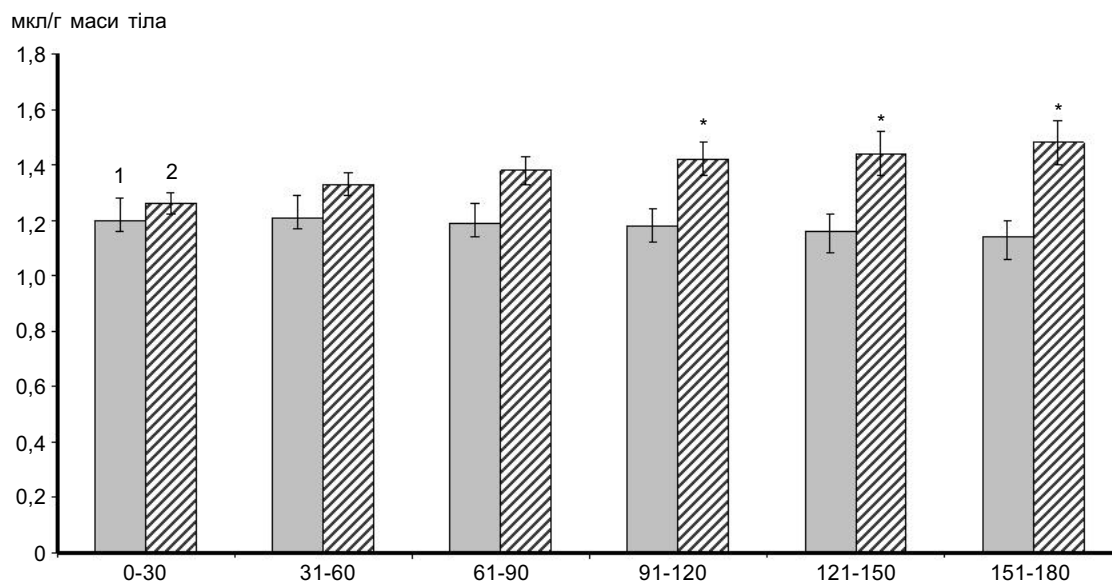
трьох півгодин досліджував контрольні значення на 5, 10 та 16 % відповідно, але ці зміни не були статистично значущими (рис. 1). В наступні 1,5 год вірогідно підвищується рівень жовчоутворення щодо контролю. Так, у четверту півгодину досліджу кількість секретованої печінкою шурів жовчі збільшилася на 20,3 % ( $P < 0,05$ ); в п'яту – на 24,1 % ( $P < 0,05$ ) і в шосту – на 29,8 % ( $P < 0,05$ ). У цілому за дослід жовчі секретувалося на 17,4 % ( $P < 0,05$ ) більше, ніж у інтактних тварин.

Як показали результати наших дослідів, під впливом гормону збільшився і абсолютний вміст жовчних кислот у жовчі (табл.1). Дебіт ТХК упродовж усього періоду спостереження перевищував контрольні значення, і збільшення в першому півгодинному проміжку часу становило 53,7 % ( $P < 0,01$ ); в другому – 56,2 % ( $P < 0,01$ ); в третьому – 65,3 % ( $P < 0,001$ ); в четвертому – 74,3 % ( $P < 0,001$ ); в п'ятому – 76,7 % ( $P < 0,001$ ); в шостому – 77,8 % ( $P < 0,001$ ). Усього за дослід ТХК секретувалося на 58,3 % ( $P < 0,001$ ) більше, ніж у контролі (див. табл.1).

Порівняльний аналіз змін абсолютного

вмісту тауродигідроксихоланових жовчних кислот, які представлені таурококон'югатами суміші хенодезоксихолевої та дезоксихолевої кислот (ТХДХК + ТДХК), в жовчі контрольних і дослідних тварин показав статистично вірогідне збільшення дебіту цих складових упродовж усього досліджу. Так, за перший півгодинний проміжок часу під впливом кальцитоніну дебіт сумарних тауродигідроксихоланових кислот збільшився щодо контролю на 50 % ( $P < 0,05$ ), у другий на 59,4 % ( $P < 0,01$ ), у третій на 64,9 % ( $P < 0,01$ ), у четвертий на 76,7 % ( $P < 0,01$ ), у п'ятий на 80,2 % ( $P < 0,01$ ) і в шостий на 80,7 % ( $P < 0,01$ ). Усього за 3 год спостереження секретувалося на 68,5 % ( $P < 0,01$ ) суміші ТХДХК і ТДХК більше, ніж у контролі.

Слід зазначити, що наші результати не узгоджуються з повідомленнями інших авторів щодо впливу кальцитоніну на об'єм і хімічний склад секретованої жовчі. Так, за даними Jonderko та Vueno [14] у собак скоротлива активність жовчного міхура та викид жовчі у дванадцятипалу кишку, стимульованих споживанням їжі, пригнічувалися після внутрішньовенного застосування кальцитоніну. Деякі автори показали,



Динаміка секреції жовчі у шурів під впливом кальцитоніну ( $M \pm m$ ;  $n=18$ ): 1 – контроль, 2 – введення кальцитоніну. \*  $P < 0,05$

що внутрішньом'язове введення цього гормону морським свинкам не призводило до статистично значущих змін об'єму виділеної жовчі, її рН, а також концентрації в секреті таурохолатів [31]. Проте такі дослідження проводили на інших лабораторних тваринах або стимульованій холе-секреції, а як гормональний чинник застосовували кальцитонін свині. При цьому автори не вивчали зміни вмісту та спектра окремих жовчних кислот, що не дає можливості повною мірою оцінити вплив кальцитоніну на жовчоутворювальну функцію печінки.

Іншою важливою складовою кон'югованих жовчних кислот є глікохолати. Тому ми дослідили як змінюється вміст цих компонентів жовчі після застосування гормону. З'ясувалося, що під впливом кальцитоніну абсолютний вміст ГХК перевищував контрольні значення у першому півгодинному проміжку часу на 43,6 %, в другому на 52,9 %, в третьому на 53,0 %, в четвертому на 65,6 %, в п'ятому на 65,5 %

і в шостому на 60,5 %, проте статистично значущими ці відмінності, як і в сумі за 3 год спроби, не були (див. табл. 1).

На відміну від ГХК, дебіт суміші ГХДХК і ГДХК збільшився статистично значущо (див. табл. 1). Так, у першій пробі жовчі вміст ГХДХК і ГДХК був більшим від контролю на 88,9 % ( $P<0,05$ ); в другій – на 126,1 % ( $P<0,001$ ); в третій – на 117,4 % ( $P<0,01$ ); в четвертій – на 140 % ( $P<0,05$ ); в п'ятій – на 152,6 % ( $P<0,05$ ) і в шостій – на 111,2 % ( $P<0,05$ ). Усього за дослід глікокон'югатів дигідроксихоланових жовчних кислот виділилося з жовчю на 120,8 % більше ( $P<0,01$ ) щодо контролю.

Як показали результати наших досліджень, під впливом кальцитоніну в жовчі щурів збільшився вміст таурохолатів і глікокон'югатів дигідроксихоланових жовчних кислот. Можна припустити, що кальцитонін активує ентерогепатичний транспортер жовчних солей Oatp3, локалізований на ентероцитах тонкого кишечника, котрий має вищу спорідненість до глікокон'ю-

Таблиця 1. Вміст жовчних кислот (мг/г) у жовчі щурів під впливом кальцитоніну ( $M\pm m$ ;  $n=18$ )

Серія дослідів	Півгодинні проміжки часу	Жовчні кислоти					
		таурохолева	таурохенодезоксихолева та таурорезоксихолева	глікохолева	глікохенодезоксихолева та глікодезоксихолева	холева	хенодезоксихолева та дезоксихолева
Контроль	1	1,88±0,23	0,94±0,14	1,33±0,32	0,27±0,05	0,27±0,06	0,10±0,02
Кальцитонін		2,89±0,06**	1,41±0,08*	1,91±0,11	0,51±0,06*	0,19±0,01	0,09±0,01
Контроль	2	1,94±0,18	0,96±0,10	1,36±0,29	0,23±0,03	0,27±0,06	0,12±0,02
Кальцитонін		3,03±0,08**	1,53±0,09**	2,08±0,14	0,52±0,04**	0,21±0,02	0,09±0,01
Контроль	3	1,90±0,16	0,94±0,10	1,34±0,29	0,23±0,03	0,25±0,05	0,10±0,01
Кальцитонін		3,14±0,16***	1,55±0,10**	2,05±0,17	0,50±0,06**	0,23±0,02	0,10±0,01
Контроль	4	1,83±0,15	0,90±0,10	1,25±0,27	0,20±0,03	0,23±0,05	0,09±0,01
Кальцитонін		3,19±0,18***	1,59±0,11**	2,07±0,20	0,48±0,09*	0,23±0,02	0,10±0,01
Контроль	5	1,76±0,16	0,86±0,11	1,19±0,27	0,19±0,03	0,21±0,05	0,09±0,01
Кальцитонін		3,11±0,19***	1,55±0,11**	1,97±0,24	0,48±0,10*	0,22±0,01	0,10±0,01
Контроль	6	1,71±0,14	0,83±0,09	1,14±0,27	0,18±0,03	0,19±0,05	0,08±0,01
Кальцитонін		3,04±0,18***	1,50±0,10**	1,83±0,23	0,38±0,08*	0,22±0,01	0,09±0,01
Контроль	Сума	11,62±0,58	5,42±0,64	7,60±1,69	1,30±0,19	1,41±0,31	0,58±0,09
Кальцитонін		18,40±0,84***	9,13±0,57**	11,90±1,07	2,87±0,41**	1,29±0,08	0,57±0,03

\*  $P<0,05$ ; \*\*  $P<0,01$ ; \*\*\*  $P<0,001$  щодо контролю.

гованих дигідроксихоланових жовчних солей, тому дигідроксихолати швидше повертаються до печінки, ніж тригідроксильовані жовчні кислоти та повторно секретуються з жовчю [32].

Меншу частку в загальному спектрі холатів становлять вільні жовчні кислоти, котрі беруть активну участь у формуванні складу бактеріальної мікрофлори тонкого та товстого кишечника. Тому було важливим з'ясувати як вплине кальцитонін на секрецію цих складових жовчі. Результати наших досліджень показали, що після його застосування абсолютний вміст вільної ХК у перших трьох півгодинах досліду був меншим (на 29,6; 22,3 та 8,0 % відповідно), в четвертій дорівнював, а в двох останніх – більшим від контролю (на 4,8 і 15,8 % відповідно), проте статистично значущими ці відмінності не були (див. табл. 1). Дебіти суміші вільних ХДХК і ДХК упродовж усього досліду із застосуванням кальцитоніну коливалися в межах контрольних значень і в сумі за 3 год практично не

відрізнялися від них (див. табл. 1).

Відомо, що інтенсивність кон'югації є фактором, що лімітує швидкість транспорту жовчних кислот у жовч, тому ми дослідили як під впливом кальцитоніну змінюється співвідношення сумарних кон'югованих і сумарних вільних жовчних кислот. З'ясувалося, що в жовчі контрольних щурів частка кон'югованих жовчних кислот на початку спроби становила 92,5 %, а вільних – 7,5 %, і значення коефіцієнта кон'югації – 12,4. З перебігом досліду частка вільних жовчних кислот зменшується до 6,3 %, а кон'югованих підвищується до 93,7 %, і значення коефіцієнта в шостій пробі становить 14,7 (табл. 2).

Після застосування гормонального чинника концентрація кон'югованих жовчних кислот збільшується, а вільних – зменшується порівняно з контролем (див. табл. 2). Внаслідок цього відбувається перерозподіл у жовчнокислотному спектрі, і частка кон'югованих холатів збільшується. Так, якщо в перші півгодини

Таблиця 2. Зміни коефіцієнта кон'югації під впливом кальцитоніну (M±m; n=18)

Показник	Півгодинні проміжки часу	Серія дослідів	
		Контроль	Кальцитонін
Концентрація сумарних кон'югованих жовчних кислот, мг%	1	410,7±25,3	503,0±21,9*
	2	394,3±21,9	501,2±25,3*
	3	397,6±26,1	479,5±23,0*
	4	385,9±26,4	462,1±25,4
	5	377,3±23,9	442,1±25,8
	6	369,6±22,3	410,3±25,6
Концентрація сумарних вільних жовчних кислот, мг%	1	33,1±3,7	23,3±1,1*
	2	33,4±3,8	24,2±1,3*
	3	30,7±3,6	23,9±1,3
	4	28,6±3,38	23,4±1,6
	5	26,5±3,5	22,1±1,0
	6	25,1±3,4	21,0±1,1
Коефіцієнт кон'югації	1	12,4	21,6
	2	11,8	20,7
	3	13,0	20,1
	4	13,5	19,7
	5	14,2	20,0
	6	14,7	19,5

\* P<0,05 щодо контролю.

досліді співвідношення кон'юговані/вільні холати становило 95,6 до 4,4 %, то в останньому воно було 94,9 до 5,1 %. Це призвело до зменшення з перебігом досліді коефіцієнта кон'югації – від 21,6 в першій півгодинній пробі до 19,5 в останній (див. табл. 2). Проте порівняльний аналіз показав, що значення коефіцієнта кон'югації у досліді значно вищі від контрольних. Тобто під впливом кальцитоніну в гепатоцитах інтенсифікуються процеси кон'югації жовчних кислот з амінокислотами, та посилюється каналікулярна секреція холатів, що поліпшує солюбілізувальні властивості жовчі й її здатність утримувати холестерин у розчиненому стані.

Відомо, що рецептори до кальцитоніну окрім кісткової тканини, де їх найбільше, експресуються в репродуктивній і центральній нервовій системах, а також в деяких органах, зокрема в нирках, легенях й печінці [6, 12, 16, 19]. Власне нині ідентифіковано дві ізоформи кальцитонінових рецепторів – C1a та C1b, причому тільки останні локалізовані на гепатоцитах [5, 24]. Обидві ізоформи належать до класу II суперродини G-білок зв'язаних рецепторів, котрі складаються з семи трансмембранних доменів [24]. Відомо, що, взаємодіючи з окремими G-білками власних рецепторів, кальцитонін може активувати різні шляхи сигнальної трансдукції [24, 25]. Так, зв'язування кальцитоніну з  $G_s$ -білком активує протеїнкіназу A, а з  $G_q$ -білком – фосфоліпазу C, що призводить до мобілізації іонів кальцію [35] та активації протеїнкінази C, котра в свою чергу стимулює транспорт сульфатів і глюкуронідів жовчних кислот, а також глутатіонкон'югованих органічних аніонів (в тому числі і холатів) за допомогою каналікулярного мультиспецифічного транспортера органічних аніонів – Mrp2 [18]. Окрім того, за даними літератури, під впливом кальцитоніну може активуватись цАМФ, котрий також стимулює біліарну екскрецію субстратів Mrp2

активацією р38 $\alpha$  мітогенактивуючої протеїнкінази [11, 17, 27]. З іншого боку, підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію викликає скорочення мікрофіламентів гепатоцитів, що також посилює везикулярний транспорт жовчних кислот у жовч [33]. До того ж можливість синтезу самого кальцитоніну та наявність його транспортера в клітинах печінки [5] зумовлюють залучення гормону до паракринної або аутокринної регуляції метаболічних процесів у цій залозі, зокрема глікогенолізу, глюконеогенезу, синтезу АТФ та вільних жирних кислот [22, 34].

Окрім безпосереднього впливу на гепатоцити, до здійснення секреторної відповіді на застосований гормон можуть бути залучені й інші, опосередковані, механізми. Відомо, що кальцитонін є одним з представників родини кальцитонінів, до якої також належать адреномедулін, амелін та кальцитонін-генспоріднений пептид, кожен з яких має власні рецептори. Літературні дані свідчать, що ці гормони є структурними гомологами та проявляють перехресну реактивність між собою та власними рецепторами [24]. Так, з кальцитоніновими рецепторами, окрім кальцитоніну, з різним ступенем спорідненості можуть зв'язуватися кальцитонін-генспоріднений пептид, амелін та адреномедулін [12]. У свою чергу кальцитонін і, зокрема, синтетичний кальцитонін лосося, може зв'язуватися не тільки з власними рецепторами в головному мозку, а й з амеліновими рецепторами, локалізованими в area postrema [20]. Тобто він проходить гематоенцефалічний бар'єр і діє як аналог амеліну, викликаючи подібний біологічний ефект, що також вказує на можливість залучення центральних механізмів до реалізації ефектів кальцитоніну на рівні цілісного організму.

Отже, отримані нами нові відомості про регуляторний вплив кальцитоніну на жовчотворювальну функцію печінки мають

важливе значення, оскільки з'ясування впливу гормону на окремі ланки холесекреторного процесу дасть змогу запобігти небажаним ускладненням, котрі виникають при лікуванні хворих з порушеннями кальцієвого обміну, а також з поєднаною патологією щитоподібної залози та печінки.

## ВИСНОВКИ

1. Кальцитонін, застосований внутрішньом'язово, стимулює жовчоутворювальну функцію печінки, збільшуючи об'єм секретованої жовчі, що свідчить про його холеретичний ефект.

2. На тлі підвищення рівня холерезу збільшується абсолютний вміст кон'югованих з таурином жовчних кислот.

3. Під впливом кальцитоніну збільшується дебіт глікодигідроксихоланових кислот, а глікохолевої та вільних жовчних кислот змінюється невірогідно.

4. При дії кальцитоніну підвищується коефіцієнт кон'югації, що свідчить про покращення солюбілізувальних властивостей жовчі.

**З.А. Горенко, Л.С. Карбовская, И.П. Вашека, С.П. Весельский**

## ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИТОНИНА НА ВНЕШНЕСЕКРЕТОРНУЮ ФУНКЦИЮ ПЕЧЕНИ У КРЫС

В острых опытах на крысах с канюлированным общим желчным протоком исследовано влияние кальцитонина на уровень холереза и спектр желчных кислот в желчи. В течение 3 час опыта определяли интенсивность секреции желчи и методом тонкослойной хроматографии содержание в ней конъюгированных и свободных желчных кислот. Показано, что синтетический кальцитонин лосося, введенный внутримышечно в дозе 200 нг/кг, увеличивает объем секреторируемой желчи и содержание в ней конъюгированных желчных кислот. В сумме за опыт объем выделенной под влиянием кальцитонина желчи увеличился на 17,4 % ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем, дебит тауротригидроксихолатов – на 58,3 % ( $P < 0,001$ ), тауродигидроксихолатов – на 68,5 % ( $P < 0,01$ ), глицодигидроксихолатов – на 120,8 % ( $P < 0,01$ ), тогда как суммарное содержание свободных желчных кислот практически не

отличалось от контрольных значений. Установлено, что под влиянием гормона происходит перераспределение в желчнокислотном спектре и доля конъюгированных холатов увеличивается на фоне уменьшения таковой свободных. Полученные результаты свидетельствуют, что под влиянием кальцитонина в гепатоцитах усиливаются процессы конъюгации желчных кислот с аминокислотами глицином и таурином, а также каналикулярной секреции, что улучшает солюбилизирующие свойства желчи, ее способность удерживать холестерин в растворе и препятствует образованию конкрементов в желчевыводящих путях.

Ключевые слова: кальцитонин, желчеобразование, таурохолаты, гликохолаты, свободные желчные кислоты.

**Z.A.Gorenko, L.S.Karbovska, I.P.Vascheka, S.P.Veselsky**

## THE INFLUENCE OF CALCITONIN ON THE LIVER BILE FORMATION FUNCTION IN RATS

The influence of calcitonin on the choleresis level and bile acids spectrum was investigated in acute experiments on the rats with common biliary duct cannulated. We determined the intensity of bile secretion during 3 hours and quantitative content of conjugated and free bile acids using thin-layer chromatography. It was shown that intramuscular introduction of synthetic salmon calcitonin (200 ng/kg) increases the secreted bile volume and the content of conjugated bile acids in the bile. The administration of salmon calcitonin resulted in increase of bile volume (+17,4% ( $P < 0.05$ )), taurotrihydroxycholates (+58,3% ( $P < .001$ )), taurodihydroxycholates (+68,5% ( $P < 0.01$ )), glycodihydroxycholates (+120,8% ( $P < 0.01$ )), while the total content of free bile acids was not significantly altered as compared with control. At the same time, under the hormone influence we observed bile acid spectrum redistribution and a part of conjugated cholates increased against a decreasing of free bile acids part. The present results suggest that the salmon calcitonin intensifies the processes of conjugation of bile acids with amino acids taurine and glycine in hepatocytes and canalicular secretion that results in improvement of solubilization properties of the bile, ability of the bile to hold cholesterol in solute state and prevent the formation of calculi in biliary tracts.

Key words: calcitonin, bile formation, taurocholates, glycocholates, free bile acids.

*Taras Shevchenko National University of Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. А.с. 1624322 СССР, МБИ G 01 N 33/50 Способ определения желчных кислот в биологической жидкости / С.П. Весельский, П.С. Лященко, И.А. Лукьяненко (СССР); № 4411066/14; заявл. 25.01.1988; опубл.30.01.1991, Бюл.№ 4.
2. Andreotti G., Mendez B.L., Amodeo P., Morelli M.,

- Nakamuta H., Motta A. Structural determinants of salmon calcitonin bioactivity. The role of the leu-based amphipathic  $\delta$ -helix // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, № 34. – P.24193–24203.
3. Azria M. Possible mechanisms of the analgesic action of calcitonin // *Bone.* – 2002. – **30**, № 5. – P.80S–83S.
  4. Bello N.T., Kemm M.H., Moran T.H. Salmon calcitonin reduces food intake through changes in meal sizes in male rhesus monkeys // *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2008. – **295**. – P.R76–R81.
  5. Bracq S., Machairas M., Clement B., Pidoux E., Andreoletti M., Moukhtar M.S., Jullienne A. Calcitonin gene expression in normal human liver // *FEBS Lett.* – 1993. – **331**. – P.15–18.
  6. Chen S., Morimoto S., Tamatani M., Fukuo K., Nakahashi T., Nishibe A., Jiang B., Ogihara T. Calcitonin prevents CCl<sub>4</sub>-induced hydroperoxide generation and cytotoxicity possibly through C1b receptor in rat hepatocytes // *Boichem. Biophys. Res. Com.* – 1996. – **218**. – P.865–71.
  7. Davey R.A., Turner A.G., McManus J.F., Chiu W.S., Tjahyono F., Moore A.J., Atkins G.J., Anderson P.H., Ma C., Glatt V., MacLean H.E., Vincent C., Boussein M., Morris H.A., Findlay D.M., Zajac J.D. Calcitonin receptor plays a physiological role to protect against hypercalcemia in mice // *J. Bone Miner. Res.* – 2008. – **23** (8). – P.1182–1193.
  8. Dubay D., Ephgrave K.S., Cullen J.J., Broadhurst K.A. Intracerebroventricular calcitonin prevents stress-induced gastric dysfunction // *J. Surg. Res.* – 2003. – **119**. – P.188–192.
  9. Eiden S., Daniel C., Steinbrueck A., Schmidt I., Simon E. Salmon calcitonin – a potent inhibitor of food intake in states of impaired leptin signalling in laboratory rodents // *J. Physiol.* – 2002. – **541** (3). – P.1041–1048.
  10. Franceschini R., Cataldi A., Cianciosi P., Garibaldi A., Consini G., Barreca T., Rolandi E. Calcitonin and  $\beta$ -endorphin secretion // *Biomed. Pharmacother.* – 1993. – **47**. – P.305–309.
  11. Gatmaitan Z.C., Nies A.T., Arias I.M. Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver // *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1997. – **272**. – P.G1041–G1049.
  12. Hilton M.J., Dowton M., Houssami S., Sexton P.M. Identification of key components in the irreversibility of salmon calcitonin binding to calcitonin receptors // *J. Endocrinol.* – 2000. – **166**. – P.213–226.
  13. Hotz J., Goebell H., Ziegler R. Calcitonin and exocrine pancreatic secretion in man: inhibition of enzymes stimulated by CCK-pancreozymin, caerulein, or calcium – no response to vagal stimulation // *Gut.* – 1977. – **18**. – P.615–622.
  14. Jonderko K., Bueno L. Effect of peripherally and centrally administered calcitonin on gallbladder emptying in dogs // *J. Gastroenterol.* – 1997. – **32**. – P.380–388.
  15. Kanis J., McCloskey E. Effect of calcitonin on vertebral and other fracture // *Q. J. Med.* – 1999. – **92**. – P.143–150.
  16. Krzysik-Walker S.M., Ocon-Grove O.M., Maddinani S.B., Hendricks III G.L., Ramachandran R. Identification of calcitonin expression in the chicken ovary: influence of follicular maturation and ovarian steroids // *Biol. Reprod.* – 2007. – **77**. – P.626–635.
  17. Kubitz R., Sutfels G., Kuhlkamp T., Kolling R., Haussinger D. Trafficking of the bile salt export pump from the Colgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase // *Gastroenterology.* – 2004. – **126**. – P.407–419.
  18. Kullak-Ublick G.A., Stieger B., Meier P.G. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease // *Ibid.* – 2004. – **126** (1). – P.322–342.
  19. Li Q., Wang J., Armant R., Bagchi M.K., Bagchi I.C. Calcitonin down regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, № 48. – P.46447–46455.
  20. Lutz T.A., Tschudy S., Rushing P.A., Scharrer E. Amylin receptors mediate the anorectic action of salmon calcitonin (sCT) // *Peptides.* – 2000. – **21**. – P.233–238.
  21. Menta N.M., Malootian A., Gilligan J.P. Calcitonin for osteoporosis and bone pain // *Curr. Pharm. Des.* – 2003. – **9**. – P.2659–2676.
  22. Nishizawa Y., Okui Y., Inaka M., Yukicka K., Miki T., Watanabe Y., Morii H. Calcium/calmodulin-mediated action of calcitonin on lipid metabolism in rats // *J. Clin. Invest.* – 1988. – **82**. – P.1165–1172.
  23. Pham V., Wade J.D., Purdue B.W., Sexton P.M. Spatial proximity between a photolabile residue in position 19 of salmon calcitonin and the amino terminus of the human calcitonin receptor // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, № 8. – P.6720–6729.
  24. Poyner D.R., Sexton P.M., Marshall I., Smith D.M., Quirion R., Born W., Muff R., Fisher J., Foord S.M. International union of pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors // *Pharmacol. Rev.* – 2002. – **54**. – P.233–246.
  25. Purdue B., Tilakaratne N., Sexton P.M. Molecular pharmacology of the calcitonin receptor // *Recept. Cennels.* – 2002. – **8** (3-4). – P.243–255.
  26. Ren Y., Chien J., Sun Y.P., Shan G.V. Calcitonin is expressed in gonadotropes of the anterior pituitary gland: its possible role in paracrine regulation of lactotrope function // *J. Endocrinol.* – 2001. – **171**. – P.217–228.
  27. Schonhoff C.M., Webster C.R.L., Anwer M.S. Cyclic AMP stimulates Mrp2 translocation by activating p38 MAPK in hepatic cells // *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2010. – **298**. – P.G667–G674.
  28. Seema M., Sushima B., Ranjan J. Evaluation of the analgesic effect of salmon calcitonin in metastatic bone pain // *Unit Anaesthesiol.* – 2003. – **9** (1). – P.8–13.
  29. Shah G.V., Rayford W., Noble M.J., Austenfeld M., Weidel J., Vamos Mebust W.K. Calcitonin stimulates growth of human prostate cancer cells through receptor-

- mediated increase in cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and cytoplasmic  $Ca^{2+}$  transient // *Endocrinology*. – 1994. – **134**. – P.596–602.
30. Sommerville B.A., Fox J. Changes in renal function of the chicken associated with calcitonin and parathyroid hormone // *Gen. Comp. Endocrinol.* – 1987. – **66**. – P.381–386.
31. Tarnawski A., Bogdal J., Dura K., Marszalek Z., Jedrychowski A. Effect of calcitonin on the formation, composition, and enzymatic activity of the hepatic bile in guinea pigs // *Gut*. – 1974. – **15**, № 9. – P.703–705.
32. Walters H.C., Craddock A.L., Fusegawa H., Willingham M.C., Dawson P.A. Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3 // *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2000. – **279**. – P.G1188–G1200.
33. Watanabe S., Phillips M.J.  $Ca^{2+}$  causes active contraction of bile canaliculi: direct evidence from microinjection studies // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1984. – **81**. – P.6164–6168.
34. Yamaguchi M. Calcitonin stimulates gluconeogenesis in fasted rats // *Endocrinol. Jpn.* – 1981. – **28**. – P.51–57.
35. Yamaguchi M. Stimulatory effect of calcitonin on  $Ca^{2+}$  inflow in isolated rat hepatocytes // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 1991. – **75** (1). – P.65–70.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка*

*Матеріал надійшов до редакції 12.01.2011*



І.І. Коренюк, І.В. Єпішкін, Т.В. Гамма, Д.Р. Хусаїнов

## Вплив похідних 1,5-бензодіазепіну на електричну активність нейронів *Helix albescens* Rossm

*Використовуючи стандартну методику внутрішньоклітинного відведення потенціалів, досліджено вплив двох нових похідних 1,5-бензодіазепін-2-ону на електричну активність нейронів *Helix albescens* Rossm. Встановлено, що ці речовини мають нейротропні властивості, спрямованість і виразність ефектів яких залежить від їхньої хімічної структури, застосовуваної концентрації й, у цілому, не залежить від типу нейронів. Досліджено ефекти сполук у діапазоні від  $10^{-6}$  до  $10^{-2}$  моль/л, на підставі яких визначені граничні, оптимальні й токсичні концентрації речовин. Установлено, що в основі механізму дії тестованих похідних лежить їхній прямий вплив на електрогенез нейронів. Аналіз сумарних іонних струмів показав, що зі збільшенням концентрації сполук спочатку зменшуються швидкості вхідних іонних натрієвих і кальцієвих, а потім і вихідних калієвих струмів. Показано, що ефекти 4-метил-1,5-бензодіазепін-2-ону настають швидше, ніж 3-метил-1,5-бензодіазепін-2-ону.*

*Ключові слова: похідні 1,5-бензодіазепін-2-ону, виноградний раулик, нейрон, електрична активність.*

### ВСТУП

Нині бензодіазепіни (БД) є найбільш поширеною групою психотропних засобів, механізм дії та фармакологічні властивості, яких досить добре вивчено [2–7, 9, 11, 12]. Насамперед це стосується 1,4-БД, які вважаються “якісними” препаратами з високою ефективністю, безпекою та низькою токсичністю [14, 18, 19]. При цьому спектр їх психофармакологічних властивостей надзвичайно широкий і включає анксиолітичну, протисудомну, гіпнотичну, міорелаксуючу, амнестичну дії [6, 7, 14, 15]. Серед сполук цього ряду широко застосовується діазепам (7-хлор-1,3-дигідро-1-метил-5-феніл-2Н-1,4-бензодіазепін-2-он), який має виражений заспокійливий, незначний судомний впливи, потенціює ефекти снодійних, наркотичних, міорелаксантних і беззаспокійливих засобів [15, 18, 19].

Крім 1,4-БД уже синтезовано і низку нових сполук класу 1,5-БД, серед них виявлені речовини з властивостями тран-

квілізаторів, анагетиків, а також седативні препарати [11]. У медичній практиці широко застосовується клобазам (Слобазам, 7-хлор-1-метил-5-феніл-1Н-1,5-бензодіазепін-2,4(3Н,5Н)-діон) – транквілізатор, який має анксиолітичну і протисудомну дії. Його рекомендовано для застосування головним чином при станах, що супроводжуються гострим і хронічним почуттям страху, і як додатковий засіб при лікуванні епілепсії [15].

Відомо, що скринінг нових синтезованих речовин з передбачуваними терапевтичними властивостями обов’язково включає етап доклінічних випробувань, у результаті яких агент повинен пройти дослідження на тваринах з вивчення загальних властивостей і механізмів його дії.

Мета нашої роботи – вивчити зміни електрофізіологічних показників функціонального стану нейронів молюска на позаклітинну аплікацію різних концентрацій двох нових похідних 1,5-БД.

© І.І. Коренюк, І.В. Єпішкін, Т.В. Гамма, Д.Р. Хусаїнов

## МЕТОДИКА

Нейрофізіологічні експерименти були проведені за допомогою стандартної методики внутрішньоклітинного відведення потенціалів та їх електричного диференціювання [1] на ідентифікованих і неідентифікованих нейронах дорсальної поверхні правого парієтального (ППаГ,  $n = 45$ ) і вісцерального (ВГ,  $n = 53$ ) гангліїв *Helix albescens* Rossm. Ідентифікацію нейронів здійснювали візуально за картою Сахарова [13] та за електрофізіологічними показниками. Детально методика описана нами раніше [8]. Загальна схема експериментів була такою. Спочатку реєстрували активність одного і того самого нейрона впродовж 1 хв до аплікації (фон), а потім протягом 5 хв за наявності в навколишньоклітинному середовищі тестованої речовини заданої концентрації й ще протягом 20–30 хв відмивання. Ми досліджували вплив двох похідних 1,5-БД, а саме, 4-метил-2,3,4,5-тетрагідро-1Н-1,5-бензодіазепін-2-ону (4-метил-1,5-БД) і 3-метил-2,3,4,5-тетрагідро-1Н-1,5-бензодіазепін-2-ону (3-метил-1,5-БД) у концентраціях  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  моль/л. Ці речовини синтезовані й переведені в хлориди на кафедрі органічної хімії Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Їхня чистота становила не менше ніж 98 %. Статистичну обробку результатів проводили з використанням непараметричного критерію Вілкоксона в програмі Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під впливом обох тестованих сполук нейротропний ефект у всіх досліджених нейронів ППаГ і ВГ починав проявлятися в концентрації  $10^{-5}$  моль/л. Оптимальна його виразність спостерігалася при концентраціях  $10^{-4}$  і  $10^{-3}$  моль/л, а при  $10^{-2}$  моль/л проявлялася токсична дія у 3-метил-1,5-БД й навіть летальна у 4-метил-1,5-БД. Більш детально особливості впливу тестованих

сполук представлені нижче.

*Ефекти 4-метил-1,5-БД.* 4-метил-1,5-БД у концентрації  $10^{-4}$  моль/л у досліджених нейронів (ППаГ –  $n=22$ , ВГ –  $n=26$ ) спочатку викликав незначне зниження їхнього мембранного потенціалу (МП), на тлі якого проявлялася пачка імпульсів (типовий приклад представлений на рис. 1,а). Після чого впродовж певного часу (50–80 с) генерація потенціалів дії (ПД), як правило, припинялась, але простежувалися флуктуації МП, які завершувалися поновленням генерації ПД з частотою їхнього слідування, котра перевищувала вихідний рівень. При цьому виявлена цікава особливість: протягом п'ятихвилинної експозиції речовини у досліджених нейронів як ППаГ, так і ВГ, що генерували до аплікації не більше ніж 1–2 ПД/хв, частота генерації імпульсів (ЧГІ) зростала в 2–3 рази і зберігалася підвищеною. Це, напевно, пояснюється скороченням періоду інактивації натрієвих каналів. У нейронів з більшою ЧГІ до аплікації не спостерігалось істотної її зміни. В цілому в 75 % досліджених нейронів 4-метил-1,5-БД у такій концентрації проявляв активуючий нейротропний ефект, тобто збільшував функціональну рухливість їхньої мембрани.

Слід зауважити, що ЧГІ зберігалася підвищеною порівняно з фоном не тільки під час експозиції 4-метил-1,5-БД, але й протягом відмивання (20 хв), що вказує на наявність у нього досить тривалої післядії. Можливо, це свідчить про те, що сполука міцно зв'язується з мембранними білками або дуже повільно біотрансформується.

У деяких нейронів ППаГ характер реакції на дію 4-метил-1,5-БД був іншим як описано вище (рис. 2). Як видно з рисунка при аплікації у концентрації  $10^{-4}$  моль/л нейрон генерував пачку ПД з більшим овершотом порівняно з фоном (див. рис. 2,а). Серед таких ПД спостерігалися також імпульси меншої амплітуди і навіть багатокомпонентні збудливі постсинаптичні

потенціали (ЗПСП). Варто відмітити, що амплітуда останніх хоча і перевищувала критичний рівень деполяризації, характерний для фонових значень, але вони не переростали в ПД (див. рис. 2,б,в). Відомо [10], що ППа1 є пейсмейкероподібним нейроном і його активність має екзогенне походження, тобто без синаптичного впливу від нейрона V7 ця клітина не здатна генерувати ПД. З іншого боку, поява низькоамплітудних ПД і ЗПСП, які розвиваються безпосередньо за повномірними ПД, зумовлена синаптичним припливом до мембрани ППа1, що надходить у фазу відносної рефрактерності або слідової гіперполяризації від попереднього ПД. Слід

відмітити, що і досить відставлені від ПД ЗПСП (див. рис. 2,в), які мають амплітуду, котра перевищує критичний рівень фонові деполяризації, не завершуються генерацією ПД. Поява таких ЗПСП, з одного боку, вказує на активацію сполукою 4-метил-1,5-БД нейронів, які мають зв'язок з нейроном ППа1. Водночас ця речовина призводить до зниження ефективності синаптичної передачі, оскільки виникають ЗПСП, які не запускають генерацію ПД. Не виключено також, що вона діє на мембрану нейрона ППа1, що й спричинює появу ПД меншої амплітуди та ЗПСП. Отже, можна вважати, що 4-метил-1,5-БД може селективно активувати одні нейрони та пригнічувати інші.

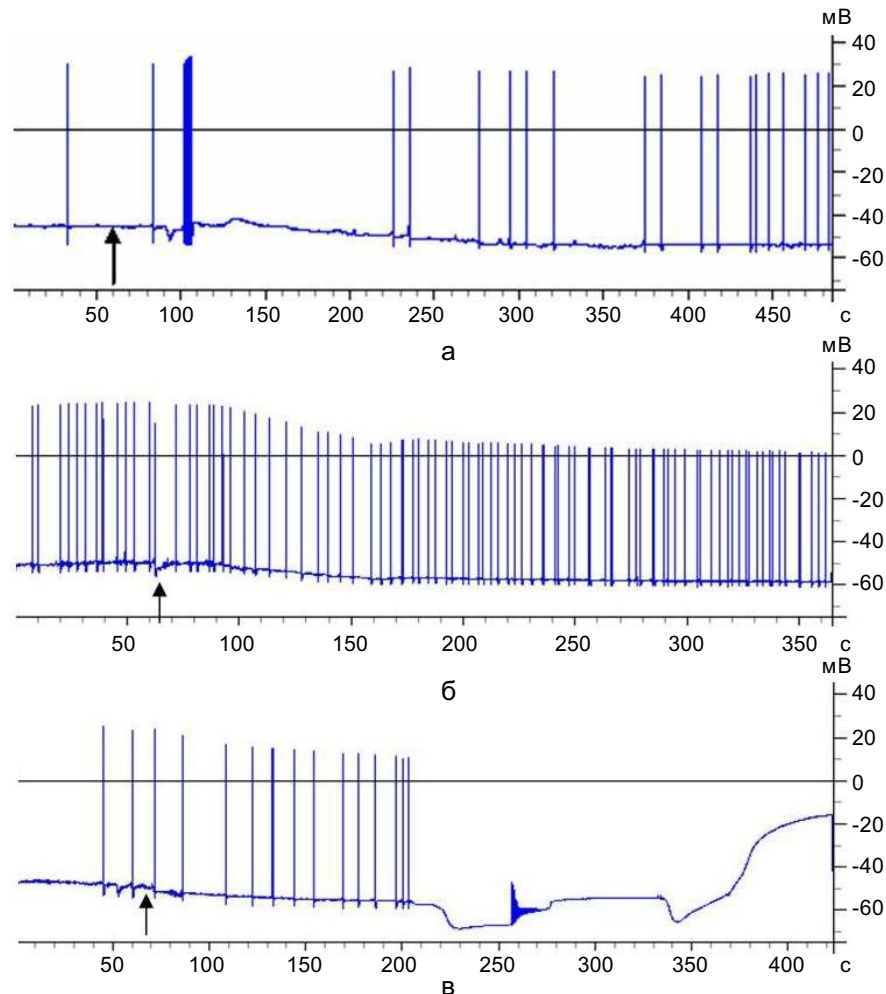


Рис. 1. Вплив 4-метил-2,3,4,5-тетрагідро-1Н-1,5-бензодіазепін-2-ону в концентраціях  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  і  $10^{-2}$  моль/л (а-в відповідно) на електричну активність нейрона ППа1. Стрілкою позначено момент аплікації

При експозиції речовини у концентрації  $10^{-3}$  моль/л у всіх досліджених нейронів також, як і при концентрації  $10^{-4}$  моль/л незначно збільшувався МП (див. рис. 1,б), однак, це супроводжувалося досить суттєвим зменшенням амплітуди ПД (у середньому на  $18,1 \text{ мВ} \pm 3,0 \text{ мВ}$ ;  $P = 0,01$ ) та слабо вираженою тенденцією збільшення ЧГІ. Ефект сягав максимальної вираженості через 95–110 с з моменту аплікації. Після відмивання вихідні характеристики електричної активності нейронів відновлювались, проте ефекту післядії не виявлялося, як при концентрації  $10^{-4}$  моль/л. Тобто спостерігається зворотний вплив сполуки при цій концентрації на електрогенез нейронів.

Той факт, що після разової аплікації 4-метил-1,5-БД у концентраціях  $10^{-4}$  і  $10^{-3}$  моль/л ефекти зберігалися при експозиції (див. рис. 1,а,б), свідчить про те, що тестована речовина мало піддається метаболічному перетворенню.

Експозиція 4-метил-1,5-БД у концентрації  $10^{-2}$  моль/л спочатку призводила до поступового збільшення МП, на тлі якого знижувалася амплітуда ПД (у середньому на  $10,5 \text{ мВ} \pm 1,5 \text{ мВ}$ ;  $P = 0,05$ ) і деякий час збільшувалася ЧГІ (у середньому в 1,5 раза; див. рис. 1,в). Через 100–250 с після аплікації в досліджених нейронів спостерігалися один-три “напади” швидкої гіперполяризації мембрани з повним припиненням генерації ПД, поступовим зниженням МП до нульового рівня (на рисунку не зображено), які не відновлювалися при відмиванні.

У разі порівняння значень амплітуди й тривалості ПД при експозиції 4-метил-1,5-БД у концентраціях  $10^{-4}$  і  $10^{-3}$  моль/л з фоновими виявилось, що під впливом тестованої сполуки вони зменшувалися у 1,5–2 рази. При концентрації  $10^{-2}$  моль/л час розвитку ПД збільшувався в 1,5 раза, а його амплітуда знижувалася. Загалом для цих показників простежувалася чітка прямо

пропорційна дозозалежність (табл. 1). Зазначимо, що при експозиції 4-метил-1,5-БД у концентрації  $10^{-2}$  моль/л суттєво знижувалася амплітуда ПД (майже до повного припинення генерації ПД) і підвищення їх тривалості.

Аналіз кривих трансмембранних іонних струмів під час генерації ПД, показав, що 4-метил-1,5-БД у концентрації  $10^{-4}$  моль/л вірогідно збільшує максимуми швидкості вхідних і вихідних іонних струмів (див. табл. 1). Отже, цим і пояснюється механізм зниження часу розвитку ПД. Зменшення амплітуди ПД, спостережуване при цьому, ймовірно, відбувається в основному внаслідок збільшення швидкості вихідних струмів. При концентрації речовини  $10^{-3}$  моль/л знижувалася швидкість вхідних і збільшувалася вихідних іонних струмів. Цілком зрозуміло, що це, в першу чергу, стосується іонів натрію. Водночас, можливо, при цьому задіяні також іони кальцію, оскільки відомо, що у нейронів ППа1 і, вірогідно, інших неідентифікованих нейронів ВГ, вхідний кальцієвий струм робить певний внесок в амплітуду ПД [10]. При концентрації сполуки  $10^{-2}$  моль/л, навпаки, різко знижується швидкість зростання вхідних і вихідних іонних струмів (див. табл. 1) до повного припинення імпульсної активності нейронів з наступним зникненням МП і, отже, загибеллю нейронів.

Таким чином, 4-метил-1,5-БД у концентрації  $10^{-5}$  моль/л проявляє слабо виражений активуючий ефект, а при концентрації  $10^{-4}$  моль/л активація сягає максимуму. При  $10^{-3}$  моль/л ця речовина починає пригнічувати електрогенний транспорт іонів через мембрану нейронів, а при  $10^{-2}$  моль/л повністю блокує механізм як генерації ПД, так і підтримки МП.

Відомо [15], що БД спочатку взаємодіють із БД-рецепторами нейронів, що входять до складу постсинаптичного ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплексу й підвищують чутливість ГАМК-рецепторів до

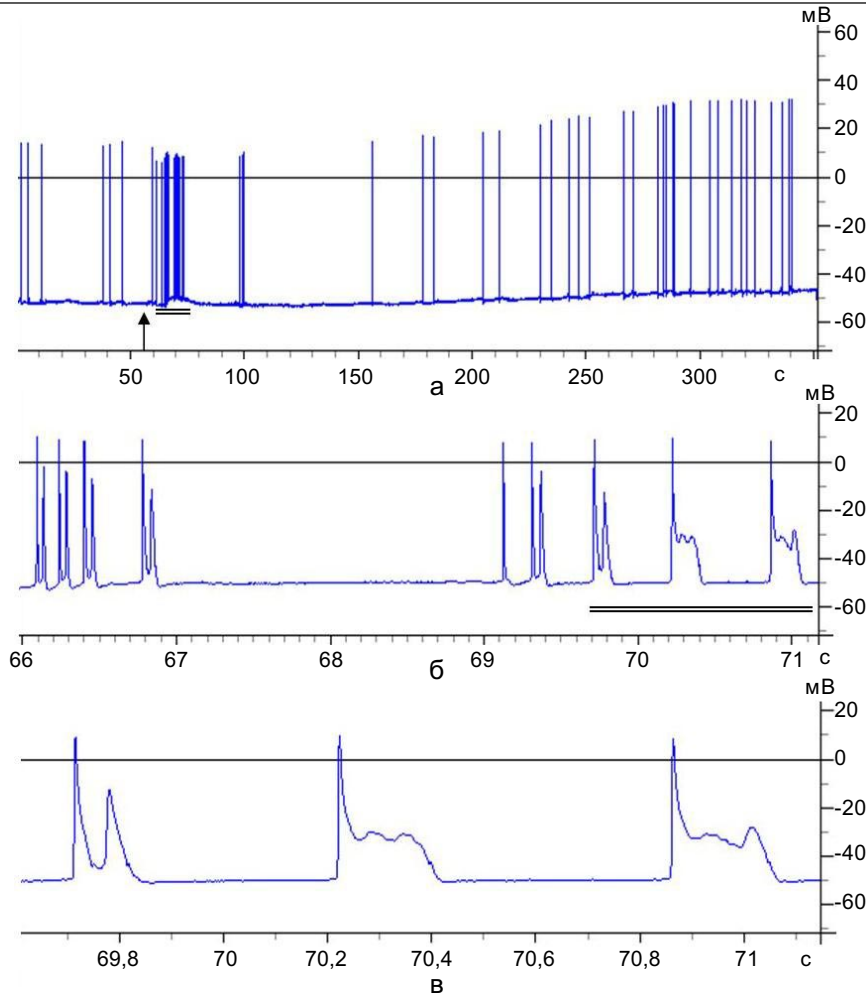


Рис. 2. Вплив 4-метил-2,3,4,5-тетрагідро-1Н-1,5-бензодіазепін-2-ону в концентрації  $10^{-4}$  моль/л на електричну активність нейрона ППа1: а – повний запис експерименту, б і в – збільшені підкреслені фрагменти а і б відповідно. Стрілкою позначено момент аплікації. Пунктирною лінією на в позначено критичний рівень деполаризації

медіатора (ГАМК), що зумовлює підвищення частоти відкривання в цитоплазматичній мембрані нейронів каналів для вхідних струмів іонів хлору [7]. Можна

вважати, що 4-метил-1,5-БД має нейротропний ефект, який реалізується внаслідок посилення гальмівного впливу ГАМК, результатом чого є пригнічення міжней-

**Таблиця 1. Вплив 4-метил-2,3,4,5-тетрагідро-1Н-1,5-бензодіазепін-2-ону на потенціали дії й швидкість трансмембранних іонних струмів нейронів правого парістального ганглія равлика (n=22)**

Концентрація речовини	Амплітуда потенціалу дії, мВ	Час розвитку потенціалу дії, мс	Швидкість іонних струмів, В/с	
			вхідних	вихідних
Фон	80,3±2,3	26,2±3,0	16,3±2,0	5,2±1,1
$10^{-4}$ моль/л	75,8±1,8*	13,2±1,0*	19,6±1,6*	11,6±1,2*
$10^{-3}$ моль/л	62,2±1,4**	13,9±1,6**	13,4±1,2	7,0±1,0*
$10^{-2}$ моль/л	7,6±0,5**	37,3±3,3**	3,0±1,1*	2,0±1,0*

Примітка. Тут і в табл. 2\*  $P < 0,05$  вірогідність розбіжностей фонових показників від таких при експозиції речовини; \*\*  $P < 0,001$ .

ронної передачі й, відповідно, блокада електричної активності нейронів.

**Ефекти 3-метил-1,5-БД.** Варто вказати, що найбільш ілюстративні ефекти цієї речовини були у неідентифікованих нейронів ВГ (n=27) порівняно з ППаГ (n=23). Типовий приклад дії 3-метил-1,5-БД у вивченому ряду концентрацій представлено на рис. 4, де видно, що застосування концентрації  $10^{-4}$  моль/л призводило до несуттєвого збільшення частоти генерації ПД і їх амплітуди впродовж усього періоду експозиції. При цьому хоча й недостовірно, але все таки зменшувалася тривалість ПД нейронів (див. табл. 2). Після відмивання вихідні значення імпульсної активності нейронів швидко і повністю відновлювалися.

При концентрації  $10^{-3}$  моль/л спостерігалися невелика (на 3–5 мВ) гіперполяризація мембрани нейронів ВГ, тенденція до зменшення амплітуди та скорочення в 1,5–2 рази ( $P = 0,001$ ) часу розвитку їх ПД (див. рис. 4,б). Незважаючи на те, що значення амплітуди змінювалися не вірогідно, швидкість сумарних вхідних іонних струмів збільшувалася майже вдвічі.

Швидкість вхідних іонних струмів також вірогідно збільшилася від  $4,0 \pm 0,2$  у вихідному стані до  $5,6 \text{ В/с} \pm 0,3 \text{ В/с}$  ( $P = 0,03$ ) при експозиції, однак не так значно як вхідних (див. табл. 2). Ефекти сягали максимальної вираженості через  $86,4 \text{ с} \pm 18,7 \text{ с}$  ( $P \leq 0,05$ ) після моменту аплікації. Таким чином, різке зниження тривалості розвитку ПД зумовлено здебільшого підвищенням натрієвої провідності мембрани.

Заміна фізіологічного розчину, який омивав нейрони на тестовий з концентрацією речовини  $10^{-2}$  моль/л уже через 3–10 с призводила до різкого підвищення МП у бік гіперполяризації й припинення генерації спочатку повномірних ПД, а потім і всіх потенціалів (див. рис. 4,в). Після 20–30 хв відмивання імпульсна активність не відновлювалась, однак МП клітини зберігався і його значення були близькі до фонового. Таким чином, 3-метил-1,5-БД пригнічує і навіть вимикає механізм генерації ПД, але істотно не впливає на механізм підтримки МП. Отже, є підстави вважати, що концентрація речовини  $10^{-2}$  моль/л є токсичною для нейронів, а не летальною.

Порівняльний аналіз ефектів 4-метил-

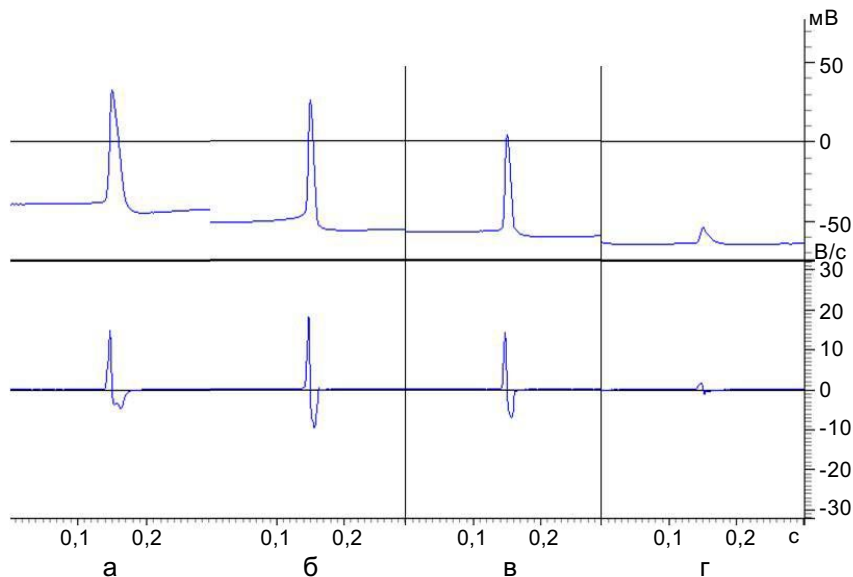


Рис. 3. Вплив 4-метил-2,3,4,5-тетрагідро-1Н-1,5-бензодіазепін-2-ону на потенціалу дії й сумарну швидкість трансмембранних іонних струмів нейрона ППа1 в концентрації речовини  $10^{-4}$  (б),  $10^{-3}$  (в) і  $10^{-2}$  моль/л (г), а – фоновий потенціал дії

**Таблиця 2. Вплив 3-метил-2,3,4,5-тетрагідро-1Н-1,5-бензодіазепін-2-ону на електричну активність нейронів вісцерального ганглія равлика (n=27)**

Концентрація речовини	Амплітуда потенціалу дії, мВ	Час розвитку потенціалу дії, мс	Швидкість іонних струмів, В/с	
			вхідних	вихідних
Фон	54,0±2,3	28,4±1,0	6,4±0,1	4,0±0,2
10 <sup>-4</sup> моль/л	58,7±2,0*	25,4±1,3	7,6±0,1*	4,3±0,4
10 <sup>-3</sup> моль/л	52,3±1,4	18,1±1,0**	12,1±1,1**	5,6±0,3*
10 <sup>-2</sup> моль/л	16,1±1,8**	31,3±1,2**	3,4±0,1*	2,3±0,2**

1,5-БД і 3-метил-1,5-БД, які мають загальний залишок молекули 1,5-БД, що відрізняються тільки місцем розташування метильної групи показав, що мінімально ефективна концентрація для прояву нейротропного ефекту обох сполук становила 10<sup>-5</sup> моль/л. У концентрації 10<sup>-4</sup> моль/л тестовані сполуки мають активуючий нейротропний ефект, при якому відбувається деполяризаційний зсув МП, збільшення

швидкостей вхідних іонних струмів крізь мембрану нейронів, не порушуючи вихідні іонні струми. При концентраціях 10<sup>-3</sup> і 10<sup>-2</sup> моль/л ефекти цих речовин були пригнічувальними, хоча відрізнялися за вираженістю. Розходження ефектів, імовірно, визначається як місцем розташування метильної групи, так і наявністю у нейронів різних підтипів рецепторів, які взаємодіють з тестованими похідними. Слід зазначити,

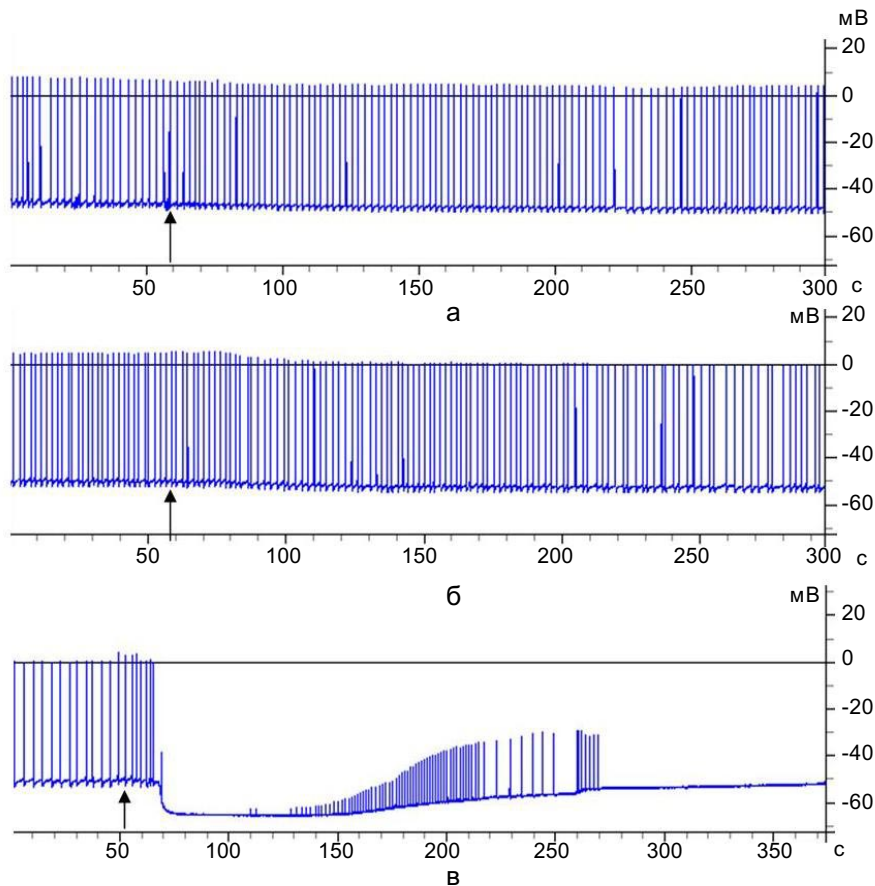


Рис. 4. Вплив 3-метил-2,3,4,5-тетрагідро-1Н-1,5-бензодіазепін-2-ону в концентраціях 10<sup>-4</sup> (а), 10<sup>-3</sup> (б) і 10<sup>-2</sup> моль/л (в) на електричну активність нейрона вісцерального ганглія. Стрілкою позначено момент аплікації

що істотною відмінністю дії тестованих сполук у концентрації  $10^{-2}$  моль/л був прояв токсичності (3-метил-1,5-БД) і летальності (4-метил-1,5-БД). Крім того, відмінності проявлялися й у швидкості зростання ефектів. Так, найбільш реактивним у менших концентраціях був 4-метил-1,5-БД. Його дія залежно від концентрації розвивалася через 20–50 с, а 3-метил-1,5-БД – через 30 ( $10^{-2}$  моль/л) – 120 с ( $10^{-4}$  моль/л) від моменту аплікації. Відомо [3, 15], що швидкість розвитку ефекту залежить від легкості проникнення діючих речовин через мембрану нейрона. З цього виходить, що 4-метил-1,5-БД має більшу ліпофільність й мембранотропність, ніж 3-метил-1,5-БД. Відомо також [3], що характер реакції, її сила, тривалість і оборотність зумовлені властивостями зв'язку речовини з рецептором, а міцність зв'язку залежить від відстані електростатичної взаємодії двох атомів, характер якої, як правило, складний, що визначається комплементарністю досліджуваної речовини й рецептора, ступенем зближення їх між собою. Очевидно, у концентраціях  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  і  $10^{-3}$  моль/л між тестованими похідними й рецепторами виникають зв'язки, що носять зворотний характер, а при концентрації до  $10^{-2}$  моль/л – необоротне їхнє фізико-хімічне зв'язування. Це призводить до порушення функціонального стану мембрани, оскільки МП зберігається, а ПД відсутні.

Таким чином, отримані результати дають змогу зробити висновок, що в основі нейротропної дії 4-метил-1,5-БД і 3-метил-1,5-БД лежить зміна іонної провідності мембрани соми нейронів, що пов'язано з конформаційними змінами білкової структури насамперед натрієвих каналів, а потім кальцієвих, калієвих і хлорних. Це порушує процеси підтримки МП, генерації ПД і, отже, міжнейронну передачу імпульсів. Відомо [15], що деякі засоби для наркозу можуть збільшити внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ . Це викликає гіперпо-

ляризацію мембрани, підвищення проникності для  $\text{K}^+$  і в цілому – зниження збудливості нейронів. Оскільки чимало анксиолітиків (нітразепам, діазепам, феназепам і інші лікарські препарати), які належать до похідних бензодіазепіну, мають виражену снодійну активність [11, 12], то не виключена і така схема реалізації нейротропного ефекту тестованих БД. Можливо, проявляється також пресинаптична дія досліджених похідних, що призводить до зниження вивільнення збудливих медіаторів.

Виявлене нами вірогідне зниження часового ходу ПД при дії обох сполук у концентраціях  $10^{-4}$  і  $10^{-3}$  моль/л дає можливість припустити, що в цих концентраціях їх можливо застосовувати як засоби, що прискорюють де- і реполяризацію мембрани й, отже, рухливість нервових процесів. З огляду на здатність цих сполук пригнічувати фізіологічні механізми активності більшості нейронів можна рекомендувати їх для подальшого вивчення як засобів, які купірують тривогу й інші розлади, пов'язані з гіперактивністю нейронів (наприклад, пароксизмальна епілептична активність). Так, наприклад, отримано дані [16, 17], які свідчать про те, що підвищене пресинаптичне гальмування в спинному мозку хворих зі спастичністю зменшує вивільнення збудливих трансмітерів з первинних аферентних терміналей і тим самим знижує активність рефлекторних реакцій. Зниження м'язового тону є наслідком застосування бензодіазепінових препаратів. Поряд із цим в експериментах на тваринах показано, що основним місцем їх дії є ретикулярна формація мозкового стовбура, що, очевидно, лежить в основі седативного ефекту.

Бензодіазепінові препарати, що використовуються в клінічній практиці, розрізняються за спорідненістю до ГАМК-рецепторів і тривалістю дії [3, 15]. Виходячи з наших результатів імовірно, що 4-метил-1,5-БД і 3-метил-1,5-БД також мають антиспастичну дію. Можна вважати перс-



пективним пошук і створення на основі цих сполук фармакологічно активних структурних аналогів, зокрема з можливою психотропною дією.

**И.И. Коренюк, И.В. Епишкин, Т.В. Гамма, Д.Р. Хусаинов**

**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ  
1,5-БЕНЗОДИАЗЕПИНА  
НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ  
НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА HELIX  
ALBESCENS ROSSM**

Используя стандартную методику внутриклеточного отведения потенциалов, исследовано влияние двух новых производных 1,5-бензодиазепин-2-она на электрическую активность нейронов *Helix albescens* Rossm. Установлено, что эти вещества обладают нейротропными свойствами, направленность и выраженность эффектов которых зависит от их химической структуры, применяемой концентрации и, в целом, не зависит от типа нейронов. Исследованы эффекты соединений в диапазоне от  $10^{-6}$  моль/л до  $10^{-2}$  моль/л, на основании которых определены пороговые, оптимальные и токсические концентрации веществ. Установлено, что в основе механизма действия тестируемых производных лежит их прямое влияние на электрогенез нейронов. Анализ суммарных ионных токов показал, что с увеличением концентрации соединений первоначально уменьшаются скорости входящих ионных натриевых и кальциевых, а затем и выходящих калиевых токов. Показано, что эффекты 4-метил-1,5-бензодиазепин-2-она наступают быстрее, чем 3-метил-1,5-бензодиазепин-2-она.

Ключевые слова: производные 1,5-бензодиазепин-2-она, виноградная улитка, нейрон, электрическая активность.

**I.I. Koreniuk, I.V. Yepishkin, T.V. Gamma, D.R. Husainov**

**EFFECT OF DERIVATIVES OF 1,5-BENZODIAZEPINE ON THE ELECTRICAL ACTIVITY OF NEURONS OF THE HELIX ALBESCENS ROSSM**

Using a standard technique for intracellular recording of potentials, we investigated the influence of two new derivatives of 1,5-benzodiazepine-2-one on the electrical activity of neurons of the *Helix albescens* Rossm. These substances possess neurotropic properties, the effects were concentration dependent in the concentration range  $10^{-6}$  M –  $10^{-2}$  and did not depend on the type of neurons. We defined the threshold, optimum and toxic concentrations for the compounds investigated. Analysis of the total ion current showed that the compounds reduce the rate of inward  $Na^{+}$ - and  $Ca^{2+}$  currents and of out-

ward  $K^{+}$ -currents.

Key words: derivatives of 1,5-benzodiazepine-2-one, grape snail, neuron, electrical activity.

*Tauryiskyi National University, Simferopol*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. А.с. № 11642 України, Комп'ютерна програма для реєстрації, обробки і автоматизованого аналізу біоелектричних сигналів / А.А. Замотайлов, I.I. Коренюк. – 2004.
2. Александровский Ю.А. Клиническая фармакология транквилизаторов. М.: Медицина, 1973. – 334 с.
3. Белоусов Ю.Б., Гуревич К.Г. Клиническая фармако-кинетики. – М.: Литтерра, 2005. – 290 с.
4. Бурчинский С.Г. Проблемы фармакотерапии невротических и соматизированных депрессий: критерии выбора антидепрессанта // Здоров'я України. – 2005. – № 6. – С. 15.
5. Бурчинський С.Г. Нові аспекти фармакотерапії психосоматичної патології // Ліки. – 2004. – № 5–6. – С. 28–32.
6. Воронина Т.А. Спектр фармакологической активности гиазепам и его место среди известных транквилизаторов. – В кн.: Гиазепам. – К., 1992. – С. 63–75.
7. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Перспективы поиска новых анксиолитиков // Эксперим. клин. фармакология. – 2002. – № 5. – С. 4–17.
8. Гамма Т.В., Коренюк I.I. Вплив бензimidазолу і його нових похідних на електричну активність нейронів *Helix albescens* Rossm і поведінку шурів // Фізіол. журн. – 2007. – 53, №5. – С. 53–67.
9. Громов Л.А., Дудко Е.Т. «Типичные» и «атипичные» транквилизаторы // Вісн. фармакології. – 2003. – № 10. – С. 11–17.
10. Кононенко Н.И., Костюченко О.В. Механизмы генерации ритмоводящей активности в идентифицированных нейронах виноградной улитки // Нейрофизиология. – 2001. – 31, №1. – С. 46–54.
11. Марута Н.А. Современные депрессивные расстройства (клинико-психопатологические особенности, диагностика, терапия) // Укр. вісн. психоневрології. – 2001. – № 4. – С. 79–82.
12. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В и др. Новый анксиолитик Афобазол: результаты сравнительного клинического исследования с диазепамом при генерализованном тревожном расстройстве // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2006. – С. 17–23.
13. Сахаров Д.А. Генеалогия нейронов. – М.: Наука, 1974. – С. 37–70.
14. Соломко З. Ф., Кост А. Н. 1,5-Бензидиазепины // ХГС. – 1975. – №.11. – С. 1443–1463.
15. Харкевич Д. А. Фармакология. 6-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР медицина, 1999. – 661 с.
16. Davidoff R.A. Spinal neurotransmitters and the mode

- of action of antispasticity drugs. –In: The origin and treatment of spasticity / Ed.R.Benecke,M.Emre, R.A. Davidoff. – USA. – 1990. – P.63–91.
17. Gracies J.M., Elovic E., Mc Guire J., Simpson D. Tradicional pharmacological treatments for spasticity. Part 2:general and regional treatments // Muscle and Nerve. – 1997. suppl. 6. – P. 92–120.
18. Greenblatt David J., Jerold S. Harmatz, H. Friedman, Ann Locniskar, and Richard I. Shader A Large-Sample Study of Diazepam Pharmacokinetics // Therap. Drug. Monitoring. –1989. – **11**. – P.652–657.
19. Heine P.R., Weyer G., Breuel H.-P., Muck W., Schmage N., Kuhlman J. Lack of interaction between diazepam and nimodipine during chronic oral administration to healthy elderly subjects // Brit. J. Clin. Pharmacol. – 1991. – **32**. – P. 605–610

*Таврій. нац. ун-т ім. В.І. Вернадського, Сімферополь*  
*E-mail: tgamma@ukr.net*

*Матеріал надійшов до редакції 16.04.2010*

А.А. Сухомлин, Т.В. Берегова, К.С. Непорада

## Зміни NO-ергічної системи слинних залоз в умовах омепразоліндукованої гіпергастринемії

*На експериментальній моделі омепразоліндукованої гіпергастринемії досліджено активність NO-синтази і концентрацію кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту –  $NO_2^-$  у слинних залозах щурів. Варто відмітити підвищення активності NO-синтази, яка сягала максимуму на 14-ту добу:  $(7,61 \pm 0,39)$  мкмоль $[NO_2^-]/(г \cdot хв)$ . Надалі вона знизилась і на 28-му добу введення становила  $(5,76 \pm 0,25)$  мкмоль $[NO_2^-]/(г \cdot хв)$ . Отримано достовірне підвищення активності NO-синтази і накопичення  $NO_2^-$  в слинних залозах щурів в умовах тривалої гіпергастринемії. Ключові слова: слинні залози, омепразол, гіпергастринемія, NO-синтаза, оксид азоту, нітрити.*

### ВСТУП

Для лікування кислотозалежних захворювань шлунково-кишкового тракту широко застосовуються інгібітори протонної помпи: омепразол, лансопразол тощо, які знижують шлункову секрецію через незворотне інгібування  $H^+-K^+-ATF$ ази, що призводить до гіпоацидитету, і як наслідок – гіпергастринемії [11]. Остання також спостерігається при розвитку пухлин секретованих гастрином, наприклад, при синдромі Золінгера–Елісона. Механізм дії гастрину, як і більшості пептидних гормонів мембранно-внутрішньоклітинний. У разі зв'язування його з гастрин/холецистокініновим рецептором типу В на мембрані паріетальних клітин слизової оболонки шлунка, підвищується вміст в клітині  $Ca^{2+}$  та, як наслідок, до підвищення активності  $H^+-K^+-ATF$ ази. Гастрин стимулює вивільнення тканинними базофілами гістаміну, який через гістамінові  $H_2$ -рецептори підвищує вміст цАМФ у паріетальній клітині та активність протонної помпи.

Нині дослідники приділяють велику увагу ролі NO в розвитку багатьох захворювань. Відомо, що він виконує месенджерну функцію, тому дослідження NO-

ергічної системи слинних залоз за умов гіпергастринемії є досить актуальним [7]. NO є основним ендogenous вазодилатором. Після зв'язування ацетилхоліну з рецепторами на мембранах ендотеліоцитів у цих клітинах синтезується NO, який мігрує у гладеньком'язові клітини (ГМК) і активує синтез цГМФ, що викликає їх розслаблення. Аналогічний механізм впливу NO на ГМК шлунково-кишкового тракту. Фізіологічним регулятором перистальтики останнього є бактеріальна флора кишечника. Компоненти мембран клітин бактерій – ліпополісахариди активують NO-синтазу безпосередньо у м'язовій клітині. NO відіграє важливу роль в імунному захисті організму, проявляючи цитотоксичну дію. Інфікування організму бактеріями, вірусами призводить до активації макрофагів (збільшується вміст лізосом), а також гідролітичних ферментів, пероксидаз, каталази [1, 3]. З одного боку, ця сполука є попередником канцерогенних N-нітрозосполук, а з іншого – бере участь разом з факторами, що стимулюють ріст, та тирозиновими протеїнкіназами у процесах проліферації клітин. Однак надлишкова продукція NO призводить до пошкодження та некрозу різних клітин.

© А.А. Сухомлин, Т.В. Берегова, К.С. Непорада

Метою нашого дослідження було вивчення змін NO-ергічної системи слинних залоз щурів за умов довготривалого введення омепразолу.

## МЕТОДИКА

Експерименти виконані на 26 щурах-самцях лінії Вістар масою 180–250 г з дотриманням рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень згідно з Європейською конвенцією. Тварин утримували на звичайному раціоні в стандартних умовах віварію. Евтаназію здійснювали під уретановим наркозом. Дослідним тваринам протягом 7, 14, 21, 28 діб внутрішньо-очеревинно вводили омепразол (“Sigma”, США) у дозі 14 мг/кг, а контрольним – 0,2 мл води для ін’єкцій. У гомогенаті слинних залоз визначали активність NO-синтази [КФ 1.14.13.19] і вміст  $\text{NO}_2^-$  [9]. Після завершення експерименту збирали кров для визначення вмісту гастрину радіоімуннологічним методом за допомогою аналітичного набору “MP Biomedicals, LLC” (США). Результати досліджень обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами встановлено, що вміст гастрину в плазмі крові щурів контрольної групи на 28-му добу становив  $59,0 \text{ пг/мл} \pm 35,5 \text{ пг/мл}$ , тоді як у дослідних тварин –  $170,7 \text{ пг/мл} \pm 90,7 \text{ пг/мл}$  ( $P < 0,05$ ). Таким чином, тривале введення омепразолу викликає гіпергастринемію.

Результати досліджень (таблиця) свідчать про те, що в умовах омепразоліндукованої гіпергастринемії в слинних залозах щурів підвищувалась активність NO-синтази, сягаючи максимуму на 14-ту добу:  $(7,61 \pm 0,39) \text{ мкмоль}[\text{NO}_2^-]/(\text{г} \cdot \text{хв})$ . Надалі вона дещо знизилась і на 28-ту добу була  $(5,76 \pm 0,25) \text{ мкмоль}[\text{NO}_2^-]/(\text{г} \cdot \text{хв})$ , що в 1,45 раза вище, ніж у контрольних щурів.

Наявність NO-синтазного механізму забезпечує ендогенний синтез NO, іонів  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ , а наявність нітритредуктазних систем створює умови для того, щоб цей ланцюг функціонував як замкнений цикл і  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  могли б відновлюватися до NO. Циклічність зв’язків між окремими сполуками забезпечує більш високу швидкість їх перетворення та зменшення токсичного впливу на клітини внаслідок накопичення окремих продуктів. Це актуально у випадку з такою високореакційною та вільнорадикальною сполукою, як NO та його метаболіти. Важливу роль у відновленні  $\text{NO}_2^-$  відіграє дезоксигемоглобін. У тканинах відновлення  $\text{NO}_2^-$  відбувається у мітохондріях і мікросомах. У перших нітритредуктазну активність має цитохром-оксидаза, а у других – цитохром P-450. Фізико-хімічні властивості NO, а саме невеликі розміри та відсутність заряду, не дають змоги ізолювати оксид азоту (II), створити депо у вигляді мембранних структур як у випадку з  $\text{Ca}^{2+}$ . Але змінюючи валентність азоту під час окисно-відновних реакцій, можна ефективно регулювати концентрацію високореакційних метаболітів у клітині [8, 10].

Активність NO-синтази та вміст нітритів у тканинах слинних залоз щурів за умов гіпергастринемії ( $M \pm m$ )

Групи тварин	Активність NO-синтази, мкмоль $[\text{NO}_2^-]/(\text{г} \cdot \text{хв})$	Вміст нітритів, мкмоль $[\text{NO}_2^-]/\text{г}$
Контроль (n=5)	$3,97 \pm 0,11$	$0,164 \pm 0,007$
Омепразол		
7 діб (n=5)	$6,49 \pm 0,37^*$	$0,198 \pm 0,004^*$
14 діб (n=5)	$7,61 \pm 0,39^*$	$0,206 \pm 0,003^*$
21 доба (n=5)	$7,48 \pm 0,18^*$	$0,208 \pm 0,005^*$
28 діб (n=6)	$5,76 \pm 0,25^*$	$0,194 \pm 0,006^*$

\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

З таблиці видно, що в умовах омепразоліндукованої гіпергастринемії в слинних залозах щурів підвищується вміст  $\text{NO}_2^-$ . Максимум (в 1,27 раза) порівняно з контролем спостерігався на 21-шу добу. Це свідчить про накопичення метаболітів NO у тканинах слинних залоз і підвищення резервів синтезу NO за рахунок нітритредуктазних систем.

Таким чином, в умовах тривалої омепразоліндукованої гіпергастринемії підвищували активність NO-ергічної системи в тканинах слинних залоз щурів, а також в слинних залозах накопичувались  $\text{NO}_2^-$  – метаболіт циклічних перетворень оксиду азоту та можливий субстрат для синтезу NO за рахунок нітритредуктазних систем. Максимальна активність NO-синтази спостерігалася на 14-ту добу, а вміст  $\text{NO}_2^-$  сягав максимального значення на 21-шу добу.  $\text{NO}_2^-$  надалі може бути субстратом для синтезу NO, що є альтернативою NO-синтазній реакції.

**А.А. Сухомлин, Т.В. Береговая, К.С. Непорада**

#### **ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ NO-ЭРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОМЕПРАЗОЛИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРГАСТРИНЕМИИ**

На экспериментальной модели омепразолиндуцированной гипергастринемии изучены активность NO-синтазы и концентрация конечных продуктов метаболизма оксида азота –  $\text{NO}_2^-$  в слюнных железах крыс. Следует отметить повышение активности NO-синтазы, которая достигала максимума на 14-е сутки:  $(7,61 \pm 0,39)$  мкмоль  $[\text{NO}_2^-]/(\text{г} \cdot \text{мин})$ , а в дальнейшем составила  $(5,76 \pm 0,25)$  мкмоль  $[\text{NO}_2^-]/(\text{г} \cdot \text{мин})$ . Получено достоверное повышение активности NO-синтазы и накопление  $\text{NO}_2^-$  в слюнных железах крыс в условиях длительной гипергастринемии.

Ключевые слова: слюнные железы, омепразол, гипергастринемия, NO-синтаза, оксид азота, нитриты.

**A.A. Sukhomlyn, T.V. Beregova, K.S. Noporada**

#### **CHANGES OF THE ACTIVITY OF NO-SYNTASE IN SALIVARY GLANDS**

*ВДНЗ України “Укр. мед. стомат. академія”, Полтава;  
Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка*

#### **OF RATS UNDER CONDITIONS OF OMEPRAZOLE-INDUCED HYPERGASTRINEMIA**

Under conditions of omeprazole-induced hypergastrinemia the activity of NOS and the concentration of  $\text{NO}_2^-$ , the end product of metabolism of nitric oxide were studied in salivary glands of rats. We detected an increase in NOS activity, reaching a maximum  $(7,61 \pm 0,39)$  mmol  $[\text{NO}_2^-]/(\text{g} \cdot \text{min})$  at 14th day of the experiment. At 28th day following omeprazole introduction its activity was  $5,76 \pm 0,25$  mmol  $[\text{NO}_2^-]/(\text{g} \cdot \text{min})$ .

Key words: salivary glands, omeprazole, hypergastrinemia, NO-synthase, NO, nitrites.

*Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava  
Taras Shevchenko National University, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Голиков П.П., Николаев Н.Ю., Гавриленко И.А. Оксид азота и перекисное окисление липидов как фактор эндогенной интоксикации при неотложных состояниях // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2000. – № 2 – С. 6–9.
2. Денисов А.Б. Слюнные железы. Слюна. Часть 2 Методы моделирования физиологических и патологических процессов. – М.: Изд-во РАМН, 2003. – 60 с.
3. Мещишен І.Ф., Пішак В.П., Григор'єва Н.П. Біомолекули: структура та функції. – Чернівці: Медик, 1999. – 149 с.
4. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., В.Е. Охотин В.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 159 с.
5. Сукманский О.И. Биологически активные вещества слюнных желез. – К.: Здоровье, 1991. – 112 с.
6. Тарасенко Л.М., Суханова Г.А., Мищенко В.П., Непорада К.С. Слюнные железы (биохимия, физиология, клинические аспекты). – Томск: Изд-во НТЛ, 2002. – 124 с.:ил.
7. Ткаченко М.М. Оксид азоту та судинна регуляція (огляд літератури) // Журн. АМН України. – 1997. – 3, №2. – С. 241–254.
8. Asanuma K., Iijima K., Sugata H. Diffusion of cytotoxic concentrations of nitric oxide generated luminally at the gastro-oesophageal junction of rats // Gut. – 2005. – 54. – P.1072–1077.
9. Hevel J.M. Purification of the inducible murene macrophage nitric oxide synthase // J. Biol. Chem. – 1991. – 266, №34. – P. 22.
10. Lowenstein C.J., Snyder S.H. Nitric oxide, a novel biologic messenger // Cell. – 1992. – 70. – P. 705–707.
11. Olbe L., Cederberg C., Lind T., Olausson M. Effect of omeprazole on gastric acid secretion and plasma gastrin in man // Scand J.Gastroenterology. – 1989. – 24 (suppl. 166). – P.27–32.
12. Pal Pacher, Joseph S. Beckman, Lucas L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease // Physiol. Rev. – 2007. – 87. – P.315–424.

*Матеріал надійшов до  
редакції 03.08.2010*

Т.Т. Володіна, Н.Д. Дзвонкевич, Л.М. Петрунь, І.П. Крисюк, Н.М. Попова,  
С.Г. Шандренко, М.П. Дмитренко

## Зміни властивостей колагену, активності лізілоксидази при латиризмі

*У щурів змодельовано латиризм додаванням до питної води семікарбазиду (0,075 %) протягом 45 діб. Показано, що у дослідних тварин порівняно з контролем зменшується маса тіла на 30 % та збільшуються масові коефіцієнти органів. На тлі парезу задніх кінцівок частково деградує кісткова тканина з розростанням хрящової, а концентрація Са в золі гомілкової кістки зменшується на 46 %. При розвитку латиризму суттєво змінюється структура позаклітинного матриксу, що пов'язано зі зменшенням міжмолекулярних зшивань у ньому. Активність лізілоксидази (ключового зшивального ферменту колагенових структур) у тканинах серцевої аорти зменшується у 5 разів. Концентрація формальдегіду – неферментативно зшивального реагенту, в умовах латиризму також знижується на 47 %. Таким чином, семікарбазид впливає не тільки на активність ферментативних процесів утворення альдегідних груп на білковозв'язаному лізині, але і на вміст інших альдегідів, що відповідають за утворення міжмолекулярних зшивань. Наведена модель може бути використана в дослідженнях впливу інгібіторів лізілоксидази на стан позаклітинного матриксу.*

*Ключові слова: латиризм, семікарбазид, колаген, лізілоксидаза, міжмолекулярні зшивки, формальдегід.*

### ВСТУП

Латиризм – захворювання, що розвивається у людей і тварин при вживанні насіння хіни або гороховника *Lathyrus* з сімейства *Papilionaceae*, яке містить β-амінопропіонітрил, і призводить до незворотних ушкоджень скелета та сполучної тканини у вигляді викривлень хребта, дегенеративних артритів, аневризми аорти, порушень синтезу та структури колагену й еластину [6]. Відомо, що латиризм експериментально відтворюється дією не тільки β-амінопропіонітрилу, але і таких хімічних сполук, як семікарбазид, гідразиди, гідразини, карбазати та дитіокарбамати. Дослідження семікарбазидіндукованого латиризму і досі актуальні, оскільки продукти харчування можуть бути забруднені семікарбазидом як похідною від харчової добавки азодикарбонаміду, що використовується у хлібобу-

лочному виробництві [15]. Експериментальна модель латиризму також використовується для вивчення змін у структурі кісток і позаклітинного матриксу під дією різних чинників [8, 16]. Як відомо, основним механізмом розвитку латиризму є інгібування активності лізілоксидази – ферменту з Cu-каталітичним центром, який відповідає за утворення міжмолекулярних зшивань у колагені та еластині завдяки окисному дезамінуванню ε-аміногруп лізинових і гідроксилізинових залишків. В останні роки показано, що цей фермент контролює структуру позаклітинного матриксу і відповідає за формування міжмолекулярних зшивань [13, 14]. Показана його причетність до індукції клітинної міграції та адгезії [9, 10] і механізму метастазування пухлин [9, 18]. Інгібітори лізілоксидази здатні зменшувати метастатичний потен-

© Т.Т. Володіна, Н.Д. Дзвонкевич, Л.М. Петрунь, І.П. Крисюк, Н.М. Попова, С.Г. Шандренко, М.П. Дмитренко

ціал канцерогенних клітин, їх використання перспективне для розробки антиметастатичних препаратів [7]. Щодо неферментативного зшивання, то відомо, що формальдегід бере участь в утворенні міжбілкових зшивань і може впливати на стан позаклітинного матриксу [5].

Мета нашого дослідження – в умовах відтвореного на щурах семікарбазид-індукованого латиризму оцінити розвиток патології за змінами в скелеті та структурі позаклітинного матриксу, розробити метод очистки лізилоксидози, визначити активність цього ферменту, його інгібування, а також вміст формальдегіду в тканинах організму.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 20 щурах-самцях лінії Вістар масою 55–65 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію та поділили на дві групи по 10 тварин у кожній. Щурам дослідної групи в питну воду додавали семікарбазид (0,075 %) протягом 45 діб, після чого їх декапітували. Для визначення вмісту альдегідів за 1 год до забою чотирьом тваринам з кожної групи перитонеально вводили 1%-й розчин димедону в дозі 10 мл/кг.

Окремі органи зважували на електронних вагах ТВ-300 Radwag одразу після декапітації і вираховували масовий коефіцієнт, як відсоткове відношення маси органа до маси тварини помножене на 10.

Препарати колагену І типу отримували з суглобів, шкіри та кісток за допомогою екстракції 0,5%-м розчином оцтової кислоти. Кількість колагену визначали за вмістом оксипроліну в гідролізатах екстракту [3]. Темпи розпаду колагену в організмі оцінювали за вмістом оксипроліну в сечі до та після гідролізу (вільний та пептид-нозв'язаний). Чистоту колагену, субодичний склад молекули, співвідношення його моно- і полімерних форм визначали

методом гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі з кількісною оцінкою за допомогою програм Densital.

Амінокислотний склад колагену досліджували на аналізаторі ААА-881, після гідролізу проб в 6 Н НСІ при 105°C протягом 24 год. Глікозаміноглікани (ГАГ) кісток і суглобів виділяли, використовуючи гідроліз з папаїном [4]. Кількість вуглеводів в ГАГ визначали за описаним методом [1]. Вміст Са та Р у кістках знаходили з використанням набору «PLIVA-Lachema Diagnostika», а активність лужної фосфатази в сироватці крові – за стандартними реагентами фірми «Філісит-Діагностика», Україна. Вміст формальдегіду (за умов *in vivo*) вираховували з використанням його акцептора 5,5-диметил -1,3-циклогександіону (димедон) за методикою Szarvas і співавт. [19] в нашій модифікації [2]. Щурам за 40 хв до забою внутрішньоочеревинно вводили 1%-й розчин димедону із розрахунку 10 мл/кг. Після декапітації гомогенізували тканини печінки в 1%-му розчині гідроксиду амонію у співвідношенні 1:6. Білки осаджували  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  і  $\text{Zn}(\text{SO})_4$ . До 1 мл супернатанту додавали 0,5 мл 30%-го оцтовокислого амонію, доведеного до рН 5,5. Отриманий розчин кип'ятили 20 хв у закритій пробірці, після чого швидко охолоджували. Кількість утвореного флуоресцентного продукту вимірювали на флуориметрі FL800 («Biotek», США) при  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$  360/420 нм. Для калібровки використовували стандартні розчини формальдимедону.

Ферментативну активність лізилоксидози з тканин аорти визначали за утворенням флуоресцентного продукту реакції  $\text{H}_2\text{O}_2$  з гомованіліновою кислотою [17]. Для цього очищену аорту розтирали в рідкому азоті та додавали 0,12М NaCl/0,016М калій-фосфатний буфер (рН 7,7) із розрахунку 2,5 мл/г тканини. Гомогенат центрифугували при 15000 хв<sup>-1</sup> упродовж 30 хв. Отриманий осад промивали 0,016 М калій-фосфатним

буфером (рН 7,7), потім двічі екстрагували розчином 4 М сечовини в цьому самому буфері протягом 18 год, екстракти об'єднували [11] та ізофокусували на приладі Multifor (США) з використанням амфолінів (рН 3–10). Чистоту білкових фракцій перевіряли методом електрофорезу в поліакриламідному гелі [1].

Статистичну обробку проводили за допомогою програм Excel, Statistics.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Динаміка маси тіла та органів.* Хронічне вживання семікарбазиду суттєво зменшує масу щурів. Приріст маси тіла тварин за 21 добу в дослідній групі був на 38 %, за 40 діб – на 43 % менший, ніж у контрольній, що свідчить про суттєве відставання в рості дослідних тварин (табл. 1). Зміна темпів росту тварин під дією семікарбазиду призвела до диспропорції маси певних органів. При цьому масовий коефіцієнт ( $\% \cdot 10$ ) дослідних щурів був вищим за норму у таких органах: нирки – майже на 10 % ( $6,9 \pm 0,4$  – контроль;  $7,6 \pm 0,6$  – дослід); мозок на 40 % ( $7,6 \pm 0,6$ ;  $10,6 \pm 1,8$  відповідно); сім'яники – на 22 % ( $13,3 \pm 1,6$ ;  $16,2 \pm 1,2$  відповідно). Водночас цей показник для тимуса зменшився на 22 % ( $1,7 \pm 0,2$  – контроль;  $1,3 \pm 0,5$  – дослід), що свідчить про стресовий стан дослідних щурів. Масовий коефіцієнт печінки, селезінки, серця, легенів, надниркової залози не змінився.

*Рентгенологічне дослідження.* На рентгенограмах дослідних щурів простежуються різні структурні зміни як у губчастій, так і в компактній речовині кісткової тканини (рис. 1). У кістках передніх і задніх кінцівок чітко виявляються порушення

енхондрального остеогенезу. Спонгіозна частина трубчастих кісток задніх кінцівок, що сформована кістковими трабекулами, мало насичена мінеральними речовинами. Також спостерігаються деструктивні зміни у суглобових хрящах, які схожі з остеохондропатіями епіфізів і метафізів довгих трубчастих і сезамоподібних кісток; констатується множинна остеохондропатія фалангів пальців. Тазові кістки скелета характеризуються рівномірним гомогенним просвітлінням та зникненням структурованого малюнка (див. рис.1, II). Суглобова щілина при цьому розширюється внаслідок дегенерації хряща та субхондральної кістки. Ділянки тазових кісток дають світлі гомогенні тіні та складаються з декількох безструктурних ізольованих фрагментів неправильної форми. Світлі ділянки, на тлі яких спостерігаються ці фрагменти, відповідають розростанням сполучної тканини між зонами росту метаепіфізарного хряща.

Таким чином, можна зробити висновок, що при паралічі задніх кінцівок порушуються процеси енхондрального скостеніння, котрі супроводжуються зміною морфологічної остеонної будови компактного шару кісток і формуванням кісткових трабекул губчастої речовини, а також відхиленням у метаболізмі метафізарного хряща на межі між діафізом і епіфізом. Субхондральна, апофізарна та епіметафізарна кістки мають чітку розмежованість, а часткове і місцями повне руйнування структури кісткової тканини на тлі паралічу зумовлене патологічним кровопостачанням. Зміни архітекτονіки добре виражені і в компактних частинах діафіза й епіфіза кістки. У цих ділянках не відмі-

Таблиця 1. Динаміка маси (г) тіла тварин

Група тварин	Вживання семікарбазиду		
	початок	21 доба	40 діб
Контроль	$58 \pm 4$	$144 \pm 12$	$201 \pm 24$
Дослід	$60 \pm 5$	$113 \pm 12^*$	$142 \pm 32^*$

Примітка. Тут і в табл. 2 \* $P < 0,05$ .



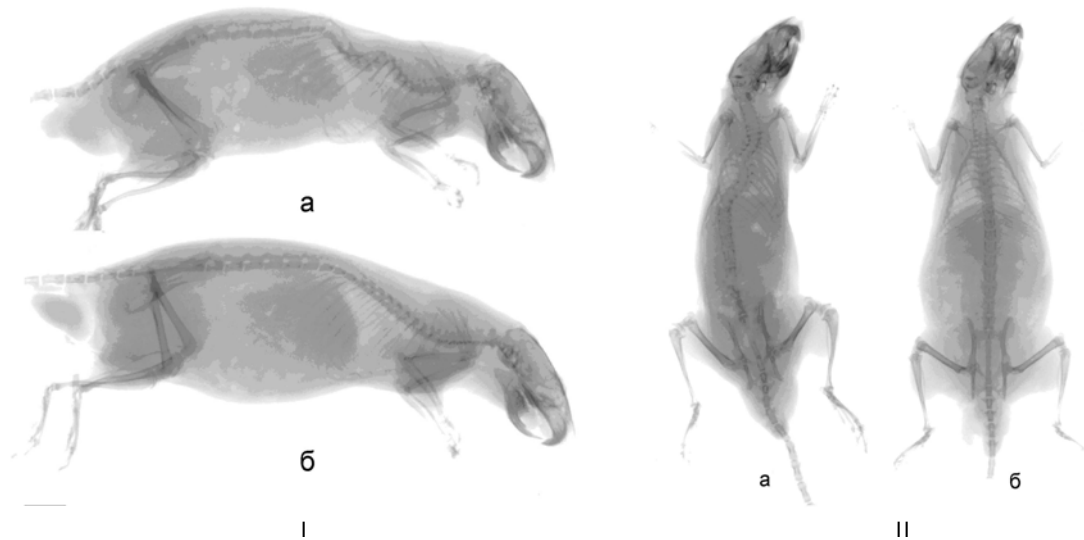


Рис. 1. Профільна (I) та вертикальна (II) рентгенограми дослідного (а) та контрольного (б) щурів

чено чітких меж як з боку окістя, так і кістково-мозкової частин кістки.

*Біохімічні дослідження стану кісток.* Вивчення мінеральних компонентів великогомілкової кістки показало зниження її зольності на 13,5 %: контроль –  $51,2 \% \pm 1,7 \%$ , дослід –  $44,3 \% \pm 4,4 \%$  ( $P < 0,05$ ); зниження вмісту кальцію в золі на 46,5 %: контроль –  $35,8 \% \pm 2,9 \%$ , дослід –  $19,4 \% \pm 3,9 \%$  ( $P < 0,05$ ). Вміст фосфору в золі залишився незмінним. Отримані результати свідчать про те, що розвиток гіпокальціємії є одним з основних чинників патологічних змін в архітектоніці скелета при латиризмі.

Порушення структури кісток при розвитку латиризму корелює зі змінами активності лужної фосфатази в сироватці крові: контроль –  $(0,4 \pm 0,6)$  мкмоль/л, дослід –  $(7,0 \pm 0,6)$  мкмоль/л ( $P < 0,05$ ).

*Властивості колагену.* Кількісний вихід колагену при його екстракції з кісток, суглобів і шкіри є інтегральним показником міжмолекулярних зшивань у ньому. Дослідження виявило суттєве підвищення розчинності колагену у щурів під дією семікарбазиду. Так, у дослідних тварин кількісний вихід колагену при кислотній екстракції з

гомілкової кістки, суглобів і шкіри підвищився в 1,7, 3,4 та 1,8 раза відповідно, що свідчить про значне зменшення розгалуженості міжмолекулярних зв'язків в позаклітинному матриксі. Аналогічні результати отримані і при екстракції колагену з використанням пепсину, який легко відщеплює телопептиди, що локалізовані в неспіралізованих N- і C-кінцевих локусах молекули та містять реакційно здатні альдегідні групи, що відповідають за утворення міжмолекулярних зшивань між субодиницями колагену.

Електрофоретичне дослідження субодиничного складу колагену шкіри – співвідношення мономера – ( $\alpha$ -компонент) та димера – ( $\beta$ -компонент) виявило, що вміст  $\alpha 1$ -компонента становив:  $26,4 \% \pm 1,6 \%$  у контрольній групі та  $31,5 \% \pm 0,6 \%$  у дослідній ( $P < 0,05$ ); вміст  $\alpha 2$ -компонента не змінився;  $\beta 1$ - та  $\beta 2$ -компоненти сумарно становили:  $54,7 \% \pm 2,8 \%$  – контроль та  $49,9 \% \pm 0,9 \%$  – дослід ( $P < 0,05$ ). Структурний  $\beta 1$ -компонент колагену утворюється внаслідок міжмолекулярних зшивань двох  $\alpha 1$ -компонентів,  $\beta 2$ -компонент – з  $\alpha 1$ - та  $\alpha 2$ -субодиниць. Таким чином, результати свідчать про те, що підвищення розчинності

колагену (табл. 2) при розвитку латиризму відбувається через зниження міжмолекулярних зшивань між  $\alpha 1$ -компонентами.

У препаратах колагену, одержаних з екстрактів після додавання пепсину (ателоколаген) досліджено склад амінокислот (оксилізін, лізин, гістидин, аргінін, оксипролін, аспарагін, треонін, серин, глутамін, пролін, гліцин, аланін, цистеїн, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, тирозин, фенілаланін). Результати аналізу не виявили достовірних змін у кількості амінокислот ателоколагену при розвитку латиризму. Вміст вуглеводних компонентів (D-глюкоза та D-галактоза) в колагені кісток, суглобів і шкіри в дослідній групі не відрізнявся від норми.

Інтенсивність обміну колагену в організмі оцінювали за вмістом продуктів його деградації в добовій сечі. Відомо, що катаболізм колагену супроводжується вивільненням пептидів і вільних амінокислот, серед яких оксипролін посідає місце специфічного маркера цього білка. Аналіз вмісту вільного та пептиднозв'язаного оксипроліну в добовій сечі до та після гідролізу також не виявив достовірних змін.

Таким чином, результати дослідження свідчать про те, що при розвитку латиризму склад первинної структури колагену залишається незмінним на тлі суттєвих змін кількості міжмолекулярних зшивань у ньому.

Важливим фактором у формуванні позаклітинного матриксу є утворення комплексів колагену з ГАГ через формування міжмолекулярних зшивань між ними. Для того, щоб оцінити цей процес провели кількісну екстракцію ГАГ з кісток і суглобів тварин. Результати свідчать про суттєве (в 1,5 рази) збільшення кількості ГАГ, що екстрагуються при латеризмі з кісток:

контроль – (70,6±8,2) мг/г, дослід – (105±31) мг/г ( $P < 0,05$ ); з суглобів – у 2 рази: контроль – (173±13) мг/г, дослід – (372±39) мг/г ( $P < 0,05$ ). Таким чином, збільшення кількості ГАГ в екстрактах тканин вказує про зниження їх зшивання з іншими інгредієнтами позаклітинного матриксу. Вміст вуглеводної складової ГАГ не змінився та залишився однаковим на рівні 0,12 % для ГАГ з кісток і суглобів у досліді та контролі. Це свідчить, як і у випадку з колагеном, що при розвитку латиризму первинна структура ГАГ не змінюється, але зменшується кількість міжмолекулярних зшивань з колагеном.

*Активність лізілоксидази.* Дослідження змін активності лізілоксидази на моделі латиризму набуває важливого значення, оскільки саме цей фермент відповідальний за формування позаклітинного матриксу – утворення міжмолекулярних зшивань у колагені, еластині та ГАГ. Лізілоксидаза має тканинну специфічність і максимально наявна в тканинах серцевої аорти [9,11]. Враховуючи низьку активність неочищеного ферменту, її дослідження проводили в окремих фракціях після ізофокусування екстракту серцевої аорти при рН 3,0–10,5. Результати показали, що активність ферменту, яку визначали при рН 6,4, становила для контрольних проб – (32,5±5,9) пмоль · хв<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>, тоді як дослідних – (6,75±1,06) пмоль · хв<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup>. Гомогенність білків цієї фракції перевіряли методом електрофорезу в поліакриламідному гелі. Виявлено одну білкову зону, локалізовану в смузі, що відповідає молекулярній масі 63–67 кДа і збігається з даними літератури [11]. Таким чином, проведені дослідження підтверджують, що семікарбазид істотно пригнічує

Таблиця 2. Розчинність колагену (мг/г) при його екстракції без пепсину та з пепсином

Група тварин	Кістки		Суглоби		Шкіра
	без пепсину	з пепсином	без пепсину	з пепсином	без пепсину
Контроль	1,74±1,09	4,9±1,3	21,6±6,7	50,8±5,1	23,6±0,75
Дослід	2,96±0,86*	10,1±0,7*	73,6±26,0*	95,1±7,6*	42,5±0,76*

активність лізилоксидази, яка, за умовами нашого експерименту, зменшується майже в 5 разів ( $P < 0,05$ ).

**Вміст формальдегіду.** Семікарбазид вступає в реакцію з формальдегідом та іншими альдегідами, утворюючи семікарбазони:  $H_2NNHC(=O)NH_2 + RCHO \rightarrow RCH=NNHC(=O)NH_2$ . Він також може зв'язуватися з карбонільними групами активних центрів ферментів та інгібувати їх активність. Це стосується і семікарбазидчутливої аміноксидази, яка є основним джерелом утворення формальдегіду в тканинах і клітинах організму. Останньому притаманне утворення міжмолекулярних зшивань, які впливають на стан позаклітинного матриксу. Щодо визначення вмісту формальдегіду безпосередньо в органах дослідних тварин, то слід враховувати, що його метаболічні перетворення відбуваються досить швидко, тому стандартні методи визначення його концентрації *in vitro* в тканинах можуть некоректно відображати вміст цієї сполуки в організмі. Тому шурам вводили димедон, який здатний розподілятися в тканинах органів та утворювати комплекс з формальдегідом – формальдимедон. Цей комплекс стабільний у часі, має гідрофобні властивості завдяки чому накопичується, і його концентрація відображає вміст формальдегіду в організмі. Концентрацію формальдимедону в тканинах печінки визначали одразу після декапітації тварин. За наявності іонів азоту при високій температурі формальдимедон утворює флуоресцентний продукт – дигідропіридинову похідну, що дає змогу проводити кількісний аналіз.

Таким чином, при хронічному введенні семікарбазиду вміст формальдегіду в печінці шурів зменшився на 47 %: контроль –  $(138 \pm 21)$  нмоль/г, дослід –  $(78 \pm 19)$  нмоль/г ( $P < 0,05$ ). Враховуючи, що дія формальдегіду призводить до неферментативного утворення внутрішньо- та міжбілкових зшивань, зменшення його кількості в організмі також

є ще одним чинником зміни стану позаклітинного матриксу.

Таким чином, при хронічному введенні семікарбазиду суттєво порушується опорно-руховий апарат – констатується остеопороз з чітко вираженими клінічними та біохімічними характеристиками, змінюється позаклітинний матрикс – зменшується кількість міжмолекулярних зшивань у колагені та ГАГ, знижується активність лізилоксидази, а також істотно зменшується вміст формальдегіду. Модель індукованого латиризму перспективна у пошуку ефективних інгібіторів лізилоксидази для розробки нових засобів модуляції метастатичних процесів злоякісних новоутворень.

**Т.Т. Володіна, Н.Д. Дзвонкевич,  
Л.М. Петрунь, І.П. Крисяк, Н.М. Попова,  
С.Г. Шандренко, Н.П. Дмитренко**

#### **ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ КОЛАГЕНА, АКТИВНОСТИ ЛИЗИЛОКСИДАЗЫ ПРИ ЛАТИРИЗМЕ**

У крыс смоделирован латиризм путем добавления к питьевой воде семикарбазида (0,075 %) на протяжении 45 сут. Показано, что у опытных животных по сравнению с контролем уменьшается масса тела на 30 % и увеличиваются массовые коэффициенты органов. На фоне паралича задних конечностей частично разрушается костная ткань с разрастанием хрящевой, концентрация Са в золе бедренной кости уменьшается на 46 %. При развитии латиризма существенно изменяется структура внеклеточного матрикса, что связано с уменьшением межмолекулярных сшивок в нем. Активность лизилоксидазы (ключевого сшивающего фермента коллагеновых структур) в тканях сердечной аорты уменьшается в 5 раз. Концентрация формальдегида – неферментативно сшивающего реагента, в условиях латиризма также снижается на 47 %. Таким образом, семикарбазид влияет не только на активность ферментативных процессов образования альдегидных групп на белковосвязанном лизине, но и на содержание других альдегидов, ответственных за образование межмолекулярных сшивок. Данную модель можно использовать в исследованиях влияния ингибиторов лизилоксидазы на состояние внеклеточного матрикса.

Ключевые слова: латиризм, семикарбазид, коллаген, лизилоксидаза, межмолекулярные сшивки, формальдегид.

**T.T. Volodina, N.D. Dzvонkevich, L.M. Petrun,  
I.P. Krisuk, N.N. Popova, S.G. Shandrenko,  
N.P. Dmytrenko**

### **ALTERED COLLAGENE PROPERTIES AND LYSYL OXIDASE ACTIVITY DURING LATHYRISM**

Experiments were carried out on rats with lathyrisms, which was induced by adding semicarbazide (0.075%) into drinking water for 45 days. The data obtained show a 30% reduction in the body weight and an increase in organ weight coefficients. Semicarbazide intake led to the pelvic limb paralysis, scoliosis, bone tissue degradation, cartilage growth, 46% decrease of the calcium level in the femur. It has been detected essential structural changes in extracellular matrix based on the collagen cross-links reduction. The activity of lysyl oxidase, a key enzyme for the collagen development, showed 5-fold decrease in the aorta tissues. The level of formaldehyde, a nonenzymic cross-links developer, has been measured in the liver tissue by the aldehyde trap (5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione) administration and then fluorimetric determination of formal-dimedone. Under semicarbazide load, the formaldehyde level in the liver tissue was reduced by 47%. Therefore, semicarbazide influences not only the enzymic development of aldehyde groups in collagen, but the level of other aldehydes, which can cause cross-links. This experimental model of lathyrisms is appropriate for investigation of the lysyl oxidase inhibitors effect on extracellular matrix.

Key words: lathyrisms, semicarbazide, collagen, lysyl oxidase, cross-links, formaldehyde.

*Palladin's institute of biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Володіна Т.Т., Печенова Т.М., Дзвонкевич Н.Д., Попова Н.М., Сілонова Н.В., Астахова В.С., Панченко Л.М., Михайловський В.О., Гулий М.Ф. Модифікуюча дія низькомолекулярних метаболітів на стан позаклітинного матриксу тварин// Укр. біохім. журн. – 2007. – 79, №6. – С. 52–65.
2. Дмитренко М.П., Шандренко С.Г., Петрунь Л.М., Кішко Т.О., Сілонова Н.В., Латишко Н.В., Гудкова О.О., Сушкова В.В. Обмін формальдегіду за семікарбозидної інтоксикації// Там само. – 2010. – 82. – С. 39–44.
3. Зайдес А.Л., Михайлов А.Н., Пушенко О.И. Модифицированный метод определения оксипролина// Биохимия. – 1964. – 29, №1. – С. 5–7.
4. Меркурьева Р.В. Метод электрофоретического разделения гликозаминогликанов различных видов соединительной ткани и биологических жидкостей// Вопр. мед. химии. – 1975. – 21(4). – С. 423–428.
5. Abe M., Takahashi M., Horiuchi K., Nagano A. The changes in crosslink contents in tissues after formalin fixation//

- Anal. Biochem. – 2003. – 318(1). – P.118–123.
6. Barrow M.V., Simpson C.F., Miller E.J. Lathyrisms: A Review //Quart. Rev. Biol. – 1974. – 49. – P. 101–128.
7. Bondareva A., Downey Ch. M., Ayres F., Liu W., Boyd S. K., Hallgrímsson B., Jirik F.R. The lysyl oxidase inhibitor, beta-aminopropionitrile, diminishes the metastatic colonization potential of circulating breast cancer Cells//PLoS ONE. – 2009. – 4(5). – 5620. – P.1–10.
8. El Rouby D.H., Bashir M.H., Korany N.S. Ultrastructural and histomorphometric alterations of rat jaw bones after experimental induction of lathyrisms //Arch. Oral Biol. – 2008. – 53(10). – P. 916–923.
9. Erler J.T., Kevin L., Bennewith K.L., Nicolau M., Dornhofer N., Kong C., Le Q.T. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis // Nature. – 2006. – 440. – P.1222–1226.
10. Giampuzzi M., Oleggini R., Di Donato A. Altered adhesion features and signal transduction in NRK-49F cells transformed by down-regulation of lysyl oxidase // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – 1647. – P. 239–244.
11. Harris E.D., Gonnerman W.A., Savage J.T. Connective tissue amine oxydase. Purification and partial characterization of lysyl oxydase from chick aorta // Ibid. – 1974. – 341. – P. 332–344.
12. Li W., Liu G., Chou I.N., Kagan H.M. Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells // J. Cell Biochem. – 2000. – 78. – P. 550–557.
13. Maki J.M., Sormunen R., Lippo S., Kaarteenaho-Wiik R., Soinen R., Myllyharju J. Lysyl Oxidase Is Essential for Normal Development and Function of the Respiratory System and for the Integrity of Elastic and Collagen Fibers in Various Tissues // Amer. J. Pathol. – 2005. – 167, № 4. – P.927–936.
14. Maki J.M. Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions // Histol Histo-pathol. – 2009. – 24(5). – P.651–660.
15. Maranghi F., Tassinari R., Lagatta V. Effects of the food contaminant semicarbazide following oral administration in juvenile Sprague-Dawley rats // Food and Chem. Tox. – 2009. – 47. – P.472–479.
16. Kusama-Eguchi K., Ikegami F., Kusama T., Suda A., Ogawa Y., Igarashi K., Watanabe K. A rat model of neurolathyrisms: repeated injection of beta-ODAP induces the paraparesis of the hind legs // Amino Acids. – 2005. – 28(2). – P.139–143.
17. Palamakumbura A.H., Trackman P.C. A Fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples // Anal. Biochem. – 2002. – 300. – P.245–251.
18. Postovit L.M., Abbott D.E., Payne S.L., Wheaton W.W., Margaryan V. Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration // J. Cell Biochem. – 2008. – 103. – P.1369–1378.
19. Szarvas T., Szatloczky E., Volford J. Determination of endogenous formaldehyde level in human blood and urine by dimedone-14C radiometric // J. Radioanal. and Nucl. Chem. – 1986. – 106(6). – P. 357–367.

*In-t біохімії ім. А.В. Палладіна НАН України, Київ*

К.Г. Лябах

## Оксид азоту, міоглобін і кисневий режим клітин: дослідження на математичних моделях

*За допомогою математичних моделей досліджувався вплив наномолярних концентрацій NO на кисневий режим клітини: внутрішньоклітинний розподіл напруження ( $pO_2$ ), NO та швидкостей споживання кисню ( $VO_2$ ) при дифузії NO з поверхні кровеносної судини в клітину з міоглобіном (Mb) і без нього. Згідно з розрахунками, без Mb NO суттєво гальмує дихання у всій клітині. Це призводить до підвищення тканинного  $pO_2$  за допомогою досить грубого регулювання. Дослідження впливу Mb на кисневий режим показали, що він потенційно здатний модулювати його. Відомо, що Mb, допомагаючи транспорту  $O_2$ , може "прибирати зайвий" при нормоксії NO, звільняючи мітохондрії від пригнічування дихання, а за умов гіпоксії деоксигенований Mb стає фактично продуцентом NO, відновлюючи нітрит. Математичне моделювання цих явищ довело, що під впливом Mb концентрація NO, а також  $pO_2$  підвищуються тільки в тій ділянці клітини, де спостерігається гіпоксія. Внаслідок цього пригнічення дихання стає локальним, а гіпоксія послаблюється або зникає. Спільно з NO Mb може здійснювати тонку регуляцію кисневого режиму тканини, підвищуючи клітинне  $pO_2$  і узгоджуючи кисневий запит з його доставкою.*

*Ключові слова: математичне моделювання, оксид азоту, міоглобін, кисень, кисневий режим, міоцит.*

### ВСТУП

Відомо, що NO впливає на різні функції організму, зокрема на вазодилатацію й активність дихального ланцюга [1–5]. Висока його концентрація в клітині через надмірне гальмування клітинного дихання може призвести до зменшення скоротливості кардіоміоцитів і пошкодження тканини [1, 11]. Але якщо концентрація NO набуває оптимального для клітини рівня, він відіграє роль цитопротектора [1, 11, 12]. Для з'ясування патогенезу та лікування тканинних пошкоджень при гіпоксії необхідне розуміння принципів формування кисневого режиму клітини під впливом NO. Згідно з даними численних експериментів, ступінь гальмування мітохондрій залежить від  $pO_2$  і концентрації NO, яка у свою чергу пов'язана з концентрацією  $O_2$ . Зворотні зв'язки створюють складну картину впливу

$O_2$  та NO на кисневий режим клітини. Окрім NO, на кисневий режим впливає міоглобін (Mb). Пряма його дія – це депонування та транспорт  $O_2$  у зони гіпоксії. Опосередкована дія відбувається через зв'язок з NO. Встановлено, що при нормоксії реакція  $MbO_2$  з NO продукує  $NO_3^-$  і тим самим зменшує цитозольний NO [8, 9]. Проте при гіпоксії Mb виявляє нітритредуктазну активність і перетворюється зі скевенджера на продуцент NO [8, 16]. У внутрішньоклітинному середовищі наявні і Mb, і  $MbO_2$ . Усе це ще більше ускладнює уяву про формування кисневого режиму клітини та потребує як допоміжного засобу дослідження математичного моделювання взаємодії потоків Mb,  $O_2$  і NO в клітині.

Для вивчення кисневого режиму тканин традиційно застосовується математичне моделювання [4, 5, 14–16, 21]. Залишивши осторонь достатньо вивчену вазодилата-

© К.Г. Лябах

торну дію NO, ми вважаємо доцільним дослідити зв'язок  $pO_2$  і  $VO_2$  з NO в міоциті. Нині відомо багато моделей дифузії NO в судинній стінці, в гладеньких м'язах і кілька, досить приблизних у тканинах [4, 5, 16]. Здебільшого вони віддзеркалюють планарну дифузію газів. Але моделі тримірної дифузії  $O_2$  і NO в клітині нам не зустрічалися, і комплексну дію Mb в моделях транспорту кисню і NO в клітині поки ще не відтворено.

Мета нашої роботи – за допомогою математичного моделювання на базі літературних даних розглянути залежність кисневого режиму клітини від концентрації NO на поверхні судини за наявності Mb і без нього, обчислити розподіл  $pO_2$ , концентрації NO і швидкості поглинання  $O_2$  при взаємодії потоків  $O_2$ , NO в клітинах скелетного м'яза або кардіоміоцита.

## МЕТОДИКА

Дослідження впливу NO на кисневий режим тканини проводили на розробленій нами моделі об'ємної дифузії  $O_2$  і NO в міоциті при навантаженнях різної інтенсивності (модель 1). Ця модель створена на базі нашої моделі капілярного кровотоку і тримірної дифузії – споживання  $O_2$  в м'язі [14, 15]. В цю модель введено взаємозв'язок NO з  $O_2$  і дифузію оксиду азоту паралельного з дифузією кисню.

Згідно з Thomas і співавт. [21], експериментально досліджене окислення NO в клітинах відображується формулою (1). NO в свою чергу впливає на концентрацію  $O_2$  в клітині, гальмуючи швидкість його поглинання. Численні експерименти доводять, що в фізіологічних умовах наномольні концентрації NO можуть ефективно діяти на цитохром-оксидазу за допомогою конкурентного гальмування її активності [3, 4, 11, 21]. Формула (2), наведена нижче, описує це оборотне гальмування [21]. Ми використали в моделі формули:

$$-\frac{d[NO]}{dt} = k[O_2][NO] \quad (1)$$

$$VO_2 = \frac{qO_2 \cdot [O_2]}{[O_2] + K_m \left(1 + \frac{[NO]}{K_{NO}}\right)} \quad (2),$$

де  $[O_2]$ ,  $[NO]$  – концентрації  $O_2$  і NO,  $qO_2$  – кисневий запит,  $K_m = 1$  мм рт. ст. – константа Міхаеліса для  $O_2$ ,  $K_{NO} = 5,2$  нмоль/л – константа гальмування для NO,  $k = 5,3810^7$  моль $^{-1} \cdot$  мл  $\cdot$  с $^{-1}$  [3, 21].

Модель 1 дає змогу знаходити внутрішньоклітинний розподіл NO,  $pO_2$  і  $VO_2$  з урахуванням: швидкості м'язового кровотоку (F),  $qO_2$  концентрації оксиду азоту на поверхні судини ( $NO_c$ ), радіуса дифузії, R, коефіцієнтів дифузії  $O_2$  і NO в тканині ( $DO_2$  і  $D_{NO}$  відповідно) кисневої ємності крові (КЄК), вміст кисню в артеріальній крові ( $C_a$ ). В моделях розглядалося лише одне джерело оксиду азоту  $NO_c$ . Для наших розрахунків цей показник передбачався заданим і вибирався з фізіологічного діапазону (20–50 нмоль/л) [3, 21]. У моделі 1 було використано такі значення:  $F=40$  мл  $\cdot$  хв $^{-1} \cdot$  100 г $^{-1}$ ,  $1 < qO_2 < 12$  мл  $\cdot$  хв $^{-1} \cdot$  100 г $^{-1}$ ,  $R=25$  мкм,  $КЄК=0,20$ ,  $C_a = 0,195$ ,  $DO_2 = 1,3 \cdot 10^{-5}$  см $^2 \cdot$  с $^{-1}$ ,  $D_{NO} = 1,33 \cdot DO_2$ .

Для моделювання участі Mb у транспорті кисню і NO застосовувалася модель площинної радіальної дифузії  $O_2$ , Mb і NO та їх взаємодія в міоциті або в кардіоміоциті (модель 2). У цій моделі вважалися заданими концентрація NO і  $pO_2$  на поверхні судини:  $NO_c=50$  нмоль/л і  $pO_{2c}=25$  мм рт. ст., концентрація Mb –  $2,8 \cdot 10^{-7}$  моль  $\cdot$  см $^{-3}$ , коефіцієнт дифузії Mb –  $1,3 \cdot 10$  см $^2 \cdot$  с $^{-1}$ , константа швидкості окиснення Mb  $2,4 \cdot 10^{10}$  моль $^{-1} \cdot$  см $^3 \cdot$  с $^{-1}$ , константа швидкості розпаду  $MbO_2$  –  $65$  с $^{-1}$  [16]. В рівнянні дифузії NO, швидкість “прибирання” NO оксиміоглобіном відображали як добуток концентрацій NO і  $MbO_2$ , швидкість появи NO при відновленні нітриту за участю Mb приймали пропорційною його концентрації.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з розрахунками, при  $K_m = 1$  мм рт. ст. ми одержали значну залежність клітинного дихання і  $pO_2$  від NO при досить низьких рівнях його концентрації ( $NO_c = 20$  нмоль/л). NO, незважаючи на наявність  $O_2$ , розповсюджується по всій клітині та руйнується лише частково, пригнічуючи дихання більшою чи меншою мірою в усьому її об'ємі (рис. 1). За формулою (1) на ступінь гальмування дихання значно впливають значення  $K_m$  і  $K_{NO}$ .

На рис. 2 показано, що вибраний режим  $1 < qO_2 < 12$  мл  $\cdot$  хв $^{-1}$   $\cdot$  100 г $^{-1}$ ,  $F = 40$  мл  $\cdot$  хв $^{-1}$   $\cdot$  100 г $^{-1}$  не забезпечує повної оксигенації клітини. В центрі волокна при концентрації NO=0 існує зона, де  $pO_2$  наближається також до 0 (див. рис. 2, а, б). Клітинне  $pO_2$ , мінімальне і середнє, збільшується пропорційно концентрації NO. Наші результати збігаються з даними Thomas і співавт. [21], отриманими на гепатоцитах у дослідженнях *in vitro* і за допомогою математичної моделі.

Згідно з розрахунками, особливість кисневого режиму клітини – це значна його залежність від NO у всьому міоциті, доки в дію не вступає Mb. Відомо, що у скелетному м'язі та міокарді NO змінює кисневий режим [8–12, 16–21]. Відзначається, що Mb входить в сімейство глобінів, які виявлені

в печінці, мозку та нирках [8, 19].

Роль Mb у регуляції кисневого режиму клітини багатогранна. Він полегшує дифузю кисню, збільшує його потік у тканину. Завдяки великій концентрації, Mb депонує кисень і віддає його мітохондріям в умовах кисневого дефіциту. Все це сприяє підвищенню  $pO_2$  всередині клітини [16]. Сучасні дослідження зв'язку MbO $_2$  з NO, що продукує метміоглобін і нітрат з подальшим його виведенням, показали, що Mb за наявності кисню частково видаляє NO, зменшуючи залежність мітохондріального дихання і скоротливості кардіоміоцитів від нього. Оскільки надлишок NO може гальмувати активність мітохондрій, Mb захищає клітини і регулює їх життєздатність. Роль скевенджера «зайвого» біоактивного NO в клітині прийнято вважати критичною, ключовою в регуляції кисневого режиму клітини [9]. Проте при недостатці кисню Mb може навпаки перетворюватися зі скевенджера NO в його продуцента при відновленні нітриту тканини до NO [17, 18].

Ми спробували математично змодельювати транспорт і споживання кисню в тканині, дифузю Mb і NO в умовах навантаження при  $qO_2 = 12$  мл  $\cdot$  хв $^{-1}$   $\cdot$  100 г $^{-1}$ , користуючись моделлю 2. На рис. 3 у відносних одиницях зображені розраховані

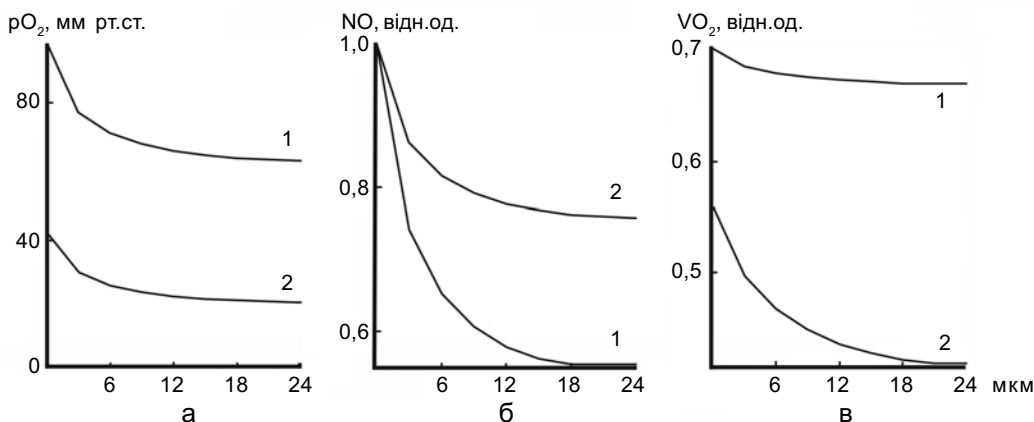


Рис. 1. Радіальні градієнти  $pO_2$  (а), NO (б) і  $VO_2$  (в) навколо артеріальних (1) і венозних (2) кінців судин при навантаженні  $qO_2 = 5$  мл  $\cdot$  хв $^{-1}$   $\cdot$  100 г $^{-1}$ ,  $NO_c = 20$  нмоль/л. За віссю абсцис – відстань у мікрометрах від поверхні судини вздовж радіуса міоцита

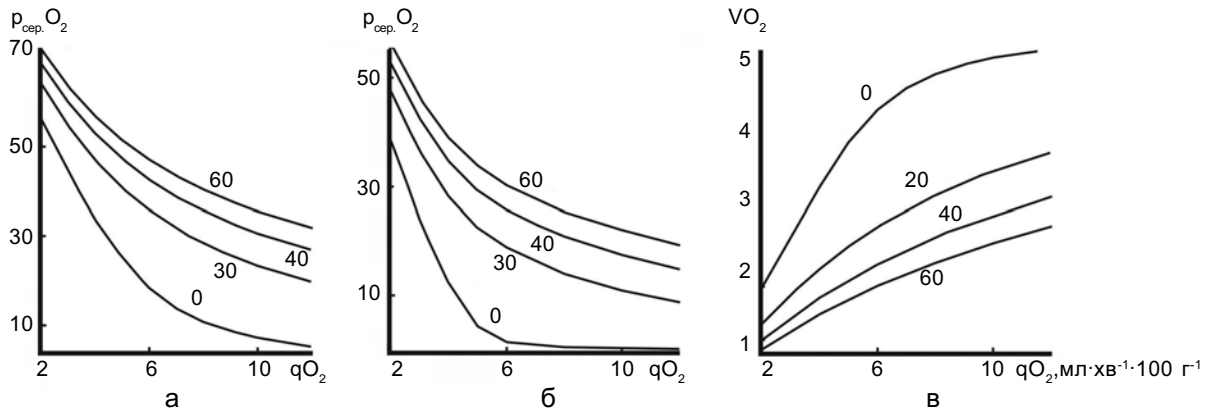


Рис. 2. Вплив  $\text{NO}_c$  на кисневий режим м'язового волокна залежно від кисневого запиту  $q\text{O}_2$ : середнє (а), мінімальне (б), напруження кисню та швидкість його поглинання (в) в клітині. Над кривими значення  $\text{NO}_c$  у наномолях на 1 л при  $F = 40 \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot 100 \text{ г}^{-1}$

градієнти  $p\text{O}_2$ ,  $\text{VO}_2$ ,  $\text{NO}$  і  $\text{MbO}_2$  уздовж радіуса дифузії від поверхні судини углиб клітини. Порівнюються три випадки: а) кисневий режим визначає дифузія  $\text{NO}$  і кисню,  $\text{Mb}$  відсутній; б) за тих самих умов у моделі додана дія  $\text{Mb}$  як скевенджера  $\text{NO}$ , тобто оксидази, якщо кисню достатньо; в) за тих самих умов передбачено, що  $\text{Mb}$  відіграє роль не тільки його скевенджера, а і його продуцента  $\text{NO}$  при гіпоксії. У цьому разі  $\text{Mb}$  діє як нітритредуктаза. При відсутності  $\text{Mb}$  (рис. 3,а), оксид азоту істотно пригнічує активність мітохондрій у всій клітині. В умовах гіпоксії в “мертвому кутку”, незважаючи на значне пригнічення дихання,  $p\text{O}_2$  виявляється нижчим за

критичний рівень і сягає 1,2 мм рт. ст. Середня швидкість споживання кисню становить лише 20 % від кисневого запиту. Надалі  $\text{Mb}$  “прибирає”  $\text{NO}$  майже всюди (див. рис. 3,б). Внаслідок цього вплив  $\text{NO}$  на швидкість споживання кисню значно слабшає. Але при вибраних значеннях  $q\text{O}_2$  і  $p\text{O}_{2c}$  концентрація кисню в точках найгіршого постачання низька, там  $p\text{O}_2$  становить 1,1 мм рт. ст., тому середня швидкість споживання  $\text{O}_2$  зменшена до 52 %. Пригнічення дихання відбувається в основному не через  $\text{NO}$ , а завдяки локальній гіпоксії – гіпоксії навантаження. Ймовірно, в обох розглянутих випадках у зоні гіпоксії проду-

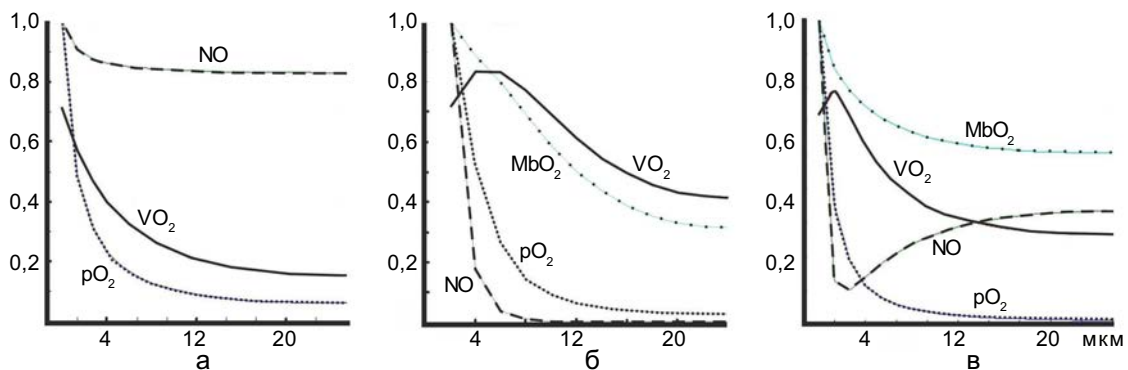


Рис. 3. Градієнти показників у міоциті (кардіоміоциті) вздовж радіуса дифузії (у відносних одиницях):  $p\text{O}_2$ , оксиду азоту, оксиміоглобіну, а також  $\text{VO}_2$  залежно від впливу міоглобіну: а – без міоглобіну, б – дія міоглобіну як скевенджера  $\text{NO}$ , в) дія міоглобіну як скевенджера або як продуцента залежно від віддаленості джерела кисню. За віссю абсцис – відстань  $r$  в мікрометрах від поверхні судини (пояснення в тексті)



куються реактивні форми кисню. Але якщо Mb поводить ся як оксидаза при надлишку кисню і як нітритредуктаза при його недостатчі (див. рис. 3,в), кисневий режим змінюється на краще. Особливо відзначимо “доцільність” дії природних регуляторів – Mb і NO. Середня швидкість поглинання кисню становить 40 % від кисневого запиту. Мітохондріальне дихання знижується локально, завдяки збільшенню концентрації NO в зоні гіпоксії, що сприяє зростанню  $pO_2$ . Так, завдяки гальмуванню споживання кисню в місцях найгіршого постачання,  $pO_2$  підвищується до 3 мм рт. ст., внаслідок чого має послабшати надлишкова продукція реактивних форм кисню. Оксигенований Mb “прибирає” зайвий NO навколо судини, деоксигенований Mb всередині клітини діє як джерело NO – «додає» його в гіпоксичних ділянках, знижуючи там  $VO_2$  і підвищуючи тканинне  $pO_2$ . Тобто, якщо ніяким чином не можна доставити потрібну кількість кисню в клітину, Mb зменшує його споживання, щоб уникнути оксидативного стресу [7]. Відбувається узгодження швидкості доставки і споживання  $O_2$ . Отже, при збалансованості концентрацій реагентів-учасників транспорту кисню в тканині Mb потенційно здатний вельми делікатно регулювати клітинний гомеостаз  $O_2$  ( $VO_2$  і  $pO_2$ ), концентрації реактивних форм кисню і NO. Ми вважаємо, що такі самі результати були б одержані при моделюванні інших джерел NO при продукції оксиду азоту з участю різних NO-синтаз. Залежно від кількісних значень концентрацій реагентів, кінетичних констант, а також місця появи NO в тканині, форма кривої і співвідношення фаз його зниження і зростання (див. рис. 3,в) відрізнятимуться, але суть локального впливу донора NO на кисневий режим при гіпоксії збережеться.

Результати математичного моделювання відповідають ідеям відносно можливої ролі Mb у регуляції тканинного біохімічного гомеостазу. Останнім часом його вплив на

концентрацію оксиду азоту і кисневе постачання тканин інтенсивно вивчається на трансгенних і безпородних мишах. Наші висновки збігаються з літературними даними [6–10, 17–20]. Якщо в експериментах на тваринах розглядаються усереднені показники кисневого режиму тканини, то ми отримали внутрішньоклітинний їх розподіл. Одержані результати слід розглядати лише як орієнтовні, якісні, оскільки багато особливостей взаємодії Mb і NO поки ще не враховано. Наприклад, слід знати розподіл концентрацій нітриту в тканині, а також бажано змоделювати перетворення проміжного з'єднання – метміоглобіну з урахуванням кінетичних констант, щоб мати право з упевненістю перейти до аналізу конкретних фізіологічних ситуацій.

Виконані розрахунки дають змогу зробити припущення, що серед великої кількості регуляторів кисневого режиму дія NO і Mb, яку ми моделювали, може розглядатися як одне з важливих джерел формування належних фізіологічних умов споживання кисню в клітині. Ймовірно, з цим пов'язаний кардіопротекторний вплив NO і нітриту – донора NO при ішемії-реперфузії міокарда [6, 10–13]. Наші розрахунки будуть корисні для розуміння і уточнення механізму їх впливу на енергетику клітин.

## ВИСНОВКИ

Аналіз транспорту кисню в тканині з постійним джерелом NO на поверхні судини довів, що останній регулює кисневий режим клітини досить грубо: пригнічування мітохондріального дихання відбувається у всій клітині. Таку ціну клітина сплачує за підвищення  $pO_2$  при гіпоксії. Згідно з розрахунками, Mb потенційно здатний модулювати вплив NO на кисневий режим клітини. Він діє як скевенджер NO у тій частині клітини, де є нормоксія, і як

продуцент NO за умов гіпоксії. Mb впливає на клітинну концентрацію NO локально і спільно з NO може змінювати і швидкість поглинання  $O_2$ , і клітинне  $pO_2$  – здійснювати тонку регуляцію кисневого режиму тканини, підвищуючи її  $pO_2$  і узгоджуючи споживання кисню з його доставкою.

**Е.Г. Лябах**

### **ОКСИД АЗОТА, МИОГЛОБИН И КИСЛОРОДНЫЙ РЕЖИМ КЛЕТКИ**

Исследовалось влияние наномолярных концентраций оксида азота на кислородный режим мышечной клетки. С помощью математического моделирования диффузии-реакции кислорода, оксида азота и миоглобина (Mb) рассчитывались внутриклеточное распределение скоростей потребления  $O_2$ ,  $pO_2$ , концентраций NO и Mb при диффузии NO с поверхности кровеносного сосуда в ткань. Согласно расчетам, в отсутствие Mb NO грубо регулирует кислородный режим клетки, увеличивая ее  $pO_2$  путем ингибирования тканевого дыхания во всем объеме клетки. Присутствие Mb способно модулировать это влияние. Помогая транспорту  $O_2$  в клетке, Mb может действовать еще и как сквенджер NO при нормоксии и как его продуцент при гипоксии. Он локально изменяет концентрацию NO и, соответственно, подавляет клеточное дыхание, повышая тем самым  $pO_2$ . Совместно с NO Mb способен тонко регулировать кислородный режим мышц, увеличивая тканевое  $pO_2$  и устраняя несоответствие между потреблением кислорода его доставкой.

Ключевые слова: математическое моделирование, оксид азота, миоглобин, кислород, кислородный режим, миоцит.

**K.G. Lyabakh**

### **NITRIC OXIDE, MYOGLOBIN AND CELL OXYGEN REGIMEN**

The influence of nanomolar concentrations of NO on oxygen regimen of muscle cells was investigated. The intracellular distribution of oxygen consumption rates,  $pO_2$ , NO and myoglobin was calculated by mathematical modeling of diffusion reactions of  $O_2$ , NO and myoglobin in the muscle cell. The diffusion of  $O_2$  and NO from blood vessel surface into cell was taken into account. According to calculations, NO roughly regulates the oxygen regimen of cell, because it increases the tissue  $pO_2$  level by inhibition of mitochondria activity in the whole cell space. The presence of myoglobin is capable potentially to modulate the influence of NO on oxygen regimen. Myoglobin not only contributes to tissue  $O_2$  supply, but it can locally affect the NO concentration. Acting as an NO scavenger under normoxia and as an NO producer under hypoxia, myoglobin together with NO can provide fine adjust-

ment of muscle oxygen regimen via an increase in tissue  $pO_2$  and elimination a mismatch between oxygen supply and demand.

Key words: mathematical modeling, nitric oxide, myoglobin, oxygen, oxygen regimen, myocyte.

*International Scientific and Training Center for Information Technologies and Systems National Academy of Sciences Ukraine, Kyiv*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008. – 517 с.
2. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М. Роль эндотелію та біологічно-активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу та діяльності серця // Фізіол. журн. – 1997. – **43**, №1–2. – С. 3–18.
3. Brown G., Cooper C. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase // FEBS. – 1994. – Lett. 19. – **356**. – P. 295–298.
4. Buerk D. Nitric oxide regulation of microvascular oxygen // Antioxidants & Redox signaling. – 2007. – **9**. – P. 829–843.
5. Buerk D., Lamkin-Kennard K., Jaron D. Modeling the influence of superoxide dismutase on superoxide and nitric oxide interactions including reversible inhibition of oxygen consumption // Free Radic. Biol. Med. – 2003. – **34**. – P. 1488–1503.
6. Calvert J., Lefer D. Clinical translation of nitrite therapy for cardiovascular diseases // Nitric. Oxide. – 2010. – **22**. – P. 91–97.
7. Clanton T. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle // J. Appl. Physiol. – 2007. – **102**. – P. 2379–2388.
8. Cossins A., Berenbrink M. Myoglobin's new clothes // Nature. – 2008. – **454**. – P. 416–417.
9. Flugel U., Merx M.W., Godecke A., Decking U.K., Schrader J. Myoglobin: a scavenger of bioactive NO // PNAS. – 2001. – **98**. – P. 735–740.
10. Flugel U., Fago A., Rassaf T. Keeping the heart in balance: the functional interactions of myoglobin with nitrogen oxides // J. Exp. Biol. – 2010. – **213**. – P. 2726–2733.
11. Hendgen-Cotta U., Flugel U., Kelm M., Rassaf T. Unmasking the Janus face of myoglobin in health and disease // *Ibid.* – P. 2734–2740.
12. Hendgen-Cotta B., Kelm M., Rassaf T. A highlight of myoglobin diversity: the nitrite reductase activity during myocardial ischemia-reperfusion // Nitric Oxide. – 2010. – **22**. – P. 75–82.
13. Jensen F. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective // Biochim. Biophys. Acta. –

2009. – **1787**. – P. 841–848.
14. Lyabakh K. Mathematical modeling of oxygen transport in skeletal muscle during exercise: hypoxia and VO<sub>2</sub> max// Adv. Exp. Med. Biol. – 1999. – **471**. – P. 585–593.
  15. Lyabakh K., Mankovskaya I. Oxygen transport to skeletal muscle working at VO<sub>2</sub> max in acute hypoxia: theoretical prediction//Comparative Biochem. and Physiol. Part A. – 1999. – **132**. – P. 53–60.
  16. Murray J. On the role of myoglobin in muscle respiration //J. Theor. Biol. – 1974. – **47**. – P.115–126.
  17. Pellegrino D., Parisella M. Nitrite as a physiological source of nitric oxide and a signalling molecule in the regulation of the cardiovascular system in both mammalian and non-mammalian vertebrates// Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov. – 2010. – **5**, № 2. – P.91–96.
  18. Rassaf T., Flugel U., Drexhage C., Hendgen-Cotta U., Kelm M., Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function//Circulat. Res. – 2007. – **100**. – P.1749–1754.
  19. Riggs A., Gorr T. A globin in every cell?//PNAS. – 2006. – **103**. – P. 2469–2470.
  20. Shiva S., Huang Z., Grubina R., Sun J., Ringwood L.A., MacArthur P.H., Xu X., Murphy E., Darley-Usmar V.M., Gladwin M.T. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration// Circulat. Res. – 2007. – **100**. – P.654–661.
  21. Thomas D., Liu X., Kantrow S., Lancaster J. The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>//PNAS. – 2001. – **98**. – P.355–360.

*Міжнар. наук.-навч. центр інформ. технологій і систем, НАН України, Київ*  
*E-mail: katya.e.g@gmail.com*

*Матеріал надійшов до редакції 18.11.2010*

V.A. Maisky

## My first 20 years in Neuroscience

*У 60-ті роки ХХ століття акад. Платоном Григоровичем Костюком та його співробітниками отримані інтригуючі нейрофізіологічні дані, що потенціали дії (ПД), які реєструються при внутрішньоклітинному відведенні (в експериментах *in vitro*) за допомогою мікроелектродів при прямій деполяризації гігантських нейронів у різних видів молюсків, виявляють різну чутливість до зміни іонного складу розчинів. Було встановлено, що у гігантських нейронах виноградного слимака (*Helix*) генерація ПД добре підтримується прямим електричним подразненням мембрани у розчинах без іонів натрію і з високою концентрацією іонів кальцію або іонів барію. Амплітуда ПД і питомий опір мембрани зростають у лінійній залежності від логарифму концентрації  $Ca^{2+}$  або  $Ba^{2+}$ . Збільшення вмісту  $Ba^{2+}$  у розчині призводить до появи подовжених ПД на пряме внутрішньоклітинне подразнення гігантських нейронів *Helix*. Також було встановлено (1962–1963), що на відміну від молюска *Helix*, гігантські нейрони легеневих молюсків *Planorbis* і *Limnaea* втрачають можливість генерувати ПД у розчині, в якому відсутні іони натрію.*

*На початку 70-х років ХХ століття учнем П.Г. Костюка (В.О. Майським) у відділі анатомії Роттердамського університету (Голландія) вивчався ретроградний аксонний транспорт пероксидази із хрому (ПХ) від спинного мозку до нейронів різних структур стовбура мозку у кішки. Цими нейроанатомічними дослідженнями керував відомий вчений, проф. Генрікус Куйперс. Як і передбачалося раніше, мічені нейрони виявлялися у ретикулярній формації, вестибулярних ядрах, а також у червоному ядрі. Вперше було показано, що введена у різні сегменти спинного мозку ПХ ретроградно транспортується по ушкоджених аксонах до нейронів блакитної плями (*Locus coeruleus, subcoeruleus*) і до пришлункової ділянки гіпоталамуса – паравентрикулярного ядра. Таким чином, у 1975 р. вперше було відкрито у мозку кішок гіпоталамо-спінальну нейронну систему (Kuypers a. Maisky, 1975). Тільки через рік у США ці дані були підтверджені на щурах (Saper et al., 1976). На другому етапі нейроанатомічних експериментів з численними пошкодженнями спинного мозку у кішок були встановлені канатикові траєкторії низхідних супраспінальних шляхів. Показано, що прямі шляхи від паравентрикулярного ядра гіпоталамуса спускаються у спинному мозку у складі латеральних канатиків, інсилатерально (Kuypers a. Maisky, 1977).*

*About author.* DSc. Vladimir A. Maisky is well-known scientist in field of neurophysiology and neuroanatomy. Together with his teachers and colleagues he has obtained for the first time the important data about ultrastructural organization of the propriospinal projections in spinal cord (in co-authorship with Acad. Platon Grygorovych Kostyuk, *Brain Res.*, 1972), axonal transport of horse

radish peroxidase and fluorescent substances in the brain (Acad. F.N. Serkov, *Dokl. AN USSR*, 1984), organization of hypothalamic and spinal serotonergic projections (Acad. V.N. Kazakov, *Neuroscience*, 1993), *c-fos* expression and NOS activity in the brain in animal model of Parkinson's disease (Corr. Member V.F. Sagach, *Parkinson. Relat. Disord.*, 2002), distribution of NO-generating



also must develop reliable method for intracellular stimulation of the studied neurons, acoustic control, and recording electrical responses of the neurons to applied stimulation. We had no the slightest idea where we can purchase all necessary equipment for such a complex task and where we can find animals having giant nerve cells. The Directorate of the Bogomoletz Institute of Physiology, and Military District in Kyiv gave us a helping hand. For our Dept., I managed to get four radar stations which were unregistered in military units. At that time, such help was a major contribution to the realization of the projects of our chief. In 1961, B.Ya. Pyatigorskii, V.D. Gerasimov, and I invested the part of our modest salaries in the purchase of additional electronic components to build necessary special transformers. Using the following Ukrainian idiom (a novel Soviet watchword) popular at that time, I can say that indeed we all worked together under this comic, but not horrifying, slogan:

“We don’t want the sun if the Party provides light!

We don’t want the bread! Give us hard work and full-time job!”

“Нам сонця не треба – нам партія світить!

Нам хліба не треба – роботу давай!”

(Original text in Ukrainian)

A set of devices for electrophysiological investigations (“3V trend brand”) was developed and made already in 1962 due to efforts of V. Pyatigorskii (Vilya, alias Benya), and two Vladimirs, V. Gerasimov and V. Maisky. In this year, we successfully used the 3V set in biophysical studies. Later on (in 1965), we described the 3V equipment in our paper published in *Fiziol. Zh.* (Kyiv). It seems impossible that the 3V set, after quite a number of modifications is still used by PhD V.D. Gerasimov in his biophysical studies carried out in the Dept. of Physic-Chemical Biology of Cellular Membranes (PCBCM). Unfortunately, DSc. B.Ya. Pyatigorskii, one of developers of this 3V set, passed away long ago.

At the same time, our chief initiated in our Dept. electrophysiological studies on the cat spinal cord; these investigations were under his patronage. He always corrected our work schedule in accordance with the data reported in current scientific literature (published in German, French, or English) and their further careful analysis.

I believe that our boss as one may say was inductive thinker. During the next years his image in the world science was grooving together with extensive career grows that has great impact on his first postgraduate students. He gave us scant personal attention. However, at that time, in spring and summer of 1962 and 1963, V.D. Gerasimov, B.Ya. Pyatigorskii, and I, as well as other associates of our Dept. were joyfully running bare-foot rather frequently (while the morning dew was on the ground) around modest cottage (“dacha”) of our teacher (33 km from Kyiv) gathering in gardens, ponds, and small lakes pulmonary mollusks *Helix pomatia*, *Limnea stagnalis*, and *Planorbis corneus*. We already knew that “giant neurons” (200  $\mu\text{m}$  in diameter) are localized in subpharyngeal ganglia in these “the creations of God.” We sacredly worshipped these animals. One day our convivial intercourse in the Dept. was unexpectedly interrupted by graduate student D.A. Vasilenko, who swallowed a whole big live *Helix pomatia* with no shell, followed by the small glass of vodka, and read us a short lecture about the utility of mucus and the protein hemocyanine of the *Helix* “blue blood” for the human stomach. It should be noted that, due to superficial localization of giant neurons in the ganglia of these mollusks, it was possible to rapidly change the ion composition of the medium around the studied neuron. In addition, since these neurons are huge, we could impale them with two microelectrodes, without any damage the cell’s membrane. We also could polarize the membrane and record the electrical activity from the neuron during many hours.

Intriguing facts were obtained in the first electrophysiological investigations [1, 2] that the action potentials (APs) produced by direct depolarization of the cell membrane in different species of mollusks showed specific dependence on the external ionic composition. In *Helix* neurons, the generation of AP was well maintained in sodium-free solutions with high calcium or barium content (fig. 1, a–h). In such case the amplitude of the spike overshoot was linearly related to the logarithm of calcium concentration. It is interesting that the increase in the external calcium or barium ions decreased the conductance of the resting membrane ( $R_o$ ) also in linear relation to the logarithm of  $Ca^{2+}$  or  $Ba^{2+}$  concentration. It was found for the first time that addition of  $Ba^{2+}$  to the external solution produced in the neurons well-developed prolonged (protracted) APs in all cases. On the contrary, the excitability of *Planorbis* and *Limnea* neurons

was rapidly (during 3 min) and reversibly depressed in sodium-free solutions (fig. 1, i–p).

Later on, my chief has proposed me more complex problem, namely, to use mathematical apparatus from the “cable theory” (mathematical modeling of spreading electrotonic potentials (EPs) along giant axons of squid, Hodgkin – Rushton, 1946) in order to predict the biophysical characteristics of individual muscle fibers (*m. sartorius*) of frog *in vitro* experiments on the effects of the changes in composition of the external solution. Within the framework of this theory, the following partial differential equation was proposed:

$$-\lambda^2 \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \tau \frac{\partial V}{\partial t} + V = 0,$$

where  $\lambda$  is the first coefficient of attenuation of the amplitude of EP (V) along the cable expressed in terms of specific resistance of the axoplasm (sarcoplasm) ( $R_i$ ) and resistance

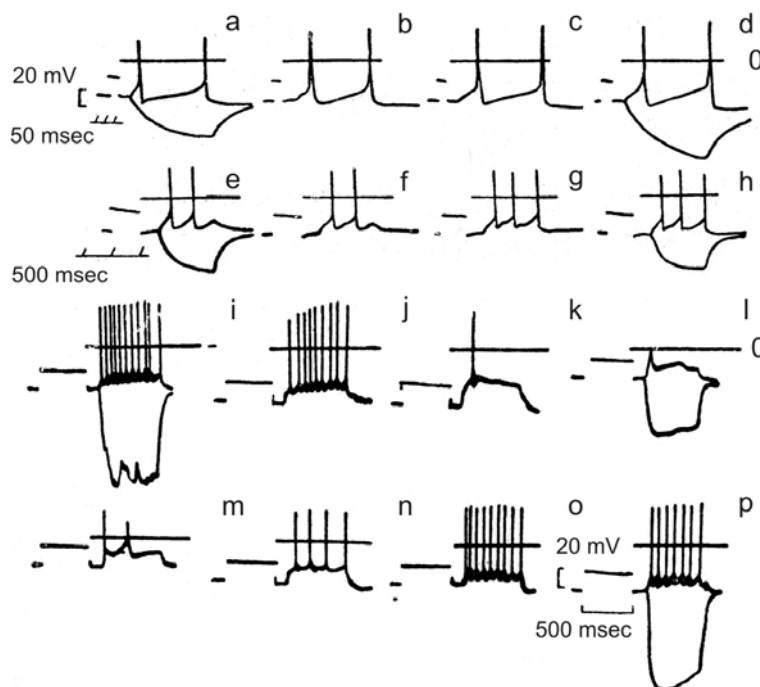


Fig. 1. Changes of electrotonic potentials and APs of the same neuron of *Helix* (a–h) and *Planorbis* (i–p) in isotonic solution  $CaCl_2$ . Note APs and electrotonic potentials in Ringer's solution without  $Na^+$  (a) and after 1, 2, 3 min registration of the same characteristics (b–d), in isotonic solution of  $CaCl_2$ , correspondently; again in normal solution without  $Na^+$  after 1, 2, 3, and 4 min registration of the same characteristics (e–h), correspondently; the same changes in these characteristics in normal (i) and isotonic solution of  $CaCl_2$  (j–l); again in normal solution (m–p) after 1, 2, 3, and 4 min, correspondently. Hyperpolarized and depolarized currents are  $1 \cdot 10^{-8}$  A and  $0.3 \cdot 10^{-8}$  A, correspondently (modified from [1, 2])

of the membrane per unit surface ( $R_m$ ). The second attenuation coefficient  $\tau$ , or the time constant, is related to the membrane capacity ( $C_m$ ) per unit surface. At earliest possible date, I developed the special electronic device and original protocol for recording of EPs along the membrane of excitable fiber. The device included a complex radio-frequency set for uncoupling of the biological object from the stimulator. The membranes of individual muscle fibers were polarized by weak hyperpolarizing current pulses ( $2 \cdot 10^{-8}$  A) passed through one microelectrode, while another electrode was used for recording of EPs along this fiber at different distances (100 – 2000  $\mu\text{m}$ ) from the polarizing electrode. Throughout 1962, I carried out these complex experiments. For the majority of the studied muscle fibers of frog, the following mean biophysical parameters were obtained in the normal Ringer solution:  $R_m = 3960 \pm 480 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $R_i = 87 \pm 10.3 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}$ , and  $C_m = 8 \pm 3.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . These parameters decreased with increase in the concentration of  $\text{K}^+$  in the external solution. The data that I obtained in these experiments were described in the paper published in the Moscow scientific journal [8]. It should be noted that the data attracted lively interest from biophysicists.

In those memorable times (namely of the 1960s), our research activities sometimes alternated with informal gatherings with music. We knew that piano concerts in philharmonics Kyiv and Moscow are another strong passion or the second dominant after science for our teacher. We knew that he wonderfully plays the piano himself and also loves to hear great pianists like S. Richter or A. Rubinstein who could make the piano sing. Each of us was just “a copy cat” and we also loved to hear great pianists and singers at the opera or on vinyl. I remember how our trade union organization bought a piano “Ukraine” for the Institute, and we put this musical instrument in the director’s office. The next day we all, connoisseurs of art, were invited to listen to

the music. Platon Grygorovych emotionally played for us a part of Chopin’s Piano Concerto No.1 in E minor. We listened to the music with bated breath. It was so beautiful! We have remarked that our maestro put his own feeling into sounds and told us the pleasant and lively story. Indeed, a Kostyuk’s master class was example of the brilliant emotionally-semantic inversion.

Many years have passed invisibly. *Tempus fugit* (time flies. Ed.). These decades seem to have flown by as inexorable fate has willed; time changes us all, and all around us. However, our glorious past, the 1960s, will always remain in our memory. This period of time our cohort: Platon Kostyuk, Lida Savoskina, Zoya Sorokina-Marina, Galina Skibo, Lysia Vihreva, Nellya Pogorelaya, B. Pyatigorskii, V. Gerasimov, N. Preobrajenskii, A. Pilyavskii, nonpareil D. Vasilenko, and I enthusiastically worked together in the Dept. of GPNS.

However, I also have had some conflicts with my boss. I have a recollection of the end of the cold winter in 1965. Before, my five original manuscripts (in co-authorship with my teacher P.G. Kostyuk) were submitted to the Moscow scientific journals. It was snowing. I saw snow-covered streets and snow-covered Bogomoletz Park from the first floor of my room. I was sitting at my desk making some notes. Just as my boss came in, he started out by attacking me and out of a clear sky. He told me about a transfer of my assistance N. Babetz to another research group in order to perform technical service of the new French-made setup “Racia” enabling scientists successfully to run electrophysiological studies on the cat spinal cord. I had an objection. I was not a diplomat yet. I was only 32 years old and my supervisor was older, 41 years old. “It is my order!” my supervisor said. And he spoke to me as if we established new contact, namely manager-subordinate relationship but not teacher – student one. He told me that he is the chief, and I am just only collaborator of the Dept. It was rather painful for me to hear



such words. I was silent. I crumpled a sheet of paper covered with my writing and began to cry... "I'm only graduate student" was in my mind and in all my body... The next day I have written the letter of voluntary resignation addressed to the Director of the Institute Acad. A.F. Makarchenko. I was the first and last "victim" of such circumstances. Many years have elapsed. My boss became an excellent diplomat; his students had never heard rude remarks from him. He could only say: "I am surprised." My vivid recollections are the homage which I pay to my first great teacher Platon Kostyuk.

## 2. Ukrainian endocrinology of socialist realism

At the beginning of 1965, by the decree of the Ministry of Public Health of the Ukr. USSR, Akad. V.P. Komissarenko founded a new research institution in Kyiv, the Institute of Endocrinology and Metabolism, and occupied the position of its first director. From February 10, I occupied the position of his scientist (Dr. Sci. K.P. Zak, a student of Akad. V.P. Komissarenko, was also the scientist). During the early years, the Institute was located in the beautiful two-storied mansion just at the corner of Shevchenko's Boulevard 8 and Pushkinskaya Street. Here, there was rather big patio. I took on a job (my first job): it was necessary to re-equip field service, organize the work shop, and storehouses. The scientific staff of the Institute, administrative staff, and support personnel has mushroomed up. My second chief was 58 years old. Over a long period of time, he worked under the guidance of Akad. A.A. Bogomoletz. Until the end of 1964, Akad. V.P. Komissarenko was the head of the Department at the Bogomoletz Institute of Physiology of the Akad. Sci. of the Ukr. SSR. He also was well-trained in the Laboratory headed by Prof. H. Selye (the founder of the theory of stress and general adaptation syndrome, GAS) at the Institute of Experimental Medicine, Montreal (Canada).

Thus, Prof. A.A. Bogomoletz and Prof. H. Selye were indeed his great teachers. There was an ambitious task in front of our energetic, full of bush fire, and talented leader and associates of his Institute: to lay the first stone of fundamental endocrinology as a science in Ukraine. It was impossible for us to stand against his energy and charm, and all of us worked wholeheartedly. In the first year, Acad. Komissarenko offered a job at his Institute for many young and talented scientists from Kharkov and Odessa (PhD Reznikov A.G. and others). In our environment, in this difficult period of formation of the Institute, a unique aura of high respect and mutual support was formed. I was Senior Res. Ass. in the Laboratory of Physiology. I again began my career from scratch. As before, I began to actively seek for biochemical equipment, amplifiers, oscillographs, and stimulators. I remember that we received a great number of items of equipment retired from the Institute of Cybernetics nearly in the mid-1965. We also bought biochemical reagents. Our experimental infrastructure and machine shops took on life. I again began to create a set of electrophysiological equipment for recording of neuronal activity in mollusks. I should emphasize that our director was a very respected within the circle of communist party functionary, government officials, and even writers in Kyiv and Moscow. One day (it was in the autumn of 1965), my second great boss, the master of science and life, said me that Japanese exhibition of high-resolution electronic microscopes (JEOL) should be opened in Moscow and that he wants to go to Moscow with me. I agreed with my boss with ineffable joy. I should note that I already published my first paper entitled "Submicroscopic Structure Giant Neurons of the Mollusk *Planorbis corneus*." I remember the interesting events in Moscow. We are in Japanese exhibition; we are burning with curiosity. Here, booklets, badges, and even 3-D postcards with Japanese women that winked are distributed... but

there are only four high-resolution microscopes for all 16 republics of the former USSR. Guests and visitors of this exhibition were talking about partitioning the spoils system by the rules of the well-known character Popandopulo: "...this is my... (Moscow), and this is... also my!" Of course, I lost all hope that Ukraine should receive an electronic microscope, but Vasiliy Pavlovich smiles mysteriously and repeats: "Choose the best!" (i.e., JEM-100). Later on, it came to my knowledge that Vasiliy Pavlovich had personal encounter with N.B. Podgorny (the first Secretary of the Central Committee of the Communist Party of Ukraine up to 1963 and the Chairman of the Presidium of the Supreme Soviet of the USSR from 1965) who already gave the special order specifically to send one electronic microscope JEM-100 to Ukraine. This JEM-100 was the first high-class electronic microscope in Ukraine that was actively used in the research at Komissarenko's Institute (in winter of 1966), and I together with DSc. K.P. Zak began electron microscopic examination of blood cells in dogs. The first experimental paper was published already in 1967 [12].

In that time, I also actively studied electrical activity of the giant neurons, located in the buccal ganglia of mollusks. These giant neurons of *Planorbis corneus* exhibited intense electrical activity periodically (after 3 sec) substituted by deep (up to 30 mV) and prolonged (nearly 2 sec) inhibitory hyperpolarization. These parameters sharply changed with the addition of different neurotransmitters (or other biologically active substances used in very high dilutions) to superfusing solutions. I remember that, one day, Vasiliy Pavlovich invited high-profile officials of the Ministry of Public Health, writers, and journalists in order to demonstrate at the Institute the electrical activity of these giant nerve cells of *Planorbis* using microelectrode technique for recording of action potentials, combined it with video and sound control. When guests saw

alternate impulse discharges of a separate neuron on the screen of oscillograph and heard how this neuron "speaks," they were truly amazed. A well-known Ukrainian writer Natan Rybak even exclaimed: "This is real Ukrainian endocrinological science of socialistic realism!" After inspection of other Labs and JEM-100, all guests (as well as associates of the Institute) went to the monument of the leader of world proletariat (V.I. Lenin) to give him "thanks for the miracles of socialistic science" in Ukraine. The monument was constantly visible from the windows of the first floor of our Institute. Our valuable time passed in such a way, in painstaking labour and vain efforts. My second boss (Acad. V.P. Komissarenko) decided for the expansion of investigations. Then, an excellent German EM (Carl Zeiss Jena) and some optical microscopes were additionally purchased for Labs. Somewhat later my first chief P.G. Kostyuk (from 1966, Corr. Member AN USSR and director of the Bogomoletz Institute of Physiology) was invited to the Komissarenko's Institute. Of course, he met me and asked me about my results obtained using EM and my electrophysiological investigations in the Institute. Then he simply said that a long time elapsed since our last "fight". The summer, but not winter, is now onside and that I can come back in the Dept. of GPNS. I decided to return "home" to the Bogomoletz Institute of Physiology. More than 40 years have elapsed, but I remember now only my deep emotions, tears in my eyes and the last words of my dear second teacher: "Volodya, I do not object you returning "home", to your *Alma Mater*."

### 3. Revolution in neuroanatomy of the 1970s and my third great mentor

At the beginning of 1970s, methods based on cell biology and chemistry, aimed as "pathway tracing" via anterograde and retrograde axonal transport of horse radish peroxidase

(HRP) and techniques for immunohistochemical localization of neurotransmitters in the brain have been introduced. Acad. P.G. Kostyuk remained abreast of scientific developments. His very interesting papers have been published in International Journals; a paper describing ultrastructural organization of propriospinal projections in cat was published in co-authorship with me in *Brain Res.* (1972). At that time, my mentor already became internationally renowned and occupied the position of Vice-President of IBRO/UNESCO (1974–1979). With the help of my supervisor, I have got Invitation to work for the period of 10 months (using IBRO/UNESCO fellowship, 1975–1976) in the Dept. of Anatomy of the Erasmus University in Rotterdam (the Netherlands) headed by the famous European scientist Prof. H. Kuypers. Thus, Prof. H. Kuypers (1925–1989) became my third great teacher. Indeed, all of us who were privilege to contact with him or work with him are fully aware of the really important scientific contributions that he made during his lifetime. At the beginning of our experiments on cats and rats, we found that microinjections of HRP into the spinal gray matter resulted in retrograde labeling of only a very limited number of brain stem neurons. About a year before, Prof. K. Kristensson from Sweden has found that effective retrograde transport of HRP in transected axons really exists. Thus, as the first step I studied temporal relationships between transport of HRP (Sigma, USA; Boehringer, Germany) and induction of chromatolysis. Prof. H. Kuypers, DSc. J. Siegel (from USA), me, and two young scientists from the Dept. of Anatomy (C. Catsman-Berrevoets and I. Molenaar) worked together. In this Dept., there was also a “secret” scientific Lab. with which Prof. H. Kuypers during 1975–1976 had begun developing a new retrograde labeling technique employing fluorescent substances (Primuline, Fast Blue, Evans Blue, and others) for double labeling of neurons in rat through divergent axon

collaterals. Only in 1977, the new technique was published by Prof. H. Kuypers and young scientist Marina Bentivoglio (from Italy, using IBRO/UNESCO fellowship). However, at the beginning of 1975 our group included Prof. H. Kuypers, two technicians, and me. We all made subsequent spinal injections of HRP into the gray and white matter of the rat’s or cat’s spinal cord and in such way damaged as many axons as possible.

The method, as we found, was very effective even in the large animals (in cats). Too many, about twenty cats (two animals per months) were used for investigation of retrograde axonal transport of HRP from spinal cord (C2, C8/TH1, TH5, L2, and L4 segments, respectively). The most important part of experimental work (contralateral or bilateral spinal lesions at C2, C8/TH1, which in the respective cases spared small portions of the different funiculi, unilaterally), was done only by Prof. H. Kuypers himself and his two very skill assistants using special binocular microscope and vacuum pump. I analyzed experimental material (sections of the cat’s brain and spinal cord) and prepared illustrations. I must note that cats were extraordinary spinal animals. After operation, all these cats needed special conditions for rehabilitation. Only one week later, spinal HRP injections were made below the lesions in both animal groups (30  $\mu$ l of 30 % HRP was deposited in the case). We found that, after injections of HRP, the enzyme was transported retrogradely to brain stem neurons in the bulbar medial reticular formation, the vestibular complex, and the red nucleus. We obtained intriguing facts in our investigations: we recorded the labeled neurons in the *locus coeruleus* and *subcoeruleus*, as well as in the paraventricular hypothalamic nucleus [6]. The existence of straight pathways from hypothalamus to the spinal cord (as can be seen in fig. 2, A) has not been demonstrated earlier. The next step of our study was to determine the corresponding spinal funiculi

where descending fibers (from various brain stem cell groups) are located. Indeed, in our pioneer studies, we found that the fibers from the hypothalamus, which descend throughout the spinal cord, are located mainly in the lateral funiculus, ipsilaterally (fig. 2, B).

My stay in this beautiful country was going to the end. As often as I came in the evening to the downtown at the bus station Rotterdam – Istanbul and sadly looked after the bus with

laborers from Turkey: there, to the east, is also my country, my Ukraine. I kept firmly in my mind (as the prayers) Kostyuk's hard directions he gave me in the bar of Moscow hotel of the Acad. Sci. of USSR. "You should obtain good results and publish a paper in the International Journal as soon as possible!" he said. He went to Switzerland, the some time as I went to the Netherlands. I remembered that he was on probation in Australia during

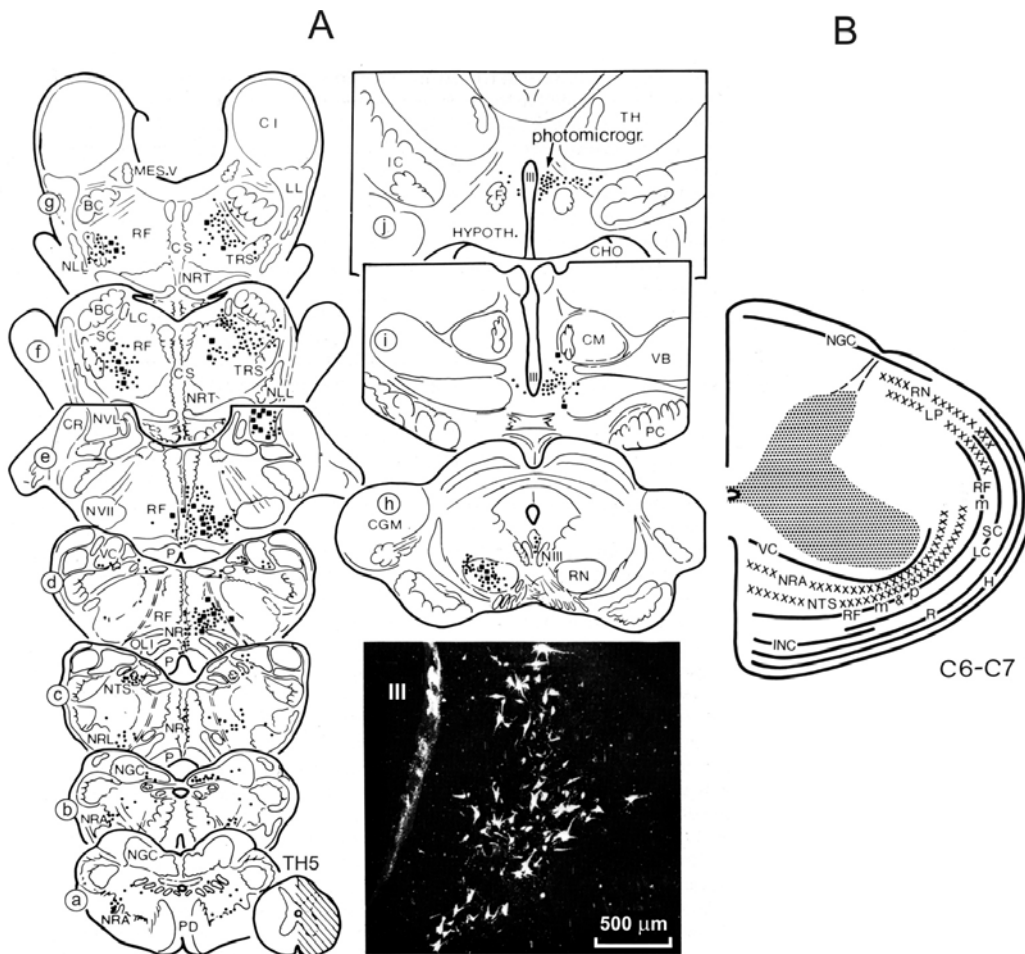


Fig. 2. Cells of origin of descending brain stem pathways to the spinal cord in cat. (A) distribution of retrogradely labeled neurons (dots and squares) at various brain stem levels (a–j) after unilateral (right) injection of HRP at TH5. Note labeled neurons in the *locus coeruleus* (LC) and the *nucleus subcoeruleus* (SC) at levels f and g, and in the *paraventricular nucleus* of hypothalamus (H) at levels i, j ipsilaterally, as well as in the *lateral pontine tegmentum* (LT), adjoining the *rubrospinal tract* (TRS) contralaterally. Dark-field photomicrograph shows the labeled neurons in *periventricular* (III) area (level j) in the hypothalamus; (B) funicular trajectories of descending brain stem pathways in C6–C7 segments. Abbreviations: CM, center medium; F, fornix; INC, interstitial nucleus of Cajal; NGC, nuclei gracilis and cuneatus; NRA, nucleus retroambiguus; NTS, nucleus of the tractus solitarius; P, pyramidal tract; R, raphe nuclei; RFm, medullary medial reticular formation; RFp, pontine medial reticular formation; RN, red nucleus; TH, thalamus (modified from [6, 7])

five months and, shortly after this probation, he published (in co-authorship) five scientific papers in 1962. But I had here (in the Netherlands) one problem. Prof. H. Kuypers even not guessed that he is a person of considerable talent. Each scientific problem he touched always turned into pioneering discoveries in Neuroscience. But he was also the father of six children. He lived in the beautiful realm together with his horses, car, certainly, with his beloved wife and dear science. Surely he did not know our “specific” idiom (in Russian) extensively used in our real life in the ex-USSR, such as “*рвать подметки на ходу!*” (“be a fast climber,” or “not to waste any time!”). Really, at the end of the first part of my academic mission (in late spring of 1975), I prepared all primary materials for our scientific paper to be published. It was necessary to write at least a short communication and submit it to the International Journal. However, Professor “dragged” preparation of our manuscript. His teaching load and extensive international

cooperation strongly distracted his efforts from the main subject – the manuscript. In this situation, I was running out of time absolutely. Academic circles “boiled” like the samovar; this was like a three-ring circus: “The winner is the scientist who first publishes the novel data!” Nearly two weeks before my return to Kyiv. I again insisted on the necessity to get through with our manuscript. I realized that my dear maestro did not comprehend my uneasiness. “You discovered for the first time the direct pathway from the hypothalamus to the spinal cord along its whole length!” I exclaimed... and then my voice suddenly trembled, and my tears dropped on Israel strawberries covered with sour cream and sugar. It has worked. Teacher put his hand on my shoulder, and then he had merely said: “I understand!” Later on, it came to my knowledge that, after our talk, Prof. H. Kuypers intensely worked during four days in his room with our manuscript. On the 5th day, in the morning Professor left by Euro-Express, together with our manuscript, for Germany to

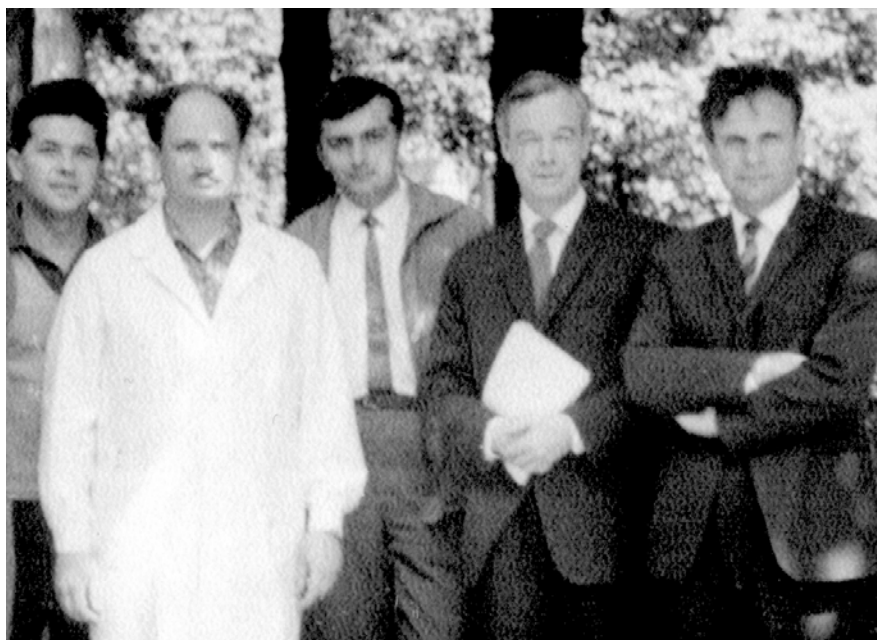


Fig. 3 (Foto). Our glorious past (the 1970s), Akad. Kostyuk P.G., Nobel prize winner Hodgkin A.L. and three young scientists (Vasilenko D., Pyatigorskii B. and Preobrajenskii N.) in Bogomoletz Park.

Prof. M. Zimmermann (II Physiological Institute in Heidelberg). He was the Editor of a new International Journal *Neuroscience Letters*, which first issue was supposed to be published in a month. Platon Kostyuk and I were pleased, since this paper was published in the first number of the Journal and on its first pages [6]. Yes, indeed, it was my victory achieved through enormous efforts. Later on, a known research group of morphologists (Cowan's laboratory, USA) published their own data about straight pathways from the hypothalamus to autonomic centers of the rat spinal cord [9]. It was also shown that direct projections from hypothalamus to spinal cord arises in paraventricular nucleus and ends in the intermediolateral column and marginal zone of the dorsal horn [10]. To emphasize the contribution of Prof. Kuypers to Neuroscience, I must note that only Pavlov's term *conditioned reflex* (1903), Bykov's postulates about transfer between hemispheres in Pavlov's Lab., and our intriguing facts about straight pathways from the hypothalamus to the spinal cord in cat [6] were discussed and cited in the last issue (50, № 5/6, 1999) of the millennium Brain Res. Bull, which was devoted to the achievements in Neuroscience of 20th Century (see [10]).

P.S. We have Shakespeare at our tongue's end:

"I hold the world but as the world, Gratiano,  
*A stage where every man must play a part.*"

(William Shakespeare. The Merchant of Venice)

The reality in Neuroscience (here severe competition reigns) means to sing certain parts of "science services" (by analogy "church services"), since we are devoted ourselves wholly to the service of Science. My first 20 years in Neuroscience will be finished. I had three great "mentors" and three times I cried bitterly. I am going home in order "to sing my own song" tomorrow! However, on the next day... the new *stage* and new singers will appear (see [3–5, 11]).

V.A. Maisky

## MY FIRST 20 YEARS IN NEUROSCIENCE

Intriguing facts were obtained in the first electrophysiological investigations (1964) that the action potentials (AP) produced by direct depolarization of the cell membrane in different species of mollusks showed specific relations to changes in external ionic composition. In *Helix* neurons, the generation of AP was well maintained in sodium-free solutions with high calcium or barium content. The amplitude of the spike overshoot in the case was linearly related to the logarithm of calcium concentration. It is interesting that increase in external calcium ions decreased the ionic conductance of the resting membrane ( $R_o$ ) also in linear relation to the logarithm of  $Ca^{2+}$  or  $Ba^{2+}$  concentration. It was found for the first time (1965) that addition of  $Ba^{2+}$  to the external solution produced in the neurons well-developed prolonged (protracted) APs in all cases. However, the excitability of *Planorbis* and *Limnea* neurons was rapidly (during 3 min) reversibly depressed in sodium-free solutions. We found that, after injections of horse radish peroxidase (HRP) in the spinal cord of cats, the enzyme was transported retrogradely to brain stem neurons in the bulbar medial reticular formation, the vestibular complex, and the red nucleus. We obtained (1975) intriguing facts in our investigations: we recorded the labeled neurons in the *locus coeruleus* and *subcoeruleus*, as well as in the paraventricular hypothalamic nucleus. The existence of straight pathways from hypothalamus to the spinal cord has not been demonstrated earlier. The next step of our study was to determine the corresponding spinal funiculi where descending fibers (from various brain stem cell groups) are located. Indeed, in our pioneer studies (1977), we found that the fibers from the hypothalamus, which descend throughout the spinal cord, are located mainly in the lateral funiculus, ipsilaterally.

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

## REFERENCES

1. Gerasimov V.D., Kostyuk P.G., Maisky V.A. Excitability of giant nerve cells of various representatives of pulmonary molluscs (*Helix pomatia*, *Limnea stagnalis*, *Planorbis corneus*) in solutions free of sodium ions // Bull. Exp. Biol. and Med. – 1964 – **58**, № 1. – P. 3 – 7 (in Russian).
2. Gerasimov V.D., Kostyuk P.G., Maisky V.A. Influence of the bivalent cations on electrical characteristics of the membrane of giant neurons // Biophysica. – 1965. – **10**, № 3 – P. 447 – 453 (in Russian).
3. Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells // Nature. – 1975. – **257**, № 5528. – P. 691 – 693.
4. Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I., Veselovsky N.S. Ionic currents in the neuroblastoma cell membrane //

- Neuroscience. – 1978. – **3**, № 3. – P. 327 – 332.
5. Kostyuk P.G., Lukyanetz E.A., Doroshenko P.A. Effect of serotonin and cAMP on calcium currents in different neurons of *Helix pomatia* // Pfluegers Arch. – 1992. – **420**, № 1. – P. 9 – 15.
  6. Kuypers H.G.J.M., Maisky V.A. Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase from spinal cord to brain stem cell groups in the cat // Neurosci. Lett. – 1975. – **1**, № 1. – P. 9 – 14.
  7. Kuypers H.G.J.M., Maisky V.A. Funicular trajectories of descending brain stem pathways in cat // Brain Res. – 1977. – **136**, № 1. – P. 159 – 165.
  8. Maisky V.A. Changes of electrical characteristics of muscle fibres in case of increase in kalian ions concentration in the external solution // Biophysica. – 1963. – **8**, № 5. – P. 588 – 596 (in Russian).
  9. Saper C.B., Loewy A.D., Swanson L.W., Cowan W.M. Direct hypothalamo-autonomic connections // Brain Res. – 1976. – **117**, № 2. – P. 305 – 312.
  10. Swanson L.W. The neuroanatomy revolution of the 1970s and the hypothalamus // Brain Res. Bull. – 1999. – **50**, № 5/6. – P. 397 – 398.
  11. Veselovsky N.S., Fedulova S.A. Two types of calcium channels in the somatic membrane of neurons in the dorsal ganglia of rat // Dokl. AN USSR. – 1983. – **268**, № 3. – P. 747 – 750 (in Russian).
  12. Zak K.P., Maisky V.A., Nadhornaya N.I. Electron microscopic investigation of leucocytes in peripheral blood in dogs // Fiziol. Zh. – 1967. – **13**, № 2. – P. 204 – 210 (in Ukrainian).

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

*Received 08.12.2010*

## Научное наследие академика А.А. Богомольца (к 130-летию со дня рождения)

Александр Александрович Богомолец – крупнейший учёный-патофизиолог, человек необычайной судьбы. Отец – Александр Михайлович Богомолец, сын мелкопоместного дворянина, врач, сотрудничал с народолюбцами. Мать – Софья Николаевна Присецкая, дочь поручика в отставке, революционерка, входила в Южно-русский рабочий союз, была арестована в январе 1881 г. Ее сын родился в лазарете Лукьяновской тюрьмы. Меньше чем через месяц жандармы отдали ребёнка отцу Софьи Николаевны, который уехал с ним в свое имение на Полтавщине, в село Климово Зеньковского уезда. Позднее Александр Михайлович увез сына в Нежин. Свою мать Саша Богомолец увидел лишь в 1891 г., когда его отец по ходатайству Льва Толстого получил разрешение навестить Софью Богомолец в Сибири. Вскоре она умерла от туберкулеза. После тяжелой поездки в Сибирь Александр Богомолец стал очень болезненным.

Несмотря на то, что мать и отец его были политическими противниками царского режима, ещё до революции А.А. Богомолец закончил одну из лучших – 1-ю гимназию в Киеве с золотой медалью, университет, общался с самыми видными учёными – В.В. Подвысоцким, И.П. Павловым, В.В. Ворониным.

В 1907 г. А.А. Богомолец стал ассистентом на кафедре общей патологии Новороссийского университета. В одной из первых работ он показал роль и значение надпочечников в защитных реакциях организма. В том же году Александр Александрович получил звание приват-доцента, защитив при оппонении И.П. Павлова

докторскую диссертацию о действии специфических сывороток на надпочечники. И что вообще удивительно, учитывая его происхождение, это то, что в феврале 1911 г. Богомольца отправили в командировку в Париж (в Сорбонну) для подготовки к профессорскому званию. Затем он был утвержден экстраординарным профессором кафедры общей патологии и бактериологии Николаевского университета в Саратове. Так что Александр Александрович сделал блестящую научную карьеру до 36 лет ещё при царской власти. Одновременно с чтением лекций проводил эпидемиологические исследования. Одним из первых указал на связь аллергии и иммунитета. Участвовал и в общественной жизни: в 1914 г. вместе с восемнадцатью другими профессорами опубликовал обращение «О судьбе женщин, оставшихся за стенами университета» и занялся организацией Высших женских медицинских курсов, позже поднимал вопрос об открытии в Саратове специального бактериологического института.

А.А. Богомолец, всегда считавшийся «неблагонадежным», революцию принял сразу. В 1919 г. был назначен консультантом-эпидемиологом санитарной части Юго-восточного фронта Красной армии и санитарного отдела Рязано-Уральской железной дороги. Во время гражданской войны был также эпидемиологом Саратовского губздрави, руководил Саратовским эвакуопунктом, создал первые в стране железнодорожную клинко-диагностическую и передвижную противомаларийную лаборатории. Не оставлял он и научных исследований и в 1921 г. опубликовал



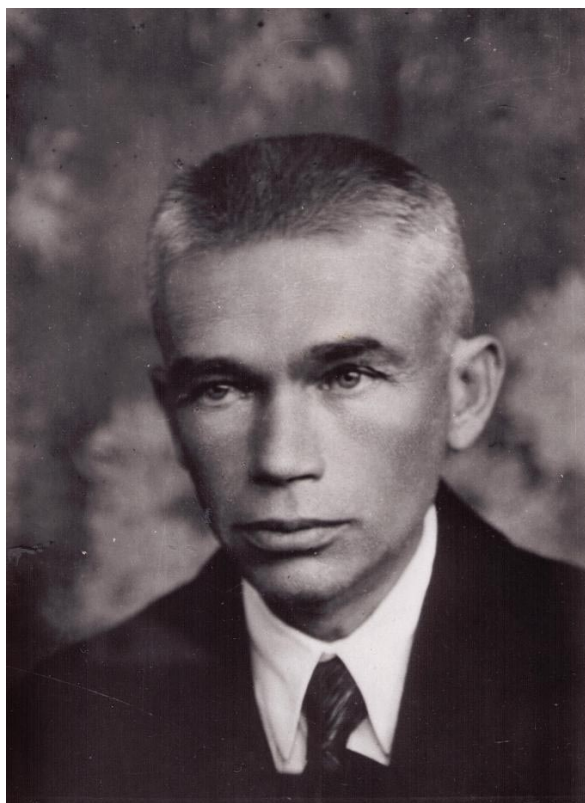
учебник «Краткий курс патологической физиологии». С 1923 г. серьезно занимался исследованиями соединительной ткани и ее роли в реакциях организма.

В 1925 г. профессор Богомолец был приглашен в Москву, на кафедру патофизиологии медицинского факультета II Московского университета. Одновременно с 1926 г. он работал в Институте гематологии и переливания крови (после смерти основателя института А. А. Богданова стал его директором), руководил отделением экспериментальной патологии в Институте высшей нервной деятельности, лабораторией экспериментальной онкологии Московского городского отдела здравоохранения, консультантом патофизиологической лаборатории при Государственном ипподроме в Москве. Всюду Богомолец продолжал заниматься изучением защитных сил

организма и возможностей их активизации.

Не будучи членом коммунистической партии, Александр Александрович вложил все свои знания, душевные и физические силы в построение зданий советского общества и советской науки. Он был депутатом Верховного Совета СССР, академиком и президентом Академии наук УССР (1930–1946), академиком и вице-президентом Академии наук СССР, Героем Социалистического труда СССР, академиком БССР и АМН СССР, почётным членом АН Грузии, заслуженным деятелем науки РСФСР, лауреатом Государственной Премии СССР, членом ЦИК УССР и ЦИК СССР.

Это признание Александра Александровича Богомольца, учёного и гражданина при любой власти – свидетельство глубокого уважения общества и его руководителей к огромным его достижениям и зас-



Александр Александрович Богомолец – профессор II Московского университета



Александр Александрович Богомолец – Президент Академии наук УССР

лугам прежде всего в научной работе на благо человечества.

Как и у большинства интеллигентных людей, у А.А. Богомольца, очевидно по наследству от матери и отца развилось критическое отношение к устоявшимся догмам в жизни и науке, стремление к их пересмотру. И, наверное, хорошо, что ум Александра Александровича был ориентирован в основном не на политические цели, а на стремление бороться с догмами, на открытии новых путей именно в этой сфере человеческой деятельности.

Тем не менее, бунтарский дух А.А. Богомольца проявлялся и на научной ниве. Именно он вступил в спор с профессором кафедры утверждая, что принятые в учебниках физиологии схемы, по которым основная часть систолического давления крови тратится не на преодоление сопротивления капилляров (что есть неверным), а на преодоление сопротивления очень мелких предкапиллярных артериол. Они, по его убеждению, играют роль шлюза, который рефлекторно открывается в тех случаях, когда интенсивность работы мышц, желез и т.п. вследствие усиления обмена веществ требует увеличения прилива крови к органу, который работает. «Взглянув на кривую распределения кровяного давления в сосудистом русле, нарисованную А.А. Богомольцем, профессор заявил: «Никакого представления о физиологии, приходите в следующий раз». Поскольку, пишет Александр Александрович, я хорошо знал предмет (именно А.А. Богомолец первым провел измерение давления в «малых сосудах»), и поэтому ответил: «Как профессору физиологии Вам должно быть известно, что, не имея представления о физиологии, эту науку нельзя выучить за неделю. Больше я к Вам не приду». Однако конфликт разрешился благополучно. Через неделю опомнившийся профессор поставил зачёт А.А. Богомольцу, не задав ему ни одного вопроса.

В дальнейшей своей работе А.А. Богомолец эти положения о механизмах регуляции сосудистого тонуса блестяще развил в изучении выяснения патогенеза артериальной гипертензии и оформил в виде монографии «Артериальная гипертензия. Очерки патогенеза». Важнейшим механизмом этого заболевания автор считал длительный спазм прекапиллярных артериол в результате нарушений функций нервной системы. Он писал: «Артериальная гипертензия – это стойкий ангионевроз, связанный с нарушением нормальных связей между нервно-мышечными аппаратами мельчайших артериол и их нервными центрами»\*. Эти работы Александра Александровича – фундаментальная основа для разработки методов патогенетической терапии гипертонической болезни.

В дальнейшем эти исследования А.А. Богомольца были развиты во многочисленных работах его ученика Н.Н. Горева и его научной школы, когда были выделены рефлексогенные, почечные, неврогенные факторы в патогенезе гипертонии.

А.А. Богомолец был ученым-энциклопедистом, способным с успехом вести занятия для студентов как на своей кафедре патофизиологии, так и на кафедрах фармакологии, бактериологии, физиологии, микробиологии.

Существует два типа учёных: одни накапливают факты и делают более или менее значительные выводы. Это учёные-аналитики, их большинство, и их место в науке в основном зависит от важности тех данных, которые им удаётся получить. Однако существуют, на счастье, и учёные другого типа, учёные-синтетика, которые обобщают факты и их взаимосвязи, и прокладывают новые пути в науке. Это учёные с более абстрактным мышлением, учёные-философы, именно им дан дар интеграции, позволяющей охватить мыслью целую область или области науки и наметить новые пути их развития.

\* А.А. Богомолец. Избранные труды. – К.: Наукова думка, 1969. том 2, стр. 396

Развитие патофизиологии в значительной мере определяется именно такими учёными, которые смогли подняться до обобщений и интеграции конкретных достижений различных направлений биологических и медицинских дисциплин, учёных, способных к определению главной составляющей патологического процесса при различных заболеваниях. Это очень трудно, необходим не только аналитический, но и синтетический склад ума и мышления. Поэтому выдающихся патофизиологов немного, но именно они генерируют новые идеи, обогащают ими патофизиологию и медицину, формируют новые направления в науке. В качестве примеров можно назвать учение И.И. Мечникова об иммунитете, теорию Селье о стрессе и механизмах адаптации организма к условиям существования и её развитие Н.Н. Сиротининым в Украине и Ф.З. Меерсоном в России, учение А.А. Богомольца о роли соединительной ткани в патогенезе заболеваний. Среди наших современников следует отметить обобщения П.Г. Костюка о роли ионов кальция в регуляции физиологических функций и развитии патологических процессов, обобщение Г.Н. Крыжановского об эндогенезе патологических процессов и протекции («дизрегуляторная патология») и некоторые другие.

Именно таким учёным был А.А. Богомолец с его многогранными идеями в области физиологической системы соединительной ткани, эндокринологии и кровообращения, иммунологии, аллергии и анафилаксии, геронтологии и продления жизни. В патофизиологии нет раздела, в котором бы не оставили глубокий след его прозорливость и беспокойный разум. Мало того: заботясь об углублении врачебных представлений о сути патологических процессов, он настойчиво проторял пути к новым открытиям не для себя – для своих последователей.

В рецензии на работу своего ученика

Е.А. Татарина он писал: «Нужно провести мысль о том, что врач, который не пытается обобщить свои наблюдения, не сможет раскрыть причины болезни и её закономерности. Поэтому он будет бесполезно метаться, пытаясь смягчить симптомы заболевания, а не лечить больной организм... Врач, который не умеет руководствоваться в своей деятельности философскими принципами общей патологии, никогда не прочтёт ни одной строчки на страничке чудесной книги природы человека, не выйдет за пределы грубого эмпиризма, неспособный будет подняться над симптоматической терапией». Т.е., иными словами, недалеко уйдёт от знахаря или фельдшера.

Примером такого синтетического подхода к решению вопросов патофизиологии является разработка А.А. Богомольцем проблемы физиологической системы соединительной ткани, – ткани, объединяющей все рабочие клетки нашего организма. (В состав этой системы входят клеточные элементы: фибробласты, гистиоциты, купферовские клетки в печени, макрофаги, эндотелиальные и адвентициальные клетки, остеобласты; клетки лимфатической системы, а также гистиобарьерные элементы (колагеновые, эластические волокна, аргентофильная ткань и др.). Соответственно, физиологическая система соединительной ткани выполняет трофическую, барьерную и пластическую функцию, участвуя в заживлении ран, определяет реактивность организма в отношении инфекционных заболеваний, в реакциях организма на неконтролируемый рост.

Как писал А.А. Богомолец, рак вряд ли может достичь клинического развития в организме, если физиологическая система соединительной ткани сохраняет достаточную сопротивляемость. Недавно показано, что развитие сердечной недостаточности также связано с так называемым его ремоделированием, в котором основную роль

играют соединительные тканевые элементы. Таким образом, патогенез инфекционных, сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний замыкается в той или иной степени на системе соединительной ткани, зависит от её реактивности, также изученной А.А. Богомольцем. «Возможность влиять на реактивность физиологической системы соединительной ткани, возможность активировать её функции имеют первоочередное значение для клинической медицины», – писал в 1940 г. А.А. Богомолец. В 1929 г. он изобрел антиретиккулярную цитотоксическую сыворотку (сыворотку Богомольца), которая с 1940 г. использовалась в борьбе со злокачественными опухолями, для заживления ран и переломов, активизации иммунитета при инфекционных заболеваниях и т. д. «Экспериментальное и клиническое изучение действия предложенной мною антиретиккулярной цитотоксической сыворотки показало, что эта сыворотка специфически влияет на клеточные элементы физиологической системы соединительной ткани (особенно на гистиоциты), в малых дозах стимулирует, а в больших – наоборот, тормозя их жизнедеятельность» (Медицинский журнал, 1940, стр. 289).

То есть, Александром Александровичем обнаружена целая система регуляции в организме, создана новая теория развития самых различных заболеваний и показан метод управления этой системой. Вот что значит синтетический ум патофизиолога. Особенно важно это было для лечения ранений на войне 1941–1945 гг. За эти исследования А.А. Богомолец получил Госпремию СССР.

На примере антиретиккулярной сыворотки последователи А.А. Богомольца стали получать и другие иммунные сыворотки – ко всем органам и тканям. Кстати, именно А.А. Богомолец выделил первую антисупраренальную сыворотку, изучил её действие на надпочечники, что стало темой его

докторской диссертации. В Институте физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины были получены антикардиальная, антигепатоцитотоксическая, антимиоцитотоксическая, антиовариальная, антитестикулярная, антилимфоцитарная, антикортико- и антимозговая супраренальная сыворотки (Ю.А. Спасокукоцкий, Н.В. Ильевич, И.Н. Алексеева, Р.И. Янчий и др.).

Изучение различных цитотоксических сывороток в эксперименте с изучением всё более тонких методических подходов позволило установить существенные механизмы нарушения и восстановления функций органов при воздействии ксеногенных антител на органном, клеточном и молекулярном уровнях. Эти исследования обогатили представления о роли аутоантител при многих заболеваниях и достаточно широко использовались в сельскохозяйственной практике, а также, в отдельных случаях, в медицине.

Результаты этих работ имеют, несомненно, общебиологический характер, как и теория стресса Селье. Кстати, роль надпочечников в адаптационных реакциях также была показана впервые А.А. Богомольцем. Непреходящее значение имели результаты исследований Александра Александровича по проблеме переливания крови (теория коллоидоклазического шока), долголетия, гормональной регуляции функций организма. Его книга «Кризис эндокринологии» была в этой области медицины.

Необходимо особо подчеркнуть, что глубокие теоретические исследования А.А. Богомольца всегда сочетались с выходом в практическую медицину. Это в полной мере относится к циклу исследования Александра Александровича по гематологии и переливанию крови. Именно ему принадлежит теория, объяснившая стимулирующее действие переливания крови. В основе её лежит описанное Богомольцем явление так называемого коллоидоклазического шока, обусловлен-

ного индивидуальными особенностями (помимо известных групп крови) структуры белков крови, которые выявляются при попадании реципиенту столь же индивидуальных белков крови донора и последующего выделения эндогенных стимуляторов функций организма. Этот механизм используется в клинической практике для стимуляции организма в условиях тяжёлых расстройств реактивности организма. Свои идеи А.А. Богомолец воплощал в жизнь, будучи заведующим экспериментальным отделом вновь открытого в 1921 г. в Москве Центрального института переливания крови, а затем директором этого института. По поводу работ А.А. Богомольца было сказано, что всё, сделанное им, представляет собой «исключительное, несравнимое пока что ни с чем благодеяние для человечества» (французский врач Л. Ляттес).

А.А. Богомолец был среди первых учёных, заложивших фундамент новой науки – геронтологии, автором основных постулатов этой области знаний. По мнению А.А. Богомольца, старение – это естественный процесс развития организма, важнейшим механизмом которого является накопление функционально неполноценных элементов в клеточных пулах. Вместе с тем А.А. Богомолец описал феномен преждевременного старения, которое обусловлено развитием патологических процессов. Механизмы преждевременного старения – это одно из направлений и проблем современной геронтологии.

Александр Александрович был не только крупнейшим учёным-теоретиком медицины, но и настоящим создателем и организатором науки в Украине. По инициативе А.А. Богомольца был создан в 1930–1934 гг. Институт экспериментальной биологии и патологии и Институт клинической физиологии, на базе которых образовался Институт физиологии НАН Украины, который носит имя академика А.А. Бо-

гомольца. Он создал этот Институт и фактически ту структуру Академии, которая существует и поныне. Эта система институтов и отделов. Ранее, до А.А. Богомольца, Академия состояла из кафедр и так называемых комиссий и кабинетов.

Так, в 1934 г. Президиум АН УССР утвердил объединение медицинских кафедр, кабинетов Академии в единый институт, который был назван по предложению А.А. Богомольца Институтом клинической физиологии (кафедра патофизиологии, кафедра клинической медицины, кафедра патологической морфологии и другие). Другие институты создавались по этому подобию.

Нельзя забыть подвига уже больного Александра Александровича, который сберег во время войны АН УССР, проведя эвакуацию оборудования и сохранив кадры учёных.

Весьма интересным и поучительным моментом в жизни А.А. Богомольца было его самостоятельное и мужественное поведение как президента АН УССР в период необоснованных репрессий и гонений учёных в период 1930–1940-е гг.

Как описывает биограф А.А. Богомольца Ю.Г. Виленский, осенью 1937 г. после пребывания во Франции на конгрессе по переливанию крови Александр Александрович возвратился в Киев и застал неожиданный «наезд» на академию. Как оказалось, целый ряд сотрудников академии, в числе которых были выдающиеся учёные демограф Михаил Птуха, основоположник экономической географии в Украине Константин Воблый, славист и востоковед Агатангел Крымский, крупнейший математик Николай Крылов, физик Александр Лейпунский были отстранены от работы по надуманным, вздорным причинам политического недоверия. Узнав об этом, как пишет Ю.Г. Виленский, А.А. Богомолец едва зайдя в квартиру, не снимая пальто, принялся звонить в ЦК КП(б)У и

через несколько минут отправился туда лично. Ему удалось доказать абсурдность обвинений и через несколько дней все эти учёные были в своих кабинетах. Физик А. Лейпунский, в будущем создатель ядерных реакторов на быстрых нейтронах, лауреат Ленинской премии был командирован АН СССР в Англию к Резерфорду и имел от него блестящие отзывы о своей работе, но как человека, который общался с иностранцами, в 1937 г. его арестовали. Он был освобождён только благодаря усилиям А.А. Богомольца.

Хотелось бы привести цитаты из воспоминаний Н.Н. Горева: «А.А. Богомолец в те годы (1928) выглядел ещё сравнительно молодым (моложе своих лет), был выше среднего роста, худой. Крупная, с широким лбом голова была подстрижена под бобрик, и на меня смотрели большие, внимательные, чёрные глаза. Как мне показалось, в них светился интерес к пришельцу и какая-то неуловимая грусть»\*. «Жизнь А.А. Богомольца была своеобразна. Большая научная, общественная и государственная загрузка сменили его рабочий день на ночное время, когда он мог

спокойно, без помех продумать и оформить текущие и предстоящие дела»\*\*. «Приехав в Киев (из эвакуации) А.А. Богомолец со свойственной ему энергией занялся восстановлением работы в академии. Дел было по горло, и он работал без устали до поздней ночи... Очень уставал, приходил поздно с работы. Чувствовалось, что он временами работает из последних сил... Но мы не думали о том, что можно потерять его. И это случилось сравнительно скоро, летом 1946 года»\*\*\*. И далее: «В течение почти двух суток к гробу усопшего Александра Александровича приходили тысячи киевлян. Популярность и любовь к нему были необычайно велики. Гроб с телом усопшего под звуки траурного марша установили на пушечный лафет, и процессия в сопровождении почётного воинского караула двинулась от Академии к Институту...»\*\*\*\*.

Научное наследие А.А. Богомольца чрезвычайно велико и многообразно. Прежде всего — это огромная научная школа, в составе которой теории и практики медицины (Н.Н. Горев, Р.Е. Кавецкий, Н.Б. Медведова, Н.Н. Сиротинин, В.П. Комисса-



Кабинет-музей Александра Александровича Богомольца в Институте физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины

\* Академик Николай Николаевич Горев. Страницы жизни. Под ред. А.А. Мойбенко и В.В. Безрукова. – К. Видавничий дім «Простір», 2010, стр. 63; \*\* там же, стр. 77; \*\*\* там же, стр. 86; \* там же, стр. 87.

ренко, Л.Р. Перельман, И.М. Нейман, Е.А. Татаринов, Н.Д. Стражеско, В.П. Протопопов и др.). Его фундаментальные разработки, идеи, которые он освятил в книгах: «Кризис эндокринологии», «О вегетативных центрах обмена», «Учение об иммунитете и аллергии», «Руководство по патологической физиологии», «Продление жизни» легли краеугольным камнем в основу современных теорий, а принципы профилактики и лечения, что вытекают из них, широко применяются в медицине. При его непосредственном активном участии созданы институты физиологии, онкологии, эндокринологии, геронтологии, которые составляют основу одного из отделений

НАН Украины. И, наконец, – сама созданная А.А. Богомольцем и существующая и поныне НАН Украины, которую он возглавлял 16 нелегких лет – самая большая его заслуга.

А.А. Богомольцу была суждена величайшая миссия в науке, а его личность и харизма в современной истории науки обуславливают тот факт, что его учение принадлежит не только прошлому и настоящему, но и будущему. Имя ученого в наше время украшает не только украинскую науку, – все, что он сделал за свою творческую жизнь имеет огромное значение для всех живущих на земле и не может не вызывать глубокой благодарности.

Президент Научного общества  
патофизиологов Украины,  
академик НАН Украины А.А. Мойбенко

Научный секретарь С.И. Павлович

## Олег Олександрович Богомолець (до 100-річчя з дня народження)

Історія Інституту імені О.О.Богомольця має багато імен видатних учених, що прославили вітчизняну науку. Нині ми згадуємо члена-кореспондента НАН України, директора Інституту з 1946 по 1953 рр. Олега Олександровича Богомольця, який сформувався як дослідник, набув наукового авторитету й визнання за роки роботи в інституті, очолював його у найбільш скрутний період політичного тиску на розвиток науки.

Народився Олег Олександрович 26 лютого 1911 р. у м. Одеса, в родині молодого приват-доцента кафедри загальної патології Новоросійського університету Олександра Олександровича Богомольця та лікаря-педіатра Ольги Георгіївни Тихоцької. Оскільки в цьому самому році батька було обрано професором кафедри загальної патології Саратовського університету, родина переїхала до Саратова. Підвалини свідомості дитини закладались як батьками, так і дідом – земським лікарем Олександром Михайловичем Богомольцем. До кінця свого життя (1935 р.) він був близьким другом і радником свого сина Олександра, і єдиного внука Олега. У 1925 р. батька було обрано на посаду завідувача кафедри патологічної фізіології медичного факультету II Московського державного університету. Родина змінила місце проживання на Москву.

Молодь Радянського Союзу у ті роки була зорієнтована урядом на індустріалізацію, електрифікацію, суспільну активність, готовність до праці й оборони, освоєння технічних дисциплін. Молодіжні організації давали можливість усім бажаючим серйозно займатися радіотехнікою та авіамоделюванням. Первинні осередки товариства

ОСОВІАХІМ широко залучали молодь до навчання у гуртках, що давали як достатні знання, так і практичні навички. Олег Олександрович захоплювався конструюванням радіоприймачів і після занять у гуртку почав відвідувати чотирирічні виробничо-технічні спецкурси (технікум) Московського відділення Комісаріату народної освіти. Захоплення конструюванням вимірювальних приладів і налагодженням радіотехнічних схем зберігав протягом усього життя. Але, вірогідно, під впливом сімейних традицій, для подальшого навчання він обрав медицину. Восени 1928 р. успішно склав вступні іспити на лікувальний факультет II Московського медичного інституту.

Віддаючи належне медичній освіті, Олег Олександрович уже у зрілому віці іронічно пригадував групові методи навчання того часу. Вони полягали у тому, що на лекцію або практичне заняття приходили всі члени групи. Проте на заліках або екзаменах за всіх відповідав лише один студент – той, хто найкраще знав предмет. Оцінку ж за відповідь виставляли всім студентам групи. У ролі відповідача з більшості дисциплін найчастіше виступав Олег Богомолець. Навіть на той час він набагато краще за інших розбирався у проблемах біології та медицини. Певну роль у цьому, звичайно, відіграла сімейна атмосфера, де кожна професійна новина або складні клінічні випадки обговорювались у домашньому колі фахівців.

У 1929 р. батька обирають дійсним членом Академії наук, а у 1930 – Президентом Академії наук УРСР. Родина переїздить до Києва. П'ятий курс медичної освіти Олег Богомолець набуває вже у I Київському медичному інституті. У січні



1934 р. він успішно складає всі іспити та отримує диплом лікаря, а з лютого – розпочинає працювати у відділі експериментальної хірургії Інституту експериментальної біології і патології Наркомату здоров'я УРСР. Основною темою його досліджень стає переливання крові, збереження її фізико-хімічних і біологічних властивостей. Для контролю стану крові було використано досить складну біофізичну методику вимірювань редокс- потенціалу зразків неоднакового терміну зберігання з застосуванням різних методів стабілізації. Той, хто працював з цією методикою, добре знає, чого варті лише один процес стандартизації показань платинового електрода. На засіданні вченої ради Київського медичного інституту 26 грудня 1937 р. Олег Олександрович успішно захистив кандидатську дисертацію й отримав своє перше наукове звання.

Технічні знання молодого науковця та лікаря втілювалися в розробку ортопедичних пристроїв, яких потребували хворі, та ще більш складних апаратів для проведення експериментів на тваринах. Завдяки наявності при Інституті експериментальної біології і патології дослідно-конструкторських майстерень, добре обладнаних верстатами, Олег Олександрович мав можливість брати участь у конструкторській розробці, налагодженні та використанні першого в країні апарата штучного кровообігу автожектора. Саме цей апарат був згодом застосований у дослідях професор С.С. Брюхоненко, а пізніше – в роботах з оживлення тварин, здійснюваних М.М. Сиротиним і В.Д. Янковським.

На початку 40-х років минулого сторіччя лікарі різних професій велику увагу приділяли вивченню терапевтичних можливостей розробленої ще у 1925 р. Олександром Олександровичем Богомольцем антиретиккулярної цитотоксичної сироватки (АЦС). Дослідниками було показано, що великі дози АЦС можуть гальмувати розвиток

метастазів злоякісних пухлин і пригнічувати проліферацію клітин. Малі дози, навпаки, активували фізіологічну регенерацію та підвищували реактивність організму. Для дорослої людини стимулювальна доза становить 0,05–0,1 см<sup>3</sup> при титрі сироватки 1:100 – 1:200. Вона дає змогу специфічно підвищувати рівень життєдіяльності клітин системи сполучної тканини. Позитивний вплив малих доз АЦС було підтверджено при гострому суглобовому ревматизмі, інфекційних захворюваннях, гінекологічному сепсисі, деяких формах нейроінфекцій і шизофренії. Ефективність АЦС при різних захворюваннях Олександр Богомолець пояснював не її полівалентністю, а специфічною дією на клітини фізіологічної системи сполучної тканини, наявні і в кістковому мозку, і в залозах внутрішньої секреції, і в головному мозку у вигляді нейроглії. Він наголошував, що саме гліальні клітини головного мозку виконують трофічне забезпечення діяльності нейронів. Одним з недостатньо вивчених елементів фізіологічної системи сполучної тканини залишалася кісткова тканина. Ці дослідження батько доручив синові.

Молодий лікар Олег Богомолець після ознайомлення з дослідженнями попередників розпочав експерименти на кролях, порівнюючи темпи зрощення травмованих кісток контрольних кролів і тварин, яким вводили малі дози АЦС. Проте він не обмежувався виключно науково-дослідною роботою, а, як і більшість молодих лікарів, основну частину часу присвячував практичній медицині, працюючи на базі першої клініки Київського інституту ортопедії та травматології під керівництвом Олександра Григоровича Єлецького. Увагу науковця привертають великі розбіжності у швидкості одужання хворих після травм. При зовні рівних умовах – однакові тип пошкодження кісткової тканини, методи лікування, вік і стать – тривалість зрощення переломів у різних пацієнтів істотно відрізняється.

Робоча гіпотеза причини такого явища, за припущенням Олега Богомольця, – це різниця реактивності клітинних елементів кісткової тканини. Адже саме сполучна тканина кістки відновлює її механічні властивості та анатомічну структуру. Водночас він продовжує активну роботу в осередку ОСОВІАХІМу.

У 1939 р. Олег Богомолець публікує одержані ним результати експериментів на тваринах. Вони показали, що створена батьком АЦС здійснює специфічну стимулювальну дію на основні клітинні елементи кісткової тканини, які відповідають за відновлення пошкодження, – остеобласти. Малі дози АЦС активували не тільки кістковий мозок і кровотворення, але й посилювали проліферативну активність клітин і скорочували час відновлення пошкоджених травмою кісток. Детальне дослідження патофізіології та морфології різних стадій розвитку репаративної регенерації стало темою докторської дисертації Олега Богомольця. У нагоді стали всі технічні навички попередніх років навчання – вміння працювати на токарному верстаті, тримати в руках тестер і паяльник, самостійно забезпечувати роботу необхідними пристроями та обладнанням. Контроль темпів регенерації кісток дисертант здійснював за анатомічними, рентгенографічними, мікроскопічними та клінічними показниками.

Результати спостережень підтвердили, що відновлення функції у хворих, які отримували АЦС, відбувається набагато швидше, ніж у пацієнтів групи порівняння. Вже на конференції з фізіологічної системи сполучної тканини, що проходила у Києві в грудні 1940 р., Олег Олександрович довів позитивну дію малих доз АЦС на відновлення структури та функцій травмованих кісток кінцівок. На підставі опублікованих ним даних Наукова Медична Рада Наркомату здоров'я УРСР рекомендувала застосування АЦС при тривало незростаючих

переломах кісток. Навіть на початку наступного 1941 р. ніхто не міг і подумати, наскільки важливою стане ця рекомендація у найближчому майбутньому...

Звичайно, з погляду сучасного пересічного громадянина, бути сином Президента не тільки почесно, але й вигідно. Але у роки домінування комуністичної моралі батьки зовсім інакше розуміли та виконували свої родинні обов'язки. Батько Олега Богомольця ніколи не був членом комуністичної партії. Проте, коли на його стіл лягли папери від директора Інституту хімії – представлення на урядові нагороди для групи хіміків, що синтезували новий лікарський препарат, він викреслив зі списку єдине прізвище – Зої В'ячеславівни Богомолець–Снежко, дружини свого сина. При цьому він прекрасно знав, що вона була активним членом колективу, ініціатором кількох удосконалень способів синтезу й очистки препарату, про що вона не раз удома розповідала тестю... А синові пояснив: «Зоя молода, ще встигне одержати нагороди...». Мені це стало відомо з уст Зої В'ячеславівни. Таке суворе відношення було в нього і до успіхів рідного сина.

Крім функцій наукового співробітника, Олег Богомолець виконував ще один, не менш вагомий, можливо набагато більш обтяжливий сімейний обов'язок – рідного сина. У ті роки Президент АН УРСР прекрасно розумів, що діється у країні, знав що у деяких наукових колективах раптово зникли провідні фахівці. Не раз ходив у відповідні інстанції, щось доводив... Багатьох повертав до наукової роботи, про що з вдячністю досі згадують їхні нащадки. Не все міг довірити офіційним помічникам. Але мав одну, повністю довірену особу. Власного сина. Деякі справи доручав винятково Олегу. Ось про який випадок я дізнався від сина Президента. Начальник відділу кадрів Президії АН УРСР зайшов до кабінету Олександра Олександровича і попросив зразок підпису Президента, подавши чис-

тий аркуш паперу. Трохи поміркувавши, Олександр Олександрович своїм каліграфічним почерком гімназиста-відмінника написав: «Зразок підпису О.О. Богомольця на прохання начальника відділу кадрів Президії АН УРСР (прізвище, ім'я, по батькові) надаю. Дата. Підпис – Богомолець.» Він добре знав чого вартий підпис на чистому аркуші.

У житті Олега Олександровича були не тільки дослідницькі та лікарські, але й дипломатичні місії. І коли в Організації Об'єднаних Націй у Нью-Йорку чи Женеві необхідно було обговорювати або підписувати особливо важливі для країни документи – туди їздив офіційний представник професор Олег Олександрович Богомолець. Саме його прізвище від імені Української Радянської Соціалістичної Республіки стоїть під Міжнародною Конвенцією про нерозповсюдження наркотичних речовин і боротьбу з наркоманіями, підписаною у Швейцарії.

Початок війни. Підготовка до евакуації інститутів АН УРСР. Не вистачає ні часу, ні вагонів. У ці дні вже не до патофізіології... Олег весь час поряд з батьком, весь час у напруженні, у авральній підготовчій роботі... Те, що не можна вивезти – треба надійно сховати. Те, що буде потрібно для роботи в тилу, – законсервувати, упакувати, довести... Олег Олександрович виконував основну частину організаційних справ, пов'язаних з переїздом інституту й співробітників у тил країни, до Уфи. Війна висуває й нові, невідкладні завдання, зумовлені масовою травматизацією як військових, так і цивільного населення. Війна проливає багато крові. А техніку відновного переливання крові вже багато років детально вивчали і вдосконалювали старший і молодший Богомольці. Тому не дивно, що восени 1941 р. Олега Олександровича призначають директором Башкирської республіканської станції переливання крові. Він організовує мережу районних станцій, відповідає за

постачання донорської крові, контролює правильність її використання у госпіталах. Найвідповідальніша ділянка збереження життя й відновлення здоров'я пораненого залежала від безперебійної роботи служби крові. Республіканська станція переливання крові свої функції виконала на «відмінно».

Крім організаційної роботи, Олег Олександрович працює лікарем евакогоспітально №1741, де використовує введення малих доз АЦС пораненим для прискорення консолідації травмованих кісток і скорочення перебування поранених у госпіталах.

Восени 1943 р. всю країну облетіла радісна новина – 6 листопада Радянська армія звільнила Київ від німецьких окупантів. Що і в якому стані залишилося від установ Академії наук за роки війни було невідомо. Тому на спеціальній нараді Президента АН УРСР було створено «розвідувальну» групу. До її складу увійшов і Олег Богомолець. На початку лютого 1944 р. група прибула до Києва. Як виявилося, головний корпус інституту зберігся, можливо, тому, що у період окупації його займала Київська окупаційна комендатура. Приміщення було заміновано. А вибуху не було. Як розповідали кияни, дроти детонаторів перерізала старенька прибиральниця інституту, яка ще до війни працювала в ньому. В деяких кімнатах були залишені масивні сталеві сейфи з німецькими орлами на дверцятах. Військові сапери розрізали їх з тильної поверхні. До дверцят кожного сейфа з середини були закріплені детонатори протитанкових мін. Міни були знешкодово. Олег Олександрович призначається відповідальним за відновлення робочого стану лабораторій, приміщень експериментальних майстерень і гуртожитку, який знаходився у прибудові до майстерень.

Усі будівельно-ремонтні роботи виконували німецькі військовополонені, серед яких виявилися і необхідні майстри. Працювали доволі мляво, що не задовольняло керів-

ництво. Тоді Олег Олександрович використав ризикований на той час прийом – організував змагання між бригадами. Нагородою було додаткове харчування. На тлі суворих обмежень продуктів і карткової системи їх розподілу такі дії могли закінчитися значними неприємностями. Проте всі ремонтні роботи були завершені своєчасно. Олег Олександрович добре розбирався і у будівництві, і у техніці, брав участь у довоєнному зведенні будівель інституту. Протягом багатьох років він був членом Технічної ради інституту, яка вирішувала перспективні напрямки конструкторської та виробничої діяльності експериментально-дослідних майстерень. За його безпосередньою участю було започатковано медичне приладобудування в Україні.

Технічні схильності Олега Олександровича спонукали його до участі у різноманітних проектах, не пов'язаних з медициною. Зокрема, він співпрацював з науковцями, що вирішували проблему спрямованих вибухів. Цією темою займався академік М.О. Лаврентьев у передмісті Києва Феофанії. На острові посеред озера розташовували зафіксований манекен об'єкта. По берегам озера, за певною схемою закріплювали декілька порцій вибухівки. Одночасний вибух у кількох точках давав змогу спрямувати вибухову хвилю на об'єкт. За ці роботи академік Лаврентьев одержав державну нагороду (фото). Принцип Лаврентьева нині використовують при ультразвуковому руйнування каменів у нирках чи сечоводах.

19 липня 1946 р. родину Богомольців і колектив двох інститутів спіткало горе – помер Олександр Олександрович Богомолец. 2 серпня 1946 р. Олега Богомольця призначено директором Інституту експериментальної біології і патології Наркомату здоров'я УРСР. Директор у цей період займався проблемами гомотрансплантації тканин, дослідженнями стимулювальної дії переливання крові, питанням клінічного

використання цитотоксинів, патогенезом променевої хвороби. Повоєнні умови створювали багато перешкод науковій роботі. Однак були й позитивні зміни – відміна карткової системи розподілу продуктів харчування. Це полегшувало налагоджувати побут співробітників. Ніщо не віщувало наступної трагедії. Проте вона відбулася.

Сесія ВАСХНІЛ ім. В.І. Леніна, здавалося, не мала нічого спільного з патофізіологією. Доповідь її Президента Т.Д. Лисенка стосувалася проблем генетики у сільському господарстві. Була проведена на кшталт партійних з'їздів, а не наукових конференцій. Заздалегідь підготовлену резолюцію сесії розповсюдили у всіх наукових закладах країни для обов'язкового виконання. Висококваліфіковані генетики були позбавлені роботи, деякі – свободи.



Директор Інституту експериментальної біології і патології МОЗ України, член-кореспондент НАН України Олег Олександрович Богомолец, 1953 рік

Із Сибіру, ті хто вижив, поверталися вже у похилому віці. Хвиля лисенківської боротьби «за чистоту партійної лінії в радянській науці» дійшла і до фізіології. Завдяки «вірним ленинцям» К.М. Бикову та Е.Ш. Айрапетьянцю серед публікацій фізіологів виявили «підозрілих» авторів. Це були Л.А. Орбелі, Л.С. Штерн, О.О. Богомолець. Підготовлена Президією спеціальної сесії АН СРСР резолюція вказувала на помилки Богомольця у перенесенні центру уваги від керівної ролі ЦНС на сполучну тканину. Олегу Олександровичу та всім його учням було запропоновано зректися помилок і переключитися на дослідження ролі ЦНС.

Як згадують члени родини, більшість учнів виступили з покайними доповідями. На своїх позиціях залишилися лише троє – О. Богомолець, Н. Медведева та І. Нейман. Всі вони втратили роботу. Кілька місяців парадні двері Інституту стояли замкненими. Ті зі співробітників, які мали невідкладні дослідження, змушені були крадькома заходити до інституту зі внутрішнього двору. Для посилення партійно-наукової дисципліни в інститут направили фахівців павлівської школи фізіологів, які очолили дослідження ЦНС.

Згодом Олег Олександрович знайшов роботу в Українському науково-дослідному санітарно-хімічному інституті МОЗ УРСР.

Очолював лабораторію патофізіології, займався проблемами інтоксикації та пошуками засобів ліквідації руйнівної дії токсинів на організм людини. У ті роки всі результати таких досліджень подавалися керівництву у вигляді прошнурованих звітів з підписами на кожному аркуші, які зберігалися у спецархівах. Незважаючи на це, рекомендовані Олегом Богомольцем антидоти у мирний час знайшли своє застосування в медицині термінальних станів. За цикл цих робіт у 1971 р. Олегу Олександровичу було присуджено та вручено премію імені його батька.

У 1980 р. О. Богомолець повернувся до роботи в Інституті фізіології імені О.О. Богомольця і спрямував зусилля на створення меморіального музею Олександра Олександровича Богомольця. Всі стенди та експозиції музею поповнені матеріалами з сімейного та державних архівів. Вони наочно ілюструють наукові досягнення минулих поколінь вчених Інституту. Музей відвідують вітчизняні та зарубіжні делегації. Першого травня 1991 р. невтомна робота його інтелекту, рук і серця припинилась... Залишились публікації О.Богомольця, звіти про його інноваційні методи детоксикації і державні нагороди. Серед них: два ордена "Знак Почета" (1944, 1953), орден Трудового Червоного Знамени (1961), вісім меда-



Академік М.О.Лаврентьев (ліворуч) та О.О.Богомолець, 1955 рік

лей (1945, 1946, 1966, 1969, 1970, 1975, 1978, 1978).

З історії славетних наукових шкіл відомо, що у Луї Пастера був постійний технічний асистент, помічник і співавтор багатьох праць – Еміль Ру. Він єдиний зі співробітників лабораторії мав водночас медичну і технічну освіту. До його обов'язків входила розробка устаткування та експериментальна перевірка всіх створених Пастером вакцин. За свідченнями французького історика А. Делано « для всіх робіт, що стосувалися медицини або які потребували спеціальних технічних навичок, Еміль був

незамінним». Такий само незамінний помічник у складних технічних проблемах медицини, біології й організації наукової роботи був і у засновника української патофізіології Олександра Олександровича Богомольця. Це – Олег Олександрович Богомолець. У роки миру, у роки війни, у роки повоєнної скрути він був взірцем громадянської свідомості, наукової етики, високої працездатності та працелюбності, особистої скромності. З усіма нагородами він приходив до Інституту лише один раз на рік – 9 травня. На знак пошани й пам'яті про друзів і колег, що не повернулися до мирного життя.

В.Я.Березовський

## ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ



### **Іван Іванович Коренюк (до 70-річчя з дня народження)**

6 липня 2011 р. виповнюється 70 років з дня народження нейрофізіолога, доктора біологічних наук, професора кафедри фізіології людини і тварин і біофізики Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського Івана Івановича Коренюка.

Іван Іванович народився в с. Збаржівка Погребищенського району Вінницької області. Одержав вищу освіту на природничо-географічному факультеті Кримського педагогічного інституту (Сімферополь, 1963–1968 рр.), після чого рік працював учителем біології в Лобанівській СШ Джанкойського району. З 1969 р. по 1971 рр. –

працював лаборантом кафедри анатомії і фізіології Кримського пединституту. З 1971 по 1974 рр. навчався в аспірантурі на кафедрі анатомії і фізіології. Для виконання експериментальної частини наукових досліджень був відряджений в Інститут зоології Молдавської академії наук (м. Кишинів), де учнем Д.С. Воронцова С.А. Кузнецовим була створена сучасна лабораторія дослідження нейронної активності. Кандидатську дисертацію («Микроэлектрфизиологическое исследование импульсной активности нейронов корковых участков моторного контроля при нанесении проприоцептивных раздражений») захистив у 1975 р. (Чернівецький державний університет). В 1974–1975 рр. Іван Іванович уперше у Криму заснував лабораторію досліджень електричної активності як окремих нейронів, так і сумарних потенціалів кори у Сімферопольському державному університеті ім. М.В. Фрунзе. З 1975 по 1995 рр. наукові інтереси І.І. Коренюка лежали в площині оригінальних досліджень сенсомоторної інтеграції на ідентифікованих нейронах тім'яної асоціативної кори великих півкуль головного мозку. Результати цих досліджень стали основою його докторської дисертації („Нейронные механизмы афферентной и эфферентной функций темной ассоциативной области коры мозга”), яку він захистив у 1990 р. (Ленінградський університет). З 1974 р. і понині працює викладачем у Таврійському національному університеті ім. В.І. Вернадського: доцент кафедри фізіології людини і тварин (від 1976 р.), професор кафедри фізіології людини і тварин та біофізики (від 1992 р.).

Потім І.І. Коренюк переорієнтував роботу лабораторії на внутрішньоклітинну реєстрацію потенціалів інтактних та ізольованих нервових клітин гангліїв мозку равлика для вивчення механізмів виник-

нення пейсмекерної активності та організації синаптичних зв'язків нейронів, виявлення можливих нейронних механізмів як еталонних лікарських засобів, так і новосинтезованих хімічних речовин у звичайних терапевтичних і надмалих концентраціях. З 2003 р. під керівництвом І.І. Коренюка у лабораторії було впроваджено поведінкові та інші системні дослідження на щурах, що дало змогу вивчати психотропні, протибольові, протизапальні та інші ефекти досліджуваних сполук. Важливим є те, що Іван Іванович в останнє десятиріччя залучив до своїх досліджень співробітників, аспірантів і студентів кафедр органічної і неорганічної хімії, які синтезують нові сполуки. Нині в лабораторії випробувано понад 150 сполук для визначення наявності у них нейротропної та психотропної дії, направленості, порогу, оптимальних і токсичних концентрацій/доз. Такі дослідження мають велике теоретичне і практичне значення для нейробіології, нейрофармакології, клінічної медицини, біохімії, синтезу нових сполук та інших наукових напрямків. Таким чином, обґрунтовується перспективність пошуку нових нейро-, психотропних та інших лікарських препаратів.

І.І. Коренюк відомий не тільки як учений

і педагог, а також як організатор науки в Таврійському національному університеті і в Україні. Протягом 15 років він виконує обов'язки голови Кримського відділення фізіологічного товариства України, три роки керував роботою спеціалізованої ради з захисту кандидатських дисертацій, з 2004 по 2010 рр. працював експертом Державної акредитаційної комісії.

За 42 роки роботи в університеті він виховав плеяду спеціалістів і учених. Під його керівництвом виконано 135 дипломних робіт та 12 кандидатських дисертацій.

Професор І.І. Коренюк понад 30 років читає лекції з дисциплін: фізіологія людини і тварин, фізіологія центральної нервової системи, фізіологія аналізаторів; він автор понад 220 наукових праць, надрукованих як у вітчизняних, так і в зарубіжних виданнях, має 12 патентів на винахід, зробив вагомий внесок у розвиток нейрофізіологічної науки. Його професійний досвід цінують колеги, аспіранти та студенти.

Колеги, учні, всі співробітники біологічного факультету Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського від щирого серця вітають ювіляра і бажають йому здоров'я, щастя та успіхів у подальшій реалізації творчих задумів.



# РЕЦЕНЗІЇ

М.Ю. Макарчук, М.С. Мірошніченко

До виходу навчального посібника

«Основи молекулярної фізіології іонних каналів» Я.М. Шуби

«Всякая живая клетка, будьто Protozoa или любая клетка многоклеточного организма, находится в определенных взаимоотношениях с окружающей ее средой. Из этой среды она берет нужные ей вещества и отдает в нее продукты своего обмена. И хотя у многоклеточных животных, особенно высших, внешняя среда для всякой клетки данного организма одинакова (кровь и лимфа), разные клетки, судя по их химическому составу, берут из внешней среды различные вещества. Естественно возникает вопрос, каким образом клетки определяют нужные им вещества в своей среде и как они эти вещества вводят внутрь? Совершенно ясно, что распознавание и введение веществ внутрь клетки осуществляется прежде всего поверхностью клетки, которая соприкасается со средой. На это давно уже обратили внимание физиологи и пришли к заключению, что всякая живая клетка покрыта снаружи особым слоем протоплазмы, который и осуществляет различение веществ во внешней среде и проведение их внутрь клетки. Этот слой получил название протоплазматической мембраны. Совершенно ясно, что познание природы этой мембраны и механизма ее деятельности было бы чрезвычайно важным шагом к познанию механизма деятельности живой клетки в целом.»

Ця досить розлога цитата з монографії Д.С.Воронцова і М.Ф. Шуби «Физический электротон нервов и мышц», яка побачила світ у видавництві «Наукова думка» у 1966 р., а

обидва автори були співробітниками Інституту фізіології імені О.О. Богомольця. Таке цитування, на нашу думку, є цілком виправданим, адже навчальний посібник, про який ітиметься, дає відповіді на ті фундаментальні питання, котрі поставили два корифеї світової електрофізіології в своїй праці в той уже далекий-недалекий час. Тим більше, що сам автор є прямим продовжувачем тих славних імен в прямому і переносному значенні цього слова.

Що ж до рецензованого навчального посібника, який рекомендований Міністерством освіти і науки України для студентів і аспірантів медично-біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів, то відразу слід відмітити його надзвичайну нагальність і необхідність для вищої школи України. Це зумовлено насамперед тим, що попри наявність в Україні потужних наукових шкіл, які були і залишаються в НАН України, їхня увага до створення сучасних підручників і навчальних посібників для вищої школи, за деякими винятками, практично не відчувається.

У чому ж нагальність і необхідність такого навчального посібника? Звичайно ж не лише в тому, що він написаний українською мовою, хоча й це його значення важко переоцінити, а основним достоїнством є те, що його автор відомий у світі фахівець у цій галузі і тому здатний викласти послідовно та логічно вкрай складні питання сучасної, за визначенням самого автора, «біоканології». Оскільки, як зазначається у вступі до посібника, нині наука про іонні канали

клітинних мембран об'єднала методичні підходи таких класичних дисциплін, як електрофізіологія, біохімія, імунологія, цитологія, молекулярна біологія й фізіологія, і перетворилась у самостійну галузь знань. Незаперечним доказом цього твердження є висвітлення в посібнику сучасних методичних підходів до дослідження мембранних іонних каналів, які крім застосування новітніх технік електрофізіологічного дослідження органічно включили більшість методів молекулярної біології.

Саме на основі даних молекулярно-біологічного клонування генів каналів, мутагенезу, структурно-функціональних досліджень гетерологічно експресованих каналів та аналізу зображень з високою роздільною здатністю кристалізованих каналних білків автор детально представляє сучасні уявлення про класифікацію, молекулярну будову та функцію іонних каналів плазматичної мембрани тваринних клітин. У посібнику показана молекулярна організація на рівні білкових доменів та окремих амінокислот важливих структурно-функціональних складових різних типів іонних каналів – іонопровідної пори, селективного фільтра, сенсора потенціалу, активаційних та інактиваційних воріт, зв'язувальних ділянок агоністів і антагоністів тощо. Вкрай важливим є і те, що при розгляді різних типів іонних каналів висвітлена не тільки їхня роль у забезпеченні нормальних фізіологічних процесів, а й показано участь у різноманітних патологічних процесах, які нині об'єднують загальним терміном «каналопатії». Окре-

мий розділ посібника присвячений розгляду класифікації та структури G-білокспряжених метаботропних рецепторів і каналів, що ними керуються.

Рецензований посібник справді є навчальним, бо попри високу складність самого предмета і матеріалу автор викладає його надзвичайно чітко і послідовно. Там, де це можливо, використовує ілюстрації, а величезний фактичний матеріал об'єднує в таблиці. Приємне враження справляють кольорові схеми і рисунки. Загалом читання посібника викликає відчуття задоволення, оскільки сам текст свідчить не тільки про величезну роботу над його змістом і формою, але засвідчує палке бажання автора прояснити й аргументувати та донести до читача всі без винятку висловлені в ньому положення. Важливим є і те, що, розглядаючи структуру і функцію тих чи інших каналів, автор завжди висвітлює «історію питання».

На завершення слід додати, що рецензований навчальний посібник є справді сучасним і тому буде корисним усім студентам-біологам, які спеціалізуються в таких галузях, як фізіологія, біофізика, молекулярна біологія, біохімія, генетика, гістологія тощо. Звичайно, що цей посібник має стати настільною книгою для всіх тих молодих науковців, які хочуть присвятити себе нейрофізіології і біофізиці. Хочеться порекомендувати його всім тим викладачам, які читають загальні курси з фізіології, біофізики, біохімії та спецкурси з фізіології нервової системи, фармакології, патологічної фізіології, фізіології сенсорних систем.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка

Посібник (448 сторінок) вийшов у видавництві “Наукова думка” наприкінці 2010 р. (відповідальний редактор – академік НАН України П.Г. Костюк, рецензент – академік НАН України І.С. Магура, Гриф Міністерства освіти та науки України – лист № 1/11-3136 від 16.04.2010). Видання здійснене за державним контрактом на випуск наукової друкованої продукції, а тому базовий наклад у 3000 примірників розповсюджується безкоштовно. Видавництво вже розіслало частину примірників до основних державних, університетських і академічних бібліотек України. Заявки на отримання обмеженої кількості додаткових примірників приймаються від колективних замовників (бібліотек, кафедр вузів, відділів НДІ) за адресою [umsbbg@biph.kiev.ua](mailto:umsbbg@biph.kiev.ua) та задовольняються за наявності на індивідуальній основі.

## CONTENTS

N. Dorofeyeva, Yu. Goshovska, V.F. Sagach. The mitochondrial membrane potential and oxygen consumption in spontaneously hypertensive rats	3
O. V. Korkushko, V. A. Ishchuk, V. B. Shatilo, V. P. Chizhova. Effect of altered insulin resistance on physical performance in middle age and elderly people	10
V.Yu. Garbuzova, V.L. Gurianova, A.N. Parkhomenko, V.E. Dosenko, A.V. Ataman. The frequency of allelic polymorphism of matrix gla-protein gene in acute coronary syndrome patients	16
D.A. Krishtal, O.M. Paduraru, O.I. Boldyrev, O.Iu. Kit, V.V. Rekalov Ia.M. Shuba. Diabetes-evoked changes in Ca <sup>2+</sup> -dependent potassium conductance of isolated smooth muscle cells of the rat bladder	25
M.V. Makarenko, V.S. Lyzogub, L.I. Yukhymenko, S.M. Khomenko. Heart rhythm regulation in humans with different processing levels of acoustic information	33
Z.A.Gorenko, L.S.Karbovska, I.P.Vascheka., S.P.Veselsky. The influence of calcitonin on the liver bile formation function in rats	40
I.I. Koreniuk, I.V. Yepishkin, T.V. Gamma, D.R. Husainov. Effect of derivatives of 1,5-benzodiazepine-2 on the electrical activity of neurons of the mollusk <i>Helix albescens</i> Rossm	49
A.A. Sukhomlyn, T.V. Beregova, K.S. Neporada. Changes of the activity of no-synthase in salivary glands of rats under conditions of omeprazole-induced hypergastrinemia	59
T.T. Volodina, N.D. Dzvonnevich, L.M. Petrun, I.P. Krisuk, N.M. Popova, S.G. Shandrenko, M.P. Dmytrenko. Altered collagene properties and lysyl oxidase activity during lathyrism	62
K.G. Lyabakh. Nitric oxide, myoglobin and cell oxygen regimen	70

