

Фізіологічний журнал

ТОМ 57 № 4 2011

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

<i>Семенихіна О.М., Базілюк О.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф.</i> Механізми впливу сірководню на скоротливу активність гладеньких м'язів судин щурів	3
<i>Резніков О.Г., Чайковська Л.В., Полякова Л.І., Сачинська О.В.</i> Вплив цитокіноподібного поліпептиду ЕМАР II і флутаміду на передміхурову залозу кастрованих щурів в умовах стимуляції тестостероном	12
<i>Владимирова І.А., Філіппов І.Б., Кулієва Є.М., Юркевич А., Скрима Р., Преварська Н., Шуба Я.М.</i> Порівняння дії ментолу та іциліну на викликані скорочення гладеньких м'язів сім'явивідної протоки нормальних і кастрованих щурів	21
<i>Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Рудик О.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф.</i> Проникність мітохондріальних мембран за умов ішемічного прекодиціонування	34
<i>Іванова І.В., Кислова О.В., Соловйов А.І.</i> Ендотелійзалежний фактор гіперполяризації як резервний захисний механізм регуляції судинного тонуусу при дії іонізуючого опромінення	46
<i>Кахановський Е.Ф.</i> Дослідження оксидативного стресу, антиоксидантного захисту та ендотеліальної дисфункції при гострій ішемії–реперфузії нижніх кінцівок у людини	57
<i>Гольцев А.М., Сафранчук О.В., Бондарович М.О., Останков М.В.</i> Зміна кріолабільності стовбурових пухлинних клітин залежно від фази росту аденокарциноми Ерліха in vivo	68
<i>Цапенко П.К., Лященко Т.П.</i> Зміни мембранного потенціалу гепатоцитів щурів під впливом вазопресину	77
<i>Богдановська Н.В., Коцюруба А.В., Маліков М.В.</i> Утворення оксиду азоту на різних етапах змагань у високотренованих спортсменів	82

ОГЛЯДИ

- Вознесенська Т.Ю., Сердюк О.М., Блашків Т.В., Янчій Р.І. Аутоімунні механізми патології яєчників 90
- Гарбузова В.Ю., Атаман О.В. Матриксний Gla-протеїн та його роль у кальцифікації судинної стінки 96

ХРОНІКА

- Кубишкін А.В., Зінкович І.І., Звягінцева Т.В., Фомочкіна І.І., Коваленко Є.П., Шатова О.П. Нові інструменти патофізіологічних досліджень (Інформація про VI Всесвітній конгрес з патофізіології в Монреалі) 113

ПАМ'ЯТНІ ДАТИ

- Пам'яті Пилипа Миколайовича Серкова 117

О.М. Семенихіна, О.В. Базілюк, Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач

Механізми впливу сірководню на скоротливу активність гладеньких м'язів судин щурів

Вивчали вплив сірководню (H_2S) різного походження на скоротливу активність гладеньких м'язів (ГМ) судин. Встановлено, що введення попередника ендogenous синтезу H_2S L-цистеїну та екзогенного (NaHS) донора H_2S залежно від концентрації змінюють тонус ГМ ізольованих препаратів аорти та ворітної вени. NaHS у концентрації 10^{-5} моль/л викликав констрикторну реакцію ГМ обох видів судин, збільшення концентрації (10^{-4} – 10^{-3} моль/л) – розслаблює ГМ досліджуваних судин. Найбільш чутливими до таких впливів виявилися ГМ ворітної вени. Показано, що реакція розслаблення ГМ на введення NaHS є незалежною від ендотелію. Видалення адвенциції у препаратах аорти значно зменшувало ефекти вазорелаксації, а також призводило до повного їх зникнення на дію NaHS і L-цистеїну відповідно порівняно з аналогічними ефектами, що спостерігалися у препаратах судин з інтактною адвенцицією. Показано, що розслаблення ГМ грудної аорти на дію H_2S опосередковано активуванням аденозинтрифосфат-залежних калієвих каналів. Доказом цього є відсутність розслаблення ГМ за дії їх блокатора глібенкламиду (10^{-5} моль/л).

Ключові слова: сірководень, L-цистеїн, NaHS, глібенкламід, аорта, ворітна вена, ендотелій, адвенциція.

ВСТУП

Нещодавно з'явилась інформація про нові властивості сірководню (H_2S), який утворюється у значній кількості у різних тканинах ссавців і викликає багато фізіологічних ефектів, що дає змогу деяким авторам вважати його регуляторним медіатором [2, 4, 10]. Протягом десятиліть безбарвний газ з сильним запахом «тухлих яєць» був відомий тільки як токсичний забруднювач навколишнього середовища. Нині відомо, що він синтезується з амінокислоти L-цистеїну за участю вітаміну B_6 як кофактора і двох ферментів: цистотіонін γ -ліази (у серцево-судинній системі) і цистотіонін- β -синтетази (у нервовій системі). Експериментально показано, що вміст H_2S у плазмі крові становить 10^{-5} моль/л у щурів лінії Вістар і $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л у щурів лінії Sprague Dawley. Також відомо, що у тканинах головного мозку його вміст сягає

від $5 \cdot 10^{-5}$ до $16 \cdot 10^{-5}$ моль/л [4]. Виявлено також, що H_2S залучений у регуляцію скоротливої активності міокарда, секреції інсуліну тощо. Крім того, показано, що він реагує з активними формами кисню й азоту, що запобігає їхньому руйнівному впливу. З'ясовано, що легенева та артеріальна гіпертензія, атеросклероз, хвороба Альцгеймера, цироз печінки тощо супроводжуються порушенням синтезу H_2S [6]. З іншого боку, надмірна його продукція може сприяти розвитку запальних процесів, септичного шоку, психічній відсталості при синдромі Дауна, тоді як зниження продукції може мати потенційну терапевтичну цінність за цих станів. Відома видова та тканинна специфічність синтезу H_2S і кілька місць його утворення: еритроцити, гладеньком'язові клітини [16], ендотелій [3], адипоцити адвенциції [7].

Встановлено, що основним механізмом токсичності сірководню є інгібування міто-

хондріальної цитохромоксидази та мітохондріального дихання, що є потужнішим за дію ціанідів [12]. Виявлення сірководню у головному мозку [17] спочатку було сприйнято як артефакт, оскільки вважалося, що збільшення його концентрації характерне для мертвих тканин ссавців [11]. Нині наявність H_2S доведено також і у серцево-судинній системі, печінці, нирках тощо [5]. Уперше Abe і Kimura [1] розкрили механізми утворення H_2S у головному мозку, його специфічні клітинні-мішені та біологічні ефекти при фізіологічних концентраціях. Зараз H_2S все більше визнається як член родини "газотрансмітерів" разом з оксидом азоту (NO) і оксидом вуглецю (CO). Проте його фізіологічна роль у порівнянні з ними, у різних органах і тканинах організму, залишається недостатньо вивченою, зокрема у різних регіонах судинного русла. Тому метою нашої роботи було дослідити дію екзогенного і ендогенного сірководню на скоротливу активність гладеньких м'язів (ГМ) аорти та ворітної вени щурів і з'ясувати основні механізми його впливу.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на препаратах ворітної вени й аорти щурів лінії Вістар віком від 6 до 8 міс та масою 250–300 г ($n=85$). Для реєстрації скоротливої активності м'язових препаратів використовували спеціальну камеру, яка складається з перфузійної комірки, механоелектричного перетворювача 6MX1C, температурного датчика, нагрівальних елементів, розподільних кранів, лійки для подавання перфузійних розчинів ($37^\circ C$). Електричний сигнал з виходу перетворювача реєстрували за допомогою пристрою КСП-4.

Ворітну вену виділяли після декапітації та розтину черевної порожнини щурів, накладаючи лігатури з двох кінців. Препарували, очищували від сполучної тканини

та розрізали на 2–3 повздовжні смужки довжиною 4–5 мм і завширшки 0,5–1,0 мм. Далі її поміщали у комірку об'ємом 1,5 мл, виготовлену з хімічно неактивного плексигласу, закріплювали у горизонтальному положенні двома гачками, один з яких з'єднували з механоелектричним перетворювачем, а другий кріпили через блок до вантажу, за допомогою якого смужка розтягувалася. Препарати розтягували з силою 3–5 мН і залишали для стабілізації режиму роботи на 30–40 хв, перфузуючи їх зі швидкістю 2–3 мл/хв стандартним розчином Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 133, KCl – 4,7, $NaHCO_3$ – 16,3, NaH_2PO_4 – 1,38, $MgCl_2$ – 1,05, глюкоза – 12, $CaCl_2$ – 2,5; pH 7,4.

Препарати ворітної вени мали міогенну скоротливу активність у вигляді періодичних фазних скорочень ГМ з частотою 4–6 $хв^{-1}$ і амплітудою – 0,8–1,0 мН/мг, що було контролем їх функціональної активності. Перед проведенням досліджень їх активували KCl (80 ммоль/л) у розчині Кребса до зникнення фазних скорочень і створення стійкого "плато", від якого і розраховували зміни амплітуди скоротливих реакцій ГМ (у відсотках).

Після розтину порожнини виділяли сегмент аорти довжиною 4–5 см і ретельно препарували, розрізали на кільцеві препарати завширшки від 0,5 до 1,5 мм з урахуванням циркуляційної орієнтації її гладеньком'язового шару (під кутом 45° від повздовжньої осі судини). Препарати аорти поміщали у комірку, розтягували з силою 8–10 мН і перфузували розчином Кребса. Період стабілізації для аорти сягав від 20 до 40 хв. Активацію ГМ аорти створювали додаванням до буферного розчину норадреналіну (10^{-5} моль/л, "Sigma", США). Стійкий рівень цього скорочення ("плато") приймали за 100 %. Від нього проводили розрахунки зміни амплітуди скоротливих реакцій ГМ на різні агоністи (у відсотках).

Ендотеліальний шар і зовнішня оболонка

судин (адвентиція) досліджуваних судин вилучалися механічно [8]. Відсутність розслаблення ГМ на ацетилхолін (10^{-6} моль/л) було контролем ефективності деендотелізації.

Синтез NO блокували за допомогою L-NAME ($3 \cdot 10^{-4}$ моль/л), активність аденозинтрифосфатзалежних калієвих каналів (K_{ATP}) – за допомогою глібенкламіду (10^{-5} моль/л). Вплив екзогенного H_2S вивчали, використовуючи відомий донор NaHS (10^{-3} – 10^{-5} моль/л), ендогенного – L- цистеїн (10^{-3} – 10^{-4} моль/л).

Отримані результати обробляли за методом варіаційної статистики, використовуючи критерій t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірні. Розрахунки середньоарифметичного значення (M), стандартної похибки (m), коефіцієнта вірогідності (P) проводили, використовуючи стандарні програми Excel (MS Office XP) та Origin 7.0 фірми «Microcall Software, Inc.» (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив донора сірководню на скоротливу активність аорти і ворітної вени щурів. Варто зазначити, що властивості ГМ різних кровоносних судин істотно відрізняються. Вони залежать не тільки від виду тварини, але й від органа чи тканини, де знаходиться судина, від ступеня її іннервації, наявності чи відсутності спонтанної активності і навіть від її калібру. Мабуть, це одна з причин того, чому досі не вдається уніфікувати гладеньком'язові клітини кровоносної системи, описати найбільш спільні закономірності їхнього функціонування.

Як було зазначено вище, препарати ворітної вени мають спонтанну скоротливу активність у вигляді періодичних фазних скорочень ГМ з певною частотою та амплітудою. Крім того, слід відзначити специфічну реакцію ворітної вени на ацетилхолін. Як відомо, цей агоніст розширює

більшість судин, активуючи синтез ендотеліальними клітинами оксиду азоту (NO), тоді як у ворітній вені – протилежний ефект, хоча також він діє через ендотелій, проте механізм реакції все ще залишається невідомим. Встановлено, що основні процеси утилізації сірководню відбуваються у печінці, а ворітна вена як колектор збирає кров з усіх травних органів черевної порожнини. Тому у нашій роботі ми намагалися з'ясувати можливі особливості реакцій ГМ ворітної вени на сірководень.

В експериментах на ізольованих препаратах ворітної вени ($n=9$), що були попередньо активовані розчином KCl, послідовне додавання NaHS у зростаючих концентраціях до розчину Кребса викликало різноспрямовану реакцію. Виявилось, що при концентрації 10^{-5} моль/л ГМ ворітної вени скорочуються з амплітудою $35,76 \% \pm 8,70 \%$ від заданого рівня активації. Більші концентрації донора сірководню (10^{-4} – 10^{-3} моль/л) розслаблювали ГМ ворітної вени. Так, при концентрації 10^{-4} моль/л амплітуда його становила $20,4 \% \pm 8,5 \%$, а при концентрації 10^{-3} моль/л сягала $131,8 \% \pm 47,1 \%$ (рис.1).

В експериментах на ізольованих препаратах аорти щурів ($n=9$), що попередньо

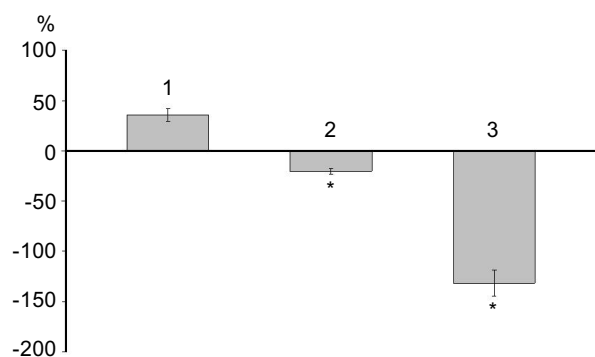


Рис. 1. Вплив екзогенного донора сірководню (NaHS) на скоротливу активність преактивованих (80 ммоль KCl) гладеньких м'язів ворітної вени щурів: 1 – 10^{-5} моль/л, 2 – 10^{-4} моль/л, 3 – 10^{-3} моль/л.

* $P < 0,05$ відносно однонаправлених реакцій за дії NaHS у концентрації 10^{-4} і 10^{-3} моль/л

були преактивовані норадреналіном у концентрації 10^{-5} моль/л, при послідовному додаванні донора сірководню у зростаючих концентраціях спостерігалася констрикторна дія його на ГМ при концентрації NaHS – 10^{-5} моль/л, амплітуда якого становила $12,50 \pm 4,3 \%$ (рис. 2,а). При збільшенні концентрації донора до 10^{-4} моль/л відбувалася різноспрямована реакція: у 50 % дослідів ГМ аорти (n=12) скорочувалися з амплітудою $36,55 \pm 10,36 \%$ від заданого рівня активації, у 25 % (n=6) – навпаки, розслаблювалися – $25,5 \pm 5,25 \%$, у решті дослідів (n=6) змін тонічного напруження ГМ не виявлено (див. рис. 2,б). При збільшенні концентрації донора до 10^{-3} моль/л спостерігалася тільки розслаблення ГМ аорти щурів (n=9) з амплітудою $82,15 \pm 10,1 \%$ (див. рис. 2,в). З літератури відомо, що збільшення концентрації донора сірководню до 10^{-2} моль/л зменшує амплітуду розслаблення, і наближує її до такої при мінімальних концентраціях (10^{-4} моль/л) [3, 7]. Отже, у концентрації 10^{-5} моль/л, донор сірководню незначно скорочував ГМ преактивованих препаратів аорти, а у ГМ ворітної вени удвічі більше. Відомо, що констрикторна реакція ГМ судин зумовлена інгібуванням перетворення $[^3\text{H}]$ -аргініну до $[^3\text{H}]$ -цитруліну, що відбувається в результаті прямого

впливу NaHS на ендотеліальну NO-синтазу [13]. При збільшенні концентрації сульфідру водню до 10^{-4} моль/л у цих судинах спостерігалася незначне розслаблення ГМ ворітної вени та різнонаправлені реакції аорти. Подальше збільшення концентрації донора сірководню до 10^{-3} моль/л підвищувало амплітуду розслаблення ГМ обох досліджуваних судин, проте у ворітній вені воно було майже на 60 % більше, ніж в аорті.

Отримані нами результати свідчать про наявність у сірководню, залежних від концентрації, вазорелаксуючих і вазоконстрикторних властивостей. Найбільш чутливими до його впливу виявились ГМ ворітної вени.

Роль ендотелію у реалізації змін тонуусу ГМ аорти і ворітної вени на вплив H_2S . Відомо, що основний механізм реалізації впливу газового трансмітера NO є ендотеліюопосередкованим. Нині дані відносно участі ендотелію у забезпеченні судинних ефектів сірководню неоднакові. Насамперед відмінності стосовно ролі ендотелію у H_2S -індукованій вазорелаксації стосуються типу судин і механізмів регуляції їх тонуусу [3].

Для оцінки можливої причетності ендотелію у H_2S -опосередкованих змінах судинного тонуусу ми вивчали вплив донора NaHS на деендотелізовані кільця аорти (n=6) і смужки ворітної вени (n=6). Виявилося (рис. 3), що на препаратах ворітної

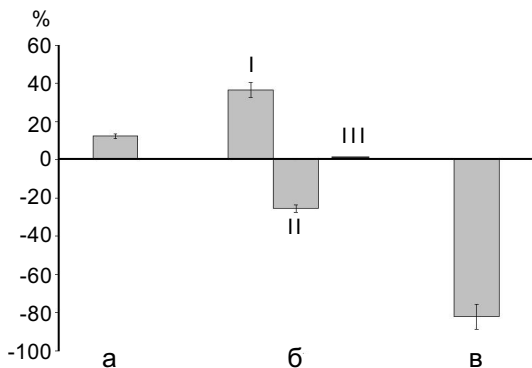


Рис. 2. Вплив екзогенного донора сірководню (NaHS) на скоротливу активність преактивованих (норадреналін 10^{-5} моль/л) гладеньких м'язів аорти щурів: а – 10^{-5} моль/л, б – 10^{-4} моль/л, в – 10^{-3} моль/л; I – 50 %, II – 25 %, III – 25 %

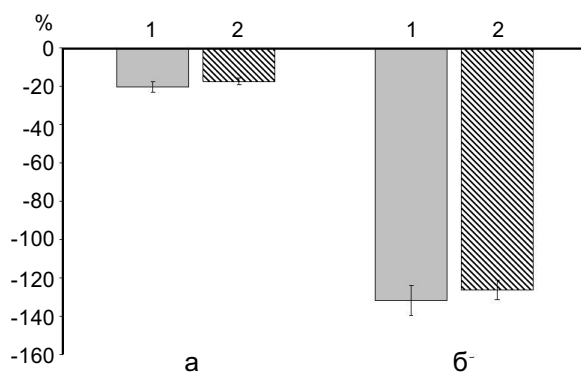


Рис. 3. Вплив екзогенного донора сірководню на скоротливу активність преактивованих гладеньких м'язів ворітної вени щурів: 1 – з ендотелієм, 2 – без ендотелію: а – 10^{-4} моль/л, б – 10^{-3} моль/л

вени з вилученим ендотелієм амплітуда розслаблення ГМ на донор сірководню у концентраціях 10^{-4} і 10^{-3} моль/л становила $17,5 \pm 4,3$ і $126,3 \pm 22,6$ % відповідно, що практично відповідало такій з інтактним ендотелієм, тобто ця реакція виявилася незалежною від наявності ендотелію. В свою чергу скорочення ГМ деендотелізованих препаратів ворітної вени при концентрації донора 10^{-5} моль/л різко пригнічувалося або його не було взагалі. Отже, ця реакція виявилася залежною від наявності ендотелію.

У дослідах на деендотелізованих кільцях аорти, що були преактивовані норадреналіном, змін скоротливої активності ГМ на NaHS у концентрації 10^{-5} моль/л не реєструвалося. При дії донора у концентраціях 10^{-4} і 10^{-3} моль/л розслаблення ГМ відтворювалося такої самої амплітуди, як і у препаратів з інтактним ендотелієм. Реакція розслаблення ГМ на донор сірководню ($2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) відбувалась і при блокаді синтезу NO (n=5), проте її амплітуда була значно меншою від контрольних значень (у середньому $16 \pm 3,2$ %; рис. 4).

Отримані результати свідчать про те, що великі концентрації сірководню викликають переважно розслаблення ГМ як ворітної вени, так і грудної аорти щурів, і в його реалізації беруть участь чинники, що



Рис. 4. H₂S-індуковані реакції розслаблення преактивованих норадреналіном гладеньких м'язів (ГМ) грудної аорти щурів. Темна лінія під кривими — тривалість впливу донора сірководню. Початок активації ГМ позначено стрілкою: 1 — контроль, 2 — препарат без ендотелію, 3 — вплив L-NAME ($3 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

не залежать від наявності ендотелію. Встановлено також, що за відсутності ендотелію, реакція скорочення ГМ цих судин на низькі концентрації донора сірководню зменшувалась або не реєструвалася взагалі. Разом з тим передбачається можлива взаємодія сірководню й оксиду азоту. Крім того, як було зазначено вище, є відомості [3] про те, що у таких судинах, як мезентеріальна та ниркова артерії, ендотелій відіграє важливу роль у реалізації ефектів H₂S. Імовірним поясненням цього феномена може бути наявність двох сигнальних шляхів для сірководню: K_{ATP}-канали ГМ судин і ChTX/апамінчутливі кальційзалежні калієві канали у ендотеліальних клітинах судин, стимулювання яких виділяє ендотеліальний фактор гіперполяризації. Сумісна активація двох типів каналів під впливом сірководню спричинює гіперполяризацію ГМК судин, що викликає їх вазорелаксацію. Отже, переважання того чи іншого сигнального шляху у аорті, ворітній вені і мезентеріальних артеріях, а також чутливості скоротливих білків до внутрішньоклітинного кальцію, може бути поясненням різної ролі ендотелію у впливі на судини.

Таким чином, ендогенний неорганічний розчинний газ H₂S впливає на реактивність аорти та ворітної вени, а відтак може відігравати суттєву роль у регуляції тонуусу судин. Дійсно, за даними інших авторів, внутрішньовенне введення NaHS щурам знижувало артеріальний тиск [1], розслаблювало судинний опір [3]. Розслаблення ГМ судин при великих концентраціях донора H₂S виявилось ендотелійнезалежним, а при малих, навпаки, залежними від нього [13, 18, 19]. Проте роль H₂S у фізіології та патології до кінця ще не з'ясована та потребує подальших досліджень, які б розкрили механізми регуляції експресії та деградації H₂S-ферментів.

Вплив L-цистеїну на скоротливу активність ГМ аорти та ворітної вени. Відомо,

що в серцево-судинній системі ссавців, сірководень утворюється з амінокислоти L-цистеїну за допомогою ферменту цистатіонін-г-ліази [9, 14]. Тому наступним кроком було вивчення впливу L-цистеїну на скоротливу активність ГМ ворітної вени і аорти щурів.

В експериментах на ізольованих препаратах аорти щурів (n=8), що попередньо були преактивовані норадреналіном (10^{-5} моль/л) при послідовному додаванні до розчину Кребса L-цистеїну у концентраціях 10^{-4} і 10^{-3} моль/л ми спостерігали стійке розслаблення ГМ. Амплітуда реакції у середньому становила $48,08 \pm 9,05$ і $37,48 \pm 9,04$ % (рис. 5) відповідно.

У експериментах на ізольованих препаратах ворітної вени щурів (n=10), що були преактивовані 80 ммоль/л розчином KCl, при послідовному додаванні L-цистеїну, відбувалася різнонаправлена реакція ГМ. У половині дослідів реєстрували скорочення, амплітуда якого при концентрації 10^{-4} моль/л становила $12,84 \pm 3,88$ % (n=5; див. рис. 5), а при концентрації 10^{-3} моль/л – $25,38 \pm 6,4$ % (див. рис. 5); у іншій частині дос-

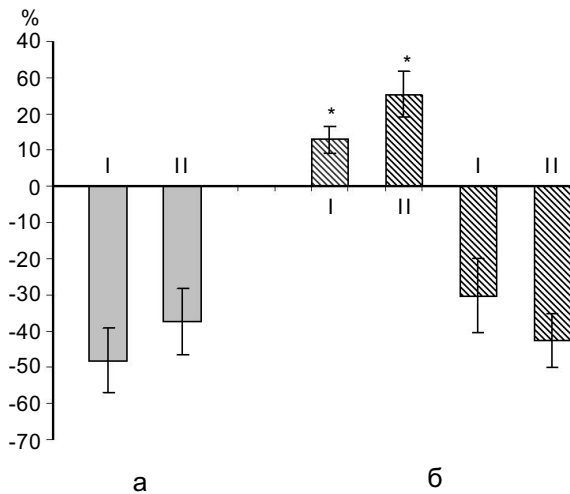


Рис. 5. Вплив ендogenousного донора сірководню (L-цистеїну) на скоротливу активність преактивованих гладеньких м'язів грудної аорти (а) і ворітної вени (б) щурів. L – цистеїн у концентраціях: I – 10^{-4} моль/л, II – 10^{-3} моль/л. * $P < 0,05$ відносно однонаправлених реакцій за дії L-цистеїну у концентрації 10^{-4} і 10^{-3} моль/л

лідів (n=5) при послідовному додаванні L-цистеїну реєстрували розслаблення ГМ. Так, при концентрації 10^{-4} моль/л його амплітуда була $30,26 \pm 10,3$ %, а при концентрації 10^{-3} моль/л – $42 \pm 7,28$ % (див. рис. 5).

Аналізуючи отримані результати, ми можемо зробити висновок, що сірководень, який утворюється ендogenousно (з L-цистеїну) і екзogenousний NaHS (10^{-4} і 10^{-3} моль/л), викликає однонаправлену реакцію розслаблення ГМ аорти. Реакції ГМ ворітної вени носили різнонаправлений характер, введення NaHS у згаданих концентраціях, викликало дозозалежне розслаблення ГМ ворітної вени, тоді як L-цистеїн призводив до різнонаправленої реакції ГМ ворітної вени.

Для того, щоб виключити безпосередній вплив L-цистеїну на ГМ без перетворення на сірководень потрібно провести досліди з використанням пропаргілгліцину, блокатора ферменту цистатіонін-г-ліази.

Дослідження ролі адвентиції в реалізації H_2S -опосередкованих змін тонусу ГМ грудної аорти. Останнім часом з'явилися дані, що H_2S може змінювати тонус ГМ судин через дію невідомого фактора, що локалізований у зовнішній сполучнотканинній оболонці судини – адвентиції [7]. Тому наступним етапом наших досліджень було

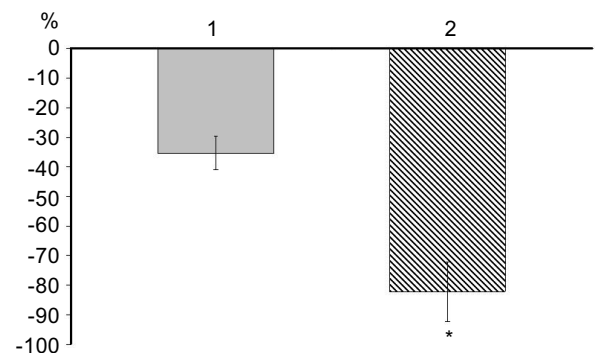


Рис. 6. Вплив донора сірководню на скоротливу активність преактивованих гладеньких м'язів (ГМ) аорти без адвентиції (1) та з адвентицією (2). * $P < 0,05$ відносно реакцій преактивованих ГМ аорти з вилученою адвентицією

з'ясувати вплив NaHS на ГМ аорти з видаленою адвентицією.

Після ретельного вилучення адвентиції грудної аорти в усіх дослідах (n=6) розслаблення ГМ на введення NaHS у концентрації 10^{-3} моль/л зменшувалося майже вдвічі і становило у середньому $35,3 \% \pm 5,6 \%$ (з інтактною адвентицією воно було $82,15 \% \pm 10,1 \%$).

Для подальшого вивчення ролі адвентиції у H_2S -змінах тонуусу ГМ аорти, вивчали вплив ендогенного донора сірководню. Виявилось, що без адвентиції характерне розслаблення ГМ аорти на введення L-цистеїну взагалі не розвивається.

Таким чином, розслаблення ГМ грудної аорти щурів на введення ендогенного сірководню повністю залежить від адвентиції, а екзогенного – тільки частково.

Вплив блокатора K_{ATP} -каналів на L-цистеїніндуковані зміни скоротливої активності ГМ. Останні дослідження показують, що вазодилаторний вплив H_2S на ГМ кровоносних судин реалізується в основному через відкриття K_{ATP} -каналів, які знаходяться у гладеньком'язових клітинах [3, 15]. Тому ми вивчали зв'язок розслаблення ГМ на введення L-цистеїну з механізмами, що пов'язані з активацією цих каналів.

Після періоду стабілізації попередньо підготовлені та преактивовані ізольовані препарати ворітної вени й аорти перфузували протягом 10 хв розчином глібенкламідом (10^{-4} моль/л) у розчині Кребса. Блокада K_{ATP} -каналів глібенкламідом запобігала розслабленню ГМ аорти та ворітної вени у відповідь на введення L-цистеїну. Отже, ці результати підтверджують гіпотезу про те, що вплив сірководню на скоротливу активність ГМ аорти та ворітної вени здійснюється через активацію K_{ATP} -каналів.

ВИСНОВКИ

1. Донор сірководню NaHS у низьких концентраціях (10^{-5} моль/л) викликає скорочення преактивованих ГМ аорти і ворітної

вени, а у високих концентраціях (10^{-4} моль/л – 10^{-3} моль/л) – розслаблення.

2. Великі концентрації сірководню викликають переважно розслаблення ГМ грудної аорти та ворітної вени щурів, і в його реалізації беруть участь чинники, незалежні від наявності ендотелію. Блокада синтезу NO зменшує дозозалежне H_2S -індуковане розслаблення, що вказує на можливу взаємодію NO і H_2S .

3. Розслаблення ГМ грудної аорти на дію попередника ендогенного синтезу сірководню (L-цистеїну) повністю, а екзогенного (NaHS) – частково реалізується через фактори, що локалізовано у адвентиції.

4. Вазодилаторний вплив ендогенного сірководню на ГМ аорти подібний до такого, що було частково отримано в експериментах з використанням екзогенного сірководню у концентрації 10^{-4} моль/л (у 25 % випадків) та у концентрації 10^{-3} моль/л (у 100 %).

5. Реакція ГМ ворітної вени на введення L-цистеїну різнонаправлена. У половині дослідів спостерігалася вазодилаторна реакція, у іншій половині – констрикторна.

6. Блокада K_{ATP} -каналів глібенкламідом запобігала розслабленню ГМ аорти та ворітної вени у відповідь на введення L-цистеїну і є доказом того, що розслаблення ГМ судин, спричинене сірководнем, пов'язано з активацією цих каналів.

**О.М. Семенихіна, О.В. Базілюк,
Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач**

МЕХАНИЗМИ ВЛИЯНИЯ СЕРОВОДОРОДА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКИХ МЫШЦ СОСУДОВ КРЫС

Изучали влияние сероводорода (H_2S) разного происхождения на сократительную активность гладких мышц (ГМ) сосудов. Установлено, что введение предшественника эндогенного синтеза H_2S L-цистеина и его донора NaHS вызывают концентрационнозависимые изменения тонуса гладких мышц (ГМ) изолированных препаратов аорты и воротной вены. Низкие концентрации донора сероводорода (10^{-5} моль/л) вызвали констрикторную реакцию ГМ

препаратов обоих видов сосудов, а высокие – расслабление. Показано, что реакция расслабления ГМ в ответ на донор сероводорода является независимой от наличия эндотелия. Удаление внешней соединительной оболочки – адвентиции – в препаратах аорты значительно уменьшало эффекты расслабления на действие донора сероводорода NaHS. Установлены некоторые клеточные механизмы влияния сероводорода, а именно показано, что расслабление ГМ грудной аорты на действие H₂S опосредовано активацией аденозинтрифосфатзависимых калиевых каналов. Доказательством этого является отсутствие расслабления ГМ на действие их блокатора глибенкламида.

Ключевые слова: сероводород, L-цистеин, NaHS, глибенкламид, аорта, воротная вена, эндотелий, адвентиция.

**О.М. Semenikhina, O.V. Bazilyuk,
Yu.P. Korkach, V.F. Sagach**

THE ROLE AND MECHANISMS OF THE EFFECT OF HYDROGEN SULFIDE ON CONTRACTILE ACTIVITY OF VASCULAR SMOOTH MUSCLES IN RATS

The effect of endogenous and exogenous hydrogen sulfide (H₂S) on contractile activity of vascular smooth muscle (VSM) was studied. The introduction of substrate synthesis H₂S L-cysteine and its donor NaHS in vitro caused concentration-dependent relaxation of VSM of aorta and portal vein. Low concentrations of hydrogen sulfide donor (10⁻⁵ mol/L) caused vasoconstriction of both types of the vessels. It was shown that the reaction of relaxation of VSM in response to NaHS is independent from endothelium. It was revealed that VSM of portal vein are more sensitive to the effects of H₂S than VSM of aorta. Removing of aorta periadventitial adipose tissue showed no relaxation reply to the hydrogen sulfide donor NaHS in 70% of experiments. Some of the cellular mechanisms of hydrogen sulfide action were established, namely relaxation of aorta is depended on K_{ATP} channel activation. This is manifested by a lack of relaxation of the aortic VSM due to K_{ATP} channel inhibitor glibenclamide.

Key words: hydrogen sulfide, L-cysteine, NaHS, glibenclamide, aorta, portal vein, endothelium, adventitia.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator // *J. Neurosci.* – 1996. – **16**. – P. 1066–1071.
2. Geng B., Yang J., Qi Y., Zhao J., Pang Y., Du J., Tang C. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function // *Biochim. and Biophys. Res. Commun.* – 2004. – **313**. – P. 362–368.
3. Cheng Y., Ndisang J.F., Tang G., Cao K., Wang R. Hydrogen sulfide-induced relaxation of mesenteric

- artery beds of rats // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – **279**. – P.52082–52086.
4. Mancardi D., Penna C., Merlino A., Soldato P. D., Wink D.A., Pagliaro P. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulde // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – **1787**. – P. 869–872.
5. Doeller J.E., Isbell T.S., Benavides G., Koenitzer J., Patel H., Patel R.P., Lancaster J.R. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues // *Anal. Biochem.* – 2005. – **341**. – P.40–50.
6. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interested for pharmacologists // *Pharmacol. Rep.* – 2007. – **59**. – P.4-24.
7. Fang L., Zhao J., Chen Y. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator // *J. Hypertens.* – 2009. – **27**. – P. 2174–2185
8. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscles by acetylcholine // *Nature.* – 1980 – **288**. – P. 373–376.
9. Iciek M., Bilaska A., Ksiazek L., Serebro Z., Wlodec L. Allyl disulfide as donor and cyanide as acceptor of sulfane sulfur in the mouse tissues // *Pharmacol. Rep.* – 2005. – **57**. – P.212–218.
10. L. Li, P. K. Moore: Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? // *Trends in Pharmacolog. Scien.* – 2007. – **2**. – P. 84–90.
11. Nagata T., Kage S., Kimura K., Kudo K., Noda M. Sulfide concentration in postmortem mammalian tissues // *J. Forensic. Sci.* – 1990. – **35**. – P.706–712.
12. Reiffenstein R.J., Hulbert W.C., Roth S.H. Toxicology of hydrogen sulfide // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1992. – **32**. – P.109–134.
13. Kubo S., Doe I., Kurokawa Y., Nishikawa H., Kawabata A. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: Contribution to dual modulation of vascular tension // *Toxicology.* – 2007. – **232** – P.138–146.
14. Stipanuk M.H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine // *Annu. Rev. Nutr.* – 2004. – **24**. – P. 539–577.
15. Tang G., Wu L., Liang W., Wang R. Direct stimulation of, K ATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells // *Mol. Pharmacol.* – 2005. – **68**. – P. 1757–1764.
16. Wagner C.A. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator // *J. Nephrol.* – 2009. – **22**. – №2. – P. 173–179.
17. Warenycia M.W., Goodwin L.R., Benishin C.G., Reiffenstein R.J., Francom D.M., Taylor J.D., Dieken F.P. Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstation of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels // *Biochem. Pharmacol.* – 1989. – **38**. – P. 973–981.

-
18. Zhao W., Wang R. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms // Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2002. – **283**. – P.474–480.
19. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener // Embo. J. – 2001. – **20**. – P.6008–6016.

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

Матеріал надійшов до редакції 10.03.2011

О.Г. Резніков, Л.В. Чайковська, Л.І. Полякова, О.В. Сачинська

Вплив цитокіноподібного поліпептиду ЕМАР II і флутаміду на передміхурову залозу кастрованих щурів в умовах стимуляції тестостероном

Вивчали вплив нарізного та поєданого застосування цитокіноподібного поліпептиду ЕМАР II і нестероїдного антиандрогену флутаміду на морфофункціональний стан додаткових статевих залоз кастрованих статевонезрілих самців щурів у умовах стимуляції тестостерону пропіонатом. Виявлені антиангіогенні, прокоагулянтні і проапоптотичні ефекти ЕМАР II у вентральній простаті. Комбіноване застосування препаратів призводить до посилення антипростатичних ефектів. Вони здатні гальмувати андрогензалежні процеси в тканині передміхурової залози, впливати на процеси проліферації та апоптозу, вміст ДНК, РНК і білка. Комбіноване застосування ЕМАР II і флутаміду може бути корисним при розробці нових схем терапії раку простати.

Ключові слова: ЕМАР II, флутамід, апоптоз, проліферація, передміхурова залоза щурів, кастрація, тестостерону пропіонат.

ВСТУП

Передміхурова залоза є класичним органом-мішенню для тестостерону та інших андрогенних гормонів. Гормональну залежність виявляють як нормальні, так і злоякісно трансформовані клітини простати. Тому в патогенезі злоякісних захворювань передміхурової залози провідна роль належить чоловічим статевим гормонам.

Останнім часом з накопиченням фундаментальних знань про патофізіологічні процеси, які лежать в основі злоякісної трансформації клітин, та про роль мікрооточення пухлин в їх рості та метастазуванні, розробляються методи таргетної терапії пухлин. Мішенями для такої терапії є ДНК, ферменти, клітинні рецептори і механізми сигнальної трансдукції, неоангіогенезу тощо [3, 4, 5, 7, 13, 16].

Перспективним є вивчення мультифункціональних регуляторних білків, які синтезуються в нормальних і пухлинних клітинах багатоклітинних організмів по

розгалужених шляхах альтернативного сплайсингу мРНК і посттрансляційних процесів. Вони регулюють міграцію, диференціацію, проліферацію і апоптоз клітин, що відкриває нові можливості протипухлинної таргетної терапії за допомогою цілеспрямованої дії на ключові механізми канцерогенезу.

У зв'язку з тим, що утворення кровонесних судин *de novo* в прогресуючій злоякісній пухлині є однією з умов її росту, антиангіогенна терапія нині визнана одним з перспективних способів лікування онкологічних хворих. Антиангіогенні властивості виявились у фрагментів деяких аміноацил-тРНК-синтетаз, що каталізують реакції приєднання амінокислот до транспортних РНК, а також їх кофакторів [10]. Зокрема, увагу дослідників привернув цитокіноподібний поліпептид ЕМАР II (від англ. endothelial monocyte activating polypeptide II). Він являє собою С-кінцевий домен кофакторного білка р43, що є компонентом мультисин-

тетазного комплексу тирозин-тРНК і має високий ступінь гомології з некаталітичним С-доменом тирозил-тРНК-синтетази. ЕМАР II був уперше виділений з надосадкової фракції клітин фібросаркоми мишей, індукованої метилхолантреном А [11, 12]. Свою назву він отримав завдяки здатності стимулювати міграцію моноцитів і прокоагуляційну активність ендотеліоцитів. Вважається, що ЕМАР II може бути застосований у клініці як новий протипухлинний агент. Однак механізми дії цитокиноподібного поліпептиду ЕМАР II як індуктора апоптозу та медіатора прокоагулянтної і антиангіогенної дії та можливість синергізму при застосуванні з іншими препаратами, що застосовуються при лікуванні онкологічних захворювань, повністю не з'ясовані.

В літературі відсутні дані про можливу роль ЕМАР II в андрогензалежних процесах в нормальній передміхуровій залозі. У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчення дії нарізного та поєданого застосування поліпептиду ЕМАР II і флутаміду на простату кастрованих щурів в умовах стимуляції тестостероном.

МЕТОДИКА

Досліди проведені на 72 статевонезрілих самцях щурів лінії Вістар 35-добового віку з масою тіла 50–60 г. Тварин утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні. Утримання та використання тварин проводили згідно з біоетичними вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

У дослідах застосовували стабілізований 1,5%-м декстраном-70 ліофілізований рекомбінантний білок ЕМАР II людини (169 амінокислотних залишків, молекулярна маса 18 535 Да), отриманий у відділі білкової інженерії і біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН

України (керівник – член-кор. НАН України О.І. Корнелюк) методом бактеріальної експресії, та нестероїдний антиандроген флутамід (таблетки флутафарму, ВАТ «Фармак», Україна) [1, 17].

Кастрованим щурам вводили підшкірно тестостерону пропіонат (ТП) у добових дозах 2мг/кг (3 дні), 0,1 або 0,2 мг/кг маси тіла (6 діб). ЕМАР II вводили підшкірно у дозі 0,05 або 0,1 мг/кг маси тіла та/або флутамід перорально у вигляді суспензії таблеткової маси флутафарму в гелі Дорфмана (ізотонічний розчин хлориду натрію, що містить 0,5 % натрієвої солі карбоксиметил целюлози, 0,4 % твіну-80, 0,9 % бензилового спирту) у дозі 10 мг/кг маси тіла, 1 раз на добу у шлунок крізь металевий зонд. Контролем були тварини, які одержували розчинники та/або гель Дорфмана.

Через добу після останнього введення препаратів щурів декапітували під легким ефірним наркозом. Додаткові статеві залози – вентральну простату (ВП), коагулюючу залозу (КЗ), сім'яні пухирці (СП) після витискання секрету зважували, частину ВП заморожували і зберігали при -20°C до аналізу. У тканинах ВП визначали вміст ДНК, РНК і білка [2]. Були також проведені гістологічні дослідження ВП.

Статистичне опрацювання результатів дослідження проводили з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі досліджувалися ранні ефекти ЕМАР II та флутаміду на морфологічну будову ВП кастрованих щурів при короткочасному (3-добовому) введенні препаратів на тлі застосування ТП.

Гістологічний аналіз препаратів ВП кастрованих щурів контрольної групи показав, що під впливом ТП через 3 доби спостерігається підвищення числа кровоносних судин та активація епітелію, що

полягала у збільшенні розмірів ацинусів та висоти епітеліальних клітин (рис. 1,а).

Під впливом ЕМАР II (0,1 мг/кг) у капілярах і посткапілярних венулах спостерігалась агрегація еритроцитів, що свідчить про стаз крові в цих судинах, тобто про прокоагуляційну дію поліпептиду. Часто в капілярах знаходили ендотеліальні клітини з пікнотичними ядрами. Будова епітеліального шару була гетерогенною. На тлі активації епітелію під впливом ТП виявляли ділянки з порушеним відновленням аци-

нарного епітелію, що свідчить про помірно виражену антипроліферативну дію ЕМАР II (див. рис. 1,б). Це супроводжувалось значною зміною клітинного складу строми – в ній зростала кількість гістіоцитарних елементів.

У кастрованих щурів, які на фоні замісного введення ТП отримували флутамід, знаходили атрофічні та деструктивні зміни епітелію (див. рис. 1,в).

При тридобовому поєднаному застосуванні ЕМАР II (0,1 мг/кг) та флутаміду (10

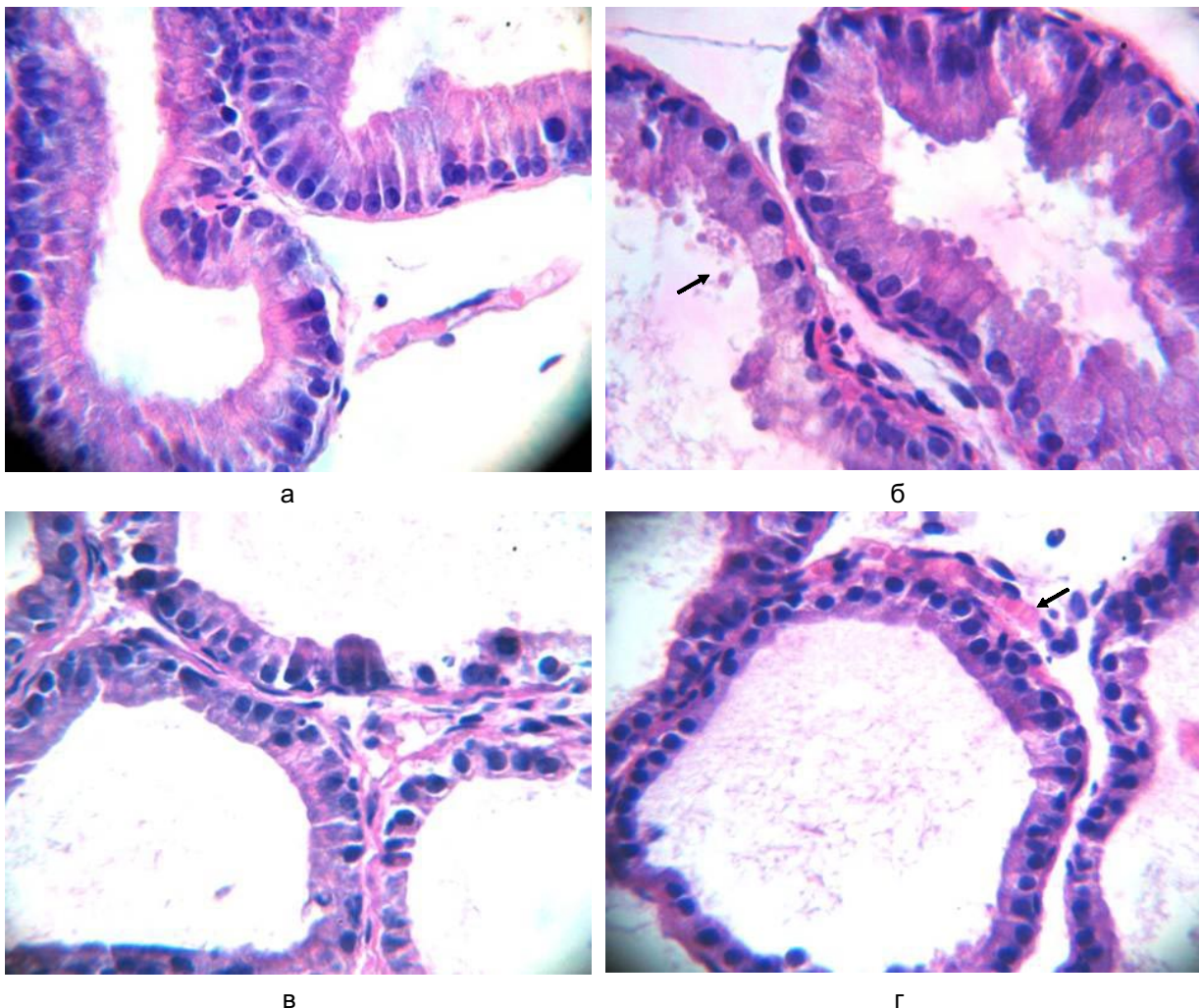


Рис. 1. Прокоагулянтні та антипроліферативні ефекти ЕМАР II, флутаміду та їх комбінації при 3-добовому застосуванні у стимульованій тестостерону пропіонатом (ТП) простаті кастрованих щурів: а – ТП (2 мг/кг) відновлений ацинарний епітелій; б – ЕМАР II (0,1 мг/кг) ділянка з порушеним відновленням епітелію (стрілка); в – флутамід (10 мг/кг); г – ТП і флутамід і ЕМАР II; атрофія епітелію, агрегація еритроцитів у капілярі (стрілка). Об. х40. Гематоксилін-Шифф

мг/кг) спостерігається посилення дії препаратів, про що говорять зміни у ВП: порушення кровотоку в залозі, виражені атрофічні та деструктивні зміни епітелію (див. рис. 1,г).

З літературних даних відомо, що відновлення маси та морфологічної будови передміхурової залози кастрованих самців щурів під впливом ТП відбувається через кілька днів після відновлення кровопостачання залози [8, 9, 14]. У зв'язку з цим вивчення ефектів нарізного та комбінованого застосування ЕМАР II і флутаміду проводили через 6 днів застосування препаратів. Ефекти оцінювали за наступними показниками: відносна маса додаткових статевих залоз, вміст нуклеїнових кислот і білка та гістологічні зміни у ВП.

Маса додаткових статевих залоз через 6 днів після кастрації суттєво зменшувалася: ВП в 4,5 раза, КЗ – в 2,6 раза, а СП – в 2,8 раза в порівнянні з контрольними інтактними тваринами (таблиця). В основі атрофії і згасання функціональної активності додаткових статевих залоз лежать біохімічні порушення. Кастрація спричиняла вірогідне зменшення вмісту ДНК у 4,3 раза, РНК у 9,7 раза, білка в 3,5 раза (рис. 2). Гістологічний аналіз ВП кастрованих статевонезрілих самців щурів показав, що через 6 днів після кастрації залоза складається з трубкоподібних ацинусів, оточених товстими міоцитами, вистелених кубічним і сплюсненим епітелієм. У щурів контрольної групи, які отримували ТП, ВП складалась із розширених залоз, вистелених високим циліндричним епітелієм, оточених малопомітними розтягнутими міоцитами.

Застосування ТП у дозі 0,1 мг/кг призводило до повного відновлення маси КЗ і СП і тільки на 50 % ВП (див. таблицю), що узгоджується з результатами гістологічних досліджень ВП. Розміри деяких залоз збільшувалися, завдяки діленню епітеліоцитів, проте в них спостерігали і атрофічні процеси, викликані, очевидно, нестачею андрогенів для підтримання існування клітин після мітозу.

Дія ЕМАР II (0,05 мг/кг) у щурів, що одержували ТП в дозі 0,1 мг/кг не викликала вірогідних змін маси всіх додаткових

мкг/орган

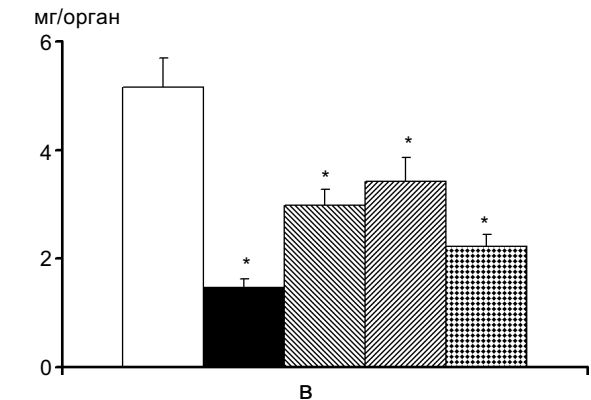
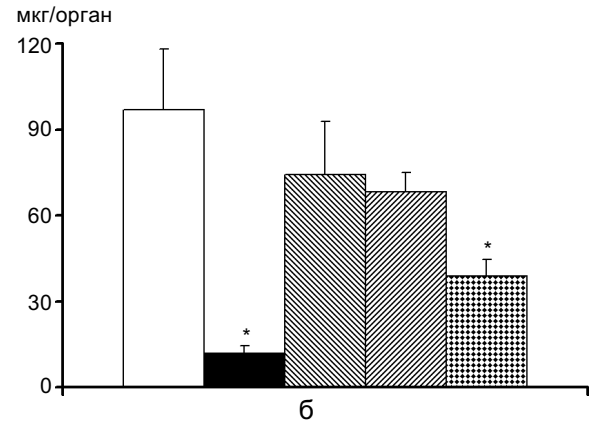
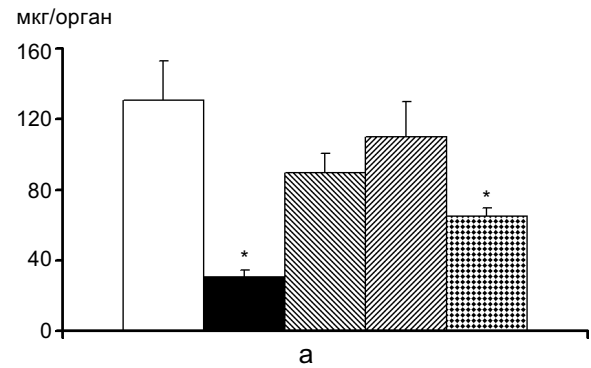


Рис. 2. Вплив ЕМАР II (0,1 мг/кг), флутаміду (10 мг/кг) та їх комбінації на вміст ДНК (а), РНК (б) і білка (в) у стимульованій тестостерону пропіонатом (ТП; 0,2 мг/кг) вентральній простаті кастрованих щурів: 1 – контроль (кастрація і ТП); 2 – кастрація; 3 – кастрація, ТП і флутамід; 4 – кастрація, ТП, і ЕМАР II; 5 – кастрація, ТП, флутамід і ЕМАР II. * різниця достовірна (P<0,05) у порівнянні з контрольною групою

статевих залоз у порівнянні з кастрованими щурами, яким робили ін'єкцію ТП у такій самій дозі. Однак спостерігався чіткий прозапальний ефект препарату, про що свідчить масовий вихід лейкоцитарних і гістіоцитарних елементів у строму ВП (рис. 4,а). Виявлялися локальні ділянки з дуже високою їх кількістю. Водночас ушкоджувались окремі ендотеліальні клітини в капілярах навколо ацинусів, в них спостерігали пікноз ядер і пристінкове розташування хроматину в набухлих ядрах.

У кастрованих щурів повністю відновлювалася маса додаткових статевих залоз при використанні ТП в дозі 0,2 мг/кг (див. таблицю). Гістологічна будова ВП наближалася до такої у інтактних щурів – значно зростав розмір залоз, епітелій у більшості з них був високим циліндричним (див. рис. 3,а).

Застосування ЕМАР II в дозі 0,1 мг/кг на тлі замісної терапії ТП в дозі 0,2 мг/кг призводило до зменшення маси ВП на 30 % в порівнянні з групою тварин, що одержували лише ТП у такій самій дозі (див.

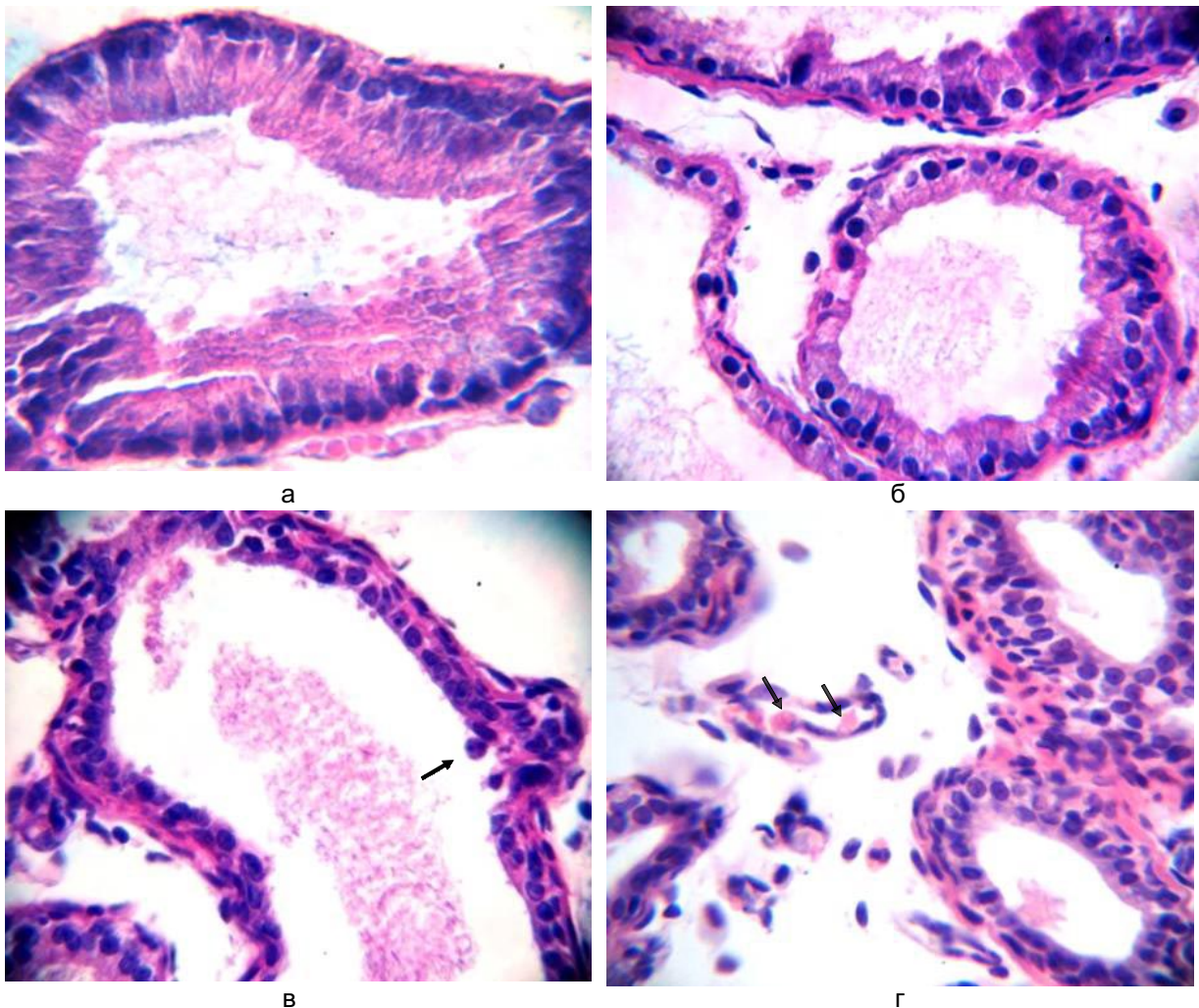


Рис. 3. Прокоагулянтні та антипроліферативні ефекти ЕМАР II, флутаміду та їх комбінації при 6-добовому застосуванні у стимульованій тестостерону пропіонатом (ТП) простаті кастрованих щурів: а – ТП (0,2 мг/кг); б – ЕМАР II (0,1 мг/кг); атрофія і деструкція епітелію; в – флутамід (10 мг/кг); атрофія епітелію, апоптотичне тільце (стрілка); г – ТП, флутамід і ЕМАР II; атрофія ацинусів, агрегація еритроцитів у венулі (стрілки), гістіоцитарні елементи у стромі. Об. х40. Гематоксилін-Шифф

таблицю) та до порушення відновлення будови ВП. У деяких залозах епітелій був кубічний, в порожнині інших знаходили десквамовані клітини, спостерігали дегенеративні зміни частини епітеліальних клітин ВП, тромбоз у кровоносних судинах (див. рис. 3,б, 4,б). Аналогічні атрофічні та деструктивні зміни епітелію ВП, тільки сильніше виражені, виявлялися при введенні шурам флутаміду (див. рис. 3,в). Застосування флутаміду в дозі 10 мг/кг на тлі замісної терапії ТП у дозі 0,2 мг/кг зумовило зменшення маси ВП на 50 %, КЗ – на 56 %, СП – на 66 % у порівнянні з контрольними тваринами, які одержували лише ТП в цій самій дозі, що свідчить про виражений антипростатичний ефект препарату. Під впливом флутаміду чи ЕМАР II у кастрованих тварин на тлі замісної терапії ТП (0,2 мг/кг) вірогідно зменшувався вміст білка щодо значень у кастрованих тварин, котрі одержували лише ТП (у 1,7 та 1,5 раза відповідно; див. рис. 2).

Зазначені ефекти посилювалися при поєднаному застосуванні флутаміду і ЕМАР II. Маса ВП зменшувалася на 64 %, КЗ –

на 69 % і СП – на 69 % порівняно з масою додаткових статевих залоз кастрованих шурів, що одержували ТП в дозі 0,2 мг/кг (див. таблицю). Комбіноване застосування препаратів спричиняло вірогідне зменшення вмісту ДНК, РНК і білка в порівнянні з кастрованими тваринами, яким вводили лише ТП (див. рис. 2). Однак ефекти комбінованого застосування флутаміду і ЕМАР II були слабшими за посткастраційні. Вміст нуклеїнових кислот і білка у ВП тварин, що отримували обидва препарати, був вірогідно нижчим щодо значень у шурів, котрим вводили лише ЕМАР II, і спостерігалася тенденція до зниження в порівнянні з тваринами, яким давали лише флутамід.

Комбіноване застосування ЕМАР II з флутамідом перешкоджало відновленню будови ВП кастрованих шурів, які отримували ТП (0,2 мг/кг): майже на всій ділянці залоз епітелій був кубічним, значна частина залоз залишалися дрібними і мала трубкоподібну форму. У деяких тварин будова ВП була майже такою, як у кастрованих тварин, у інших – антиандрогенна дія

Маса додаткових статевих залоз шурів (мг/100 г) при застосуванні ЕМАР II (0,1 мг/кг), флутаміду (10 мг/кг) або їх комбінацій (M±m)

Умови дослідження, група тварин	Вентральна простата	Коагулююча залоза	Сім'яні пухирці
Контроль, інтактний (група 1, n = 22)	45,73±3,64	11,18±1,19	22,92±3,35
Контроль, кастрація (група 2, n = 19)	10,07±0,86 ¹	4,24±0,40 ¹	8,26±0,63 ¹
Кастрація, тестостерону пропіонат, 0,1 мг/кг (група 3, n = 5)	28,96±2,52 ^{1,2}	11,46±0,62 ²	28,21±2,12 ²
Кастрація, тестостерону пропіонат, 0,2 мг/кг (група 4, n = 5)	46,49±9,25 ²	11,96±0,82 ²	31,76±2,22 ^{1,2}
Кастрація, тестостерону пропіонат, 0,1 мг/кг і ЕМАР II, 0,05 мг/кг (група 5, n = 6)	28,04±3,40 ^{1,2}	14,44±1,82 ²	24,81±1,22 ²
Кастрація, тестостерону пропіонат, 0,2 мг/кг і ЕМАР II, 0,1 мг/кг (група 6, n = 5)	31,95±2,46 ^{1,2}	9,56±0,62 ^{2,4}	27,57±0,17 ²
Кастрація, тестостерону пропіонат, 0,2 мг/кг і флутамід, 10 мг/кг (група 7, n = 5)	22,99±1,83 ^{1,2,4}	5,25±0,78 ^{1,4}	10,77±1,12 ^{1,4}
Кастрація, тестостерону пропіонат, 0,2 мг/кг, ЕМАР II, 0,1 мг/кг і флутамід, 10 мг/кг (група 8, n = 5)	16,99±2,16 ^{1,2,4,6,7}	3,70±0,32 ^{1,4,6}	10,12±0,49 ^{1,2,4,6}

Примітка: Різниця вірогідна (P<0,05) в порівнянні з групами 1, 2, 3, 4, 6 і 7 відповідно.

вказаної комбінації була слабшою. У цих тварин спостерігалася гетерогенність будови ВП: частина залоз мала невеликі розміри, трубкоподібну форму і кубічний епітелій, навколо них чітко виділялися міоцити (див. рис. 3,г). В таких ділянках у більшості навколоацинарних капілярів не знаходили еритроцитів; інші залози мали більші розміри, епітелій в них був кубічний і циліндричний, в деяких залозах десквамований. В епітелії часто знаходили типові апоптотичні тільця, епітеліальні клітини нерідко мали ознаки вакуольної дегенерації, спостерігалася макроапокрінова секреція. Тканинні базофіли були активовані, набряклі, з ознаками дегрануляції. В стромі знаходили помірну кількість лейкоцитів і гістіоцитарних клітин. У капілярах виявили агрегацію еритроцитів, що свідчить про прокоагуляційну активність ЕМАР II і порушення кровотоку в цих ділянках.

Відомо, що одним із шляхів антиангіогенної дії ЕМАР II є пригнічення експресії VEGF і його рецепторів [6]. У досліджах *in vitro* було показано, що преінкубація клітин

з ЕМАР II зменшує зв'язування VEGF з його рецепторами [6]. Як свідчать наші результати, ЕМАР II здатний протидіяти ангіогенним, проліферативним і антиапоптотичним ефектам тестостерону, а блокада андрогенних рецепторів флутамідом посилює антипростатичний ефект цитокіну в ВП шурів. Як відомо, флутамід діє прямо на андрогензалежні злоякісні клітини простати, викликаючи їх загибель, а також впливає на судини, зменшуючи кровообіг у андрогензалежних органах [15, 17].

Таким чином, результати експериментальних досліджень доводять здатність ЕМАР II і флутаміду гальмувати андрогензалежні процеси в передміхуровій залозі, впливати на процеси проліферації та апоптозу в нормальній тканині простати і мають бути враховані при розробці нових схем комбінованої фармакотерапії раку передміхурової залози.

ВИСНОВКИ

1. У вентральній частці передміхурової залози кастрованих шурів, стимульованих

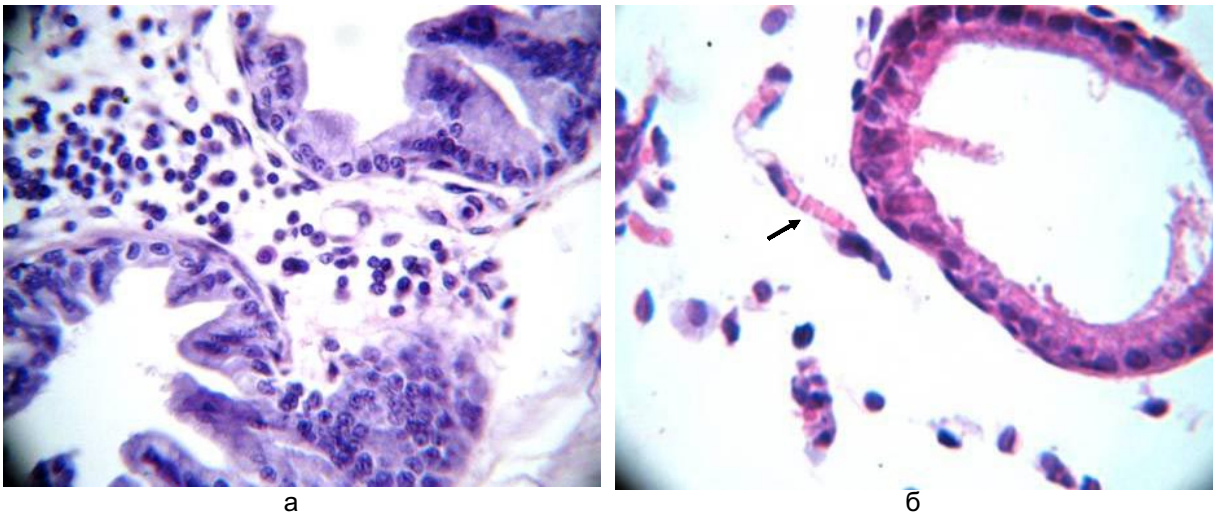


Рис. 4. Прозапальний та прокоагулянтний ефекти ЕМАР II у простаті кастрованих шурів, стимульованих тестостерону пропіонатом (ТП) при 6-добовому застосуванні: а – ЕМАР II (0,05 мг/кг) і ТП (0,1 мг/кг); масований вихід лейкоцитарних і гістіоцитарних елементів у строму вентральної простати. Об. х 40. Гематоксилін-еозин; б – ЕМАР II (0,1 мг/кг) і ТП (0,2 мг/кг); агрегація еритроцитів у капілярі (стрілка), значно менша інфільтрація стромі. Об. х 40. Гематоксилін-Шифф

ТП (2 мг/кг), ЕМАР II (0,05 та 0,1 мг/кг) проявляє антиангіогенні, прокоагуляційні та антипроліферативні ефекти через 3 доби введення препарату. Ці ефекти посилювалися при поєднаному застосуванні ЕМАР II і флутаміду, що підтверджується результатами гістологічного дослідження.

2. При 6-добовому застосуванні ЕМАР II (0,1 мг/кг) на фоні замісної гормонотерапії ТП (0,2 мг/кг) зменшувалася маса вентральної частки передміхурової залози (на 30 %), вміст білка, спостерігались атрофічні та деструктивні зміни епітелію простати.

3. Ефекти комбінованого 6-добового застосування ЕМАР II (0,1 мг/кг) та флутаміду у простаті кастрованих щурів, стимульованих ТП (0,2 мг/кг), були значно виразнішими і виявлялись у зменшенні маси додаткових статевих залоз, вмісту ДНК, РНК і білка, а також посиленні атрофічних змін епітелію та порушенні кровотоку в передміхуровій залозі, що свідчить про сумарну дію препаратів.

**А.Г. Резников, Л.В. Чайковская,
Л.И. Полякова, О.В. Сачинская**

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОПОДОБНОГО ПОЛИПЕПТИДА ЕМАР II И ФЛУТАМИДА НА ПРЕДСТАТЕЛЬНУЮ ЖЕЛЕЗУ КАСТРИРОВАННЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ ТЕСТОСТЕРОНОМ

Изучали влияние раздельного и сочетанного применения цитокиноподобного полипептида ЕМАР II и нестероидного антиандрогена флутамида на морфофункциональное состояние добавочных половых желез кастрированных неполовозрелых самцов крыс, стимулированных тестостерона пропионатом. Обнаружены антиангиогенные, прокоагулянтные и проапоптотические эффекты ЕМАР II в вентральной простате. Комбинированное применение препаратов приводило к усилению антипростатических эффектов. Они способны тормозить андрогензависимые процессы в ткани предстательной железы, влиять на процессы пролиферации и апоптоза, содержание ДНК, РНК и белка. Комбинированное применение ЕМАР II и флутамида может быть полезно при разработке новых схем терапии рака простаты.

Ключевые слова: ЕМАР II, флутамид, апоптоз, пролиферация, предстательная железа крыс, кастрация, тестостерона пропионат.

**A.Reznikov, L.Chaykovskaya, L.Polyakova,
O.Sachynska**

EFFECTS OF CYTOKINE-LIKE POLYPEPTIDE EMAP II AND FLUTAMIDE ON TESTOSTERONE-STIMULATED PROSTATE OF CASTRATED RATS

The effects of separate and combined administration of cytokine-like polypeptide EMAP II and flutamide, a non-steroid antiandrogen, on morphology and function of the accessory sexual glands in castrated rats stimulated with testosterone propionate were studied. We found antiangiogenic, procoagulating and proapoptotic effects of EMAP II in the ventral prostate. Combined administration of the preparations enhanced their antiprostatic effects, which were manifested in inhibition of the androgen-dependent processes in prostate tissues, changes in proliferation and apoptosis, DNA, RNA and protein contents. We conclude that combined administration of EMAP II and flutamide can be used for development of new therapeutic modalities in prostate cancer.

Key words: EMAP II, flutamide, apoptosis, proliferation, rat prostate, castration, testosterone propionate.

*V.Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism,
Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дубровский А.Л., Браун Дж., Корнелюк А.И. Бактериальная экспрессия полноразмерных и усеченных форм цитокина ЕМАР II и цитокиноподобного домена тирозил-тРНК-синтазы млекопитающих // Биополимеры и клетка. – 2000. – № 3. – С. 229–235.
2. Шаткин А. Колориметрические методы определения ДНК, РНК и белка // Методы вирусологии и молекулярной биологии / Ред. К. Хабель, М.П. Зальцман. – М.: Мир, 1972. – С. 84–89.
3. Alam S., McNeel D.G. DNA vaccines for the treatment of prostate cancer // Expert Rev Vaccines. – 2010. – № 7. – P. 731–745.
4. Antonarakis E.S., Carducci M.A., Eisenberger M.A. Novel targeted therapeutics for metastatic castration-resistant prostate cancer // Cancer Lett. – 2010. – № 291. – P. 1–13.
5. Aragon-Ching J.B., Dahut W.L. VEGF inhibitors and prostate cancer therapy // Curr Mol Pharmacol. – 2009. – № 2. – P. 161–168.
6. Awasthi N., Schwarz M.A., Verma V., Cappiello C., Schwarz R.E. Endothelial monocyte activating polypeptide II interferes with VEGF-induced proangiogenic signaling // Lab Invest. – 2009. – № 89. – P. 38–46.
7. Chen Y., Clegg N.J., Scher H.I. Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target // Lancet Oncol. – 2009. –

- 10, № 10. – P.981–991.
8. Folkman J. Is tissue mass regulated by vascular endothelial cells? Prostate as the first evidence // *Endocrinology*. – 1998. – **139**, № 2. – P. 441–442.
9. Franck-Lissbrant I., Ндggstrum S., Damber J.E., Bergh A. Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats // *Ibid.* – 1998. – **139**, № 2. – P. 451–456.
10. Ivakhno S. S., Kornelyuk A. I. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis // *Exper. Oncol.* – 2004. – **26**, № 4. – P. 250–255.
11. Kao J., Houck K., Fan Y., Haehnel I., Libutti S.K., Kayton M.L., Grikscheit T., Chabot J., Nowygrod R., Greenberg S. Characterization of a novel tumor-derived cytokine Endothelia-monocyte activating polypeptide II // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **9**, № 40. – P.25106–25119.
12. Kao J., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y.G., Godman G., Familletti P.C., Wang F., Pan Y.C. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumour-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // *Ibid.* – 1992. – **267**, № 28. – P. 20239–20247.
13. Li Y., Cozzi P.J. Angiogenesis as a strategic target for prostate cancer therapy // *Med Res Rev.* – 2010. – **30**, № 1. – P. 23–66.
14. Shibata Y., Kashiwagi B., Arai S., Fukabori Y., Suzuki K., Honma S., Yamanaka H. Direct regulation of prostate blood flow by vascular endothelial growth factor and its participation in the androgenic regulation of prostate blood flow in vivo // *Endocrinology*. – 2004. – **145**, № 10. – P. 4507–4512.
15. Shibata Y., Ono Y., Kashiwagi B., Suzuki K., Fukabori Y., Honma S., Yamanaka H. Hormonal and morphologic evaluation of the effects of antiandrogens on the blood supply of the rat prostate // *Urology*. – 2003. – **62**, № 5. – P. 942–946.
16. Reddy G.P., Barrack E.R., Dou Q.P., Menon M., Pelley R., Sarkar F.H., Sheng S. Regulatory processes affecting androgen receptor expression, stability, and function: potential targets to treat hormone-refractory prostate cancer // *J. Cell Biochem.* – 2006. – **98**, № 6. – P. 1408–1423.
17. Vozianov A., Reznikov A., Klimenko I. Androgen deprivation strategy in prostate cancer – Kyiv: Naukova Dumka, 2001. – 240 p.

*ДУ «Ін-т едокринології і обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України», Київ
E-mail : reprod@i.com.ua*

Матеріал надійшов до редакції 06.04.2011

І.А. Владимирова, І.Б. Філіппов, Є.М. Кулієва, А. Юркевич,
Р. Скрима, Н. Преварская, Я.М. Шуба

Порівняння дії ментолу та іциліну на викликані скорочення гладеньких м'язів сім'явивідної протоки нормальних і кастрованих щурів

Відомий екзогенний агоніст холододового рецептора TRPM8 ментол здатний пригнічувати KC1- і агоністактивовані скорочення гладеньких м'язів сім'явивідної протоки (vas deferens) щура. Щоб визначити залучення в ці ефекти саме TRPM8 порівняно вплив ментолу з дією більш TRPM8-специфічного агоніста іциліну на скорочення гладеньких м'язів простатної й епідидимальної ділянок vas deferens нормальних і кастрованих (60–137 діб) щурів, викликаних KC1 та дією агоністів М-холіно- та α-адренорецепторів карбахоліном (КХ) й норадреналіном (НА), відповідно. Пригнічувальна дія ментолу й іциліну на KC1-індуковані скорочення простатної ділянки як нормальних, так і кастрованих щурів мало відрізнялась і становила приблизно 50 %. Водночас кастрація призводила до появи КХ- та НА-індукованих скорочень, які частково пригнічувалися цими сполуками. У епідидимальній ділянці vas deferens контрольних тварин ментол набагато сильніше пригнічував KC1- та КХ-викликані скорочення, ніж іцилін, тоді як після кастрації вплив обох сполук практично не було. Оскільки сумарний вплив ментолу на скорочення зумовлений відносним внеском трьох його можливих ефектів: блокуванням потенціалзалежних кальцієвих каналів (ПЗКК) L-типу, зниженням наповнення кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулума (СР) через активацію СР-резидентного TRPM8 та активацією входу кальцію через сарколемальний TRPM8, а іциліну тільки двома останніми, то наші результати свідчать, що в простатній ділянці vas deferens роль TRPM8 переважно зводиться до зменшення наповненості депо СР, а у епідидимальній – як до зменшення наповнюваності депо СР, так і до активації TRPM8-опосередкованого входу. Зниження циркулюючих андрогенів призводить до змін в ментол- та іцилінопосередкованій модуляції скорочень внаслідок зменшення експресії ПЗКК L-типу та збільшення експресії TRPM8. Ключові слова: vas deferens, гладенькі м'язи, TRPM8, ментол, іцилін, норадреналін, карбахолін, кастрація.

ВСТУП

В нашій попередній роботі було показано пригнічення викликаних скорочень м'язових смужок сім'явивідної протоки (vas deferens) щура ментолом [2], що, за даними літератури й результатами власних досліджень, було пояснено частковим блокуванням цією холодімітуючою сполукою надходження кальцію в гладеньком'язові клітини (ГМК) через потенціалзалежні кальцієві канали (ПЗКК) L-типу[9] та зниженням

кальційіндукованого вивільнення Ca^{2+} (CICR – від англ. calcium-induced calcium release) з депо саркоплазматического ретикулума (СР). Оскільки нами також була виявлена експресія в мембрані СР ГМК vas deferens холододового рецептора TRPM8 [1], який є кальційпроникним катіонним каналом, чутливим до ментолу, то його ефект, принаймні, частково пов'язаний з активацією ментолом СР-резидентного TRPM8. Наслідком цього буде збільшення пасивних

© І.А. Владимирова, І.Б. Філіппов, Є.М. Кулієва, А. Юркевич, Р. Скрима, Н. Преварская, Я.М. Шуба

втрата Ca^{2+} з депо, зниження його наповнюваності і, відповідно, зменшення кількості вивільненого Ca^{2+} в результаті CICR. Можливість експресії TRPM8 в мембрані CP і пов'язаний з цим його вплив на кальцієву сигналізацію були раніше продемонстровані на декількох типах клітин [12, 13]. Однак для більш обґрунтованих висновків щодо участі TRPM8 у модуляції скорочення vas deferens потрібне використання специфічних, порівняно з ментолом, інших його активаторів, наприклад, таких як іцилін.

Експресія TRPM8, принаймні, в такому андрогенчутливому органі, як простата залежить від наявності функціонального андрогенового рецептора (AR), тобто є андрогензалежною [4]. Vas deferens теж являє собою андрогензалежну тканину. Нами було показано зростання експресії мРНК як TRPM8, так і AR ГМК vas deferens при орхидектомії (кастрації) щурів порівняно з контролем [1]. З літературних джерел відомо, що після кастрації в мембрані ГМК vas deferens щурів спостерігається зменшення щільності дигідропіридинчутливих ПЗКК [5]. Отже, можна припустити, що зміна концентрації циркулюючих андрогенів у результаті кастрації позначиться на скорочувальних відповідях не тільки за участю ПЗКК L-типу, а й TRPM8, що дозволить краще зрозуміти роль останнього в модуляції скоротливої активності. Мета роботи – порівняти дію агоністів TRPM8-каналів селективного – іциліну та неспецифічного – ментолу на скорочення, викликаних гіперкалієвою деполяризацією (KCl) мембрани ГМК, або дією агоністів М-холіно- і α -адренорецепторів – карбахоліном (КХ) і норадреналіном (НА) гладеньких м'язів простатної та епідидимальної ділянок vas deferens щурів.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на м'язових смужках простатної і епідидимальної ділянок vas deferens самців нормальних (контроль) і кастрованих щурів 5–6-місяч-

ного віку. В дослідах використовували тварин на 60–137-ту добу після кастрації, яку проводили за загальноприйнятою методикою [14]. Приготування м'язових смужок (довжиною близько 10 мм) простатної та епідидимальної ділянок vas deferens і тензометричне вимірювання їх скоротливої активності не відрізнялись від описаних раніше [2]. Омиваючий розчин Кребса мав такий склад (ммоль/л): NaCl – 120,4, KCl – 5,9, NaHCO_3 – 15,5, Na_2PO_4 – 1,2, MgCl_2 – 1,2, глюкоза 11,5, CaCl_2 – 2,5; рН 7,3. Скоротливі реакції записували на жорсткий диск комп'ютера за допомогою програми pClamp 8 (Axon Instr., США) і паралельно на діаграмну стрічку самописця для подальшої обробки.

Аплікацію речовин проводили за допомогою їхнього додавання в певній концентрації до розчину Кребса, що омивав м'язові смужки. Ментол розводили в етанолі в базовій концентрації 100 ммоль/л, а іцилін – 10 ммоль/л і додавали до розчину Кребса до потрібної робочої концентрації. Всі реактиви від фірми “Sigma-Aldrich” (США).

Типовий експеримент починався записом контрольного скорочення у відповідь на 3-хвилинне прикладання гіперкалієвого розчину Кребса (KCl=60 ммоль/л, еквімолярна заміна NaCl), 4-хвилинне прикладання НА (10 мкмоль/л) або 4-хвилинне прикладання КХ (10 мкмоль/л). На 20-й хвилині відмивання препаратів нормальним розчином Кребса додавали іцилін (10 мкмоль/л) або ментол (100 мкмоль/л) і на 10-й хвилині їхньої дії знову реєстрували скорочення у відповідь на KCl або агоністи. Іцилін і ментол відмивали протягом 30 хв і потім проводили повторну аплікацію KCl або агоністів для визначення зворотності впливу холодимітуючих сполук на KCl- або агоністіндуковані скорочення. Якщо досліджувалися додаткові речовини, то їх прикладали протягом 20–30 хв до іциліну або ментолу, а потім разом з ними ще протягом 10 хв. Всі амплітуди скорочень нормували до контрольних значень, отриманих у відповідь на

гіперкалієву деполяризацію мембрани ГМК, НА або КХ до прикладання будь-якої з тестуючих речовин. Нормовані значення амплітуд скорочень, отримані в різних експериментах за однакових умов, усереднювали та наводили у вигляді діаграм (середнє значення \pm стандартна похибка).

РЕЗУЛЬТАТИ

Порівняння дії ментолу та іциліну на КС1-індуковані скорочення гладеньких м'язів vas deferens. Неспецифічний активатор TRPM8-каналів ментол пригнічував амплітуду КС1-індукованих скорочень м'язових смужок простатної ділянки vas deferens до $52\% \pm 4\%$ ($n=5$) від контролю, тоді як їх більш селективний агоніст іцилін виявився не таким ефективним, зменшуючи її до $63\% \pm 8\%$ ($n=12$; рис. 1,Б). В епідидимальній ділянці vas deferens різниця в пригнічуючій дії двох речовин на амплітуду скорочень, викликаних гіперкалієвою деполяризацією, була ще менше чутливішою: ментол її зменшував до $54\pm 5\%$ ($n=15$) від контролю, а іцилін – лише до $86\pm 4\%$ ($n=9$; див. рис. 1,Б).

Загальна пригнічувальна дія ментолу на КС1-індуковані скорочення може бути сумарним наслідком трьох його ефектів, описаних у літературі: 1) блокування потенціалзалежного входу кальцію через ПЗКК L-типу [11], 2) зменшення можливості вивільнення Ca^{2+} внаслідок CICR через активацію CP-резидентного TRPM8 та зростання TRPM8-опосередкованих пасивних втрат Ca^{2+} з депо [12], 3) активації сарколемального TRPM8 і збільшення входу кальцію через нього [7]. Оскільки для іциліну можливість блокування ПЗКК L-типу поки не описано, то виявлені відмінності в пригнічувальному впливі ментолу й іциліну на КС1-індуковані скорочення можуть бути пояснені особливостями дії цих сполук на ПЗКК L-типу. Той факт, що відсоткові співвідношення дії ментолу й іциліну в простатній та епідидимальній ділянках vas deferens відрізняються, свідчить про різний вне-

сок ПЗКК і TRPM8 в скорочення цих ділянок.

Порівняння дії ментолу та іциліну на агоністіндуковані скорочення гладеньких м'язів vas deferens. Оскільки у простатній ділянці vas deferens щура в нормі скорочувальні реакції на прикладання агоністів холіно- та адренорецепторів відсутні [3, 14], дослідження дії іциліну та ментолу на КХ- і НА-індуковані скорочення проводили виключно на препаратах епідидимальних ділянок.

КХ-викликані скорочення епідидимальної ділянки під впливом іциліну достовірно не відрізнялися – до $94\% \pm 7\%$ ($n=3$) від контролю, тоді як ментол їх зменшував до $68\pm 3\%$ ($n=6$; див. рис. 1,Б). Незначна пригнічувальна дія іциліну вказує або на незначну роль TRPM8-залежного зменшення наповнюваності депо CP ГМК в механізмі активації скорочення КХ, або на компенсацію зменшеної можливості вивільнення кальцію через TRPM8-опосередкований вхід. Водночас більша ефективність ментолу свідчить про те, що активація скорочення через M-холіноорецептори (згідно з літературними даними, vas deferens містить рецептори як M2-, так і M3-типу [8] супроводжується деполяризацією мембрани й надходженням кальцію через ПЗКК L-типу [16], які ментол здатний блокувати [11]. Це твердження добре узгоджується з виявленими нами відмінностями в дії іциліну та ментолу на скорочення цієї самої ділянки vas deferens, викликані гіперкалієвою деполяризацією, які за своєю природою майже повністю залежать від активації ПЗКК L-типу: ментол зменшував ці скорочення значно сильніше (до $54\% \pm 5\%$, $n=15$) ніж іцилін (до $86\% \pm 4\%$, $n=9$; рис. 1,Б).

Ицилін зменшував викликані НА скорочення гладеньких м'язів епідидимальної ділянки до $69\% \pm 5\%$ ($n=3$) від контролю, а ментол – до $61\% \pm 9\%$ ($n=6$); тобто відмінності в дії двох сполук виявилися статистично недостовірними (див. рис. 1,Б). Оскільки ментол здатний блокувати

потенціалзалежний вхід кальцію через ПЗКК L-типу [11], а іцилін ні, то це означає, що активація скорочення при дії НА майже цілком залежить від вивільнення кальцію з СР, наповнення якого зменшується внас-

лідок активації ментолом та іциліном СР-резидентного TRPM8.

Отже, різниця в пригнічувальній дії іциліну на КХ- і НА-викликані скорочення епідидимальної ділянки *vas deferens*, на

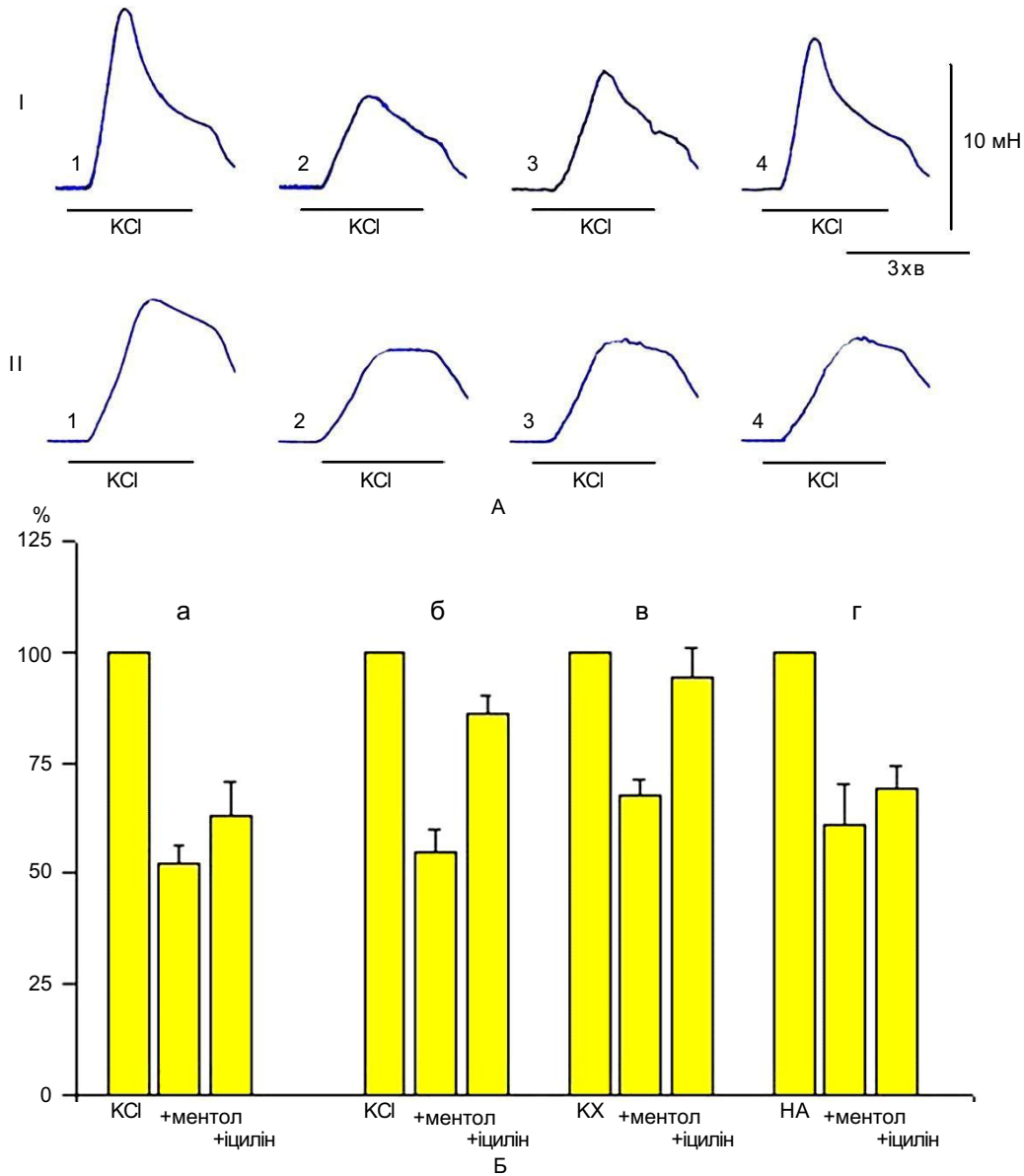


Рис. 1. Пригнічувальний вплив іциліну та ментолу на KCl- та агоністіндуковані скорочення гладеньких м'язів сім'явивідної протоки щура: А – оригінальні записи KCl-індукованих (60 ммоль/л KCl) скорочень м'язових смужок простатної (I) та епідидимальної (II) ділянок *vas deferens*: 1 – контроль, 2 – дія іциліну (10 мкмоль/л), 3, 4 – через 30 і 60 хв відмивання розчином Кребса, Б – діаграми відносних змін амплітуди KCl-індукованих скорочень простатної (а) та епідидимальної (б) ділянок *vas deferens* під впливом ментолу та іциліну; в, г – діаграми відносних змін амплітуди скорочень епідидимальної ділянки *vas deferens*, викликаних карбахоліном (КХ; 10 мкмоль/л, в) та норадреналіном (НА; 10 мкмоль/л, г) під впливом ментолу та іциліну

нашу думку, відображають відмінності в механізмах внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації при стимуляції α -адрено- і М-холінорецепторів і вказують на СР-резидентний TRPM8 як мішень дії цієї холодімітуючої сполуки. Активація СР-резидентного TRPM8 іциліном або ментолом призводить до збільшення пасивних втрат кальцію з СР, зменшення його наповнення і, відповідно, зниження кількості вивільненого кальцію при стимуляції α -адрено-рецепторів, як це передбачалося нами раніше [2]. У випадку з ментолом загальний ефект зумовлюється також блокуванням потенціалзалежного входу кальцію через ПЗКК L-типу. Нарешті, не виключено, що пригнічувальна дія ментолу принаймні частково може бути також зумовлена стимуляцією ним кальцієвої АТФази СР та посилення в результаті цього захоплення Ca^{2+} в СР [10].

Ефекти блокатора TRPM8-каналів капсазепіну на скорочення гладеньких м'язів vas deferens. Хоч специфічних блокаторів TRPM8 не існує, показано, що його функція може бути пригнічена капсазепіном [15], більше відомим як специфічний антагоніст TRPV1-каналів, що активуються високими температурами та капсаїцином. Прикладання капсазепіну (10 мкмоль/л) зменшувало КС1-викликане скорочення простатної ділянки vas deferens до $87\% \pm 7\%$ ($n=4$) порівняно з контролем (рис. 2,Г), що, очевидно, пояснюється здатністю капсазепіну блокувати не тільки TRPV1 і TRPM8, але й ПЗКК L-типу [6]. Однак слід зазначити, що в деяких експериментах капсазепін викликав збільшення (до 5–10 %) амплітуди КС1- і КХ-викликаних скорочень обох ділянок vas deferens. При сумісній дії капсазепіну й іциліну КС1-викликані скорочення цієї ділянки завжди блокувалися повністю. Повне блокування скорочення спостерігалось також у разі комбінації капсазепіну з ментолом (див. рис. 2,Г). Отже, всупереч очікуванням, капсазепін не тільки не усував пригні-

чувальну дію ментолу й іциліну на КС1-викликані скорочення простатної ділянки, як можна було б припустити, виходячи з того факту, що він є блокатором TRPM8, а навпаки, посилював цю дію. Пояснень цьому спостереженню можна висунути принаймні два. По-перше, може бути синергізм у блокувальній дії капсазепіну й ментолу (можливо, й іциліну) на ПЗКК L-типу, по-друге, капсазепін може не блокувати, а потенціювати ретикулярну ізоформу TRPM8, що є вкороченим сплайс-варіантом повнорозмірної, плазмолемальної ізоформи каналу [4], оскільки блокувальна дія капсазепіну була показана тільки для останньої.

Капсазепін сам по собі зменшував амплітуду КС1-викликаних скорочень також і епідидимальної ділянки vas deferens, однак це зменшення було не на стільки вираженим (до $92\% \pm 7\%$, $n=4$), як у простатній (до $87\% \pm 7\%$, $n=4$; див. рис. 2,Г). За наявності капсазепіну пригнічувальна дія як іциліну (до $62\% \pm 7\%$), так і ментолу (до $18\% \pm 9\%$) на амплітуду КС1-викликаних скорочень посилювалася порівняно з експериментами, коли використовували лише ці холодімітуючі сполуки (до 86 ± 4 і $54 \pm 5\%$ відповідно; див. рис. 1,Б).

КХ-викликане скорочення епідидимальної ділянки під впливом капсазепіну практично не змінювалося й становило $98\% \pm 4\%$ порівняно з контролем (див. рис. 2,В,Г). Однак при спільній дії капсазепіну й іциліну це скорочення зменшувалося до $49\% \pm 4\%$, тоді як один іцилін на нього статистично достовірно не впливав ($94\% \pm 7\%$, див. рис. 1,Б). Пригнічувальна дія ментолу на КХ-викликане скорочення за наявності капсазепіну також суттєво збільшувалася (до $13\% \pm 3\%$; див. рис. 2,В,Г) порівняно з дією одного ментолу (до $68\% \pm 3\%$; див. рис. 1,Б).

З огляду на наш попередній висновок про ключову роль ПЗКК-опосередкованого входу кальцію в механізмі активації скорочення епідидимальної ділянки vas deferens як гіперкалієвою деполяризацією, так і КХ,

якісний збіг результатів сумісного впливу капсазепіну з іциліном або ментолом на ці скорочення підтверджує припущення про те, що капсазепін, очевидно, має набагато складнішу фармакологічну дію. Крім TRPV1 і TRPM8, він включає також блокування ПЗКК L-типу і синергізм у дії з іциліном і, особливо, з ментолом. Не виключена також можливість відмінної дії капсазепіну на ретикулярну та плазмалемальну ізоформи TRPM8.

Вплив ментолу та іциліну на KCl- і агоністіндуковані скорочення гладеньких м'язів vas deferens кастрованих тварин. Результати попередніх [14] і проведених досліджень свідчать, що кастрація призво-

дить до набуття простатною ділянкою vas deferens щура здатності скорочуватись у відповідь на прикладання агоністів (рис. 3, А, Б), у той час як в епідидимальній ділянці амплітуда скорочувальних відповідей зменшується порівняно з контролем (рис. 4, А). Ці зміни пояснювалися регіональними особливостями у регуляції андрогенами молекулярних механізмів кальцієвої сигналізації по довжині vas deferens.

В наших попередніх дослідженнях було показано, що після кастрації у гладеньких м'язах vas deferens щурів збільшується експресія мРНК як TRPM8, так і андрогенового рецептора [1]. У зв'язку з цим можна припустити, що кастрація мала б

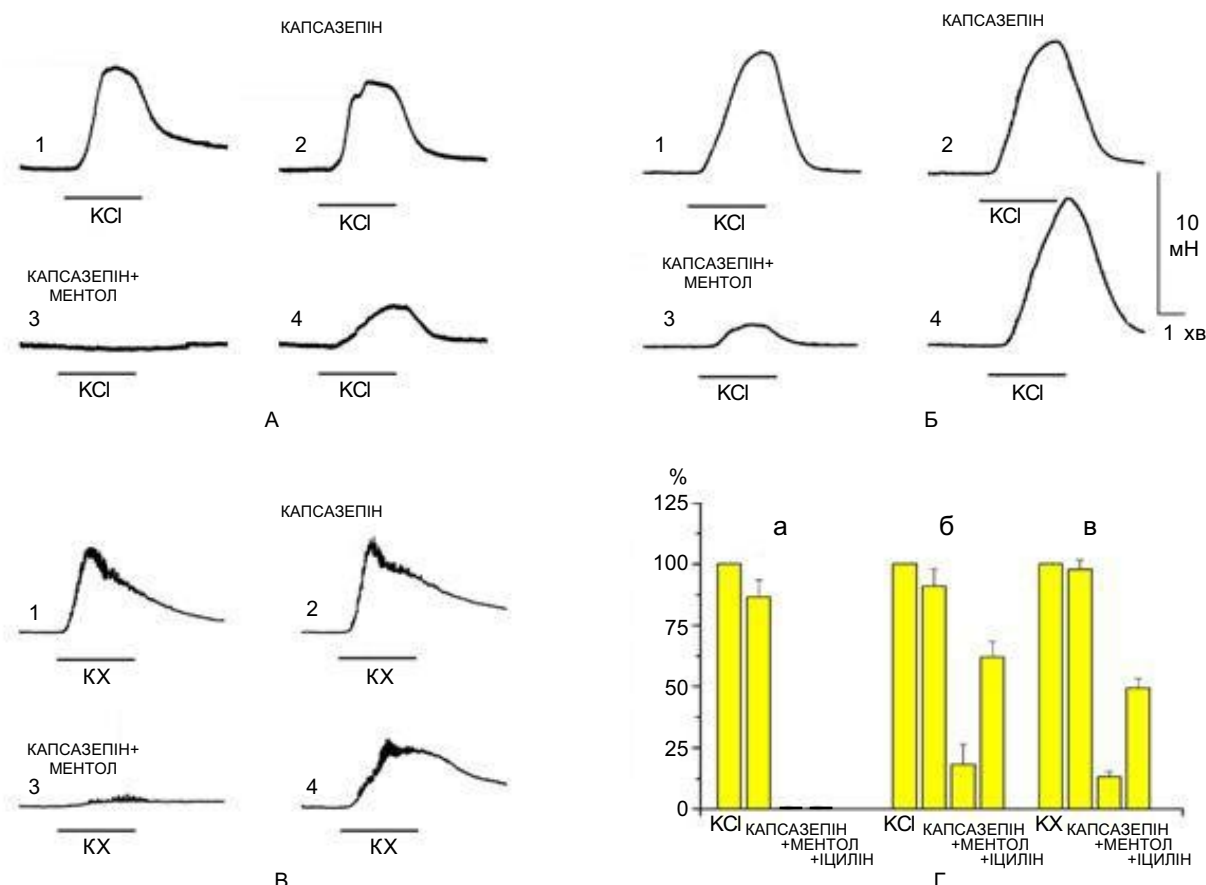


Рис. 2. Посилення пригнічувальної дії ментолу та іциліну на KCl- та агоністіндуковані скорочення гладеньких м'язів сім'явидної протоки (vas deferens) щура під впливом капсазепіну. Представлені криві (А, Б, В) та діаграми (Г) змін амплітуди скорочень простатної (А; Г,а) та епідидимальної (Б, В; Г,б,в) ділянок vas deferens, викликаних гіперкалієвою (60 ммоль/л KCl) деполаризацією (А, Б; Г,а,б) та карбахоліном (КХ; 10 мкмоль/л, В, Г,в) за наявності капсазепіну (10 мкмоль/л) і дії капсазепіну з ментолом (100 мкмоль/л) або іциліном (10 мкмоль/л). 1- контроль, 2 - дія капсазепіну, 3 - сумісна дія капсазепіну та ментолу, 4 - 30-та хвилина відмивання нормальним розчином Кребса

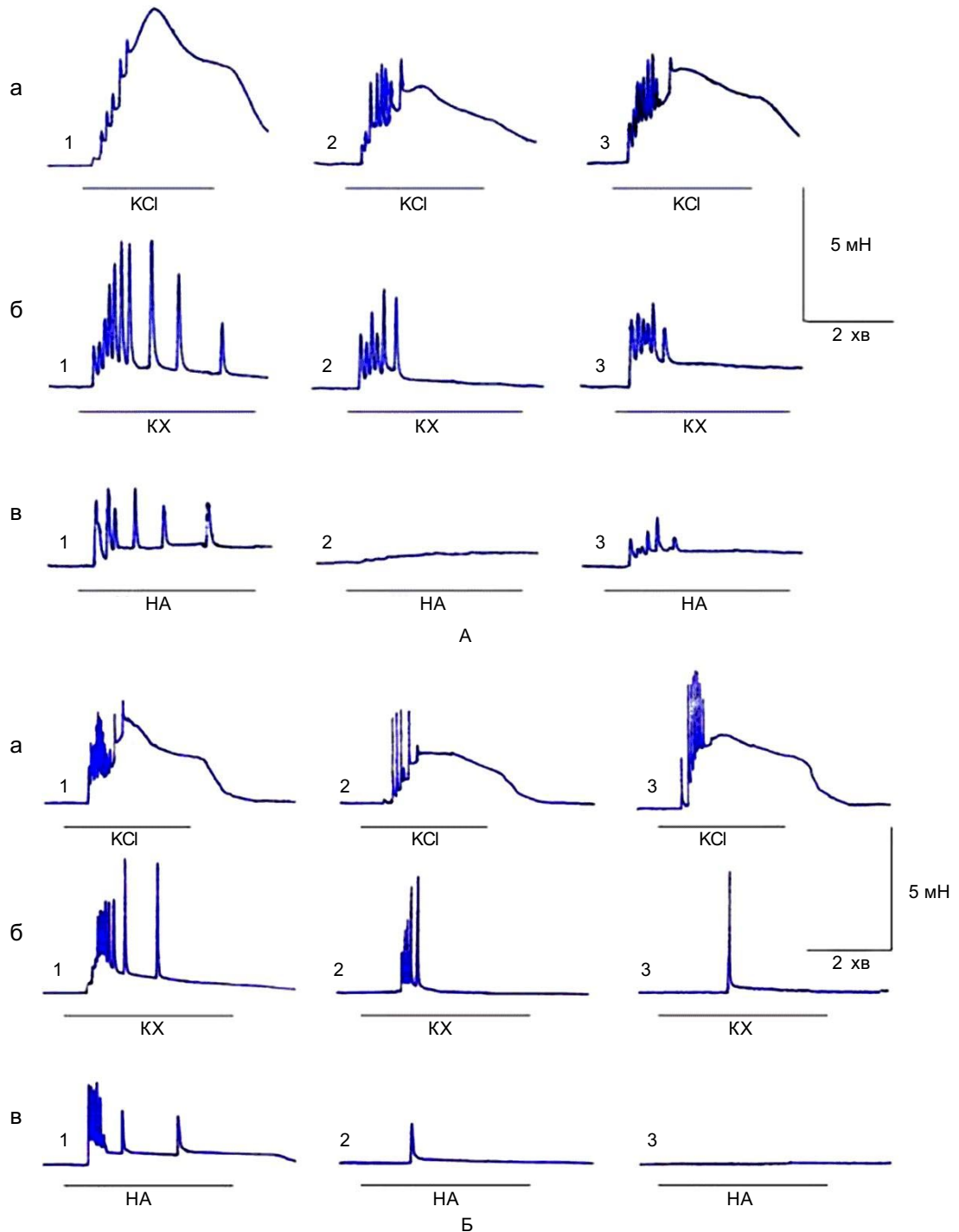


Рис. 3. Вплив ментолу та іциліну на викликані скорочення простатної ділянки сім'явидної протоки (vas deferens) кастрованих щурів. А, Б: приклади оригінальних записів KCl- (а), карбахоліном (КХ, б) та норадреналіном (НА, в) індукованих скорочень м'язових смужок простатної ділянки vas deferens щура на 92-гу (А) та 127-му (Б) добу після кастрації за контрольних умов (1), на 10-й хвилині дії ментолу (А, 2) або іциліну (Б, 2) та через 30 хв відмивання нормальним розчином Кребса (3)

позначитися також і на ефективності модуляції іциліном і ментолом скоротливих відповідей.

Так, у кастрованих тварин під впливом ментолу амплітуда фазного і тонічного компонентів KCl-індукованих скорочень простатної ділянки зменшувалася до $58\% \pm 6\%$ ($n=10$), а іциліну – до $57\% \pm 13\%$ ($n=10$), тоді як у контролі відповідні

значення становили 52 ± 4 і $63\% \pm 8\%$. Слід зазначити, що частота та кількість осциляцій KCl- та агоністіндукованих скорочень під впливом ментолу та іциліну також зменшувалася (див. рис. 3, А, Б). Отже, показане раніше збільшення експресії мРНК TRPM8-каналів в гладеньких м'язах *vas deferens* внаслідок кастрації [1] помітно не позначається на пригніченні

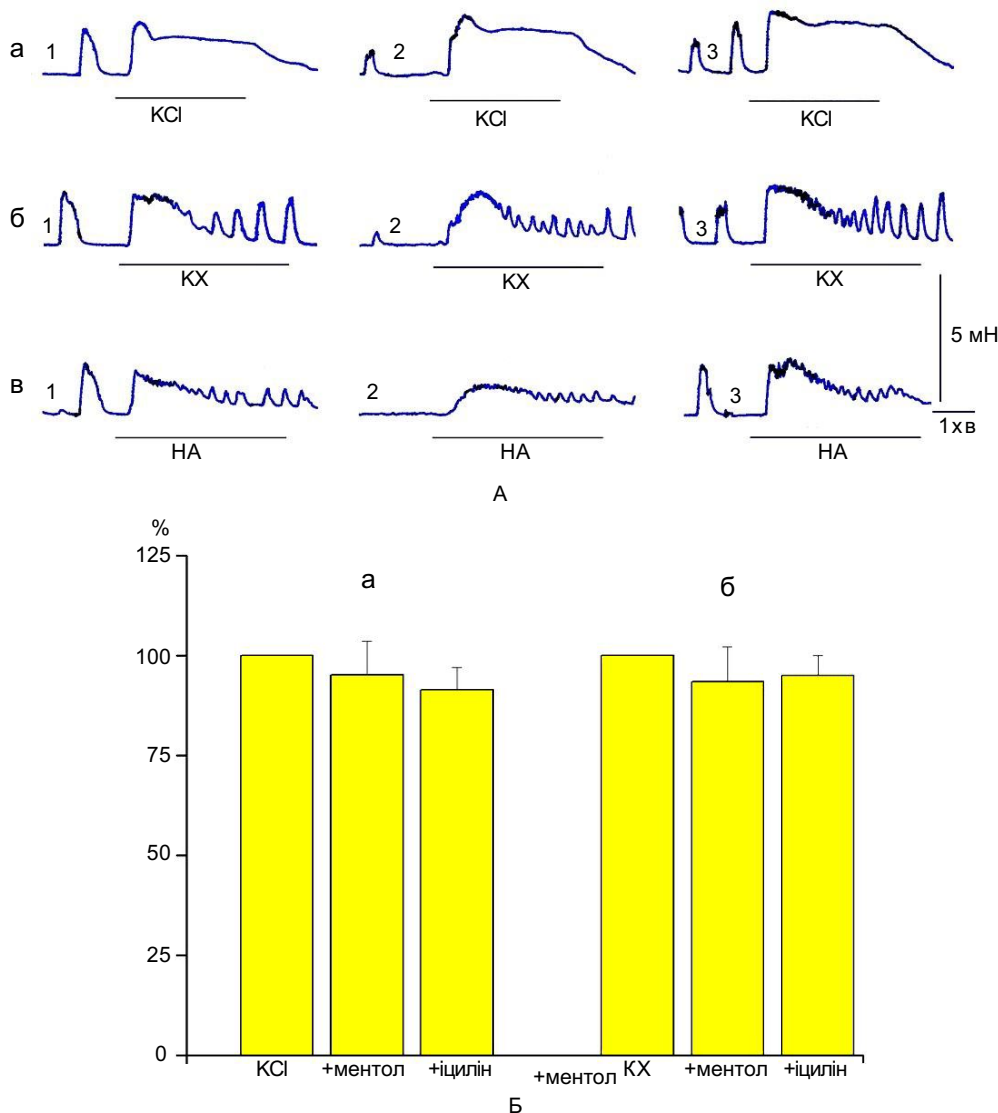


Рис. 4. Вплив ментолу та іциліну на викликані скорочення епідидимальної ділянки сім'явидної протоки (*vas deferens*) кастрованих щурів. А: оригінальні записи KCl (а) карбахоліном (КХ, б) і норадреналіном (НА, в) індукованих скорочень м'язових смужок епідидимальної ділянки *vas deferens* щура на 92-гу добу після кастрації за контрольних умов (1), на 10-й хвилині дії ментолу (2) та через 30 хвилин відмивання нормальним розчином Кребса (3); Б: діаграми, що ілюструють статистичну недостовірність змін амплітуд KCl- (а) та КХ- (б) індукованих скорочень м'язових смужок епідидимальної ділянки кастрованих щурів (60–137-ма доба, $n=10$) під дією ментолу, або іциліну

скорочень, викликаних гіперкалієвою деполаризацією, TRPM8 агоністами – іциліном і ментолом. Останнє може бути пов'язане з тим, що за умов значного зниження вмісту циркулюючих андрогенів новоекспресовані TRPM8-канали або є нефункціональними сплайс-варіантами, або порушується процес їх нормального мембранного транспорту й складання у функціональні тетрамери.

Під впливом ментолу КХ-індуковані скорочення простатної ділянки *vas deferens* зменшувалися, в той самий час НА-індуковані скорочення пригнічувалися цими агентами більш ефективно (див. рис. 3,Б).

В епідидимальній ділянці *vas deferens* кастрованих тварин, на відміну від простатної, пригнічувальна дія ментолу або іциліну на амплітуду викликаних скорочень практично усувалася (див. рис. 4,А,Б). Так, ментол зменшував скорочення у відповідь на гіперкалієву деполаризацію лише до $95 \pm 8 \%$ ($n=9$), а іцилін – до $91 \pm 6 \%$ ($n=12$; див. рис. 4,Б), тоді як у контрольній групі тварин відповідні значення становили $54 \pm 5 \%$ ($n=15$) і $86 \pm 4 \%$ ($n=9$; див. рис. 1,Б). Після кастрації амплітуда КХ-індукованих скорочень гладеньких м'язів епідидимальної ділянки під впливом ментолу та іциліну змінювалася лише до $93 \pm 9 \%$ ($n=5$) і $95 \pm 5 \%$ ($n=6$) відповідно (див. рис. 4,Б). Нагадаємо, що для контрольної групи тварин пригнічення ментолом було значно більшим (до $68 \pm 3 \%$, $n=6$), тоді як іцилін і в цьому разі помітною ефективністю не відзначався (до $94 \pm 7 \%$ ($n=3$); див. рис. 1,Б). Ментол та іцилін зменшували частоту й амплітуду спонтанних скорочень, причому цей вплив був повністю зворотнім (див. рис. 4,А).

Той факт, що кастрація призводила до переважного усунення дії ментолу, мало змінюючи вплив іциліну на амплітуду КСІ- і КХ-індукованих скорочень епідидимальної ділянки добре узгоджується з показаним раніше зниженням щільності дигідропіридинових рецепторів гладеньких м'язів *vas deferens* у таких щурів [5].

Очевидно, що таке зниження відображає реальне зменшення кількості функціональних ПЗКК L-типу, вхід Ca^{2+} через які є ключовим у КСІ- і КХ-індукованих скороченнях і які є мішенню блокувальної дії ментолу, але не іциліну. Але це припущення мало узгоджується з отриманими нами даними, які свідчать про підвищення ефективності дії НА та КХ на гладенькі м'язи простатної ділянки *vas deferens* щурів після кастрації.

ОБГОВОРЕННЯ

Ефективність іциліну в модуляції КСІ- і агоніствикликаних скорочень різних ділянок *vas deferens* щурів безумовно свідчить про залучення холододового рецептора TRPM8, для якого іцилін є специфічним агоністом у механізмі кальцієвої сигналізації, задіяній у активації цих скорочень. Таким чином отримані результати доводять, що експресія TRPM8, виявлена нами раніше у гладеньких м'язах *vas deferens* як на рівні мРНК, так і білка [1], має функціональне значення. Однак той факт, що поряд з переважною локалізацією TRPM8 білка в мембрані СР ГМК *vas deferens* він також може бути наявний і в сарколемі [1], що досить ускладнює інтерпретацію отриманих результатів. Дійсно, функціональним проявом активації СР-резидентного TRPM8 іциліном будуть збільшені пасивні втрати Ca^{2+} з СР і, відповідно, зменшене його вивільнення у відповідь на зовнішні стимули, які активують скорочення посередньо мобілізації депонованого кальцію. Результатом цього буде зменшення амплітуди викликаних скорочень, що нами і спостерігалось у більшості випадків. Якщо ж одночасно відбувається активація іциліном також і сарколемального TRPM8, то TRPM8-опосередкований вхід кальцію буде компенсувати зменшення його вивільнення і пригнічувальна дія іциліну на викликані скорочення буде зменшуватися. Таким чином, залежно від співвідношення СР-

резидентного та сарколемального TRPM8 так від того, наскільки стимул, який активує скорочення, задіює депонований кальцій модульовальний вплив іциліну на амплітуду викликаних скорочень, теоретично може коливатися в широких межах – від пригнічення до потенціації.

Дещо полегшити ситуацію з інтерпретацією результатів допомогло використання поряд із іциліном і ментолу, який, крім того, що він є агоністом TRPM8, проявляє також здатність блокувати ПЗКК L-типу [11]. При цьому схожість пригнічувальної дії ментолу та іциліну на амплітуду викликаних скорочень указує на незначне значення ПЗКК-опосередкованого входу кальцію та вагому роль його мобілізації в механізмі активації скорочень. Подібна ситуація спостерігається, наприклад, у випадку KCl-індукованого скорочення простатної та HA-індукованого скорочення епідидимальної (див. рис. 1,Б) ділянок *vas deferens*, пригнічення яких ментолом і іциліном, очевидно, відбувається внаслідок активації CP-резидентного TRPM8 та зменшення в результаті цього можливості вивільнення депонованого кальцію. Однак, якщо HA-індуковане скорочення епідидимальної ділянки може взагалі не вимагати змін мембранного потенціалу та залучення потенціалзалежного входу кальцію, то скорочення простатної ділянки, викликане гіперкалієвою деполяризацією, за своєю природою залежить від ПЗКК-опосередкованого входу. Тому для пояснення схожості пригнічувального впливу ментолу та іциліну на KCl-індуковане скорочення простатної ділянки доводиться також припустити великий коефіцієнт ампліфікації між потенціалзалежним входом та вивільненням Ca^{2+} при SICR, за якого навіть незначний вхід спричиняє потужне вивільнення.

На нашу думку, потенціація капсазепіном пригнічувальної дії ментолу та іциліну на KCl-індуковане скорочення

простатної ділянки (див. рис. 2) зумовлена як його синергізмом з ментолом (і, можливо, з іциліном) у блокуванні ПЗКК L-типу, так і стимуляцією (а не блокуванням) ним ретикулярної ізоформи TRPM8.

У тих же випадках, коли пригнічувальний вплив ментолу на викликані скорочення помітно перевищував вплив іциліну, – а це насамперед KCl- та KX-індуковане (див. рис. 1,Б) скорочення епідидимальної ділянки – доводиться припустити суттєву роль ПЗКК-опосередкованого входу кальцію, який блокується ментолом, але не іциліном в механізмі їх активації, а також наявність функціонального сарколемального TRPM8. Дійсно, активація тим же іциліном сарколемального TRPM8 буде мати протилежну спрямованість дії на амплітуду скорочень порівняно з активацією CP-резидентного TRPM8, тим самим зменшуючи результуючий пригнічувальний ефект іциліну аж до його зникнення або реверсії. Можливість локалізації білка TRPM8 не тільки в мембрані CP, а і у сарколемі ГМК *vas deferens* була нами показана імуноцитохімічними методами [1].

Нарешті, не виключено, що релаксуюча дія ментолу принаймні частково може бути також зумовлена стимуляцією ним кальцієвої АТФази CP (SERCA) та посилення в результаті цього захоплення Ca^{2+} в CP [10]. Можливість такої стимуляції була насамперед показана для жасмону (ефективні концентрації приблизно 10^{-4} моль/л), але при вищих концентраціях аналогічну дію може виявляти і ментол [10]. Для підтвердження чи спростування такого механізму потрібно проведення вимірювань цитоплазматичної та інтралюмінальної концентрації кальцію в ГМК.

Отже, наші результати, з одного боку, доводять залучення TRPM8 в модуляцію скорочень гладеньких м'язів *vas deferens*, а з другого – показують, що використання відомих фармакологічних засобів впливу на TRPM8 – ментолу, іциліну, капсазепіну

через множинність своїх дій дуже ускладнює інтерпретацію результатів. Наші результати також підтверджують зроблені раніше висновки щодо відмінностей як у механізмах активації скорочення різними стимулами, так одним і тим самим стимулом у різних ділянках *vas deferens* [3]. Цікавим є вплив кастрації на модуляцію амплітуди викликаних скорочень холодимітуючими сполуками. Відомо, що в результаті кастрації простатна ділянка *vas deferens* щура набуває здатності скорочуватись у відповідь на прикладання агоністів, а епідидимальна, навпаки, – зменшує амплітуду своїх агоністіндукованих скорочень [14]. Кастрація також знижує щільність дигідропіридинових рецепторів у *vas deferens* щура [5] та підвищення експресії мРНК TRPM8 [1]. При цьому, як показали наші експерименти, якісні та кількісні характеристики пригнічення КС1-індукованих скорочень простатної ділянки ментолом та іциліном не змінювалися порівняно з контролем. Більше того, характеристики пригнічення ментолом та іциліном КХ- та НА-індукованих скорочень, які стали можливими в результаті кастрації, мало відрізнялися від того, що спостерігалось для КС1-індукованих (див. рис. 3). Ці дані, з одного боку, підтвердили наш висновок про незначну роль ПЗКК-опосередкованого входу кальцію в механізмі активації скорочень простатної ділянки (адже щільність дигідропіридинових рецепторів при кастрації зменшилась [5], а на різниці в дії ментолу і іциліну це не позначилось), а з другого, – показали, що підвищення вмісту мРНК TRPM8 при кастрації [1] не транслюється у збільшення експресії функціонального каналу (хоч сильніша пригнічувальна дія ментолу та іциліну на НА-індуковані скорочення порівняно із КС1- та КХ-індукованими (див. рис. 3) вказує, що таке збільшення може бути).

В епідидимальній ділянці кастрація практично усувала дію ментолу на амплі-

туду КС1- і КХ-індукованих скорочень до рівня іциліну, який і у контрольних тварин був малоефективним. Це може відображати як зменшення кількості функціональних ПЗКК L-типу (тобто дигідропіридинових рецепторів) при кастрації [5], так і ймовірно деяке підвищення експресії функціонального сарколемального TRPM8 [1].

**І.А. Владимирова, І.Б. Филиппов,
Е.М. Кулиева, А. Юркевич, Р. Скрима,
Н. Преварская, Я.М. Шуба**

СРАВНЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ МЕНТОЛА И ИСИЛИНА НА ВЫЗВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ СЕМЯВЫНОСЯЩЕГО КАНАЛА НОРМАЛЬНЫХ И КАСТРИРОВАННЫХ КРЫС

Исследовано влияние агонистов холодого рецептора TRPM8 ментола и исилина на сокращения гладких мышц (ГМ) простатного и эпидидимального участков семявыносящего протока (*vas deferens*) нормальных и орхидэктомированных (ОХ) в течение 60–120 сут крыс, вызванные гиперкалиевой деполяризацией (КС1), или приложением агонистов М-холино и α -адренорецепторов карбахолина (КХ) и норадrenalина (НА). В той или иной степени ментол и исилин угнетали все сократительные реакции ГМ *vas deferens*. Статистически достоверных отличий в угнетающем действии ментола и исилина на амплитуду КС1-вызванных сокращений ГМ простатного участка *vas deferens* контрольной группы животных (52 ± 4 и $63 \% \pm 8 \%$) и ОХ животных (58 ± 6 и $57 \% \pm 13 \%$) выявить не удалось. У контрольных животных КХ- и НА-вызванные сокращения в простатном участке практически отсутствовали, однако орхидэктомия приводила к их появлению. В ОХ животных как ментол, так и исилин уменьшали КХ-индуцированные сокращения простатного участка *vas deferens* примерно на половину – соответственно до 46 ± 15 и $47 \% \pm 19 \%$ от контроля, тогда как НА-индуцированные сокращения угнетались этими веществами более эффективно – соответственно до 22 ± 11 и $13 \% \pm 10 \%$ от контроля. Во всех случаях различия в действии ментола и исилина на ГМ простатного участка были статистически недостоверными. В эпидидимальном участке *vas deferens* животных контрольной группы ментол оказался более эффективным ингибитором сокращений по сравнению с исилином, снижая амплитуду КС1-, КХ- и НА-вызванных сокращений соответственно до 54 ± 5 , 70 ± 3 и $61 \% \pm 10 \%$ против 86 ± 4 , 94 ± 7 и $69 \% \pm 5 \%$ для исилина. Однако на этом участке, в отличие от простатного, орхидэктомия приводила к устранению угнетающего действия обеих веществ, в присутствии которых ответы

изменялись ститистически недостоверно до 91 % ± 95 % от контрольных значений. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что сокращения ГМ клеток (ГМК) *vas deferens*, вызванные как калиевой деполаризацией мембраны, так и агонистами холино- и адренорецепторов, могут модулироваться активацией TRPM8-каналов, а орхидэктомия и сопутствующее снижение уровня циркулирующих андрогенов, влияющие, как показано ранее, как на экспрессию, так и на функционирование TRPM8, достоверно не сказывается на эффективности угнетающего действия ментола и исилина в простатном участке, а в эпидидимальном, даже, приводит к его устранению.

Ключевые слова: *vas deferens*, гладкие мышцы, TRPM8, ментол, исилин, норадреналин, карбахолин, кастрация.

I.A. Vladimirova, I.B. Philippov, E.M. Kulieva, A. Jurkiewicz, R. Skryma, P. Prevarskaya, Y.M. Shuba

COMPARISON OF THE EFFECTS OF MENTHOL AND ILICIN ON THE KCL- AND AGONIST-INDUCED CONTRACTION OF THE SMOOTH MUSCLES STRIPS OF THE VAS DEFERENS OF NORMAL AND CASTRATED RATS

Non-specific TRPM8 agonist menthol was shown to inhibit voltage- and agonist-evoked contractions of the smooth muscle (SM) of rat *vas deferens*. Here we compared the action of menthol with the action of more specific TRPM8 agonist icilin on depolarization-(60 mM KCl), carbachol-(CCh) and noradrenalin-(Nor)-evoked contractions of the SM strips from the prostatic and epididymal portions of the *vas deferens* of normal and castrated (60-137 days) rats. Inhibitory action of menthol (100 μM) and icilin (10 μM) on the amplitude of KCl-, CCh- and Nor-induced contractions of normal as well as castrated rats was similar consisting about 50%, despite castration per se strongly potentiated CCh- and Nor-evoked contractions compared to the control animals. In the epididymal portion of the control animals menthol suppressed KCl- and CCh-evoked contractions by 46±5% and 32±3% and icilin by only 14±4% and 6±7%, respectively, whilst after castration both compounds became virtually ineffective. Considering that TRPM8 may localize in the sarcolemma and sarcoplasmic reticulum (SR) membrane and that menthol can also block voltage-gated calcium channels (VGCCs), our data indicate that in the prostatic portion TRPM8 modulates contractility by primarily decreasing the SR Ca²⁺ stores content, whilst in the epididymal one by both decreasing the SR filling and supporting Ca²⁺ entry. Drop in the circulation androgens as a result of castration changes the menthol- and icilin-mediated modulation of the rat *vas deferens* SM contractility via the decrease of the expression of L-type VGCCs and increase of the expression of TRPM8.

Key words: *vas deferens*, smooth muscle, TRPM8, menthol,

icilin, noradrenalin, carbachol, castration.

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; Department of Pharmacology, Escola Paulistata de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo, Brazil; Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Universite des Sciences et Technologies de Lille, France

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болдирев О.І., Соткіс Г.В., Кулієва С.М., Владимірова Й.А., Філіппов І.Б., Скрима Р., Преварська Н., Шуба Я.М. Експресія холодового рецептора TRPM8 у гладеньких м'язах сім'явидних протоків щурів // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №5. – С. 17–27.
2. Філіппов І.Б., Владимірова Й.А., Кулієва С.М., Скрима Р., Преварська Н., Шуба Я.М. Модуляція скорочення гладеньких м'язів сім'явидних протоків щура агоністом TRPM8 каналів ментолом // Там само. – 2009. – 55, № 6. – С. 30–40.
3. Amobi N.I., Smith I.C. Different actions in the rat prostatic and epididymal *vas deferens* of cyclopiazonic acid or ryanodine on noradrenaline-induced contractions // *Gen. Pharmacol.* – 1999. – 32, №2. – P. 271–278.
4. Bidaux G., Flourakis M., Thebault S., Zholos A., Bech B., Gkika D., Roudbaraki M., Bonnal Y.-J., Mauroy B., Shuba Ya., Skryma R., Prevarskaya N. Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function // *J. Clin. Invest.* – 2007. – 117, № 6. – P. 1647-1657.
5. Castillo C.J., Lafayette S., Caricati-Neto A., Sette M., Jurkiewicz N.H., Garcia A.G., Jurkiewicz A. Low digidropyridine receptor density in *vas deferens* of castrated rats // *Brit. J. Pharmacol.* – 1992. – 105, №2. – P. 257–258.
6. Docherty R.J., Yeats J.C., Piper A.S. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture // *Ibid.* – 1997. – 121, №7. – P. 1461–1467.
7. McKemy D.D., Neuhauser W.M., Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation // *Nature.* – 2002. – 416, №6876. – P. 52–58.
8. Miranda H.F., Duran E., Fernandez E., Pinardi G. Muscarinic receptor subtypes in the bisected *vas deferens* of the rat // *Gen. Pharmacol.* – 1995. – 26, №2. – P. 387–391.
9. Rohacs T., Nilius B. Regulation of transient potential (TRP) channels by phosphoinositides // *Pflug. Arch.* – 2007. – 455, №1. – P. 157–168.
10. Starling A.P., Hughes G., East J.M., Lee A.G. Mechanism of stimulation of the calcium adenosinet-

- riphosphatase by jasmone // Biochemistry. – 1994 Mar 15; **33**(10). – P. 3023–3031.
11. Swandulla D., Carbone E., Schafer K., Lux H.D. Effect of menthol on two types of Ca currents in cultured sensory neurons of vertebrates // Pflug. Arch. – 1987. – **409**. – P. 52–59.
12. Thebault S., Lemonnier L., Bidaux G., Flourahis M., Bavancoffe A., Gordienko D., Roudbaraki M., Delcourt Ph., Panchin Yu., Shuba Ya., Skryma R., Prevarskaya N. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**. – P. 39423–39435.
13. Tsuzuki K., Xing H., Ling J., Gu L.G. Menthol-induced Ca²⁺ release from presynaptic Ca²⁺ stores potentiates sensory synaptic transmission // J Neurosci. – 2004. – **24**. – P. 762–771.
14. Vladimirova I.V., Hirata H., Jurkiewicz N.H., Jurkiewicz A. Interconversion of agonist-induced responses of prostatic and epididymal portion of the rat vas deferens induced by castration // Neurophysiology (Kiev). – 2003. – **35**, №3/4. – P. 302–310.
15. Voets T., Owsianik G., Nilius B. TRPM8 // Handb. Exp. Pharmacol. – 2007. – **179**. – P. 329–344.
16. Zholos A.V. Regulation of TRP-like muscarinic cation current in gastrointestinal smooth muscle with special reference to PLC/Ins3/Ca²⁺ system // Acta Pharmacol. Sin. – 2006. – **27**, №7. – P. 833–842.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Міжнарод. центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ;
Держ. мед. ун-т Сан Пауло, Бразилія;
Львівськ. ун-т наук і технологій, Франція
E-mail: irinav@serv.biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 20.01.2010*

Ю.В. Гошовська, Т.В.Шиманська, О.В. Рудик, Ю.П. Коркач, В.Ф.Сагач

Проникність мітохондріальних мембран за умов ішемічного прекодиціювання

Феномен ішемічного прекодиціювання полягає у підвищенні стійкості міокарда до ішемічно-реперфузійних уражень. Механізми, які лежать в основі адаптації міокарда до ішемії, активно вивчаються, але достеменно відомо про відновлення при цьому енергопродукуючої функції мітохондрії. Метою роботи було з'ясування шляхів формування кардіопротекторного ефекту ішемічного прекодиціювання, що полягають в регуляції проникності мітохондріальних мембран і опосередковують адаптацію серця до ішемії. В експериментах на ізольованих серцях і суспензії мітохондрій щурів було показано, що ішемічне прекодиціювання у вигляді трьох 5-хвилинних епізодів зупинки перфузії запобігало надмірній продукції активних форм кисню при тривалій ішемії–реперфузії міокарда і сприяло більш повному відновленню функції серця щурів. При цьому спостерігали інгібування утворення мітохондріальних пор внаслідок посилення синтезу NO. Це підтверджувалося зменшенням вивільнення мітохондріального фактора у коронарне русло і зниженням чутливості ізольованих після тотальної ішемії серця мітохондрій до іонів кальцію. Зроблено висновок, що серед процесів, які беруть участь у формуванні кардіопротекторного ефекту ішемічного прекодиціювання, зменшення проникності мітохондріальних мембран внаслідок блокади утворення мітохондріальних пор вирішальну роль.

Ключові слова: серце, ішемічне прекодиціювання, оксид азоту, мітохондріальна пора

ВСТУП

В умовах недостатнього постачання міокарда киснем спостерігається пошкодження серця, пов'язане з активацією вільнорадикальних процесів, кальцієвим переважаттям, денатурацією білків, виснаженням запасів аденозинтрифосфату (АТФ) і глюкози, накопиченням токсичних метаболітів і зниженням клітинного рН [28]. Після коротких періодів ішемії функція серця відновлюється, однак при тривалій оклюзії пошкодження тканин стають незворотними, а реперфузія тільки погіршує ситуацію. Основними «винуватцями» реперфузійних порушень функції міокарда вважаються збільшена концентрація іонів кальцію в цитозолі клітин і посилена генерація активних форм кисню (АФК), кількість яких після відновлення коронар-

ного потоку зростає до вільнорадикального вибуху. У більшості випадків окисне пошкодження мітохондрій є пусковим механізмом апоптозу, першою ланкою якого є утворення неселективних каналів – мітохондріальних пор (МП) і вивільнення таких проапоптотичних факторів, як цитохром с тощо [7, 13, 28]. Встановлено, що реперфузійні порушення функції серця і коронарного кровообігу зумовлені саме відкриванням МП [6, 27]. З'ясування механізмів запобігання цьому при ішемії є важливими для розробки якісно нових підходів у сучасній клінічній практиці.

Фундаментальні дослідження показали, що метаболічна адаптація або так зване ішемічне прекодиціювання (ІП), коли при послідовному пред'явленні стресорних подразників відповідь на наступний може бути модифікована під впливом поперед-

© Ю.В. Гошовська, Т.В.Шиманська, О.В. Рудик, Ю.П. Коркач, В.Ф.Сагач

нього, є найбільш ефективним захистом клітин від ішемічного ушкодження [41]. Механізми, які лежать в основі адаптації міокарда до ішемії, активно вивчаються, але достеменно відомо, що мітохондрії відіграють при цьому найважливішу роль [17, 28, 30]. Повідомляється зокрема, що у мітохондріях, отриманих із сердець після ішемічного прекодиціювання, ефективно відновлюється синтез АТФ під час реоксигенації [44]. Існують декілька гіпотез, що пояснюють феномен адаптації до ішемії, але, як правило, кінцевою ланкою передачі сигналу вважається фосфорилування і активація АТФ-залежних калієвих каналів [24, 40]. Відкривання останніх зменшує вхід Ca^{2+} , що призводить до зниження скоротливої здатності кардіоміоцитів, зменшення споживання клітинами енергії та витрати АТФ [8]. При вивченні феномену ІП було показано також участь білка теплового шоку HSP70, який накопичується в серці при короткочасній ішемії і значно підвищує стійкість міокарда до подальшої тривалої оклюзії. Зроблений висновок, що активація HSP70 за допомогою стресових чинників лежить в основі адаптації міокарда до пошкоджень. Слід також відзначити можливість поєднання різних потенційних механізмів феномена прекодиціювання серця. Наприклад, HSP70 і HSP90 є основними структурними компонентами глюкокортикоїдного, стероїдного і прогестеронового рецепторів, завдяки чому беруть участь у генерації сигналу після взаємодії рецептора зі своїм лігандом. Крім того, HSP70 зв'язує рецептор кальцію кальмодулін і бере участь у регуляції транскрипції NO-синтази [9]. Раніше було показано, що ендогенний оксид азоту (NO) пригнічує утворення МП [10, 21, 46]. Незважаючи на значний прогрес у вивченні феномена ІП, механізми, що лежать в його основі, залишаються не до кінця зрозумілими.

Метою нашої роботи було з'ясування шляхів формування кардіопротекторного ефекту, що здійснюється при ІП і опосеред-

ковує адаптацію серця до ішемії, на фоні комплексної оцінки функціонального стану серця.

МЕТОДИКА

Експерименти виконували на дорослих самцях щурів лінії Вістар віком 6 міс, масою 300–350 г. з дотриманням вимог Європейської конвенції щодо роботи з експериментальними тваринами (Страсбург, 1986). Перфузію коронарних судин ізольованого серця здійснювали за методом Лангендорфа в умовах постійного тиску. Реєстрацію показників кардіодинаміки (тиск, що розвиває лівий шлуночок – ТЛШ; кінцево-діастолічний тиск – КДТ; коронарний потік; швидкість скорочення – dP/dt_{\max} і розслаблення – dP/dt_{\min} міокарда, частота серцевих скорочень – ЧСС) проводили як описано нами раніше [10]. Для розрахунку споживання кисню міокардом реєстрували напруження кисню у пробах перфузійного розчину, що притікав і відтікав від серця за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk-2 Radiometer («Elema», Швеція). Кисневу вартість роботи серця виражали як співвідношення споживання кисню до інтенсивності скоротливої функції серця (добуток ТЛШ і ЧСС).

Адаптацію до ішемії здійснювали за допомогою трьох сеансів тотальної 5-хвилинної ішемії, розділених 5 хв періодами реперфузії. Ішемію міокарда моделювали припиненням перфузії серця на 20 хв. Відновлення функції серця спостерігали протягом 40 хв реперфузії.

Вивільнення мітохондріального фактора, що є маркером відкривання МП [7, 42], визначали за підвищенням оптичної густини розчинів, що відтікали від серця. Оптичну густину проб вимірювали в ультрафіолетовому спектрі в діапазоні довжин хвиль 230–260 нм спектрофотометром СФ-46.

Після закінчення реєстрації функціональних характеристик серця промивали у 0,9%-му розчині KCl (2–4°C) і виділяли

мітохондрії за допомогою методу диференційного ультрацентрифугування [2]. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі. Концентрація білка в пробі становила 0,4–0,5 мг/мл.

Дослідження відкриття МП проводили за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій. Проби останніх поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): КСІ – 120, тріс-НСІ – 25, KH_2PO_4 – 3, сукцинат натрію – 5; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і за допомогою спектрофотометра СФ-46 реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при $\lambda=520$ нм за 5 хв до і через 15 хв після їх набухання в інкубаційному середовищі за умов дії індуктора відкриття МП – Ca^{2+} (у кінцевій концентрації 10^{-4} моль/л) та інгібітора – циклоспорину А (у кінцевій концентрації 10^{-5} моль/л, «Fluka», Швеція) [16]. Як контроль використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора, оптичну густину якої реєстрували протягом 15 хв. Функціональну залежність набухання мітохондрій від часу обраховували за допомогою програми ORIGIN 6.0 («Microcall Inc.», США).

Для біохімічних досліджень серця негайно заморожували у рідкому азоті. Інтенсивність оксидативного метаболізму у гомогенатах серця щурів оцінювали за зміною швидкості генерації нестабільних вільних радикалів кисню – супероксидного аніон-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) [37], $\cdot\text{OH}$ -радикала [33], вмісту стабільного пероксиду водню (H_2O_2) [34] і кінцевого продукту перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду [43].

Інтенсивність генерації NO оцінювали за утворенням цитруліну (активність індукбельної і конститутивної NOS), вмісту нітрит-аніона (NO_2^-) [26] і нітрат-аніона (NO_3^-) [47]. Інтенсивність реутилізаційної генерації NO – нітратредуктазну активність – визначали за змінами вмісту нітрат-

аніона в інкубаційному середовищі за наявності надлишку НАДН. Активність аргінази, яка є конкурентом NOS, оцінювали спектрофотометричним методом [11]. Цитрулін – продукт NOS і маркер генерації NO – визначали чутливим спектрометричним методом [14], а вміст сечовини – за допомогою добірки реактивів «Філіст-Діагностика» (Україна). Вказані біохімічні дослідження проводили: в контрольних умовах; після трьох ішемічних епізодів; після тривалої ішемії–реперфузії без і на фоні ІП.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням програми MS Excell і виражали у вигляді середнього \pm стандартне відхилення. Застосовуючи критерій t Стьюдента, достовірними вважали зміни при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ішемічне прекодиціювання сприяло покращенню відновлення функції ізольованого серця після тривалої ішемії. Три короткі епізоди ішемії ізольованого серця – ІП певною мірою пригнічували функціональний стан серця: ТЛШ, dP/dt , ЧСС, а також коронарний потік мали тенденцію до зменшення на 15–20 % (таблиця). Біохімічні показники активності вільнорадикальних процесів не зазнавали істотних змін.

ІП ефективно запобігало розвитку важких реперфузійних порушень функції ізольованого серця і виникненню фібриляції з початком реперфузії, що яскраво демонструють криві зміни ТЛШ на рис. 1.

Кардіопротекторний ефект адаптації до ішемії проявлявся вже на 10-й хвилині реперфузійного періоду: ТЛШ відновлювався до $82,5 \% \pm 8,8 \%$ (рис. 2,а), коронарний потік – до $80 \% \pm 9,4 \%$, інтенсивність скоротливої функції серця становила $67,4 \% \pm 12 \%$. ІП істотно зменшувало розвиток контрактури міокарда: крутизна підйому КДТ під час ішемії була нижчою,

Вплив ішемічного прекодицювання на показники кардіодинаміки і кисневого обміну ізольованого серця (M±m, n = 8)

Показник	Ішемічне прекодицювання	
	до	після
Тиск, що розвиває лівий шлуночок, мм рт. ст.	140±7,9	117±8,5
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт. ст.	-1,5±1,1	1,04±1,9
Швидкість скорочення міокарда, мм рт. ст./с	2360±168	1919±165
Швидкість розслаблення міокарда, мм рт. ст./с	-2005±150	-1631±152
Коронарний потік, мл · хв ⁻¹	13,1±1,1	11,7±1,1
Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	206±26	196±28
Споживання кисню, мм рт. ст. · мл	3278±398	2915±395
Інтенсивність скорочувальної функції, мм рт. ст. · хв ⁻¹	30102±4469	23703±4014
Киснева вартість роботи серця, мл · хв	0,119±0,013	0,138±0,016

ніж у контролі (рис. 2,б), а dP/dt_{min} у адаптованих сердець становила $78,7 \pm 5,8$ порівняно $28 \% \pm 6,7 \%$ у неадаптованих (рис. 2,в). Останній факт є яскравим підтвердженням кардіопротекторної дії ІП. Запобігання функціональних розладів серця супроводжується попередженням морфологічних змін міокарда: у літературі неодноразово повідомляється про зменшення

розміру зони інфаркту при застосуванні ІП [23, 24, 28, 31, 35].

Слід відмітити, що ІП оптимізувало кисневий метаболізм в ішемізованому серці: у початковий період реперфузії ми не спостерігали різкого збільшення споживання кисню ($78,2 \% \pm 11\%$), а киснева вартість роботи міокарда становила лише $111,6 \% \pm 12 \%$, тоді як у контрольній серії

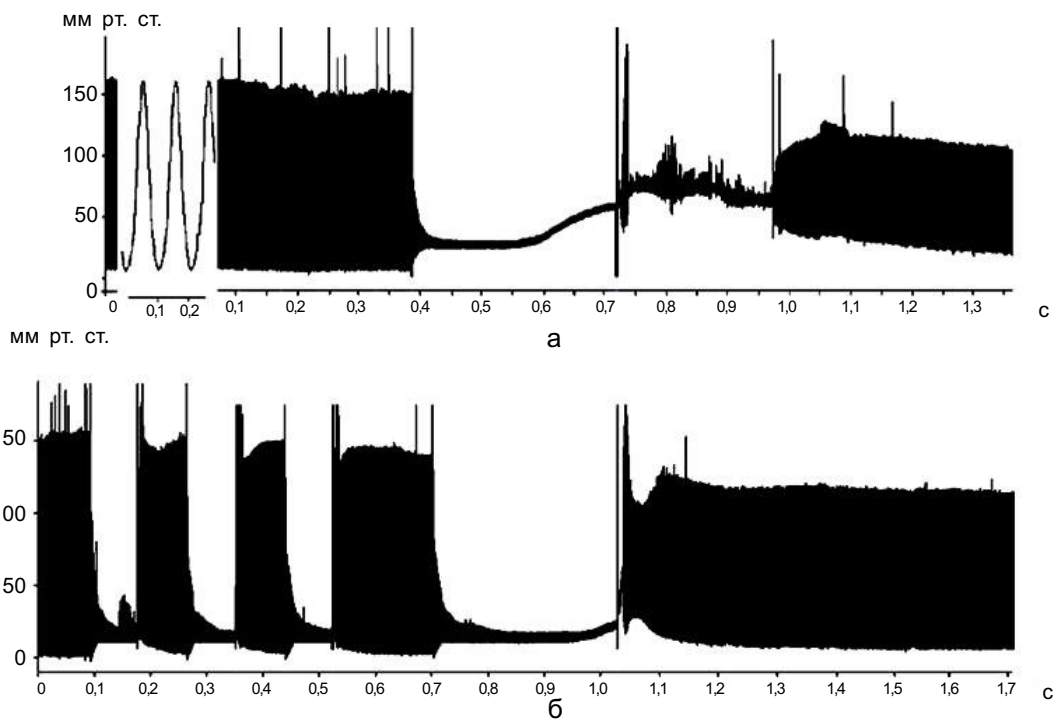


Рис. 1. Криві тиску, що розвиває лівий шлуночок при ішемії–реперфузії ізольованого серця щурів без (а) і на фоні попереднього ішемічного прекодицювання (б)

на 10-й хвилині реперфузії вона зростала більш ніж у 4 рази (див. рис. 2,г). Таким чином, ІП підвищувало ефективність роботи дихального ланцюга мітохондрій кардіоміоцитів і, відповідно, використання кисню міокардом.

Дані наших попередніх досліджень свідчили, що зменшення кисневої вартості роботи серця може бути результатом стимуляції синтезу оксиду азоту [4] або зниження продукції вільних радикалів. Для з'ясування механізму оптимізації кисневого обміну ми порівнювали інтенсивність генерації NO і ступінь розвитку окисного стресу при ішемії–реперфузії міокарда у щурів без і з ІП.

Ішемічне прекоондиціонування гальмувало розвиток окисного стресу при ішемії міо-

карда. Мітохондрії виступають одним з основних джерел утворення АФК за різних патологічних станів [18, 19, 39]. Це спостерігалось і в наших експериментах: тривала ішемія і наступна реперфузія міокарда супроводжувалися інтенсифікацією вільно-радикальних процесів (рис.3). Зниження активності сNOS під час ішемії–реперфузії на фоні трикратного підвищення активності аргінази, що конкурує з нею за спільний субстрат L-аргінін, свідчило про гальмування кальційзалежного синтезу NO, а збільшення у 5 разів активності нітрат-редуктази – про інтенсифікацію реутилізаційного синтезу оксиду азоту і розвиток гіпоксичного стану в серці. Наявність нітрозативного окисного стресу, наслідком якого були ініціація ПОЛ і порушення

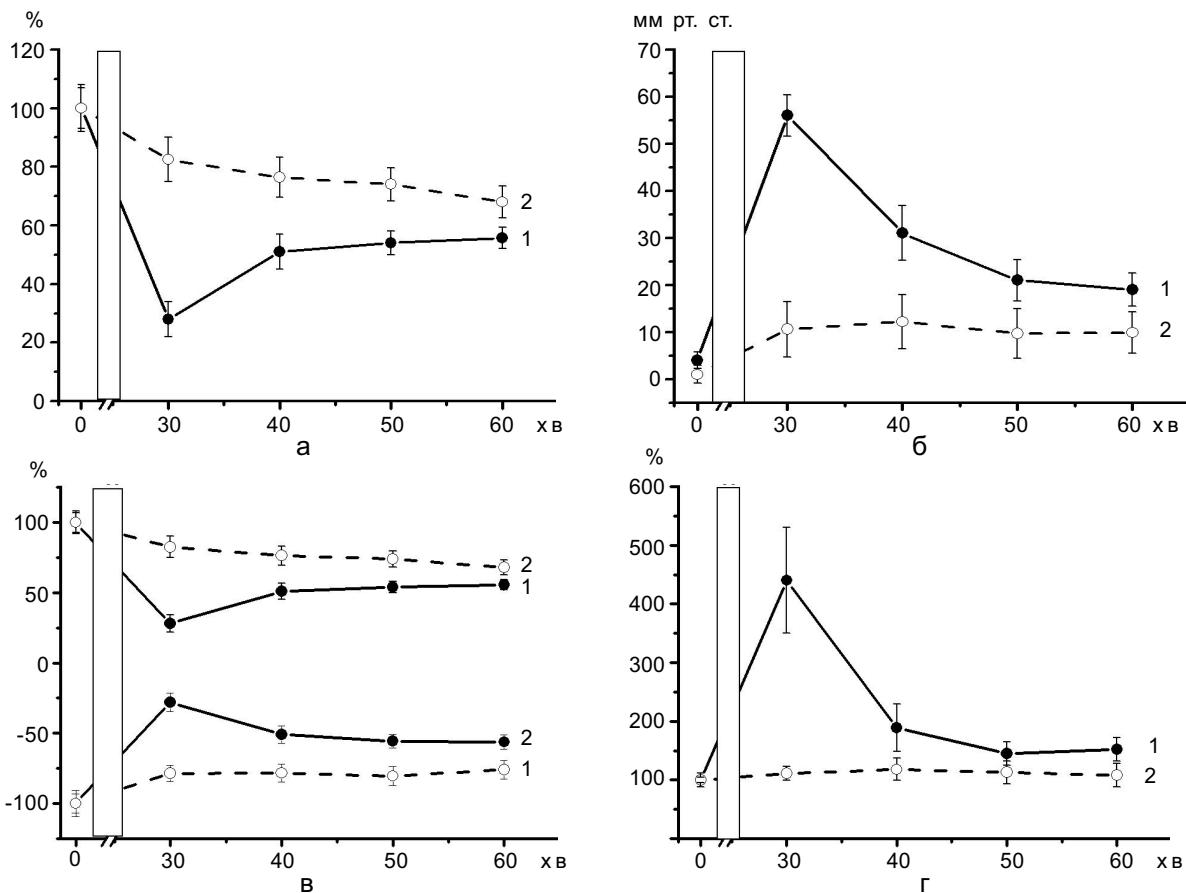


Рис. 2. Відновлення показників функціонального стану серця під час реперфузії без (1) і на фоні ішемічного прекоондиціонування (2): а – тиск у лівому шлуночку; б – кінцево-діастолічний тиск; в – швидкість скорочення і розслаблення міокарда; г – киснева вартість роботи серця

проникності мембран, підтверджувалося істотним підвищенням вмісту NO_3^- . Отже, розвиток окисного стресу після тривалої ішемії-реперфузії супроводжувався пригніченням синтезу NO в тканинах серця шурів.

ІІ значною мірою нівелювало розвиток окисного стресу при тривалій ішемії-реперфузії серця: зменшувався ступінь утворення вільних радикалів (див. рис. 3), активність sNOS відновлювалася до контрольних значень (рис. 4) на фоні невеликого, порівняно з контролем, підвищення вмісту NO_3^- (на $40\% \pm 12\%$). Виникає питання про активацію можливих шляхів клітинного обміну для запобігання розвитку окисного стресу.

Ми встановили цікавий факт, що після трьох циклів короткотривалих ішемій у клітинній фракції гомогенатів серця зростає активність NOS за рахунок iNOS з $5,4 \pm 1,6$ до $8,5$ $\text{пмоль/хв} \cdot \text{мг білка} \pm 1,0$ $\text{пмоль/хв} \cdot \text{мг білка}$ (рис. 5), що може свідчити на користь протекторної ролі iNOS у разі дисфункції sNOS . Ці результати узгоджуються з даними інших дослідників [1, 36], як і зі свідченнями про захисну роль

активації iNOS у пізній реперфузійний період [12, 32, 49]. Ймовірно, короткотривалих періодів ішемії і реперфузії цілком достатньо для легкої активації iNOS , яка бере на себе роль «швидкої допомоги» постачальника оксиду азоту. Таким чином, одним із шляхів адаптації до ішемії є посилення утворення оксиду азоту внаслідок активації iNOS .

Тонкий баланс між функціонуванням АФК як сигнальних молекул і токсичними ефектами, індукованими надлишковою кількістю кисневих радикалів, має велике значення в регуляції фізіологічних процесів клітини. Повідомляється, що АФК є одними з медіаторів ІІ [3, 48]: короткі ішемічні епізоди стимулюють збільшення фонового їх рівня, що «готує» серце до наступної тривалої оклюзії і, як наслідок, ранній реперфузійний період проходить зі значно меншими морфологічними та функціональними пошкодженнями міокарда. Серед можливих механізмів протекторної дії АФК – активація протеїнкінази C [25], транскрипційних факторів AP-1 та $\text{NF-}\kappa\text{B}$ і експресії низки протекторних генів, а також iNOS [45]. Можливо, АФК викликають процес так

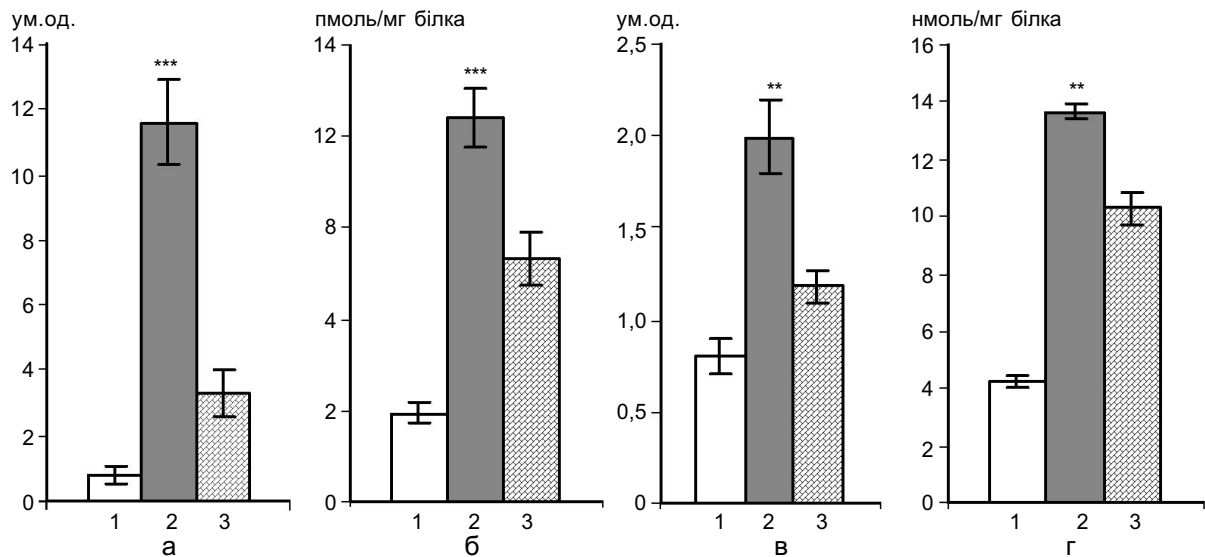


Рис. 3. Протекторний вплив ішемічного прекоондиціонування на розвиток окисного стресу при ішемії-реперфузії серця: а – O_2^- , б – H_2O_2 , в – $\text{OH}\cdot$, г – малоновий діальдегід у контролі (1), ішемії-реперфузії без (2) і на фоні ішемічного прекоондиціонування (3). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ відносно контролю

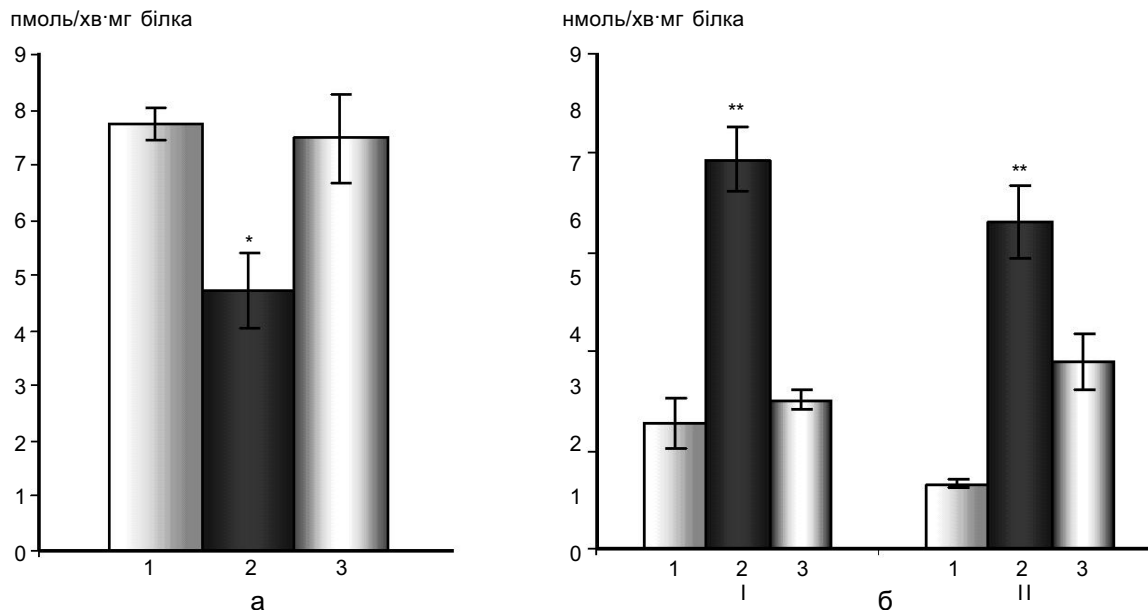


Рис. 4. Активність конститутивної NOS (а), аргінази (I) і нітратредуктази (II) (б) в контролі (1), при реперфузії серця без (2) і на фоні ішемічного прекодиціювання (3). * P<0,05, ** P<0,01 відносно контролю

званого «м'якого» роз'єднання мітохондрій, що сьогодні визнається дослідниками як універсальний механізм стимуляції продукції АТФ. При цьому активується протон-провідна функція роз'єднувальних білків, що запобігає надмірній продукції АФК дихальним ланцюгом при патологічних станах [15, 22] і, відповідно, утворенню МП [29].

Таким чином, ІП активує механізми, які пригнічують ініціацію вільнорадикальних процесів у міокарді в умовах тривалої ішемії. Одним з них є „легка” активація іNOS під впливом АФК.

Ішемічне прекодиціювання зменшувало ступінь порушення проникності мітохондріальних мембран під дією ішемії. Відомо, що потужний окисний стрес активує процес утворення МП [38], призводить до розвитку апоптозу кардіоміоцитів і пригніченню функціонального стану серця. Реперфузійні порушення функції серця пов'язані саме зі зміною проникності мітохондріальних мембран кардіоміоцитів внаслідок утворення МП неспецифічної провідності [7, 20]. Маркером утворення останнього може виступати виявлений

нами мітохондріальний фактор [5, 7, 42], наявність якого характеризується збільшенням оптичної густини відтікаючого від серця розчину при дослідженні його в ультрафіолетовій ділянці спектра при $\lambda=230-260$ нм. Результати спектрофотометричного аналізу свідчили, що проби відтікаючого від серця розчину, зібрані за першу хвилину реперфузії у групі щурів, яким

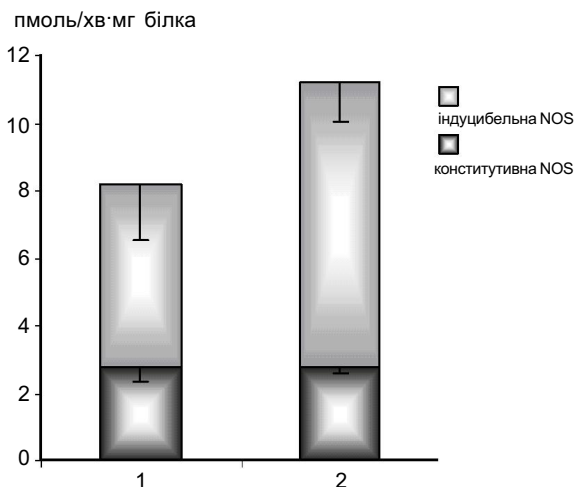


Рис. 5. Співвідношення активності NO-синтаз у вихідному стані (1) і після циклів ішемії–реперфузії (2)

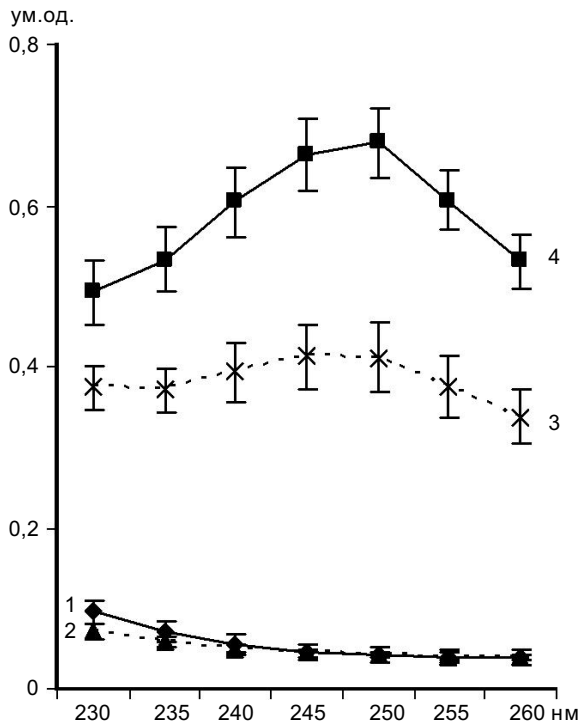


Рис. 6. Зміни оптичної густини розчину, що відтікав від ізольованого серця щурів перед ішемією (1, 2) і за першу хвилину реперфузії без (4) і при моделюванні ішемічного прекоондиціонування (3)

попередньо проводили ІП, характеризувалися не тільки достовірно меншим приростом оптичної густини розчину – 0,369 ум.од. \pm 0,045 ум.од. порівняно з контрольними тваринами без ІП – 0,638 ум.од.

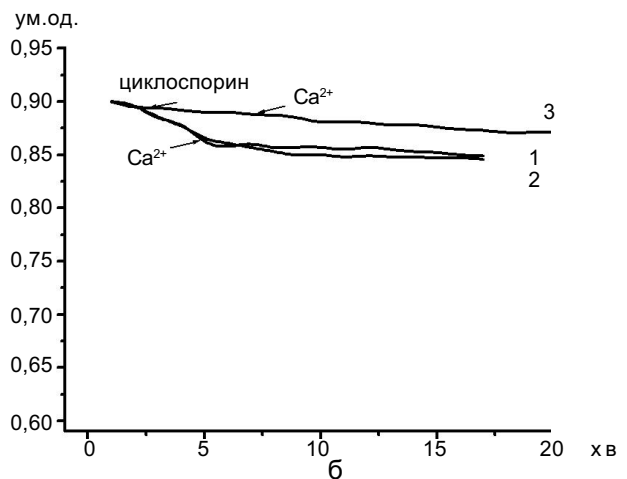
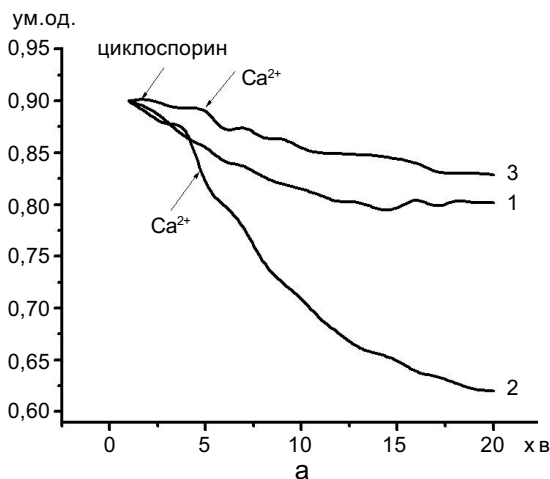


Рис. 7. Нативні криві кальційіндукованого набухання мітохондрій ішемізованого серця щурів без (а) і після ішемічного прекоондиціонування (б): 1 – контроль; 2 – Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – циклоспорин А (10^{-5} моль/л) і Ca^{2+} (10^{-4} моль/л)

\pm 0,039 ум.од. ($P < 0,001$), але й відсутністю вивільнення маркера утворення МП (рис. 6). Отже, ІП призводить до зменшення порушень проникності мітохондріальних мембран. Таким чином, один зі шляхів кардіопротекторного ефекту ІП реалізується через механізм блокади утворення МП. Цей висновок перевіряли в експериментах з кальційіндукованим набуханням мітохондрій ішемізованого серця.

Ішемічне прекоондиціонування попереджало кальційіндуковане набухання мітохондрій ішемізованого серця. Відомо, що набухання мітохондрій кардіоміоцитів, яке спостерігається при реперфузії серця, призводить до роз'єднання окисного фосфорилування, порушення синтезу АТФ, збільшення проникності мітохондріальних мембран і ініціації апоптозу. Під час експериментів досліджували чутливість мітохондрій до Ca^{2+} – класичного активатора МП. Ступінь набухання мітохондрій, виділених з сердець після тривалої ішемії-реперфузії, під дією Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л був значно вищим (див. рис. 7,а, крива 2), ніж у інтактних мітохондрій (див. рис. 7,а, крива 1). Активація МП вдало блокувалася класичним їх інгібітором циклоспорином А (див. рис. 7,а, крива 3), що підтверджувало МП-залежну динаміку досліджуваного

процесу. Під впливом Ca^{2+} набухання мітохондрій, виділених з ішемізованих сердець після моделювання ІП, мало характер, аналогічний такому у інтактних мітохондрій внаслідок перебування їх в ізотонічному розчині середовища інкубації (див. рис. 7,б). Отже, курс ІП призводив до підвищення резистентності мітохондрій серця до Ca^{2+} , який викликає МП-залежне набухання мітохондрій. Таким чином, один із шляхів захисного ефекту ІП включає зменшення чутливості мітохондрій міокарда до дії активаторів відкриття МП.

Нині багато досліджень присвячено вивченню внутрішньоклітинних захисних сигнальних механізмів, що активуються ІП. Факторами, які вивільнюються під час коротких періодів ішемії і діють через відповідні рецептори – аденозин, брадикінін, норадреналін, ендорфіни – активується протеїназа С [35]. АФК, які виділяються в «проміжних» реперфузіях, також задіяні в процесах активації протеїнази С і експресії певних «протекторних» генів. Оскільки інгібітори останньої та скевенджери вільних радикалів «знімають» ефект прекодиціювання, а агоністи аденозину посилюють його, то роль протеїнази С у процесі прекодиціювання очевидна і беззаперечна. Однак залишається до кінця не зрозумілим питання, яким саме чином ІП «захищає» мітохондрії і серце від пошкоджуючої дії ішемії?

Результати наших комплексних експериментів свідчать, що захисний вплив ІП значною мірою зумовлений пригніченням утворення МП. При моделюванні прекодиціювання спостерігали блокаду МП на рівні ізольованого серця: вивільнення речовин з ішемізованого серця істотно зменшувалося. Це підтверджувалося зниженою чутливістю мітохондрій, отриманих з прекодиційованих сердець, до природного індуктора відкриття пор – іонів кальцію, тобто тривала ішемія практично не викликала відкриття МП в адаптованих до

ішемії серцях. Безперечно, попередження вільнорадикального вибуху при реперфузії міокарда після ІП запобігало функціональним порушенням серця, а індукція синтезу оксиду азоту iNOS при короткочасних ішемічних епізодах могла виступати одним із протекторних механізмів адаптації серця до тривалої ішемії.

Базуючись на результатах наших досліджень, ми вважаємо, що серед процесів, які беруть участь у формуванні кардіопротекторного ефекту ІП, зменшення проникності мітохондріальних мембран внаслідок блокади утворення МП оксидом азоту відіграє вирішальну роль.

ВИСНОВКИ

1. ІП запобігало розвитку потужного окисного стресу, який зазвичай виникає при ішемії–реперфузії міокарда, збільшенню чутливості мітохондрій ішемізованого серця до кальційіндукованого набухання і сприяло більш істотному відновленню функції ізольованого серця щурів після тотальної ішемії, що яскраво проявлялося вже на ранніх етапах реперфузії.

2. Кардіопротекторний вплив ІП значною мірою був зумовлений пригніченням утворення МП, що підтверджувалося зменшенням вивільнення мітохондріального фактора у коронарне русло після тривалої ішемії.

3. Серед протекторних механізмів, що активуються ІП і, які дають змогу серцю швидше адаптуватися до тривалого ішемічного епізоду, є збільшення синтезу оксиду азоту внаслідок посилення активності iNOS.

**Ю.В. Гошовская, Т. В. Шиманская,
Е.В. Рудык, Ю.П. Коркач, В. Ф. Сагач**

ПРОНИЦАЕМОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН В УСЛОВИЯХ ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

Феномен ишемического прекодиционирования заключается в повышении устойчивости миокарда к репер-

фузионным поражениям. Механизмы, лежащие в основе адаптации миокарда к ишемии, активно изучаются, но доподлинно известно, что важнейшую роль при этом играют митохондрии. Целью работы было выяснение NO-зависимых путей формирования кардиопротекторного эффекта, который имеет место при ишемическом preconditionировании и опосредует адаптацию сердца к ишемии. В экспериментах на изолированных сердцах крыс и суспензии изолированных митохондрий сердца было показано, что ишемическое preconditionирование в виде трех 5-минутных эпизодов остановки перфузии сердца предотвращало развитие мощного окислительного стресса после длительной ишемии–реперфузии миокарда и способствовало более полному восстановлению функции изолированного сердца крыс. При этом ингибировался процесс образования митохондриальных пор вследствие усиления синтеза NO, что подтверждалось уменьшением высвобождения митохондриального фактора в коронарное русло и снижением чувствительности изолированных после тотальной ишемии митохондрий к действию ионов кальция. Сделан вывод, что среди процессов, участвующих в формировании кардиопротекторного эффекта ишемического preconditionирования, уменьшение проницаемости митохондриальных мембран вследствие блокады образования митохондриальных пор играет решающую роль.

Ключевые слова: изолированное сердце, ишемическое preconditionирование, оксид азота, митохондриальная пора.

Y.V. Goshovska, T.V. Shimanskaya, O.M. Rudyk, Y.P. Korkach, V.F. Sagach

MITOCHONDRIA PERMEABILITY TRANSITION AS A TARGET FOR ISCHEMIC PRECONDITIONING

The ischemic preconditioning (IPC) limits myocardial injury provoked by a subsequent prolonged ischemia-reperfusion (I/R). The underlying mechanisms of enhanced resistance of heart are actively studied, but for sure it was established that mitochondria play a major role in IPC-stimulated adaptation to ischemia. In this article we present and discuss evidences that cardioprotective effect of IPC is mediated by inhibition of mitochondria permeability transition pore (MPTP) opening. It was shown that IPC effectively prevents the excessive production of ROS by mitochondria during I/R and promotes a more complete restoration of function of isolated rat hearts. It was revealed that MPTP formation due to I/R was inhibited in IPC heart. Mitochondrial factor, the marker of MPTP opening found in outflow probes, was released in much lesser amounts in IPC hearts than in non-IPC. Furthermore, mitochondria isolated from IPC hearts showed a decreased sensitivity to calcium ions, a MPTP inductor, and, thus, massive MPTP-dependent swelling of mitochondria was abrogated in IPC hearts. In our experiments we observed slight increase in

inducible NOS activity right after short ischemic stimuli. We suppose that increased NO production by iNOS is involved in inhibition of MPTP and this may be one of the possible mechanisms of decreased sensitivity of mitochondria to calcium ions. It is concluded that among the processes involved in formation of cardioprotective effect of IPC, a reduction of membrane permeability due to the inhibition of MPTP opening plays a crucial role.

Key words: isolated heart, ischemic precondition, nitric oxide, iNOS, MPTP

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гарматина О.Ю., Ткаченко М.Н., Мойбенко А.А. Индуцибельная синтеза оксида азота при патологии сердца // Журн. АМН України. – 2005. – 11, № 4. – С. 645–659.
2. 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.
3. Петрищев Н.Н., Шляхто В.Е., Цырлин Е.А. Роль свободных радикалов кислорода в механизмах локального и дистантного ишемического preconditionирования миокарда // Вестник Рос. акад. мед. наук. – 2006. – №8. – С. 10–15.
4. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Вивчення ролі оксиду азоту у змінах споживання кисню та кисневої вартості роботи серцевого м'яза // Фізіол. журн. – 2000. – 46, №2. – С.33–38.
5. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Рудик О.В., Струтинська Н.А. Вивільнення неідентифікованих речовин мітохондріального походження – показник відкриття мітохондріальної пори серця шурів // Там само. – 2003. – 49, №5. – С. 3–12.
6. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Попередження постреперфузійних порушень функції серця та неефективного використання кисню за допомогою інгібіторів мітохондріальної пори // Там само. – 2002. – 48, №6. – С. 3–9.
7. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Там само. – 2003. – 49, №4. – С. 6–12.
8. Шабалин А.В. Никитин Ю.П. Защита кардиомиоцита. Современное состояние и перспективы // Кардиология. – 1999. – №3. – С. 4–10.
9. Шевченко Ю.Л., Карпищенко А.И., Белевитин А.Б., Свистов А.С., Демидов О.Н., Тыренко В.В. Аутоиндуцированная толерантность миокарда к ишемии: роль стресс-белков в механизмах ее возникновения // Физиология человека. – 1999. – 25, № 1. – С. 134–139.

10. Шиманская Т.В., Добровольский Ф.В., Вавилова Г.Л., Струтинская Н.А., Рудык Е.В., Сагач В.Ф. NO-зависимая модуляция чувствительности открытия митохондриальной поры при ишемии/реперфузии изолированного сердца // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2009. – **95**, №1. – С. 28–37.
11. Шугалей В.С., Козина А.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду // Физиол. журн. СССР. – 1977. – № 8. – С. 1199–1202.
12. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research // J. Mol. Cell Cardiol. – 2001. – **33**. – P. 1897–1918.
13. Borutaite V., Morkuniene R., Brown G.C. Release of cytochrome c from heart mitochondria is induced by high Ca²⁺ and peroxynitrite and is responsible for Ca(2+)-induced inhibition of substrate oxidation // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – **1453**, №1. – P. 41–48.
14. Boyde T.R., Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime // Anal. Biochem. – 1980. – **107**, № 2. – P. 424–431.
15. Brand M.D., Buckingham J.A., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Murphy M.P., Pakay J.L., Talbot D.A., Echtay K.S. Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production // Biochem. Soc. Symp. – 2004. – **71**. – P. 203–213.
16. Brookes P.S., Salinas E.P., Darley-Usmar K., Eiserich J.P., Freeman B.A., Darley-Usmar V.M., Anderson P.G. Concentration-dependent effect of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome C release // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, №27. – P. 20474–20479.
17. Burwell L.S., Brookes P.S. Mitochondria as a target for the cardioprotective effects of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury // Antioxid. Redox Signal. – 2008. – **10**, №3. – P. 579–599.
18. Chen Q., Hoppel C. L. Ischemia reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – **420**. – P. 287–297.
19. Choksi K. B., Papaconstantinou J. Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse heart mitochondrial electron transport chain complexes // Free Rad. Biol. Med. – 2008. – **44**. – P. 1795–1805.
20. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // Biochem. J. – 1999. – **341**. – P. 233–249.
21. Dedkova EN, Blatter LA. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase // J. Physiol. – 2009. – **587**. – №4. – 851–872.
22. Echtay K.S., Roussel D., St-Pierre J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., Brand M.D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein // Nature. – 2002. – **415**. – P. 96–99.
23. Fisher S. G., Marber M. S. An in vivo model of ischemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the mouse heart // J. Pharmacol. Toxicol. Methods – 2002. – **48**. – P. 161–169.
24. Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V., Murray H.N., Darbenzio R.B., D'Alonzo A.J., Lodge N.J., Smith M.A., Grover G.J. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanisms of cardioprotection // Circ. Res. – 1997, № 81. – P. 1072–1082.
25. Gopalakrishna R, Anderson WB. Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1989. – **86**. – P. 6758–6762.
26. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131–138.
27. Griffiths E., Halestrap A. Mitochondrial non specific pores remain closed during cardiac ischaemia but open upon reperfusion // Biochem. J. – 1995. – **307**. – P. 93–98.
28. Halestrap A., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection // Cardiovasc. Res. – 2004. – **61**. – P. 372–385.
29. Halestrap A.P., Clarke S.J., Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – **1767**, № 8. – P. 1007–1031.
30. Han H.G., Wang Z.W., Zhang N.B., Zhu H.Y. Role of nitric oxide during early phase myocardial ischemic preconditioning in rats // Chin. Med. J. (Engl). – 2008. – **121**, №13. – P. 1210–1214.
31. Hausenloy D.J., Maddock H. L., Baxter G.F., Yellon D.M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? // Cardiovasc. Res. – 2002. – **55**. – P. 534–543.
32. Heger J., Gudecke A., Flugel U., Merx M.W., Molojavyi A., Kohn-Velten W.N., Schrader J. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction // Circ. Res. – 2002. – **90**. – P. 93–99.
33. Humphries K.M., Yoo Y., Szweda L.I. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal // Biochem. – 1998. – **37**, № 2. – P. 552–557.
34. Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system // Eur. J. Biochem. – 1984. – **141**. – №1. – P. 69–74.
35. Javadov S. A., Clarke S., Das M., Griffiths E.J., Lim K.H.H., Halestrap A.P. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart // J. Physiol. – 2003. – **549**. – P. 513–524.
36. Kanno S., Lee P., Zhang Y., Ho C., Griffith B.P., Shears L.L. 2nd, Billiar T.R. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase // Circulation. – 2000. –

101. – P. 2742–2748.
37. Kuthan H., Ullrich V., Estabrook R.W. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems // *Biochem. J.* – 1982. – **203**, № 3. – P. 551–558.
38. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // *Physiol.Rev.* – 2007. – **87**. – P. 99–163.
39. Lesnefsky E.J., Gudiz T.I., Migita C.T., Ikeda-Saito M., Hassan M.O., Turkaly P.J., Hoppel C.L. Ischemic injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: damage to the iron-sulfur protein subunit of electron transport complex III // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001. – **385**. – №1. – P. 117–128.
40. Liu Y., Sato T., O'Rourke B., Marban E. Mitochondrial ATP dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection // *Circulation.* – 1998. – № 97. – P. 2463–2469.
41. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Ibid.* – 1986. – **74**. – P. 1124–1136.
42. Nadtochiy S.M., Nauduri D., Shimanskaya T.V., Sagach V.F., Brookes P.S. Purine release: a protective signaling mechanism of the mitochondrial permeability transition pore in ischemia // *Фізіол. журн.* – 2008. – **54**, №6. – С. 5–14.
43. Nair V., Cooper C.S., Vietti D.E., Turner G.A., The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde // *Lipids.* – 1986. – **21**. – P. 6–10.
44. Oshima Y., Fujio Y., Nakanishi T., Itoh N., Yamamoto Y., Negoro S., Tanaka K., Kishimoto T., Kawase I., Azuma J. STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart // *Cardiovasc. Res.* – 2005. – **65**. – P. 428–435.
45. Pinkus R., Weiner L.M., Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**. – P. 13422–13429.
46. Shimanskaya T.V. Goshovska Y., Sagach V. The role of mitochondrial permeability transition pore in modulation of oxygen cost of myocardial work by endogenous NO // *Adv. Biomed. Res. (Cambridge).* – 2010. – P.313–317.
47. Tsukahara H., Miura M., Tsuchida S., Hata I., Hata K., Yamamoto K., Ishii Y., Muramatsu I., Sudo M. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats // *Amer. J. Physiol.* – 1996. – **270**. – № 5, Pt 1. – P. E840–E845.
48. Van den Hoek T.L., Becker L.B., Shao Z., Li C., Schumacker P.T. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**. – P. 18092–18098.
49. West M.B., Rokosh G., Obal D., Velayutham M., Xuan Yu-Ting, Hill B., Keith R., Schrader J., Guo Y., Conklin D., Prabhu S., Zweier J., Bolli R., Bhatnagar A. Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition // *Circulation.* – 2008. – **118**. – P. 1970–1978.

Ин-т фізіології ім.О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: tshimanskaya@gmail.com

Матеріал надійшов до
редакції 21.02.2011

І.В. Іванова, О.В. Кислова, А.І. Соловйов

Ендотелійзалежний фактор гіперполяризації як резервний захисний механізм регуляції судинного тонусу при дії іонізуючого опромінення

Вивчали мембранні механізми, що лежать в основі змін скорочувальної активності судин, індукованих впливом γ -опромінення. Отримані результати свідчать, що останнє пригнічує ендотелійзалежне розслаблення ізольованих сегментів грудної аорти за рахунок значного зменшення NO-компонента, у той час як компонент ендотелійзалежного фактора гіперполяризації (ЕЗФ) залишається практично незмінним. Це підтверджувалося при визначенні вмісту метаболітів NO – нітритів: концентрація ацетилхолінстимульованого нітрит-аніона, що виділяється аортою опромінених щурів, була значно нижчою від контролю. Результати електрофізіологічних експериментів показали, що хоча опромінення значно пригнічувало сумарний вихідний струм у мембранах гладеньком'язових клітин аорти, однак цільність струму, що проходив через апамінчутливі калієві канали, при цьому не змінювалась, а через харибдотоксинчутливі – навіть істотно зростала. Таким чином, ЕЗФ стійкий до впливу γ -опромінення. Оскільки його активність зростала в умовах опромінення, можна припустити, що він відіграє ключову роль у резервному захисному механізмі, що вступає в дію при розвитку ендотеліальної дисфункції.

Ключові слова: ендотелійзалежний фактор гіперполяризації, оксид азоту, ендотелій, гладеньком'язові клітини, калієві канали, опромінення.

ВСТУП

Як відомо, ендотелій бере участь у регуляції судинного тонусу за допомогою секреції багатьох констрикторних та дилататорних речовин, які, в свою чергу, впливаючи на калієві канали мембран гладеньком'язових клітин (ГМК), здатні викликати скорочення або розслаблення кровоносних судин. Встановлено, що ендотелійзалежне розслаблення (ЕЗР) судин виникає за допомогою секреції/виділення низки вазодилататорних факторів [29]. Ендотелійзалежний фактор розслаблення (ЕЗФР), ідентифікований як NO, та простациклін, здатні відкривати калієві канали мембран ГМК, що призводить до виходу іонів калію, гіперполяризації, інактивації потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу та розслаблення судин [6, 26].

Було показано, що вагомий внесок у ЕЗР робить його третій, відмінний від NO та простацикліну, компонент, що позначається терміном “ендотеліальний гіперполяризувальний фактор” (ЕЗФГ), який вперше був уведений у 1988 р. [7]. Він характеризується здатністю викликати гіперполяризацію не тільки ГМК, але й ендотеліальних клітин (ЕК) [5, 13, 16, 19, 33]. Так, за наявності блокаторів NO-синтази та простацикліну ацетилхолін (АХ) викликав ЕЗР судин, яке супроводжувалось дозозалежною гіперполяризацією мембран ЕК і ГМК і підвищенням їхнього потенціалу спокою [11, 14]. Хімічна природа ЕЗФГ остаточно не встановлена, але дані багатьох досліджень свідчать, що, залежно від типу судин і виду тварин, функціональні його особливості притаманні багатьом та-

© І.В. Іванова, О.В. Кислова, А.І. Соловйов

ким сполукам, як метаболіти арахідонової кислоти ейпоксіейкозатрієнові та тригідроксіейкозатрієнові кислоти [4, 21], H_2O_2 [15, 24], натрійуретичні пептиди С-типу [24, 44], H_2S [16] та навіть K^+ [24]. Тобто, якщо терміном ЕЗФР позначається одиночна, чітко ідентифікована сполука (NO), то він включає в себе низку ендотеліальних факторів, механізм дії яких досліджується досить давно і продовжує бути предметом наукових дискусій.

Вважається, що ЕЗГФ-індукований механізм вазодилатації пов'язаний з активацією кальційзалежних калієвих каналів малої (SKCa) та середньої провідності (IKCa) у мембранах ЕК [19, 23, 26] і ГМК [6, 11, 21]. У відповідь на стимуляцію фізичними або нейрогуморальними чинниками у ЕК підвищується внутрішньоклітинна концентрація іонізованого кальцію, ендотелієм виділяється ЕЗГФ, що призводить до відкриття каналів SKCa та IKCa, витоку K^+ та гіперполяризації мембран ЕК [19]. Надалі ЕЗГФ може викликати гіперполяризацію ГМК через активацію каналів SKCa та IKCa у мембранах ГМК [6, 11, 21] або прямим її розповсюдженням від ЕК до ГМК через міоендотеліальні контакти [10, 14] чи відкриттям ендотеліальних IKCa-каналів, виходом K^+ з ЕК та акумуляції їх у просторі між ЕК і ГМК [16, 19, 23]. Ці механізми розвитку гіперполяризації мембран ГМК не обов'язково взаємовиключні, вони можуть проходити послідовно або одночасно, залежно від типу судин та умов експерименту, та залишаються предметом подальших наукових досліджень.

Встановлено, що сумісна дія селективного блокатора SKCa-каналів апаміну та неселективного блокатора IKCa харибдотоксину повністю блокує ЕЗФГ-гіперполяризацію мембран судинних міоцитів [20, 22, 45]. Були отримані фармакологічні підтвердження, що саме IKCa-канали беруть участь у процесах ендотеліязалежної гіперполяризації [11, 32]. Наприклад,

показано, що заміна харибдотоксину на блокатор калієвих каналів великої провідності іберіотоксин не призводила до повного пригнічення гіперполяризації мембран ЕК [17].

Відомо, що ендотелій є найбільш радіочутливою складовою судинної стінки, і саме порушення його функціонального стану значною мірою визначає зміни скорочувальних властивостей судин під дією іонізуючого опромінення [2]. Вплив γ -радіації здатний викликати пригнічення ЕЗР судин [31, 37], через втрату спроможності ендотелію контролювати судинний тонус, що призводитиме до розвитку артеріальної гіпертензії [36]. Опромінення може по-різному впливати на окремі компоненти ЕЗР судин і пов'язані з ними мембранні процеси [2, 37, 38], тому вивчення механізмів дії γ -радіації на судини є важливим для проведення направленої фармакологічної корекції судинних розладів. Відомо, що маркерами NO в організмі є нітрити (NO_2^-) та нітрати (NO_3^-), що утворюються в результаті його метаболічних перетворень [9, 39]. Показано, що серед стабільних метаболітів NO, який продукується стимульованим АХ ендотелієм, значно зростає питома вага саме нітрит-аніона [9], тому вимірювання його вмісту може відображати зміни концентрації ендотеліального NO. Оскільки, згідно з вищевказаним, гіперполяризація мембран судинних ГМК, що виникає внаслідок дії ЕЗГФ, пов'язана з каналами SKCa та IKCa, то вивчення їх активності при опроміненні може позначитися на функціонуванні ЕЗГФ. Тому метою нашого дослідження було вивчення мембранних механізмів розвитку ендотеліальної дисфункції судин, індукованих впливом іонізуючого опромінення.

МЕТОДИКА

У дослідженні було використано 20 самців-щурів лінії Вістар масою 170–220 г.

Тварин піддавали загальному одноразовому зовнішньому опроміненню в дозі 6 Гр при потужності 0,8-0,84 Гр/хв із використанням джерела "ТГТ Рокус-М", Росія (^{60}Co). Декапітацію їх здійснювали після попередньої анестезії фенобарбіталом натрію (50 мг/кг).

У щурів видаляли грудну аорту, очищали її від жирової та сполучної тканин. Сегменти аорти розміром 2–3 мм фіксували у проточній камері на сталевих гачках з навантаженням 10–20 мН і перфузували термостабілізованим (37° С) розчином Кребса. Реєстрацію скорочень здійснювали в ізометричному режимі за допомогою аналогово-цифрового перетворювача Lab-Trax 4/16 ("World Precision Instruments", США), з'єданого з персональним комп'ютером.

Скорочення ізольованих сегментів аорти викликали додаванням до перфузуючого розчину норадреналіну бітартату (НА, 10^{-6} моль/л). ЕЗР досліджуваних судин викликали кумулятивною аплікацією АХ (10^{-9} – 10^{-5} моль/л) і реєстрували на фоні скорочення, викликаного дією НА за наявності у розчині індометацину (10^{-5} моль/л).

Для визначення вмісту нітритів з аорти видаляли сегмент довжиною 1 см, вивертали його та для надання йому робочого навантаження натягували на спеціально виготовлену поліетиленову трубку діаметром 3 мм і довжиною 15 мм. Сегмент аорти витримували в такому положенні у розчині Кребса протягом 30 хв. Впродовж 2 год судини інкубували (37° С) у розчині Кребса (10^{-6} моль/л) і без нього. Вимірювали вміст нітритів за допомогою реактиву Гріса на фотометрі "Screen Master" (Італія) спектрофотометричним методом [1]. Потім за методом Бредфорд [3] визначали вміст загального білка в гомогенатах досліджуваних сегментів, отриманих з використанням гомогенізатора Потера.

Для проведення досліджень використовували модифікований розчин Кребса

наступного складу (ммоль/л): NaCl – 133,0, KCl – 4,7, NaHCO₃ – 16,3, NaH₂PO₄ – 1,38, CaCl₂ – 2,5, MgCl₂ – 1,05, глюкоза – 7,8 (рН 7,4). Усі названі реактиви були виробництва фірми "Sigma" (США). В експериментах також використовували наступні реагенти: N^w-нітро-L-аргінін метиловий ефір (L-NAME, $3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, "Sigma", США), апамін і харибдотоксин (10^{-6} моль/л, "Peninsula Laboratories Europe LTD", Японія) та неселективний інгібітор калієвих каналів тетраетиламоній (ТЕА, 5 ммоль/л, "Sigma", США).

Трансмембранні іонні струми ГМК досліджували методом patch-clamp у конфігурації ціла клітина. Свіжоізольовані ГМК аорти отримували таким чином. Сегменти судин поміщали у розчин, що містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 6, MgCl₂ – 3, глюкози – 10, HEPES – 10, а також 1 мг/мл папаїну (11,55 од./мл), 1 мг/мл дитіотретіол, та 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну. Тканини інкубували у термостаті (+37°С) протягом 20 хв, відмивали від папаїну у свіжому розчині та піпетували. Аліквоти отриманих ізольованих ГМК поміщали у розчин з нормальною концентрацією Ca²⁺, що містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5,9, MgCl₂ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, HEPES – 10, глюкози – 11,5 (рН 7,4). Фіксацію потенціалу та реєстрацію струмів здійснювали за допомогою підсилювача Axopatch 200B та аналого-цифрового перетворювача Digidata 1200B ("Axon Instruments", США). Результати аналізували за допомогою програми pCLAMP 9.0 та Origin 6.0. Електроди для вимірювання трансмембранного струму виготовляли із боросилікатних скляних капілярів. Електроди, що мали опір 2–5 МОм, заповнювали розчином такого складу (ммоль/л): KCl – 140, Na₂АТФ – 1, MgCl₂ – 1, EGTA – 0,3, HEPES – 10 (рН 7,2).

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Origin 6.0 зі знаход-

женням середнього арифметичного та стандартної помилки середнього значення ($M \pm m$). Порівняння вибірок проводили за критерієм t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження ендотелійзалежних реакцій судин. Для визначення механізмів розвитку ендотеліальної дисфункції судин застосовувався метод фармакологічного розділення основних компонентів ЕЗР за допомогою селективних блокаторів. Дія простацикліну блокувалася індометацином, NO-залежного компонента – L-NAME, а ефекти ЕЗГФ усувалися при сукупній дії двох специфічних блокаторів кальційзалежних калієвих каналів апаміну та харибдотоксину. Оскільки у наших попередніх дослідженнях було виявлено, що внесок простацикліну в загальне ЕЗР аорти щурів на дію АХ незначний, цей компонент протягом усіх

експериментів блокувався індометацином. Було встановлено, що сегменти аорти щурів контрольної групи відповідали дозозалежним розслабленням на дію АХ у концентраціях 10^{-9} – 10^{-5} моль/л. Максимальна амплітуда цього розслаблення становила $92,3 \pm 2,1\%$ ($n=12$, рис.1). На 30-ту добу пострадіаційного періоду спостерігалось різке зменшення АХ-індукованого розслаблення: до $42,8 \pm 2,9 \%$ ($n=8$, $P < 0,001$; рис. 2) відносно контролю. Аналіз результатів дослідження показав, що іонізуюче опромінення знижує також і чутливість ефекторних елементів судин до дії АХ: значення $\log EC_{50}$ становило $-6,1 \pm 0,02$, що вірогідно відрізнялося від контролю: $-7,8 \pm 0,20$ ($n = 8$, $P < 0,01$). Отримані результати свідчать про те, що γ -опромінення здатне суттєво пригнічувати ЕЗР аорти щурів на всьому діапазоні концентрацій АХ.

Додавання до розчину Кребса L-NAME значно зменшувало ЕЗР реакцій судин

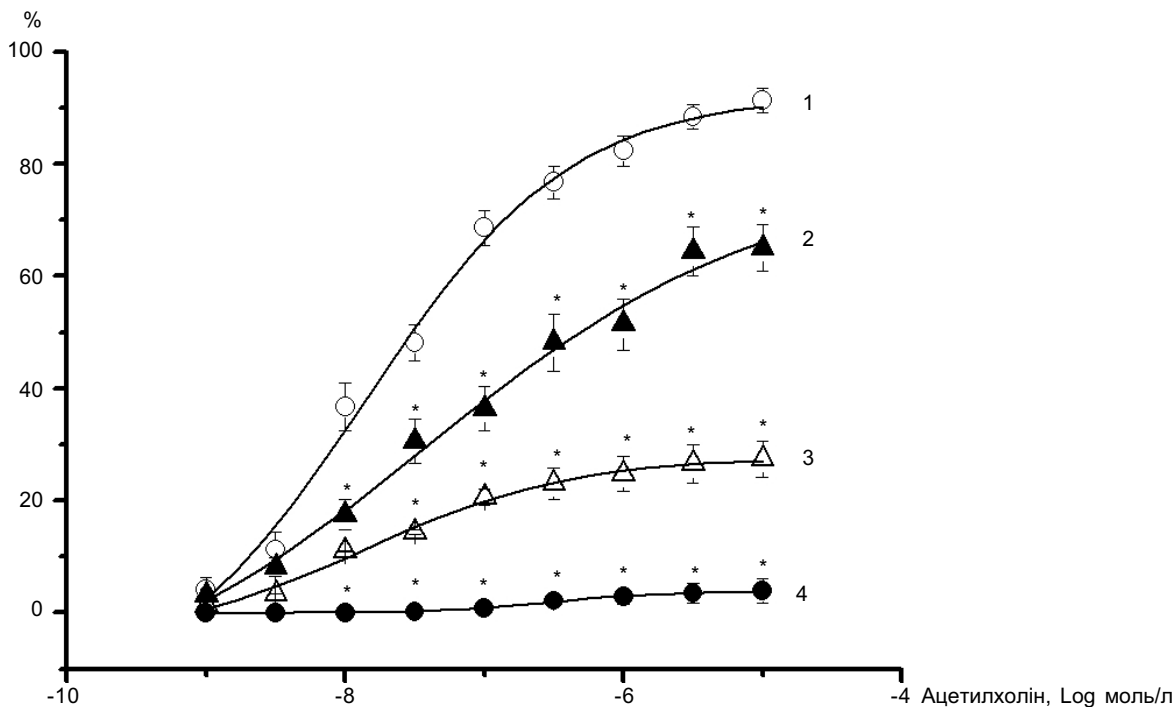


Рис 1. Ацетилхолініндуковане ендотелійзалежне розслаблення судинних сегментів аорти щурів контрольної групи: 1 – вихідний стан, 2 – за наявності апаміну та харибдотоксину, 3 – метилового ефіру N^w-нітро-L-аргініну, 4 – метилового ефіру N^w-нітро-L-аргініну, апаміну, харибдотоксину та тетраетиламонію. * $P < 0,05$

контрольної групи щурів: до $27,4 \% \pm 3,3 \%$ ($n=10$, $P<0,001$), у той час як сумісна дія апаміну і харибдотоксину знижувала амплітуду ЕЗР лише до $65,0 \% \pm 4,1 \%$ ($n=10$, $P<0,001$; рис.1). Блокування NO-синтази не впливало на амплітуду ЕЗР аорти опроміненних щурів: значення максимальної дилатації при цьому вірогідно не змінювалося: з $42,8 \pm 3,0$ до $39,6 \% \pm 2,3 \%$ ($n=8$, $P>0,05$; див. рис.2). Дія апаміну і харибдотоксину, навпаки, спричиняла значне зменшення амплітуди ЕЗР: до $16,0 \% \pm 4,7 \%$ ($n=8$, $P<0,05$). Для усунення залишкової амплітуди ЕЗР судин у розчин Кребса разом з апаміном і харибдотоксинами і L-NAME додавався неселективний блокатор калієвих каналів ТЕА, після чого реакція розслаблення практично зникла: $2,3 \% \pm 0,3 \%$ ($n=8$, $P<0,001$). Таким чином, результати експериментів свідчать, що опромінення здатне пригнічувати ЕЗР за рахунок значного зменшення його NO-компонента, у той час як ЕЗГФ-компонент цього роз-

слаблення залишається практично незмінним (див. рис. 1, 2).

Вимірювання вмісту нітритів, утворених ендотелієм аорти. Таким чином оцінювалася кількість продукування ендотелієм NO. Результати показали, що опромінення суттєво не впливало на базальний вміст нітрит-аніона, що виділяли сегменти аорти (рис. 3). АХ-стимульований вміст нітрит-аніона, утвореного ендотелієм аорти щурів контрольної групи, становив $27,0$ нмоль/мг $\pm 2,7$ нмоль/мг і був вірогідно вищий від базального ($15,7$ нмоль/мг $\pm 1,1$ нмоль/мг, $n=6$, $P<0,001$). Концентрація АХ-стимульованого нітрит-аніона, утворена аортою опроміненних щурів, була значно нижчою, ніж у контролі та становила $14,9$ нмоль/мг $\pm 1,7$ нмоль/мг ($n=6$, $P<0,001$). При цьому АХ-стимульований вміст нітрит-аніона достовірно не відрізнявся від базального (див. рис.3). Отже, згідно з отриманими результатами, можна припустити, що радіаційний вплив практично повністю блокує здатність

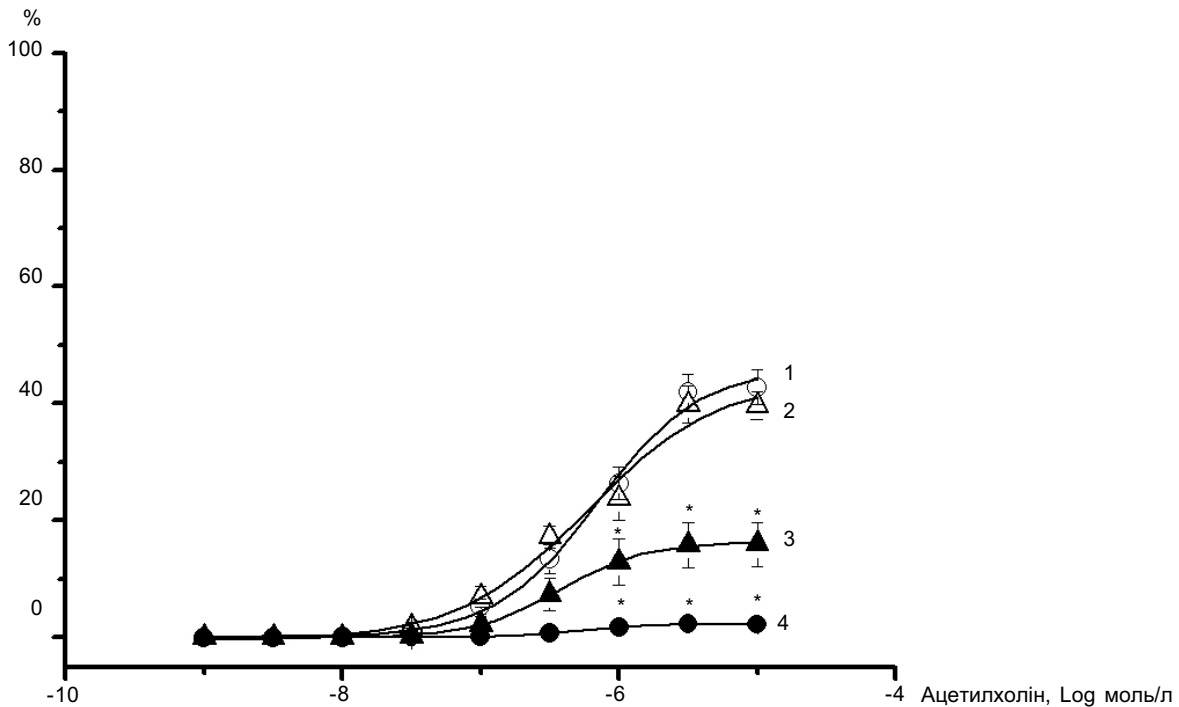


Рис 2. Ацетилхолініндуковані реакції судинних сегментів аорти щурів, досліджуваних на 30-ту добу після опромінення (1) та впливу метилового ефіру N^o-нітро-L-аргініну (2), апаміну та харибдотоксину (3), метилового ефіру N^o-нітро-L-аргініну, апаміну, харибдотоксину та тетраетиламонію (4). *P<0,05

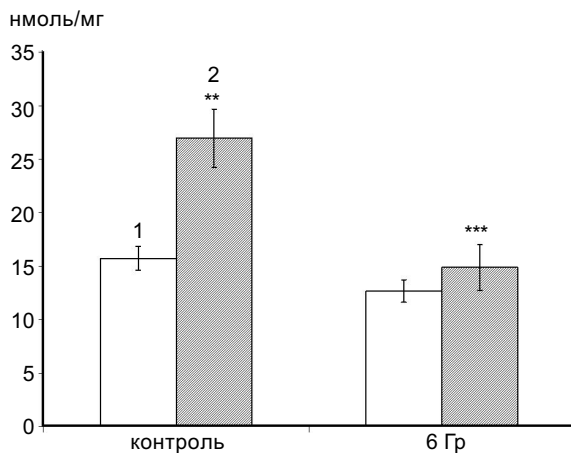


Рис 3 Базальна (1) та стимульована (2) ацетилхоліном концентрація нітрит-аніона (n=6), утвореного з оксиду азоту, що виділявся ендотелієм сегментів аорти (через 2 год інкубації).

**P < 0,01 порівняно з базальною концентрацією;
***P < 0,001 порівняно зі стимульованою концентрацією

ендотелію аорти виділяти оксид азоту на дію АХ.

Електрофізіологічні дослідження. Сумарний вихідний струм було зафіксовано у відповідь на ступінчасту деполяризацію плазматичної мембрани ГМК від -100 до +70 мВ через кожні 3 с за підтримуваного потенціалу -60 мВ. Отримані результати показали, що γ -опромінення значно пригнічує сумарний вихідний струм: при максимальному рівні деполяризації мембрани +70 мВ щільність струму у опромінених тварин становила $24,4 \text{ пА/пФ} \pm 2,6 \text{ пА/пФ}$, що було значно нижче порівняно з контролем ($63,3 \text{ пА/пФ} \pm 3,9 \text{ пА/пФ}$, n=8, P<0,001; рис. 4, 5). В обох групах тварин проводилась оцінка внеску в сумарний вихідний струм каналів SKCa і IKCa. Дія апаміну, селективного блокатора SKCa-каналів, достовірно знижувала сумарний вихідний струм як у контролі (з $63,3 \pm 3,9$ до $37,9 \text{ пА/пФ} \pm 5,4 \text{ пА/пФ}$, n=8, P<0,01; рис.4), так і за умов опромінення

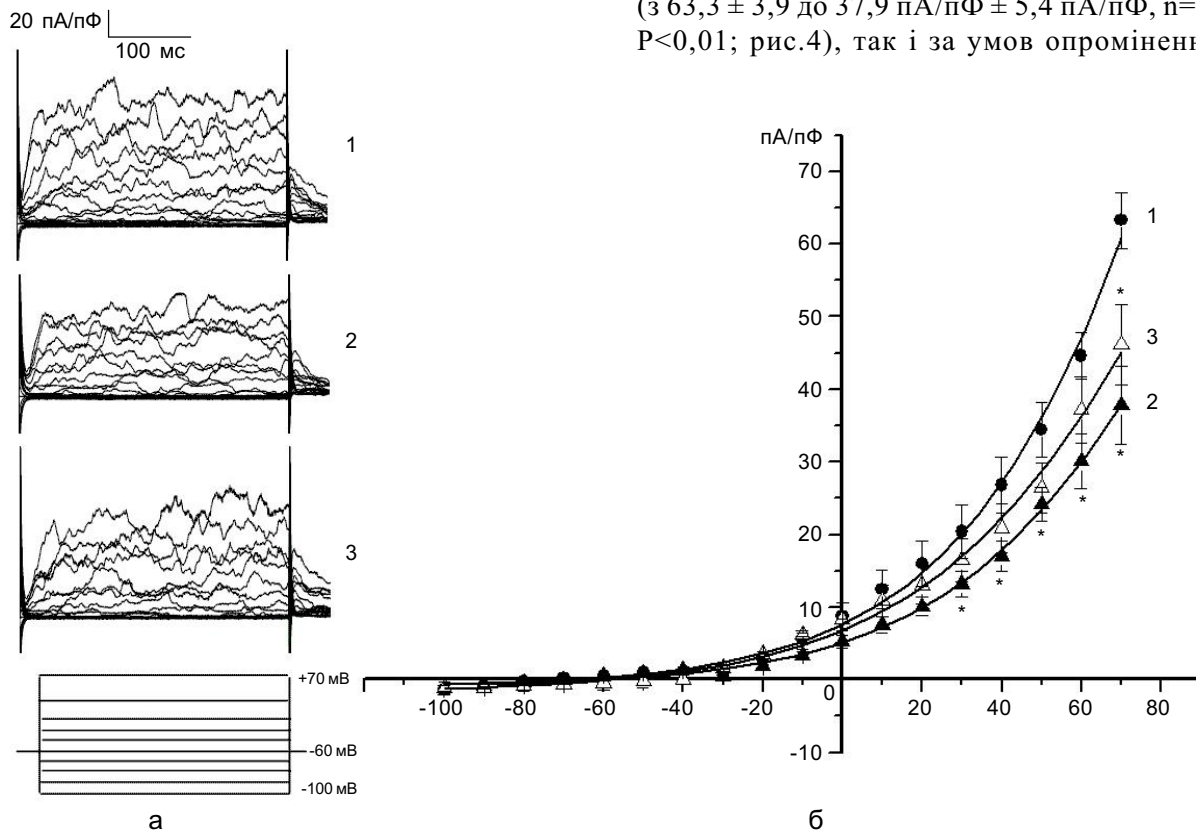


Рис 4. Сумарний вихідний калієвий струм мембрани гладеньком'язових клітинах аорти контрольних щурів (а): 1 – вихідний стан, 2 – вплив апаміну, 3 – харибдотоксину, а також вольт-амперна характеристика вихідного струму (б). * P<0,05 порівняно з контрольними значеннями

(з $24,4 \pm 2,6$ до $11,5 \text{ пА/пФ} \pm 1,6 \text{ пА/пФ}$, $n=8$, $P<0,001$; див. рис. 5). Харибдотоксин, неселективний інгібітор ІКСа-каналів, майже не змінював сумарний вихідний струм у контролі (див. рис 4), водночас при опроміненні пригнічував амплітуду вихідного струму так само, як апамін: до $12,3 \text{ пА/пФ} \pm 1,3 \text{ пА/пФ}$ ($n=8$, $P<0,001$) при рівні мембранного потенціалу $+70 \text{ мВ}$ (див. рис. 5). Таким чином, результати показали, що хоча опромінення значно пригнічувало сумарний вихідний струм мембрани ГМК, але щільність струму, який проходив через апамінчутливі калієві канали, при цьому не змінювалась, а через харибдотоксинчутливі – навіть суттєво підвищувалася (рис. 6).

Вищенаведені результати свідчать, що внаслідок дії іонізуючого опромінення значно зменшується NO-залежний компонент інтегрального розслаблення [38]. Це підтверджують і результати досліджень з визначення вмісту нітрит-аніона, який

виділяється ендотелієм аорти. Зменшення NO-компонента ЕЗР може бути пов'язано з пригніченням ендотеліальної активності NO-синтази, а також вільнорадикальною інактивацією NO при дії γ -опромінення [31]. Нами нещодавно було показано, що внаслідок іонізуючої радіації майже повністю пригнічується активність кальційзалежних калієвих каналів великої провідності не тільки мембрани ГМК [35], а і ендотеліоцитів [42]. Оскільки ці канали беруть участь у формуванні рушійної сили для входу Ca^{2+} та кальційзалежної ендотеліальної активації NO-синтази, це також може призводити до зниження синтезу NO, що і проявляється в зменшенні ЕЗР.

Вважається, що внесок ЕЗГФ у ЕЗР збільшується зі зменшенням діаметра судин, тобто найбільшим він буде у резистивних судин, від яких залежить рівень системного кров'яного тиску [34, 43]. Отже значний внесок ЕЗГФ-компонента в ЕЗР саме цих судин доводить його важливу роль у процесах контролю судинного тонуусу. Навпаки, внесок NO-компонента в ЕЗР підвищується

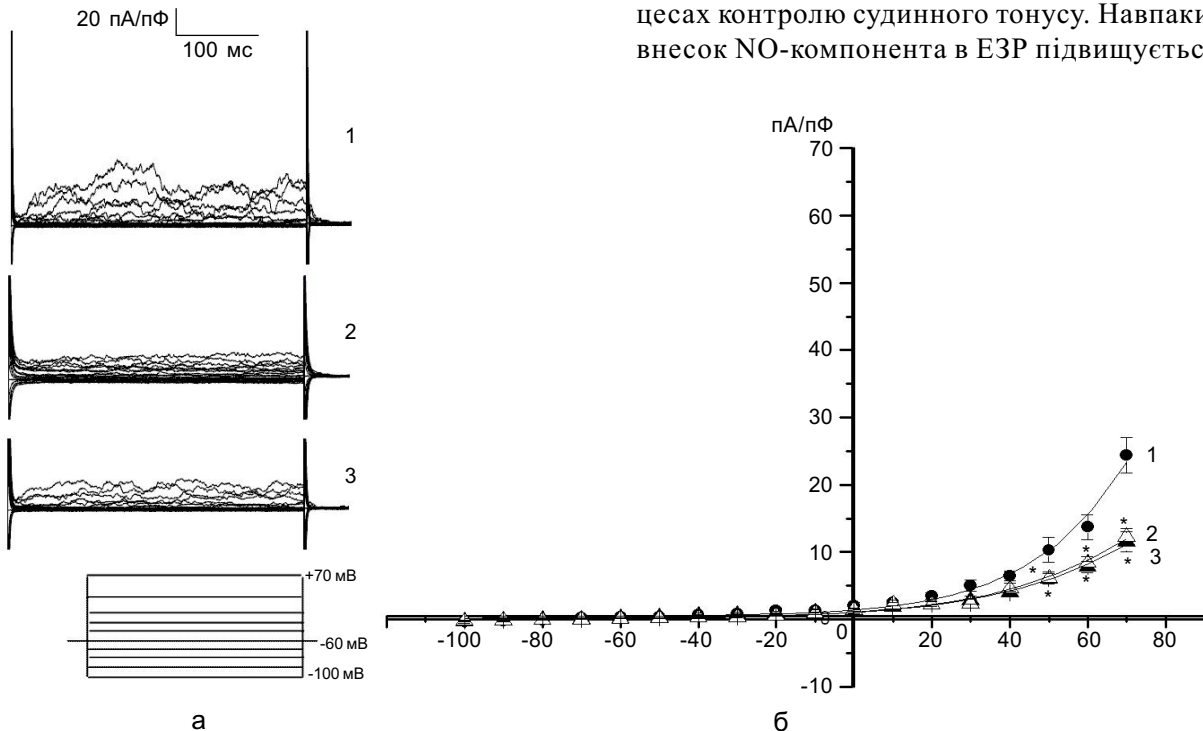


Рис 5. Сумарний вихідний калієвий струм мембрани гладеньком'язових клітинах аорти опромінених щурів (а) та вольт-амперна характеристика вихідного струму (б): 1 – 30-та доба після опромінення, 2 – вплив апаміну, 3 – вплив харибдотоксину. * $P<0,05$ порівняно зі значеннями, зареєстрованими на 30-ту добу після опромінення

зі збільшенням діаметра судин [34, 43], тобто в аорті здорових щурів переважає NO-залежна релаксація, а дія ЕЗГФ мінімальна, що і показали наші результати. У судинах опромінених тварин синтез та/або виділення NO зменшувався, що супроводжувалося збільшенням ЕЗГФ-компонента, дією якого значною мірою визначалася величина ЕЗР. Таким чином, наші результати дають змогу припустити, що за ендотеліальної дисфункції ЕЗГФ здатний збільшувати свою функціональну активність, у той час як ефект NO значно знижується. Ця компенсаторна функція ЕЗГФ при розвитку серцево-судинної патології була показана як на деяких експериментальних моделях [6, 17], так і при лікуванні людей. Так, наприклад, активність ЕЗГФ зростала у пацієнтів з есенціальною гіпертензією за умов пониженого ендотеліозалежного NO виділення [40].

Результати показали, що апамінчутливий компонент струму мембрани ГМК, виявляв стійкість до γ -опромінення, а майже не пред-

ставлені в контрольних ГМК харибдотоксинчутливі канали при цьому значно активувалися (див. рис. 6). Існують дані, що експресія ІКСа-каналів значно посилюється при проліферації ГМК [27, 28], яка спостерігається при серцево-судинних захворюваннях [8, 41]. Можна припустити, що за умов опромінення внесок ЕЗГФ зростає внаслідок збільшення експресії ІКСа-каналів при проліферації ГМК, яка може відбуватися за розвитку дисфункції судин під впливом опромінення. Згідно з цим, коли чутливий до радіації NO [31, 37] не здатний підтримувати вазодилатацію, може вступати в дію захисний механізм, який частково проявляється в активації пов'язаних з ЕЗГФ ІКСа-каналів ГМК, що посилює гіперполяризацію мембран ГМК та, відповідно, вазодилатацію судин. При цьому слід враховувати, що ендотеліальні ІКСа-канали також можуть сприяти збільшенню ЕЗГФ-компонента. Оскільки відомо, що їх активність підвищується при вазо-

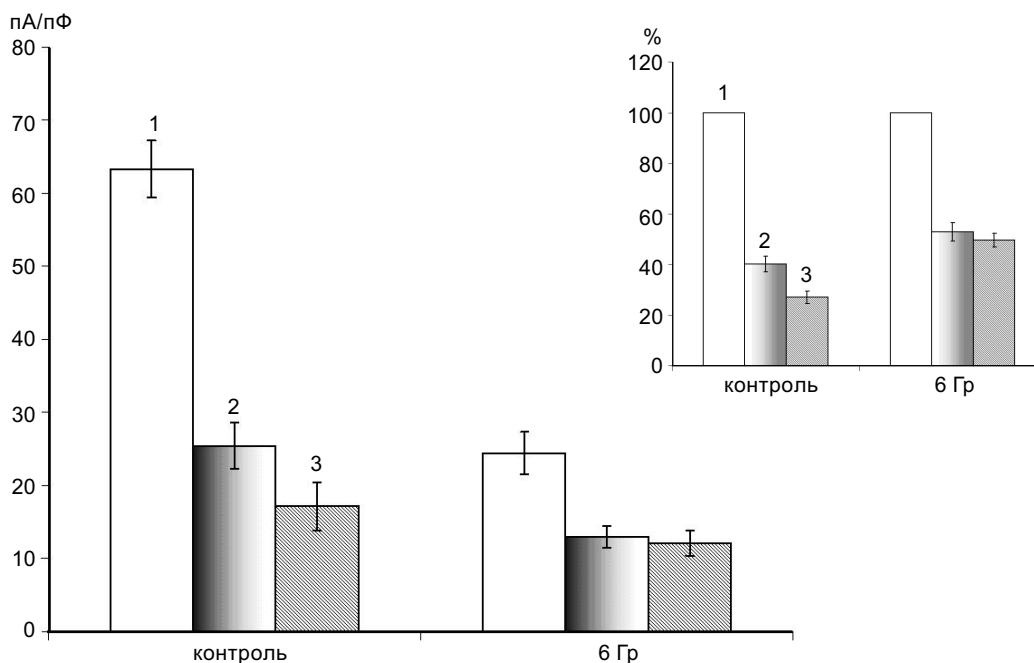


Рис. 6. Апамін- і харибдотоксинчутливі компоненти загального вихідного калієвого струму, зареєстрованого у гладеньком'язових глітинах аорти контрольних та щурів, досліджуваних на 30-ту добу після опромінення при рівні мембранного потенціалу +70 мВ: 1 – сумарний вихідний струм, 2 – апамінчутливий компонент калієвого струму, 3 – харибдотоксинчутливий компонент калієвого струму. На вставці показано відносний внесок кожного з компонентів у загальний струм, що був прийнятий до 100 % як в контролі, так і за умов опромінення

констрикції [11, 12], вона може зростати і при судинній патології, викликаній дією іонізуючого опромінення.

Результати дослідження показали, що хоча L-NAME майже не впливав на амплітуду ЕЗР судин опромінених тварин, після сумісної дії апаміну і харибдотоксину рееструвалася залишкова амплітуда ЕЗР, яка повністю усувалася тільки за додаткового впливу ТЕА. Тому можна припустити, що в процес розвитку гіперполяризації мембрани ГМК, можливо, залучаються також інші типи калієвих каналів. Так, наприклад, існують дані, що калієві канали вхідного випрямлення та Na^+ , K^+ -помпа можуть брати участь у ЕЗГФ-реакціях, активуючись у відповідь на незначне підвищення концентрації K^+ в міжклітинному просторі, викликати гіперполяризацію мембрани ГМК і вазодилатацію [18].

Отже, ЕЗГФ стійкий до іонізуючої радіації [37] і його активність зростає за патологічних умов [30]. Більше того, показано, що ендотелій аорти морських свинок, де не виражений ЕЗГФ-компонент, ЕЗР під впливом опромінення пригнічується практично повністю [25]. Тому не виключено, що саме ЕЗГФ може відігравати ключову роль у резервному захисному механізмі, який вступає в дію при розвитку ендотеліальної дисфункції, викликаній γ -опроміненням. Враховуючи це, подальші дослідження, направлені на вивчення механізму дії ЕЗГФ є надзвичайно перспективним напрямком для пошуку нових підходів до фармакологічної корекції порушень ендотеліальної функції судин.

И.В. Иванова, О.В. Кислова, А.И. Соловйов

ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМЫЙ ФАКТОР ГИПЕРПОЛЯРИЗАЦИИ КАК РЕЗЕРВНЫЙ ЗАЩИТНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ СОСУДИСНОГО ТОНУСА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ

Изучали мембранные механизмы, лежащие в основе изменений сократительной активности сосудов, инду-

цированных воздействием облучения. Полученные результаты свидетельствуют, что γ -радиация подавляет эндотелийзависимое расслабление изолированных сегментов грудной аорты за счет значительного уменьшения его NO-компоненты, в то время как компонента эндотелийзависимого фактора гиперполяризации (ЭЗГФ) остается практически неизменной. Это подтверждается при определении содержания метаболитов NO – нитритов: концентрация ацетилхолинстимулированного нитрита-аниона была значительно ниже контроля. Результаты электрофизиологических экспериментов показали, что хотя облучение существенно уменьшало суммарный выходящий ток в мембранах гладкомышечных клеток аорты, однако плотность тока, который проходил через апаминчувствительные калиевые каналы, при этом не изменялась, а через харибдотоксинчувствительные – даже возрастала. Таким образом, ЭЗГФ устойчивый к воздействию γ -радиации. Поскольку его активность повышалась в условиях облучения, можно предположить, что он играет ключевую роль в резервном защитном механизме, который вступает в действие при развитии эндотелиальной дисфункции.

Ключевые слова: эндотелийзависимый фактор гиперполяризации, оксид азота, эндотелий, гладкомышечные клетки, калиевые каналы, облучение.

I.V. Ivanova, O.V. Kislova, A.I. Soloviev

THE ENDOTHELIUM – DERIVED HYPERPOLARIZING FACTOR: A RESERVE DEFENCE MECHANISM OF VASODILATATION UNDER RADIATION IMPACT

The goal of this study was to determine the cellular mechanisms of vascular endothelial dysfunction in rats irradiated with γ -rays. Acetylcholine (Ach)-induced relaxation of rat thoracic aorta rings was measured as a test of endothelial integrity and function. The data obtained allow suggest that endothelial function is impaired in aorta from g-irradiated rats mainly due to the loss of EDRF/NO-dependent, but not EDHF-dependent relaxation. It has been shown that γ -irradiation reduced the Ach-induced NO-release measured as nitrite anion content. Experiments on isolated rat aortic smooth muscle cells using whole-cell patch clamp technique demonstrated that irradiation led to a significant decrease in outward potassium currents. However, γ -ray irradiation was without effect on K^+ -current carried through apamine-sensitive channels while the current through charybdotoxin-sensitive channels was increased as compared to cells from control animals. The data suggest that EDHF is resistant to ionized radiation and may constitute a crucial reserve mechanism for maintenance of blood flow under radiation. Therefore, it is likely that the subsequent studies related to EDHF identification will be important for new drugs development and targeted pharmacological intervention at endothelium dysfunction in case of radiation impact.

Key words: endothelium-derived hyperpolarizing factor, ni-

tric oxide, endothelium, potassium channels, smooth muscle cells, irradiation

Institute of Pharmacology and Toxicology of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коцюрuba A.B., Семикопна Т.В., Вікторов О.П. Спосіб кількісного визначення нітрит-аніона в біологічній рідині // Пат. України UA 31600 A, G 01 N 33/52. – Бюл. № 7–11 від 15.12.2000 р.
2. Beckman J.A., Thakore A., Kalinowski B.H., Harris J.R., Creager M.A. Radiation therapy impairs endothelium-dependent vasodilation in humans // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2001. – **37**, №3. – P. 761–765.
3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteing-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
4. Campbell W.B., Falck J.R. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors // *Hypertension.* – 2007. – **49**. – P.590–596.
5. Chataigneau T., Fleming I., Busse R. EDHF-mediated responses induced by bradykinin in the porcine coronary artery // *EDHF* – 2000. – P. 187–194.
6. Chawengsub Y., Gauthier K., Campbell W.B. Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in the regulation of vascular tone // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2009. – **297**, №2. – P. 495–507.
7. Chen G., Suzuki H., Weston A.H. Acetylcholine released endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels // *Brit. J. Pharmacol.* – 1988. – **95**. – P. 1165–1174.
8. Cheong A., Bingham A.J., Li J., Kumar B., Sukumar P., Munsch C., Buckley N.J., Neylon C.B., Porter K.E., Beech D.J., Wood I.C. Downregulated REST transcription factor is a switch enabling critical potassium channel expression and cell proliferation // *Mol. Cell.* – 2005. – **20**. – P. 45–52.
9. Cohen R.A., Plane F., Najibi S., Huk I., Malinski T., Garland C.J. Nitric oxide is the mediator of both endothelium dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P. 4193–4198.
10. Coleman H.A., Tare M., Parkington H. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2004. – **31**, №9. – P.641–649.
11. Crane G.J., Gallagher N., Dora K.A., Garland C.J. Small and intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery // *J. Physiol.* – 2003. – **553**. – P.183–189.
12. Crane G.J., Garland C.J. Thromboxane receptor stimulation associated with loss of SKCa activity and reduced EDHF responses in the rat isolated mesenteric artery // *Brit. J. Pharmacol.* – 2004. – **142**. – P. 43–50.
13. Dora K.A., Gallagher N.T., McNeish A., Garland C.J. Modulation of endothelial cell KCa3.1 channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries // *Circ. Res.* – 2008. – **102**, № 10. – P.1148–50.
14. Dora K.A. Coordination of vasomotor responses by the endothelium // *Circ. J.* – 2010. – **74**, №2. – P. 226–232.
15. Ellis A., Triggle C.R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2003. – **81**. – P. 1013–1028.
16. Fällittou M., Vanhoutte P.M. EDHF: an update // *Clin. Sci. (Lond.)*. – 2009. – **117**, №4. – P.139–155.
17. Feletou M., Vanhoutte P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – **26**. – P.1215–1225.
18. Feletou M., Vanhoutte P. EDHF: The Complete Story. – USA: Taylor&Francis. – 2006. – 312 P.
19. Feletou M., Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization: past beliefs and present facts // *Ann. Med.* – 2007. – **39**. – P. 495–516.
20. Garland C.J., Hiley C.R., Dora K.A. EDHF: spreading the influence of the endothelium // *Brit. J. Pharmacol.* – 2010. – Dec 6.
21. Gauthier K., Chawengsub Y., Goldman D., Conrow R.E., Anjaiah S., Falck J., Campbell W.B. 11(R), 12(S), 15(S)-trihydroxyeicosa-5(Z), 8(Z), 13(E)-trienoic acid: an endothelium-derived 15-lipoxygenase metabolite that relaxes rabbit aorta // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – **294**. – P. 1467–1472.
22. Gluais P., Edwards G., Weston A., Falck J.R., Vanhoutte P.M., Fällittou M. Role of SK_{Ca} and IK_{Ca} in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery // *Brit. J. Pharmacol.* – 2005. – **144**, №4. – №P. 477–485.
23. Grgic I.; Kaistha B.P., Hoyer J., Kuhler R. Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses – relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery // *Ibid.* – 2009. – **157**, 4. – P. 509–526.
24. Griffith T.M. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? // *Ibid.* – 2004. – **141**, №6. – P. 881–903.
25. Ivanova I.V., Tishkin S.M., Kislova O.V. Kizub I.V., Soloviev A.I. The EDHF component of the endothelium-dependent relaxation constitutes a reserve mechanism of vasodilatation under radiation impact // In: 5-th International EDHF Symposium – Endothelium, Vasoactive Factors and Inflammation. – 2008. – Tampere, Finland. – 30 P.
26. Jackson W.F. Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation // *Microcirculation.* – 2005. – **12**, №1. – P. 113–127.
27. Kuhler R, Wulff H., Eichler I., Kneifel M., Neumann

- D., Knorr A., Grgic I., Kdmpfe D., Si H., Wibawa J., Real R., Borner K., Brakemeier S., Orzechowski H.D., Reusch H.P., Paul M., Chandy K.G., Hoyer J. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis // *Circulation*. – 2003. – **108**. – P. 1119–1125.
28. Neylon C.B., Lang R.J., Fu Y., Bobik A., Reinhart P.H. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channel in vascular smooth muscle: relationship between $K(Ca)$ channel diversity and smooth muscle cell function // *Circ. Res.* – 1999. – **85**. – P. 33–43.
29. Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium // *Physiol. Rev.* – 2001. – **81**. – P. 1415–1459.
30. Park Y., Capobianco S., Gao X., Falck J.R., Dellsperger K.C., Zhang C. Role of EDHF in type 2 diabetes-induced endothelial dysfunction // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – **295**. – P. 1982–1988.
31. Qi F.Z., Sugihara T., Hattori Y., Kanno M., Abe K. Functional and morphological damage of endothelium in rabbit ear artery following irradiation with cobalt 60 // *Brit. J. Pharmacol.* – 1998. – **123**, №4. – P. 653–660.
32. Sandow S.L., Neylon C.B., Chen M.X., Garland C.J. Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K^{+}) and connexins: possible relationship to vasodilator function? // *J. Anat.* – 2006. – **209**. – P.689–698.
33. Selemidis S., Cocks T. Myoendothelial and circumferential spread of endothelium-dependent hyperpolarization in coronary arteries // *EDHF*. – 2000. – P. 75–86.
34. Shimokawa H., Yasutake H., Fujii K., Owada M.K., Nakaike R., Fukumoto Y., Takayanagi T., Nagao T., Egashira K., Fujishima M., Takeshita A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1996. – **28**. – P. 703–711.
35. Soloviev A.I., Tishkin S.M., Ivanova I.V., Zelensky S.N., Dosenko V.E., Kyrychenko S.V., Moreland R.S. Function and mRNA expression of large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channels in rat aorta smooth muscle cells under ionized irradiation // *Life Sci.* – 2009. – **84**. – P. 164–171.
36. Soloviev A.I., Tishkin S.M., Zelensky S.N., Ivanova I.V., Kizub I.V., Pavlova A.A., Moreland R.S. Ionizing radiation alters myofilament calcium sensitivity in vascular smooth muscle: Potential role of protein kinase C // *Amer. J. Physiol. Reg. Integr. Compar. Physiol.* – 2005. – **289**. – P. 755–762.
37. Soloviev A., Tishkin S., Parshikov A. Mosse I., Stefanov A., Gurney A., Osipenko O. The EDHF-dependent but not the NO-dependent component of the acetylcholine-induced relaxation of the rabbit aorta resistant to ionized radiation // *Endothelium-dependent Hyperpolarizations*. – EDHF–2000. – P. 400–410.
38. Sugihara T., Hattori Y., Yamamoto Y., Qi F., Ichikawa R., Sato A., Liu M., Abe K., Kanno M. Preferential impairment of nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in human cervical arteries after irradiation // *Circulation*. – 1999. – **100**, №6. – P. 635–641.
39. Sun J., Zhang X., Broderick M., Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay // *Sensors*. – 2003. – **3**. – P. 276–284.
40. Taddei S., Versari D., Cipriano A., Ghiadoni L., Galetta F., Franzoni F., Magagna A., Virdis A., Salvetti A. Identification of a cytochrome P450 2C9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2006. – **48**. – P. 508–515.
41. Tharp D.L., Wamhoff B.R., Wulff H., Raman G., Cheong A., Bowles D.K. Local delivery of the $KCa3.1$ blocker, TRAM-34, prevents acute angioplasty-induced coronary smooth muscle phenotypic modulation and limits stenosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – **28**. – P. 1084–1089.
42. Tishkin S.M., Rekalov V.V., Ivanova I.V., Moreland R.M., Soloviev A.I. Ionized non-fatal whole-body irradiation inhibits Ca^{2+} -dependent K^{+} -channels in endothelial cells of rat coronary artery: possible contribution to depression of endothelium-dependent vascular relaxation // *J. Radiat. Biol.* – 2007. – **83**, №3. – P. 161–169.
43. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries // *J. Clin. Invest.* – 1997. – **100**. – P. 2793–2799.
44. Wei C.M., Hu S., Miller V.M., Burnett J.C. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – **205**. – P.765–771.
45. Zygmunt P.M.; Edwards G.; Weston A.H. Larsson B., Hugstedt E.D. Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery // *Brit. J. Pharmacol.* – 1997. – **121**, №1. – P. 141–149.

Е.Ф. Кахановський, В.Ф. Сагач

Дослідження оксидативного стресу, антиоксидантного захисту та ендотеліальної дисфункції при гострій ішемії–реперфузії нижніх кінцівок у людини

Дослідження проведено у людей похилого віку ($70 \pm 2,2$ роки), котрі були прооперовані з приводу гострої оклюзії стегнової артерії на різних анатомічних рівнях. На основі отриманих результатів про суттєве збільшення первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) гідроперекисів ліпідів і одного із кінцевих продуктів ПОЛ малонового діальдегіду зроблено висновок, що при ішемії–реперфузії в ураженій нижній кінцівці розвивався оксидативний стрес. Істотне підвищення активності каталази в крові свідчить імовірно, що система антиоксидантного захисту в цих умовах працює з напругою. За умов ішемії–реперфузії виявлено також збільшення активності аспаратамінотрансферази, аланінамінотрансферази і креатинінкінази, які традиційно використовуються в клінічних умовах як індикатори патологічних станів. У крові пацієнтів обох груп як у період ішемії, так і при реперфузії був виявлений стабільний мітохондріальний фактор, який є маркером відкриття мітохондріальної пори. Нами виявлені значні зміни вмісту NO_2^- в крові за умов реперфузії, направленість яких певною мірою залежала від тривалості ішемії. Значні зміни стабільного метаболіту NO^- нітриту в крові вказують на можливість розвитку ендотеліальної дисфункції. Сукупність усіх отриманих результатів вказує на розвиток оксидативного стресу і ендотеліальної дисфункції у людей з гострими оклюзуючими ураженнями нижніх кінцівок.

Ключові слова: оксидативний стрес, антиоксидантний захист, ішемія–реперфузія, ендотеліальна дисфункція.

ВСТУП

Гострими оклюзуючими ураженнями артерій нижніх кінцівок страждає близько 5 % осіб літнього віку, з них на частку оклюзійних уражень артерій нижніх кінцівок атеросклеротичного генезу припадає 90 % хворих, переважно чоловічої статі зрілого віку. При цьому за прогнозами експертів ВОЗ, найближчими роками очікується зростання цієї категорії хворих на 5–7 % [9, 20]. Думка про те, що ішемічні розлади у хворих з облітеруючими пошкодженнями артерій нижніх кінцівок переважно зумовлені недостатнім притоком крові в уражену кінцівку, була спростована результатами прижиттєвих ангіографічних, а також морфологічних досліджень стану судинної

мережі ампутованих кінцівок. Зокрема, було встановлено, що у деяких випадках об'єм капілярної мережі ураженої кінцівки та сумарний просвіт мікросудин перевищував діаметр оклюзованої магістральної судини [23]. Ішемія і гіпоксія тканин є лише пусковими чинниками патологічного процесу – його подальший перебіг визначається змінами метаболізму в ураженій кінцівці [9, 20, 23]. Одним із механізмів управління внутрішньоклітинним метаболізмом є перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ). Посилення цього процесу призводить до утворення надлишкової кількості вільних радикалів кисню і азоту, а також розвитку оксидативного стресу. Часто в природних умовах (при тромбозі) і завжди в штучних

© Е.Ф. Кахановський, В.Ф. Сагач

умовах (при оперативному втручанні) ішемія при відновленні кровотоку супроводжується реперфузією і реоксигенацією, що призводить до розвитку оксидативного стресу, який значною мірою є необерненим деструктивним процесом. У цей час у клітинах активується синтез оксиду азоту та його активних форм, що може викликати нітрозильне ушкодження клітин.

Відомо, що оксид азоту (NO) відіграє суттєву роль у функціонуванні судин, причому в його циклі важливе значення мають продукти ферментативного і неферментативного окиснення NO, в першу чергу стабільні метаболіти NO_2^- і NO_3^- [16]. Останнім часом з'явилось достатньо відомостей про оксид азоту як універсальний регулятор клітинного і тканинного метаболізму [14, 25, 42]. Його ефекти в артеріальних судинах залежать від концентрації, ступеня дифузії через судинну стінку, здатності взаємодіяти з кисневими радикалами тощо [2]. Оксид азоту, який синтезується в ендотеліальних клітинах судин із L-аргініну за участю ендотеліальної NO-синтази, забезпечує вазодилатацію внаслідок активації гуанілатциклази в гладеньком'язових клітинах і стимуляції синтезу циклічного гуанізинмонофосфату (цГМФ). Метаболізм NO змінюється з віком, впливаючи на ендотеліальну функцію [10, 12]. Його порушення відіграють важливу роль у дисфункції ендотелію і є невід'ємною частиною патогенезу атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, цукрового діабету тощо [6, 11, 13, 15, 28]. Нині отримано дані [18, 24, 40], що дисфункція ендотелію супроводжується послабленням його антиоксидантних можливостей, накопиченням активних форм кисню, що сприяє ініціації клітинної загибелі. Непрямим показником метаболізму NO в організмі є вміст нітритів і нітратів (кінцеві продукти), які можуть бути визначені в плазмі, сироватці крові, культуральних рідин, сечі з використанням різноманітних методів [38, 39, 43].

Це отримало широке розповсюдження в експериментальних і клінічних роботах для оцінки загального синтезу NO [11, 38, 39, 43].

Внутрішньоклітинною мішенню ушкодження вважаються мітохондрії, в яких під впливом несприятливих факторів раптово збільшується проникність обох мітохондріальних мембран, що сприяє відкриванню мітохондріальних пор (МП). Останнє, в свою чергу, супроводжується виходом із мітохондрій цілої низки молекул (до 1500 Да), зокрема цитохрому *c*, фактора індукції апоптозу та інших проапоптичних білків [30, 35, 36], для яких внутрішня мітохондріальна мембрана за нормальних умов є непроникною. Ці метаболіти запускають розвиток порушень, які призводять до апоптозу або некрозу клітин. До цього часу в літературі відсутні дані про функціональний стан мітохондрій в ендотеліальних клітинах при гострих оклюзуючих ураженнях артерій нижніх кінцівок.

Дані експериментів *in vivo* [29] свідчать про те, що оксидативний стрес, який виникає внаслідок накопичення окиснених ліпопротеїнів низької щільності, прискорює апоптоз ендотеліоцитів, однак до цього часу не проведено детальний аналіз стану антиоксидантного захисту при гострій ішемії–реперфузії нижніх кінцівок у людини. Тому метою нашої роботи стало дослідження характеру змін показників оксидативного стресу, антиоксидантного захисту та ендотеліальної дисфункції при гострій ішемії–реперфузії нижніх кінцівок у людини.

МЕТОДИКА

Обстежено 27 осіб (11 жінок і 16 чоловіків), які були прооперовані з приводу гострої оклюзії стегнової артерії на різних її анатомічних рівнях. Середній вік пацієнтів був $(70 \pm 2,2)$ років. Ішемія тривала в середньому $(135,8 \pm 52,1)$ год. Усі пацієнти страждали на супутню патологію: ішемічна хвороба серця, гіпертонічна хвороба,

облітеруючий атеросклероз нижніх кінцівок, цукровий діабет II типу, чоловіки мали тютюнову залежність.

Відбір проб крові проводили перед початком оперативного втручання зі стегнової вени ушкодженої кінцівки і через 20 хв реперфузії, після відновлення кровотоку в ураженій кінцівці. Як маркери оксидативного стресу визначали: малоновий діальдегід (МДА), що утворюється з продуктів ПОЛ при нагріванні в кислому середовищі, який при взаємодії з молекулами тіобарбітурової кислоти утворює фарбований комплекс, що досліджують за допомогою спектрофотометра при довжині хвиль 535 та 580 нм [6]; мітохондріальний фактор (МФ), який є маркером відкриття МП, – спектрофотометричне дослідження спеціально обробленої сироватки крові в ультрафіолетовій ділянці спектра при довжині хвилі від 230 до 260 нм [19]; вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) крові [3] – за описаною методикою обробляли зразки крові реактивами, відбирали гептановий шар, в якому за допомогою спектрофотометра вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 233 нм і розраховували вміст ГПЛ за формулою у відносних одиницях [3]; стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю каталази, яку визначали в сироватці крові [8], обробленої реактивами та реєстрували оптичне поглинання за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 410 нм. Стан системи оксиду азоту в судинах оцінювали за вмістом в крові NO_2^- [5], який визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 517 нм відносно розчину порівняння. За допомогою автоматичного біохімічного аналізатора Vitros - 250 (США) вивчали ферменти крові: аспартатамінотрансферазу (АсТ), аланінамінотрансферазу (АлТ), креатинінкіназу, які традиційно використовуються в клінічних умовах для ідентифікації деяких патологічних станів. Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою

критерію *t* Стьюдента, використовуючи стандартну комп'ютерну програму STATISTICA'99 Edition ("StatSoft. Inc", США). Як статистично значимі розглядалися відміни з $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оскільки вважається, що визначення вмісту нітритів дає реальну інформацію про рівень метаболізму NO і, відповідно, функціональний стан ендотелію, ми проаналізували вміст нітритів в крові при ішемії–реперфузії у різних осіб і виявили, що він змінювався неоднозначно: здебільшого зменшувався відносно рівня при ішемії, однак спостерігалось також і його збільшення. Залежно від цього було виділено дві групи осіб. До першої групи ввійшли особи (37 %, 6 чоловіків і 4 жінки) віком ($71 \pm 2,4$) роки у яких вміст нітритів підвищувався при реперфузії, ішемія тривала ($91,5 \pm 14,5$) год. Другу групу склали люди (63 %, 10 чоловіків і 7 жінок) віком ($69 \pm 3,2$) роки, у яких вміст нітритів знизився, а ішемія тривала ($161,8 \pm 82,6$) год. У першій групі тривалість ішемії була на 70 год меншою, ніж у осіб другої групи. Виходячи з цього, складається враження, що при реперфузії напрямок змін вмісту нітритів в крові пацієнтів певною мірою залежав від тривалості ішемії. З іншого боку, в першій групі вік був дещо більшим за такий у осіб другої групи.

Як з'ясувалось, у першій групі вміст нітритів у венозній крові зі стегнової вени ураженої кінцівки при ішемії становив $0,60 \text{ мкг/мл} \pm 0,14 \text{ мкг/мл}$ ($P < 0,05$), а після відновлення кровообігу – $1,43 \text{ мкг/мл} \pm 0,4 \text{ мкг/мл}$ ($P < 0,05$; рис. 1), тобто він підвищився в 2,4 раза відносно значень при ішемії. Значне збільшення кінцевих метаболітів NO при реперфузії свідчить про виражене підвищення його продукції в цей період. Надмірне утворення NO звичайно пригнічує активність ендотеліальної NO -синтази і ушкоджує ендотеліальні клітини. В другій групі

вміст нітритів у венозній крові стегнової вени ураженої кінцівки при ішемії становив $1,4 \text{ мкг/мл} \pm 0,28 \text{ мкг/мл}$ ($P < 0,05$; див. рис. 1), а після відновлення кровообігу – $0,68 \text{ мкг/мл} \pm 0,1 \text{ мкг/мл}$ ($P < 0,05$). Це свідчить про значне зниження продукції NO, яке також сприяє розвитку ендотеліальної дисфункції. У здорових людей зрілого віку вміст нітритів у крові коливається від 0 до $4,2 \text{ мкмоль/л}$ [44]. У проведених нами досліджах вміст нітритів при ішемії–реперфузії ми аналізували у осіб похилого віку, причому з наявністю супутньої серцево-судинної патології. Існують дані про виражену негативну кореляцію між вмістом нітритів і віком пацієнтів ($r = -0,89$, $P < 0,05$) [12]; показано, що синтез NO у осіб старших за 75 років у 4 рази нижчий, ніж у 25-річних осіб [37]. Аналогічним чином було визначено, що у старих щурів вміст нітрит-аніона значно зменшувався (на 40 %) внаслідок зниження активності ендотеліальної NO-синтази, яка у старих щурів на 52 % нижча, ніж у дорослих, а вміст індубібельної NO-синтази виявився на 67 % вищим, що пов'язують із надлишковим утворенням і накопиченням у тканинах пероксинітриту в процесі старіння [10]. Вважають, що дисбаланс у системі NO, який лежить в основі виникнення ендотеліальної дисфункції, відіграє важливу роль у розвитку серцево-судинної патології залежно від віку. Як з'ясувалося, вміст нітритів у крові переважно знижується і при різних видах серцево-судинної патології [11, 37]. Типовим для дисфункції ендотелію на фоні серцево-судинної патології (гіпертензія, ішемічна хвороба серця, хронічна серцева недостатність, гострий інфаркт міокарда, атеросклероз) вважається зниження вмісту кінцевих метаболітів NO в крові та сечі. Це свідчить про депресію генерації NO і може бути пов'язано з пригніченням експресії гена ендотеліальної NO-синтази, зниженням експресії і активності цього ферменту, недостатністю ко-

факторів синтезу NO, недостатністю L-аргініну, збільшенням локальної концентрації пероксинітриту у судинній стінці, пригніченням антиоксидантного захисту тощо. Підвищення вмісту кінцевих метаболітів NO і, відповідно, його синтезу може відбуватися при вираженій дисфункції ендотелію на фоні високого рівня генерації NO. Отже, отримані нами результати відповідають загальній тенденції динаміки вмісту кінцевих метаболітів NO у осіб похилого віку, які до того ж мають порушення діяльності серцево-судинної системи – ішемічну хворобу серця, гіпертонічну хворобу, облітеруючий атеросклероз нижніх кінцівок, цукровий діабет II типу, тобто серцево-судинні захворювання, в патогенезі яких значну роль відіграють зміни в системі оксиду азоту. Істотні зміни вмісту нітритів при ішемії–реперфузії у осіб з гострими оклюзуючими ураженнями артерій нижніх кінцівок свідчать про значні порушення метаболізму NO і можливість розвитку ендотеліальної дисфункції у цих осіб.

Одним із механізмів управління внутрішньоклітинним метаболізмом вважається ПОЛ, яке є необхідною ланкою багатьох життєво важливих процесів. Його поси-

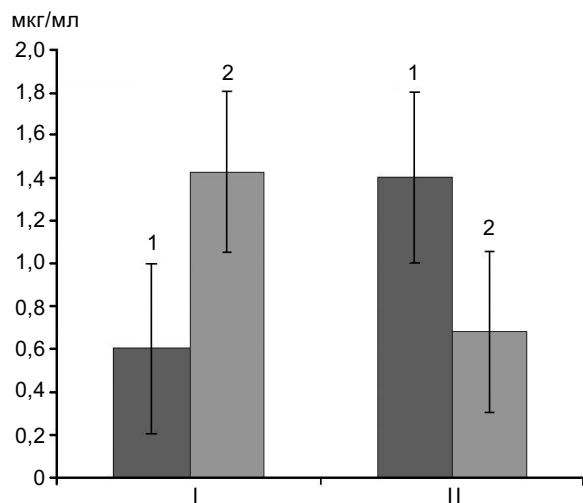


Рис. 1. Концентрація нітритів крові при ішемії (1) і реперфузії (2) нижньої кінцівки у осіб з гострою оклюзією стегнової артерії: I, II – групи 1 і 2 – особи з підвищеним і зниженим вмістом нітритів відповідно

лення призводить до утворення надлишкової кількості вільних радикалів, що відіграє важливу роль у розвитку багатьох патологічних станів і призводить до зниження вмісту NO і розвитку ендотеліальної дисфункції [31]. Первинним продуктом ПОЛ є ГПЛ, а одним із кінцевих продуктів вільнорадикального окиснення – МДА. Зважаючи на те, що дисфункція ендотелію звичайно супроводжується послабленням його антиоксидантних можливостей і накопиченням активних форм кисню, нами було проаналізовано зміни активності каталази, вмісту ГПЛ і МДА для оцінки ролі оксидативного стресу при гострій ішемії–реперфузії нижніх кінцівок.

Активність каталази, яка характеризує стан антиоксидантної системи, підвищувалась при реперфузії у пацієнтів обох груп. Так, у осіб першої групи при реперфузії вона підвищилася на 67 % (206,9 мкат/л ± 47 мкат/л; P<0,05) у порівнянні з її значеннями до реперфузії (139,2 мкат/л ± 42 мкат/л; P<0,05). У пацієнтів другої групи цей показник після реперфузії підвищився на 69 % (354,2 мкат/л ± 58,5 мкат/л; P=0,14) у порівнянні із її значеннями при ішемії (245,4 мкат/л ± 58,9 мкат/л; P=0,14; рис. 2,а). Якщо порівняти ці результати з такими у пацієнтів першої групи, то виявляються відмінності в абсолютних значеннях активності цього ферменту, в другій групі вона майже вдвічі більша, ніж у першій групі. Що стосується збільшення активності цього ферменту при реперфузії, то воно було майже однаковим в обох групах. Отримані результати можуть свідчити про те, що антиоксидантна система при ішемії–реперфузії працює з напругою.

У контролі вміст МДА в крові не перевищує 3,6 нмоль/мл ± 0,13 нмоль/мл. При ішемії в першій групі він становив 6,52 нмоль/мл ± 0,53 нмоль/мл (P<0,05), а в другій групі – 6,45 нмоль/мл ± 0,47 нмоль/мл (P<0,05), тобто в обох групах він значно перевищував рівень у здорових людей. У

разі реперфузії в першій групі вміст МДА становив в 5,97 нмоль/мл ± 0,4 нмоль/мл (P=0,26), а в другій групі – 5,58 нмоль/мл ± 0,53 нмоль/мл (P<0,05), тобто при ішемії–

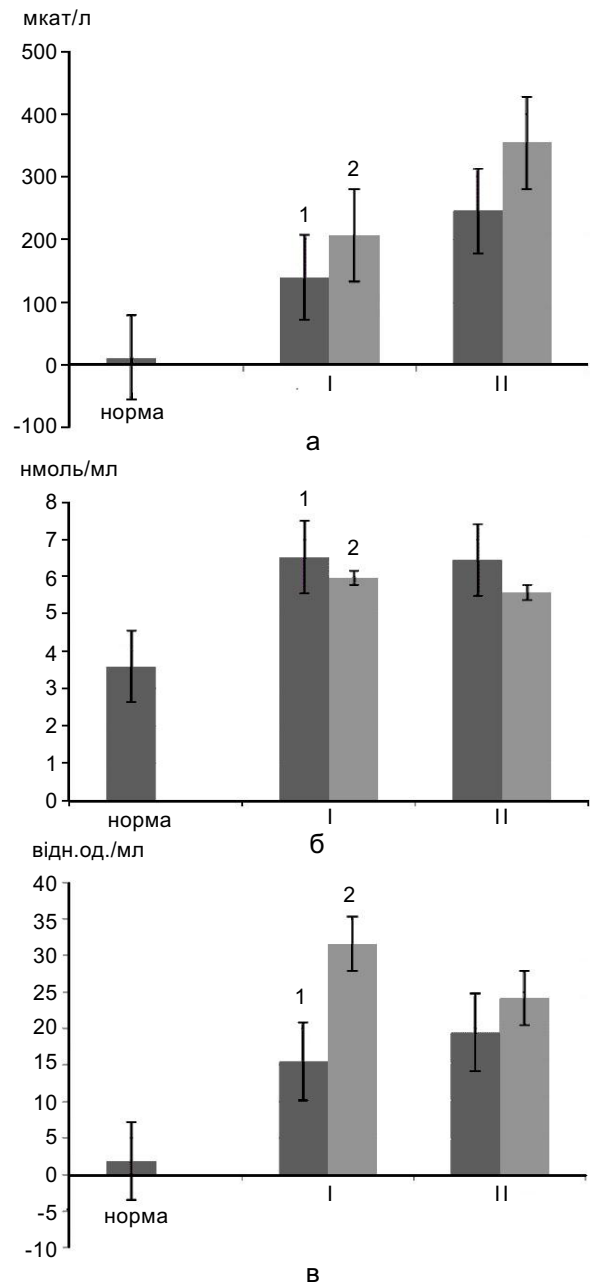


Рис. 2. Зміни показників оксидативного стресу і антиоксидантного захисту при ішемії (1) і реперфузії (2) нижньої кінцівки людей: а – активність каталази; б – вміст малонового діальдегіду; в – вміст гідроперексидів ліпідів; I, II – групи 1 і 2 – особи з підвищеним і зниженим вмістом нітритів відповідно

реперфузії цей показник значно перевищував такий у контролі, що вказує на розвиток оксидативного стресу в обох групах (див. рис. 2,б).

Аналогічно вміст ГПЛ при реперфузії теж збільшувався в крові осіб обох груп. У першій групі він достовірно збільшився в 2 рази ($P < 0,05$) порівняно з таким при ішемії ($P < 0,05$). У пацієнтів другої групи цей показник збільшився на 20 % ($P < 0,05$) щодо значень при ішемії ($P < 0,05$; рис. 2,в). Таким чином, в обох групах при ішемії–реперфузії значно збільшився вміст первинних продуктів ПОЛ ГПЛ і одного із кінцевих продуктів – МДА, що вказує на розвиток оксидативного стресу, який звичайно сприяє розвитку деструктивних процесів.

Відомо, що АсТ і АлТ є внутрішньоклітинними ферментами, які виявляються в усіх клітинах людського організму і відомі також як трансамінази. Вони виконують важливу функцію – перенесення аміногруп від амінокислот на кетокислоти. В нормі активність АсТ у плазмі крові становить 0,2–0,46 мкмоль/(год · мл), а АлТ – 0,1–0,66 мкмоль/(год · мл). Разом із креатинкіназою вони традиційно використовуються в клінічній практиці для визначення ступеня пошкодження тканин при різних патологічних станах. Креатинкіназа є ферментом, який бере участь в енергетичному обміні клітин, вона каталізує реакцію утворення і розпаду креатинфосфату і вважається одним із основних ферментів, який характеризує ішемічні ушкодження скелетної мускулатури. В нормі його активність в плазмі крові становить 42–150 од./л неорганічного фосфору і звичайно підвищується при ураженнях м'язової тканини внаслідок травми, оперативного втручання тощо. Аналіз активності цих ферментів у осіб із гострими оклюзуючими ураженнями артерій нижніх кінцівок показав, що їх значення в обох групах збільшується в період реперфузії відносно показника при ішемії за наявності кількісних відмінностей. Так, у

першій групі активність АлТ при ішемії і реперфузії знаходилася в межах, характерних для здорових осіб, хоча вона збільшилася при реперфузії на 2 % порівняно з такою при ішемії. Активність АсТ при реперфузії достовірно збільшилася на 50 % ($P < 0,05$) порівняно зі значеннями при ішемії (рис. 3,а).

У другій групі активність АлТ при реперфузії становила 0,63 мкмоль/(год · мл) \pm 0,15 мкмоль/(год · мл), ($P = 0,86$) порівняно зі значенням при ішемії (0,64 мкмоль/(год · мл) \pm 0,17 мкмоль/(год · мл), ($P = 0,86$). Тобто в цій групі активність АлТ була вищою при ішемії і реперфузії за таку в нормі і у осіб першої групи. Активність АсТ при ішемії і реперфузії була істотно вищою щодо норми на відміну від пацієнтів першої групи. Вона збільшилася при реперфузії на 22 % і становила 1,04 мкмоль/(год · мл) \pm 0,2 мкмоль/(год · мл), ($P < 0,05$), порівняно зі значеннями при ішемії (0,82 мкмоль/(год · мл) \pm 0,2 мкмоль/(год · мл), ($P < 0,05$; рис. 3,б). Активність цього ферменту в крові осіб другої групи при ішемії була в 2,7 рази вищою за таку у пацієнтів першої групи, але її зміни при реперфузії були менш вираженими у порівнянні зі значеннями у пацієнтів першої групи.

Активність креатинкінази в обох групах осіб при ішемії і при реперфузії суттєво перевищувала таку у здорових осіб. Слід відмітити, що при ішемії у осіб другої групи вона виявилася в 2,5 рази більшою, ніж у першій групі. Аналогічна закономірність спостерігалася при реперфузії: активність креатинкінази у осіб першої групи становила (666,7 \pm 94,3) од./л, а у осіб другої групи – (1085 \pm 418,3) од./л (див. рис. 3,в). Таким чином, отримані результати про надмірну активацію АсТ, АлТ і креатинкінази у осіб із гострими оклюзуючими ураженнями артерій нижніх кінцівок вказують на розвиток деструктивних процесів при ішемії–реперфузії.

У крові осіб обох груп як у період іше-

мії, так і при реперфузії був виявлений стабільний мітохондріальний фактор (МФ). Збільшення його рівня через 20 хв реперфузійного періоду відносно його значення при ішемії становило 5 % у пацієнтів першої групи (рис. 4,а). У пацієнтів другої групи

(див. рис. 4,б) збільшення рівня МФ через 20 хв реперфузійного періоду було статистично вірогідним і становило 3 % ($P < 0,05$), тобто в другій групі пацієнтів збільшення рівня МФ при реперфузії відносно його значення при ішемії було менш вираженим, ніж у пацієнтів першої групи (5 %). Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, вважається маркером відкривання МП [21]. Отже, є підстави вважати, що вивільнення МФ є індикатором порушень в ендотеліальних клітинах судин.

Аналіз отриманих результатів вказує на наявність ендотеліальної дисфункції у хворих з гострою ішемією–реперфузією нижньої кінцівки. Безумовно свій внесок у розвиток ендотеліальної дисфункції у осіб, які обстежувалися, вносила супутня соматична патологія та вікові зміни ендотелію. Відомо, що функціонально та структурно повноцінний ендотелій регенерує тільки до 30-річного віку [31]. У більш пізньому віці при природному оновленні регенерують «неповноцінні» ендотеліоцити. За даними морфологічних досліджень [22] у здорових людей, старших за 60 років, визначається гетерохромність ядра ендотеліоцитів, збідніння рибосомами мембран гранулярного ендоплазматичного ретикулула, що вказує на порушення білоксинтезувальної функції клітин. Змінюється структура частини мітохондрій, що проявляється в їх набуханні, загибелі крист, руйнуванні окремих органел, що супроводжується погіршенням енергетичного обміну клітини. Збільшується число первинних і вторинних лізосом. Порушується структура мікрофібрил [22]. Описані зміни є морфологічним підтвердженням функціональної неспроможності ендотеліоцитів. Це доводять експериментальні та клінічні дослідження, в яких показано вікові зміни судинно-рухової, антитромботичної, антиоксидантної, протизапальної активності ендотелію [31, 32]. Морфофункціональні зміни в ендотелії судин у людей похилого віку

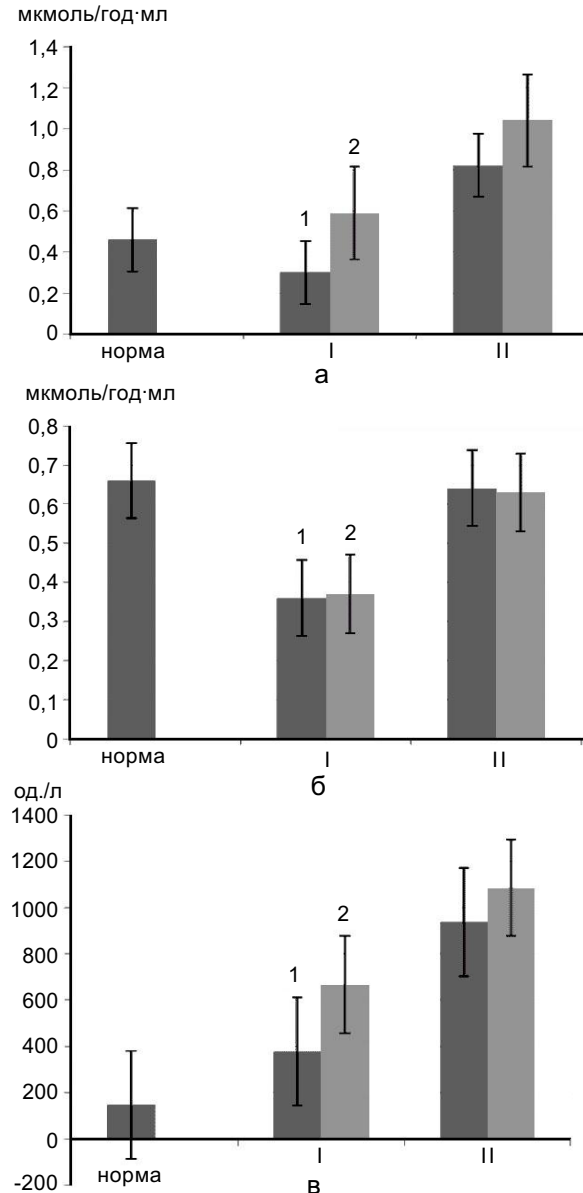


Рис. 3. Зміни показників ушкодження тканин при ішемії (1) і реперфузії (2) нижньої кінцівки людей: а – активність аспартатамінотрансферази; б – активність аланінамінотрансферази; в – активність креатинкінази; I, II – групи 1 і 2 – особи з підвищеним і зниженим вмістом нітритів відповідно

сприяють розвитку судинної патології, і в умовах дії таких факторів ризику, як куріння, гіперхолестеринемія, підвищений рівень артеріального тиску та інші можуть бути тригером розвитку захворювань серцево-судинної системи [33]. Стан ішемії–реперфузії, який супроводжується розвитком оксидативного стресу, здійснює потужну руйнівну дію на систему NO. Джерелом вільних радикалів можуть бути лейкоцити, які містять рецепторрегульовану НАД(Ф)Н-оксидазу з високою здатністю виробляти цитотоксичні рівні вільних радикалів. Іншим їх джерелом може бути підвищена активність циклооксигенази

ендотеліоцитів. Вільні радикали, особливо пероксиди, збільшуючи вміст внутрішньоклітинного кальцію, здатні активувати ендотеліальну NO-синтазу (NOS-3), що у свою чергу призводить до синтезу надмірної кількості NO і, як наслідок, до утворення ONOO⁻. Велика кількість вільних радикалів і надмірне посилення продукції NO, причому відразу за рахунок активації двох типів NOS – індукцйбельної NOS (NOS-2), яка індукується цитокінами [27] і надмірної активації ендотеліальної NOS (NOS-3), що індукується підвищеним вмістом внутрішньоклітинного кальцію в ендотелії, створюють умови для утворення токсичних рівнів ONOO⁻.

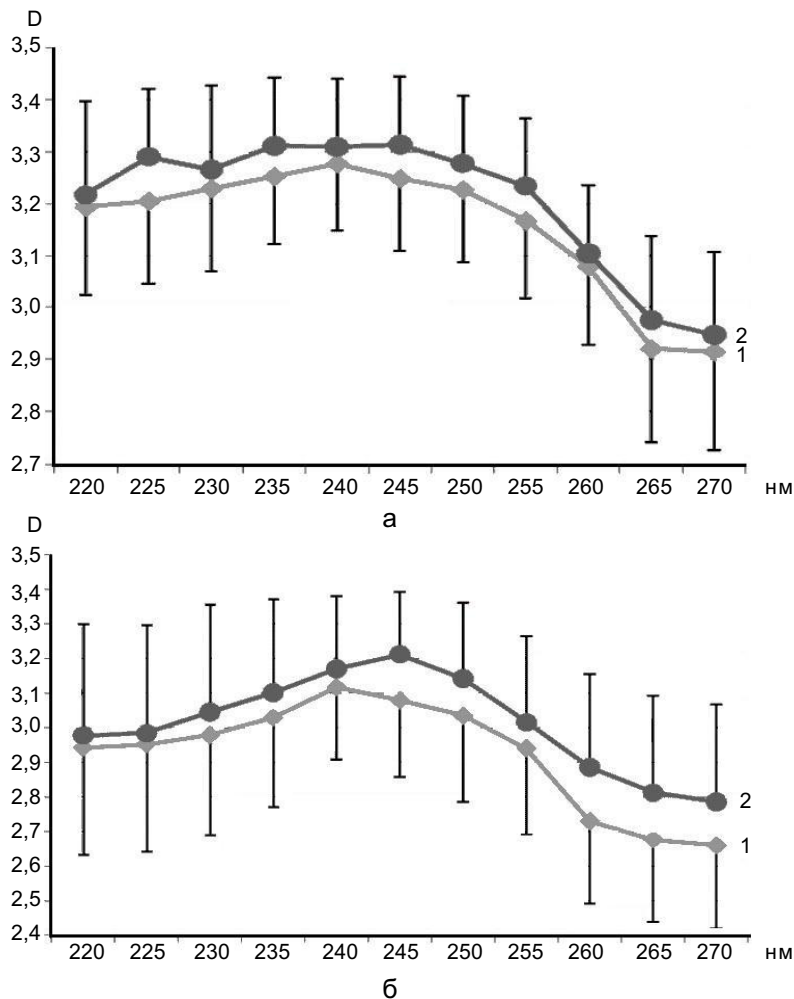


Рис. 4. Вивільнення мітохондріального фактора при ішемії (1) і реперфузії (2) нижньої кінцівки у осіб з гострою окклюзією стегнової артерії: а – під час відновлення кровообігу у осіб із зниженням вмісту нітритів крові; б – при ішемії–реперфузії у осіб із підвищенням вмісту нітритів крові

Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що у всіх осіб розвинувся оксидативний стрес під час відновлення кровообігу в ураженій кінцівці, що підтверджується підвищенням вмісту МДА, ГПЛ, МФ. У цих умовах система антиоксидантного захисту працює з навантаженням, про що свідчить збільшення активності каталази крові майже в 2 рази. Зміни в крові стабільного метаболіту NO – нітриту у осіб з гострими оклюзуючими ураженнями артерій нижніх кінцівок говорять про розвиток ендотеліальної дисфункції. Цікавими є результати про два типи реакції ендотелію на відновлення кровообігу в постраждалій кінцівці: підвищення вмісту нітритів крові та його зниження. Якоюсь мірою напрямком змін вмісту NO_2^- корелює із тривалістю ішемії: він зменшувався при більш тривалій і збільшувався при менш тривалій ішемії. Але при цьому при зменшенні вмісту нітритів в крові, всі досліджені показники знаходилися на більш високому рівні при ішемії і реперфузії.

Е.Ф. Кахановський, В.Ф. Сагач

ИССЛЕДОВАНИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА, АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У ЧЕЛОВЕКА

Исследование проведено у людей преклонного возраста ($70 \pm 2,2$ лет), прооперированных по поводу острой окклюзии бедренной артерии на разных ее анатомических уровнях. На основе результатов о существенном увеличении первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) гидроперекисей липидов и одного из конечных продуктов – малонового диальдегида (МДА) сделан вывод, что при ишемии–реперфузии в тканях пораженной нижней конечности развивался оксидативный стресс. Существенное увеличение активности каталазы в крови позволяет думать, что система антиоксидантной защиты в этих условиях работает с напряжением. При ишемии–реперфузии у этих лиц нами выявлено выраженное увеличение активности ряда ферментов – аспаргатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы и креатининкиназы, которые традиционно используются в клинических условиях в качестве индикатора повреждения тканей. Содержание нитритов существенно уменьшалось при

реперфузии относительно их уровня при ишемии у большей части лиц (63 %), хотя в ряде случаев (33 %) наблюдалось его столь же существенное увеличение. Выраженное снижение продукции NO, также как и существенное ее увеличение свидетельствуют о дисфункции эндотелия. Как в период ишемии, так и при реперфузии, был выявлен стабильный митохондриальный фактор, что свидетельствует об открытии митохондриальной поры. При открытой митохондриальной поре становится возможным транспорт проапоптических веществ из митохондрий в цитозоль клетки, что обычно приводит к деструктивным изменениям в ней. Совокупность всех полученных результатов указывают на развитие оксидативного стресса и эндотелиальной дисфункции у людей с острыми окклюзирующими поражениями нижней конечности. Ключевые слова: оксидативный стресс, антиоксидантная защита, ишемия–реперфузия, эндотелиальная дисфункция.

E.F. Kakhanovsky, V.F. Sagach

STUDY OF CHANGES IN THE PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS, ANTI-OXIDATIVE DEFENCE AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN ACUTE ISCHEMIA/REPERFUSION IN LOWER EXTREMITIES IN HUMANS

We carried out a study on elderly people ($70 \pm 2,2$ years old) operated on as an acute occlusion of the femoral artery at its different anatomical levels. In those people, development of oxidative stress has been shown in injured lower extremity in the process of restoring of circulation. Marked increase in catalase activity in the blood gives evidence for work of the anti-oxidative defence system with tense. We determined an increase in aspartataminotransferase, alaninaminotransferase and creatininkinase in ischemia/reperfusion which are widely used to identify injures in muscular tissues. It has been shown that NO_2^- content in the blood at reperfusion depended on the level of nitrites and the duration of ischemia. Significant changes in NO metabolite content in the blood of the patients suffering from acute occlusion injures of the arteries in the lower extremities could be related with endothelial dysfunction.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акопова О.В., Коцюруба А.В., Ткаченко Ю.П., Сагач В.Ф. Оксид азоту пригнічує відкриття митохондриальної пори і збільшує кальцієву ємність митохондрий *in vivo* // Фізіол. журн. – 2005. – 51, №3. – С. 3–11.
2. Беридзе М.З., Урушадзе И.Т., Шакаршвили Р.Р. (2001) Механизмы отсроченной гибели нейронов при острой церебральной ишемии в эксперименте // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Инсульт (приложение). – 3. – С. 35–40.

3. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 34–37.
4. Камышников В.С. О чем говорят медицинские анализы. Справочное пособие. Минск: Беларус. Наука, 1997. – 197 с.
5. Катаев С.С., Чухустова В.С., Акимов П.А., Опутина Л.А. Спектрофотометрический метод определения нитритов в трупной крови // Актуальные проблемы паталогической анатомии и судебной медицины: Межвуз. сб. науч. работ. – 2001. – С. 158–161.
6. Коваленко В.Н, Гулая Н.М, Семикоппая Т.В, Коцюруба А.В., Корниенко Т.М. Нарушение функции эндотелия у пациентов с ишемической болезнью сердца в сочетании с артериальной гипертензией // Укр. кардиол. журн. – 2002. – 3. – С. 5–8.
7. Коробейникова Э.Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1989. – №7. – С. 8–9.
8. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Там же. – 1988. – №1. – С. 16–19.
9. Кошкин В.М. Консервативное лечение хронической артериальной недостаточности нижних конечностей / Под ред. Савельева В.С. – М.: Медиа Медика, 2003. – С. 84–90.
10. Кульчицкий О.К. Эндотелиальная функция и процесс старения // Лікування та діагностика. – 2002. – 4. – С.6–9.
11. Лапшина Л.А, Кравчук П.Г., Титова А.Ю., Глебова О.В. Значение определения нитритов-нитратов как маркеров дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистой патологии // Укр. мед. часопис. – 2009. – 6(74). – С. 49–52.
12. Лапшина Л.А, Титова А.Ю, Горбач Т. В. Уровень S-нитрозотиола и нитритов-нитратов в сыворотке крови при хронической сердечной недостаточности у больных пожилого и старческого возраста // Эксперим. і клін. медицина. – 2005. – 2. – С.61–64.
13. Малая Л.Т, Корж А.Н, Балковая Л.Б. Эндотелиальная дисфункция при патологии сердечно-сосудистой системы. – Харьков: Торсинг, 1999. – 432 с.
14. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. – 1998. – 63. – С.992–1006.
15. Манухина Е.Б, Малышев И.Ю. Роль оксида азота в сердечно-сосудистой патологии: взгляд патофизиолога // Рос. кардиол. журн. – 2000. – 5. – С.55–63.
16. Менщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных состояниях // Биохимия. – 2000. – 65. – № 4. – 485–503.
17. Мотавкин П.А., Гельцер Б.И. Клиническая и экспериментальная патофизиология легких. – М.: Наука, 1998. – 336 с.
18. Паливода С.Н, Черепок А.А. Роль оксидативного стресса и нарушения метаболизма оксида азота при гипертонической болезни // Серце і судини. – 2004. – 5 (1). – С.39–44.
19. Патент на корисну модель №23948 Україна. Спосіб оцінки розвитку оксидативного стресу в ішемізованій нижній кінцівці/ Кахановський Е.Ф., Сагач В.Ф. // Бюл. №8, 2007.
20. Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей. – М.: Медицина, 1997. – 160 с.
21. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В, Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори// Фізіол. журн. – 2003. – 49, №4. – С.6–12.
22. Саркисов К.Г., Коркушко О.В., Ступина А.С. Дужак Г.В., Лишнева В.Ю. Микроциркуляция и гемореология при старении человека// Проблемы старения и долголетия. – 1998. – 7, №3. – С. 269–278.
23. Соколович А.Г., Соколович Г.Е., Дамбаев Г.Ц. Новые аспекты патогенеза, диагностики и лечения критической ишемии нижних конечностей. – Томск, 2001. – 485 с.
24. Яковлева Л.Н, Савченко Н.П, Стогінчук О.В. Антиоксидантна корекція ендотеліальної дисфункції у хворих на ішемічну хворобу серця// Медицина світу. – 2004. – Додаток. 2. – С. 4.
25. Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C.L., Reed R.R., Snyder S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase // Nature. – 1991. – 351. – P.714–718.
26. Brookes P.S., Darley-Usmar V.M. Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition // Amer. J. Physiol. Heart Circ.Physiol. – 2004. – 286, №1. – P.H39–H46.
27. Chartrain N.A., Geller D.A., Koty P.P., Sitrin N.F., Nussler A.K., Hoffman E.P., Billiar T.R., Hutchinson N.I., Mudgett J.S. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene // J. Biol. Chem.. – 1994. – 269. – P. 6765–6772.
28. Chou T.C., Ven M.H., Li C.V., Ding Y.A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats // Hypertension. – 1998. – 31, 2. – P.643–648.
29. Heermeier K., Galle J. Oxidative stress mediated apoptosis induced by oxLDL // Kidney Int. – 1999. – 56. – P. 1310–1312.
30. Hunter P., Haworth R., Sousard J. Relationship between configuration, function and permeability in calcium-treated mitochondria // J. Biol. Chem. – 1976. – 251. – P.5069–5077.
31. Ji L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1999. – 222. – P. 283–292.
32. John S., Schmieder R.E. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia:

- potential mechanisms and differences // J. Hypertens. – 2000. – **18**. – P. 363–374.
33. Kannel W. Prospects for prevention of coronary disease in the elderly // Amer. J. Geriatric Cardiol. – 2002. – **9**, №2. – P. 83–86.
34. Kim J.S., Ohshima S., Peditadakis P., Lemasters J.J. Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition // Hepatology. – 2004. – **39**, №6. – P.1533–1543.
35. Kowaltowski A., Castilho R.F., Vercesi A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress // FEBS Lett. – 2001. – **495**. – P.12–15.
36. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – **304**, №3. – P. 433–435.
37. Lyons D., Roy S., Patel M. Impaired nitric oxide-mediated vasodilatation and total body nitric oxide production in healthy old age // Clin.Sci.(Lond). – 1997. – **93**, №6. – P. 519–526.
38. Marzinzig M., Nussler A., Sradler J. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols // Nitric. Oxide. – 1997. – № 1, 2. – P.177–189.
39. Moshage H, Kok B, Huizenga J.R. Nitrite and nitrate determinations in plasma :a critical evaluation // Clin. Chem. – 1995. – **41**, №6, Pt1. – P.892–896.
40. Rosenfield M.E. Inflammation, lipids and free radicals: Lessons learned from the atherogenic process // Semin. Reprod. Endocrinol. – 1999. – **16**. – P. 249–261.
41. Tanaka S, Yashiro A, Nakashima Y. Plasma nitrite/nitrate level is inversely connected with plasma low-density lipoprotein cholesterol level// Clin.Cardiol. – 1997. – **20**, № 4. – P.361–365.
42. Tavaf-Motamen H., Miner T.J., Starnes B.W. Nitric oxide mediates acute injury by modulation of inflammation // J. Surg. Res. – 1998. – **78**, № 2. – P.137–142.
43. Tsikas D. Methods og quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological liquids // Free Radic. Res. – 2005. – **39**, № 8. – P.797–815.
44. Vinikka L. Nitric oxide as a challenge of laboratory-clinical chemistry // Scand. J.Clin. Lab.Invwst. – 1996. – **56**, № 7. – P. 577–581.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 21.01.2011*

А.М. Гольцев, О.В. Сафранчук, М.О. Бондарович, М.В. Останков

Зміна кріолабільності стовбурових пухлинних клітин залежно від фази росту аденокарциноми Ерліха *in vivo*

*Проведено порівняльне вивчення змін функціональної активності стовбурових пухлинних клітин двох рівнів диференціювання на різних стадіях росту аденокарциноми Ерліха (АКЕ) *in vivo*. Відзначено різний характер зміни функціонального статусу пухлиноіндукуючих попередників після кріовпливу залежно від ступеня їх диференціювання і діб культивування. У відношенні стовбурових попередників “старіючої” культури АКЕ фактори кріоконсервування реалізують “ревіталізуючий” ефект. Отримані результати акцентують увагу на необхідності коректного вибору термінів кріоірадикації злякисних новоутворень у загальних схемах лікування.*

Ключові слова: стовбурові пухлинні клітини, кріоконсервування, аденокарцинома Ерліха.

ВСТУП

Практика використання ультранизьких температур для кріодеструкції злякисних новоутворень [4, 17] визначила необхідність інтенсифікації експериментальних робіт для оцінки впливу цього фактора на стовбурові пухлинні клітини – СПК. Останні є головною структурною одиницею ініціації, підтримки росту *in situ*, а також метастазування пухлини при злякисних новоутвореннях мозку, молочної залози, простати, підшлункової залози, гемопоетичної системи тощо [13, 27, 28]. Ці клітини здатні продукувати цитокіни, хемокіни й ангіогенні фактори [22], їм властиві надрегуляторні сигнальні каскади [29]. Хіміо- і радіорезистентність СПК [15, 18] переводить їх у категорію потенційних клітин-мішеней для факторів кріовпливу при ірадикації пухлини. Незважаючи на достатнє число праць з оцінки впливу кріоконсервування на стовбурові кровотворні, нервові та клітини з інших джерел [1–3], існують лише поодинокі відомості про такий вплив на СПК [16]. Основна увага цих досліджень сфокусована на доказах можливості обраних умов кріоконсервування забезпечувати вихідну збе-

реженість якісно-кількісних характеристик таких клітин, що нині активно використовуються в технологіях клітинної терапії раку [7, 30]. Однак у ракурсі розглянутої проблеми кріоірадикації злякисних новоутворень викликає інтерес оцінка стану цих клітин після жорсткого “пресингу” факторів кріоконсервування, тобто без захисту якими-небудь протективними субстанціями. Важливо також знати про характер дії саме таких умов кріовпливу на СПК, що знаходяться на різних етапах росту пухлини *in vivo*.

Показники структурно-функціонального стану СПК мають низку загальних характеристик, незважаючи на те, що вони варіюють у пухлинах різної локалізації та різного його генезу [28]. Як і для стовбурових кровотворних клітин потенціал СПК визначається їхньою унікальною здатністю до самопідтримки та продукції більш диференційованих попередників [20, 24, 27, 28]. СПК експресують широкий спектр фенотипових маркерів, що, власне, і визначають їх структуру [13]. Для СПК солідних пухлин характерними є маркери CD44, CD133, ESA (від англ. epithelial surface antigen), CD24-молекул, що дають змогу

© А.М. Гольцев, О.В. Сафранчук, М.О. Бондарович, М.В. Останков

виявляти їх у загальній популяції [19]. Зокрема, клітини раку товстого кишечника, молочної залози, простати та підшлункової залози експресують CD44-молекулу [13, 25]. Однак тільки клітини з високим рівнем експресії цього маркера, які ідентифікують як CD44^{hi}, мають усі ознаки СПК [12, 19, 23]. Висока туморогенність CD44^{hi}-клітин підтверджується формуванням нової пухлини всього з 10 таких клітин, що в 10–50 разів перевищує туморогенність інших [23].

Пухлиноіндукуючі CD44^{hi}-клітини не експресують молекулу CD24, вони виявляються при подвійному маркуванні разом з попередниками CD44⁺/CD24⁻, що відносяться до наступного ступеня їхнього диференціювання [25]. У цих клітинах визначено високий рівень експресії проінвазивних генів, які також здатні формувати в організмі реципієнтів пухлини, але CD44^{hi} при введенні вже в дозі $1 \cdot 10^2$, а з фенотипом CD44⁺/CD24⁻ – в значно більшій. Найбільш диференційовані клітини з фенотипом CD44⁻/CD24⁺ навіть при уведенні в дозі $1 \cdot 10^4$ не виявляли такої активності [13]. Тобто за цими маркерами можна відтворити лінійний ряд потентності СПК.

Використання технологій фенотипового маркування клітин-попередників різного рівня диференціювання в пухлинному вогнищі дає змогу не тільки ідентифікувати стадії, динаміку розвитку та інвазивність процесу, але і його чутливість до проведеної в тій або іншій формі терапії, включаючи кріовплив. Хоча треба визнати й існування деяких труднощів у цій роботі, зумовлених ізоляцією з клінічного матеріалу мізерної кількості СПК, необхідності стандартизації первинного органно-тканинного субстрату тощо [17]. В експериментальних дослідженнях абсолютно реальне уявлення про характер кріовпливу на СПК може бути отримане при використанні аденокарциноми Ерліха (АКЕ), що являє собою лінію недиференційованих клітин раку молочної залози мишей, що перевивається *in vivo* [11].

Розвиток асцитної форми АКЕ носить стадійний характер, включаючи фази високої та низької проліферативної активності клітин у процесі накопичення в перитонеальній порожнині (ПП) експериментальних тварин [11]. Ці показники залежать від кількості введених клітин, перебування в різному початковому функціональному (проліферативному) статусі, від фази розвитку процесу тощо [11]. Є поодинокі відомості про характер росту загальної популяції АКЕ після кріоконсервування з акцентом уваги на інгібіцію їхнього накопичення в ПП [8]. Однак не описано особливості змін популяційного складу і проліферативної активності СПК в АКЕ після кріовпливу, залежності цих характеристик від фази розвитку АКЕ.

Мета нашої роботи – ідентифікація СПК в АКЕ в динаміці її розвитку *in vivo* і оцінка характеру змін їхніх структурно-функціональних показників після кріоконсервування.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на клітинах АКЕ, отриманих на 7-му і 14-ту добу (АКЕ-7, АКЕ-14), які вирощували *in vivo*. Як первинну культуру в експеримент було взято кріоконсервовані клітини АКЕ-7 (кАКЕ-7), що зберігалися в низькотемпературному банку Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, при -196°C . Кріоконсервовані клітини АКЕ “стабілізували” трикратним перевиванням *in vivo* протягом 7 діб, після чого вони набували структурно-функціональних ознак нативних АКЕ-7 (нАКЕ-7). Далі клітини АКЕ знову вирощували протягом 7 і 14 діб, проводячи атестацію їхнього морфофункціонального стану до і після кріоконсервування на 7-му та 14-ту добу вирощування.

Вирощування клітин АКЕ в системі *in vivo*. Клітини вводили внутрішньоочеревинно в дозі $3 \cdot 10^6$ /мишу об'ємом 0,3 мл

і культивували в ПП 7-місячних самиць лінії VALB/c, що утримуються в стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Вихідна суспензія клітин в асцитичній рідині була доведена до необхідної концентрації фізіологічним розчином (“Черкаси-фарма”, Україна”). Асцит із ПП одержували шприцем через голку № 10, попередньо вводячи мишей у легкий ефірний наркоз. Для оцінки абсолютної кількості клітин у ПП визначали об’єм накопиченої в ній асцитичної рідини (мілілітри) з урахуванням концентрації ядровмісних клітин у суспензії АКЕ, що підраховували в камері Горяєва [6].

Проведені роботи не суперечать загальним принципам експериментів на тваринах, що схвалені Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та положенням “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних і інших наукових цілей” (Страсбург, 1986).

Кріоконсервування суспензії клітин АКЕ. Процедуру здійснювали в пластикових ампулах (“Nunc”, США), без застосування класичних кріопротекторів в асцитичній рідині в концентрації $1 \cdot 10^7$ клітин/мл об’ємом 1,8 мл на заморозувачі УОП-06, виробництва СКТБ з ОВ Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Умови кріоконсервування були такими: швидкість охолодження $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ до -80°C , від -80°C до -196°C зі швидкістю $300\text{--}400^\circ\text{C}/\text{хв}$. Зразки відігрівали на водяній бані при $40\text{--}41^\circ\text{C}$ протягом $45\text{--}50$ с, при постійному шутелюванні ампул до зникнення твердої фази [9].

Оцінка життєздатності клітин АКЕ. Життєздатність клітин АКЕ оцінювали до та після кріоконсервування за допомогою методу суправітального фарбування йодидом пропідіуму. Процедуру здійснювали додаванням до 100 мкл ($1 \cdot 10^7$ клітин/мл) досліджуваної суспензії клітин 5 мкл йодиду

пропідіуму (10 мг/моль), перемішували й інкубували в темряві протягом 30 хв при кімнатній температурі, після чого додавали 400 мкл фізіологічного розчину. З подальшою оцінкою результатів на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (“Becton Dickinson”, США).

Оцінка імунофенотипових характеристик клітин АКЕ. У роботі були використані моноклональні антитіла (“BD Pharmingen”, США) до CD44 (кон’юговані з FITC (від англ. Fluorescein isothiocyanate; за каталогом № 553133, клон IM7)), а також CD24 (кон’юговані з PE (від англ. Phycoerythrin; за каталогом № 553262, клон M1/69)). За допомогою цих моноклональних антитіл були ідентифіковані клітини з фенотипом CD44^{hi}, що являють собою субпопуляцію недиференційованих, а також просунутих у диференціюванні – CD44⁺/CD24⁻ СПК [24, 26]. Імуноглобуліни тих самих ізотипів (за каталогом № 553988, клон A95-1 і № 553989, клон A95-1; “BD Pharmingen”, США) були використані як контроль. Визначення концентрації досліджуваних субпопуляцій клітин у зразках АКЕ здійснювали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (“Becton Dickinson”, США). CD44^{hi}-клітини входять до складу CD44⁺/CD24⁻-популяції і характеризуються найбільшою флуорисценцією за логарифмічною шкалою з інтенсивністю сигналу 10^4 .

Для мінімізації помилок у пробах аналізували 10000 подій. Облік і аналіз результатів здійснювали за допомогою програми WinMDI 2.9.

Оцінка функціонального стану (проліферативного статусу) клітин АКЕ. При оцінці проліферативного потенціалу загальної популяції АКЕ, а також реплікативної активності різного рівня диференціювання СПК обчислювали час подвоєння кількості цих клітин (від англ. Time doubling – Td) за формулою $Td = T / \log N_f / \log N_0$. 3,3219, де T – час культивування клітин (години), 3,3219 – коефіцієнт переведення log в ln, N

– кількість клітин, кінцева (f) і початкова (0), кратність збільшення абсолютного їхнього числа за 0–7-му та 7–14-ту добу вирощування й абсолютну кратність збільшення за весь період росту (0–14-та доба) у ПП у вигляді умовних коефіцієнтів. Такий підрахунок був проведений в чотирьох групах тварин: 1-ша група, яким вводили нативні АКЕ-7 (нАКЕ-7); 2-га – кріоконсервовані АКЕ-7 (кАКЕ-7); 3-тя – нативні АКЕ-14 (нАКЕ-14); 4-та – кріоконсервовані АКЕ-14 (кАКЕ-14).

Отримані результати статистично обробляли за методом Стьюдента в модифікації Фішера з застосуванням комп'ютерної програми MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У технологіях підтримки росту клітин АКЕ в системі *in vivo* як “первинну” культуру, зазвичай, використовують клітини, отримані на 7-му добу їхнього культивування (АКЕ-7) [8]. Стадія експонентного росту пухлини (0–7-ма доба) характеризується максимальним темпом накопичення клітин у ПП, тоді як для наступної стаціонарної стадії (7–14-та доба) характерний баланс процесів проліферації та загибелі клітин [5, 11]. Така феноменологія поведінки загальної популяції клітин у ПП на кожному з етапів зумовлена проявом функціонального (проліферативного) статусу пухлиноіндукуючих клітин-попередників [21]. Як видно з табл. 1, у загальній популяції АКЕ-7 концентрація клітин-попередників, експресуючих у високому ступені мембранний маркер CD44 (CD44^{hi} СПК) становила близько 0,4 %, а більш диференційованих CD44⁺24⁻ – близько 5 %.

Протягом перших 7 діб вирощування Td нАКЕ-7 був відносно коротким (23 год), зумовлюючи більш ніж 150-кратне збільшення загальної кількості клітин у ПП без зміни концентрації обох субпопуляцій СПК.

У фазі стаціонарного росту (7–14-та доба) проліферативна активність загальної

популяції і CD44⁺24⁻ СПК істотно знижувалася, а CD44^{hi} цілком припинялася (див. табл. 1). Важливим є те, що при ретрансплантації в ПП нативних АКЕ-14 (нАКЕ-14) які, на думку деяких дослідників, є “старіючою” формою АКЕ [5, 10], функціональна активність усіх форм оцінених клітин істотно підвищувалася, хоча за перші 7 діб росту все-таки поступалася нАКЕ-7. Цей факт говорить про збереження їхнього потенціалу росту та виходу насамперед CD44^{hi} СПК із функціонального “спокою”, що, вочевидь, зумовлено до 14-ї доби інгібувальним впливом умов їхнього мікрооточення [21]. Такого роду модифікації стану клітин АКЕ в міру пролонгації їхніх термінів культивування по-різному змінювали їхню чутливість до факторів кріоконсервування.

З рисунка видно, що після кріовпливу кількість ядерних клітин у кАКЕ-7 і кАКЕ-14 істотно не мінчалася, а їх життєздатність знижувалася приблизно однаково. Що ж стосується проліферативного потенціалу, то кАКЕ-7 формували до 7-ї доби в ПП у 4,5 раза менше загального пулу клітин, ніж нАКЕ-7. Дійсно, Td загального числа клітин у перші 7 діб культивування збільшувався з 23 год у нАКЕ-7 до 32 год в кАКЕ-7 (табл. 2). Однак у наступні 7 діб росту, Td кАКЕ-7 підвищувався і вже удвічі був вищим, ніж у нАКЕ-7.

Не був “байдужим” кріовплив і до наявних у АКЕ субпопуляцій СПК. По-перше, після кріоконсервування концентрація в АКЕ-7 CD44^{hi} у 3,5 раза знижувалася, тоді як CD44⁺24⁻ у 1,5 раза підвищувалася порівняно з нАКЕ-7 (див. табл. 2). Проте у перші 7 діб у кАКЕ-7 спостерігалось зниження Td CD44⁺24⁻ і, тим більше, CD44^{hi}-клітин порівняно з нАКЕ-7, причому більш виражене, ніж зниження Td загальної популяції АКЕ. Однак у наступні 7 діб росту функціональний потенціал кріоконсервованих СПК істотно перевищував нативні, причому посилення потенціалу

Таблиця 1. Структурно-функціональні характеристики нативних клітин аденокарциноми Ерліха (наАКЕ), (M±m, n=5)

Схема дослідження	Вихідні значення		7-ма доба				14-га доба					
	Абсолютна кількість	%	Кількість клітин у перитонеальній порожнині		Кратність збільшення кількості клітин	Час подвоєння кількості клітин	Кількість клітин у перитонеальній порожнині		Кратність збільшення кількості клітин	Час подвоєння кількості клітин		
			Абсолютна кількість	%			Абсолютна кількість	%				
наКЕ-7												
загальна популяція	$3,3 \cdot 10^6$	-	$5,2 \pm 0,36 \cdot 10^8$ -		$157,0 \pm 10,99$	$2,1 \pm 0,14$	$1,15 \pm 0,08 \cdot 10^9$ -		$2,1 \pm 0,14$	$152,0 \pm 10,64$		
CD44 ⁺ /24 ⁻	$1,6 \pm 0,11 \cdot 10^5$	$4,80 \pm 0,33$	$2,2 \pm 0,15 \cdot 10^7$ $4,2 \pm 0,29$		$137,0 \pm 9,59$	$2,4 \pm 0,16$	$2,8 \pm 0,19 \cdot 10^7$ $2,47 \pm 0,17$		$1,3 \pm 0,09$	$258,0 \pm 18,06$		
CD44 ^{hi}	$1,26 \pm 0,08 \cdot 10^4$	$0,38 \pm 0,02$	$1,7 \pm 0,11 \cdot 10^6$ $0,32 \pm 0,02$		$135,0 \pm 9,45$	$2,5 \pm 0,17$	$1,7 \pm 0,11 \cdot 10^6$ $0,15 \pm 0,01$		-	-		
наКЕ-14												
загальна популяція	$3,3 \cdot 10^6$	-	$2,1 \pm 0,14 \cdot 10^8$ -		$63,0 \pm 4,41$	$5,3 \pm 0,37$	$5,3 \pm 0,37 \cdot 10^8$ -		$2,5 \pm 0,17$	$134,0 \pm 9,38$		
CD44 ⁺ /24 ⁻	$9 \pm 0,63 \cdot 10^4$	$2,68 \pm 0,18$	$3,3 \pm 0,23 \cdot 10^6$ $1,64 \pm 0,11$		$36,0 \pm 2,52$	$9,0 \pm 0,63$	$9,8 \pm 0,68 \cdot 10^6$ $1,85 \pm 0,12$		$2,9 \pm 0,21$	$116,0 \pm 8,12$		
CD44 ^{hi}	$3,6 \pm 0,25 \cdot 10^3$	$0,11 \pm 0,007$	$6,3 \pm 0,44 \cdot 10^4$ $0,03 \pm 0,002$		$17,5 \pm 1,22$	$19,2 \pm 1,34$	$1,6 \pm 0,11 \cdot 10^5$ $0,03 \pm 0,002$		$2,5 \pm 0,17$	$134,0 \pm 9,38$		

Таблиця 2. Структурно-функціональні характеристики кріоконсервованих клітин аденокарциноми Ерліха (каКЕ), (M±m, n=5)

Схема дослідження	Вихідні значення		7-ма доба				14-га доба					
	Абсолютна кількість	%	Кількість клітин у перитонеальній порожнині		Кратність збільшення кількості клітин	Час подвоєння кількості клітин	Кількість клітин у перитонеальній порожнині		Кратність збільшення кількості клітин	Час подвоєння кількості клітин		
			Абсолютна кількість	%			Абсолютна кількість	%				
наКЕ-7												
загальна популяція	$3,3 \cdot 10^6$	-	$1,2 \pm 0,08 \cdot 10^8$ -		$36,0 \pm 2,52$	$9,3 \pm 0,65$	$5,0 \pm 0,35 \cdot 10^8$ -		$4,2 \pm 0,29$	$80,0 \pm 5,6$		
CD44 ⁺ /24 ⁻	$2,5 \pm 0,17 \cdot 10^5$	$7,41 \pm 0,51$	$6,0 \pm 0,42 \cdot 10^6$ $5,02 \pm 0,35$		$24,0 \pm 1,68$	$14,0 \pm 0,98$	$1,7 \pm 0,11 \cdot 10^7$ $3,41 \pm 0,23$		$2,8 \pm 0,19$	$120,0 \pm 8,4$		
CD44 ^{hi}	$3,6 \pm 0,25 \cdot 10^3$	$0,11 \pm 0,007$	$3,6 \pm 0,25 \cdot 10^4$ $0,03 \pm 0,002$		$10,0 \pm 0,70$	$34,0 \pm 2,38$	$3,5 \pm 0,24 \cdot 10^5$ $0,07 \pm 0,008$		$9,7 \pm 0,67$	$34,6 \pm 2,42$		
каКЕ-14												
загальна популяція	$3,3 \cdot 10^6$	-	$2,9 \pm 0,21 \cdot 10^7$ -		$8,8 \pm 0,61$	$38,2 \pm 2,67$	$8,74 \pm 0,61 \cdot 10^8$ -		$30,0 \pm 2,10$	$11,2 \pm 0,78$		
CD44 ⁺ /24 ⁻	$5,8 \pm 0,41 \cdot 10^5$	$17,50 \pm 1,25$	$7,1 \pm 0,49 \cdot 10^6$ $24,57 \pm 1,71$		$12,2 \pm 0,85$	$27,5 \pm 1,92$	$4,89 \pm 0,34 \cdot 10^7$ $5,56 \pm 0,38$		$6,9 \pm 0,48$	$48,7 \pm 3,40$		
CD44 ^{hi}	$1,67 \pm 0,12 \cdot 10^3$	$0,05 \pm 0,003$	$3,2 \pm 0,22 \cdot 10^4$ $0,11 \pm 0,007$		$19,0 \pm 1,33$	$18,0 \pm 1,26$	$1,8 \pm 0,12 \cdot 10^5$ $0,03 \pm 0,002$		$8,0 \pm 0,56$	$42,0 \pm 2,94$		

самопідтримки СПК знову відрізнялося від загальної популяції клітин.

Значимість вихідного стану клітин АКЕ у дослідженні їх кріочутливості підтверджують також результати оцінки статусу “старіючої” культури АКЕ-14. Як видно з табл. 2, у кАКЕ-14 ще більше, ніж у кАКЕ-7 знижувався вміст CD44^{hi} і ще істотніше підвищувався вміст CD44^{+/24}-клітин. Тобто кріовплив з тією самою спрямованістю, але в більш вираженій формі змінював субпопуляційний склад СПК в АКЕ-14.

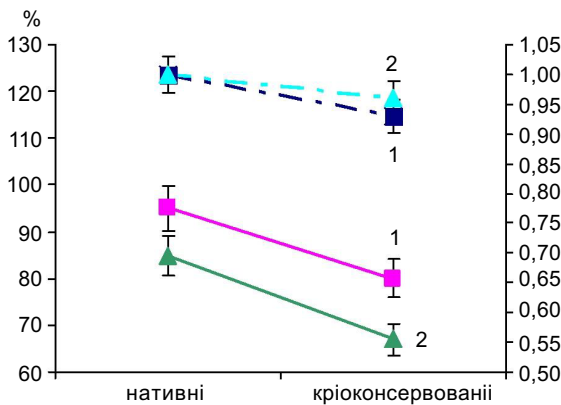
Проліферативний потенціал кАКЕ-14, із зазначеними фенотиповими характеристиками СПК, судячи з кратності збільшення загального числа клітин у ПП, був у перші 7 діб інгібований сильніше, ніж кАКЕ-7 (див. табл. 2). Це цілком логічно з огляду на те, що кріоконсервування модифікує контроль проліферації клітин за участі окисного та гліколітичного фосфорилування, у яких при старінні клітин спостерігаються зміни їхньої інтенсивності та налагодженості [8, 10]. Однак на наступному тижні Td кАКЕ-14 більш ніж у 4 рази перевершував такий у нАКЕ-14 і був навіть удвічі вищим порівняно з кАКЕ-7. Кратність збільшення загального числа клітин кАКЕ-14 у цей період наближалася до нАКЕ-7 у період 0–7-ї доби, характеризуючи саме цей етап як фазу експонен-

ційного росту кАКЕ-14.

Потенціал самопідтримки СПК із фенотипом CD44^{hi} у кАКЕ-14 на першому тижні був у 1,5 рази нижчим, ніж у кАКЕ-7. А на наступному етапі росту, цей показник у CD44^{hi}-клітин був таким, як у кАКЕ-7 і удвічі перевершував нАКЕ-14. Іншими словами, кріоконсервування виявляло “ревіталізуючий” ефект відносно CD44^{hi}-клітин в АКЕ-14.

У порівняльному аспекті важливо також відзначити, що для АКЕ-7 виразність кріосупресії у відношенні їх функціонального статусу на початкових етапах росту зростала від більш диференційованих попередників, що формують загальний пул клітин у ПП, до високопотентних CD44^{hi}. Навпаки, у “старіючих” АКЕ-14, такий ефект знижувався від більш до менш диференційованих клітин, викликаючи в останніх (CD44^{hi}) навіть стимуляцію росту. Більше того, мінімальна проліферативна активність клітин загальної популяції кАКЕ-14 на першому тижні, змінювалася на наступному етапі максимальною її виразністю з усіх видів клітин АКЕ обох термінів культивування. Ці результати ще раз підкреслюють значимість кріолабільності (кріостабільності) біооб’єкта не тільки умов кріоконсервування, але і вихідного його стану [2, 3, 14]. Для клітин АКЕ, як видно, таким є термін культивування і рівень їх диференціювання. Крім розходжень, для кАКЕ-7 і кАКЕ-14 мали деякі і загальні ознаки їхнього функціонування. Так, субпопуляційні клітини, що були найбільше інгібовані кріоконсервуванням у своїй активності на першому етапі росту, максимально виявляли її на наступному.

Істотний внесок у розуміння характеру впливу кріоконсервування на клітини АКЕ зробили результати оцінки їхнього інтегрального функціонального потенціалу за весь період росту (табл. 3). Для нАКЕ-7, наприклад, максимальною була кратність збільшення загальної кількості клітин у ПП,



Зміни кількості ядромісних і життєздатних клітин в аденокарциномі Ерліха, отриманих на 7-му (1) і 14-ту (2) добу та після кріоконсервування; зверху – ядромісні, знизу – життєздатні клітини

Таблиця 3. Абсолютна кратність зміни вмісту клітин від 0 до 14-ї доби (M \pm m, n=5)

Схема дослідження	АКЕ-7		Вплив кріоконсервування (коефіцієнт зміни)		АКЕ-14		Вплив кріоконсервування (коефіцієнт зміни)	
	нативні	кріоконсервовані	інгібіція	стимуляція	нативні	кріоконсервовані	інгібіція	стимуляція
Загальна популяція	329,7 \pm 23,07	151 \pm 10,57 ²	2,18 \pm 0,15	-	157,5 \pm 11,02 ¹	264 \pm 18,48 ^{3,4,5}	-	1,68 \pm 0,11
CD44 ⁺ /24 ⁻	178 \pm 12,46	67 \pm 4,69 ²	2,66 \pm 0,18	-	104,4 \pm 7,30 ¹	85 \pm 5,95 ^{3,4,5}	1,23 \pm 0,08	-
CD44 ^{hi}	135 \pm 9,45	97 \pm 6,79 ²	1,39 \pm 0,09	-	43,7 \pm 3,05 ¹	160 \pm 11,2 ^{3,4,5}	-	3,66 \pm 0,25

*P<0,01 порівняно з групою нативних АКЕ-7.

мінімальною – CD44^{hi} СПК. Для “старіючих” нАКЕ-14 зберігалася та сама закономірність, але з меншою в 2–3 рази виразністю. Після кріоконсервування проліферативний потенціал усіх видів попередників як в АКЕ-7, так і АКЕ-14 значно змінювався. Однак спрямованість цих змін була неоднаковою в різних “вікових” групах АКЕ. Для АКЕ-7 характерною була інгібіція факторами кріоконсервування функцій усіх видів попередників з максимальною супресією CD44⁺/24-субпопуляції. Стан клітин “старіючої” популяції АКЕ-14 непередбачувано змінювався після кріоконсервування. Тільки в клітинах CD44⁺/24 кріоконсервування інгібувало потенціал самопідтримки. По загальній популяції клітин у ПП і CD44^{hi} СПК був отриманий виражений стимулювальний ефект кріоконсервування, причому не тільки порівняно з нАКЕ-14. Так, кратність збільшення загальної популяції клітин майже в 2 рази перевищувала цей показник кАКЕ-7, а найбільш канцерогенних CD44^{hi} СПК навіть у нАКЕ-7.

Таким чином, на підставі результатів виконаних досліджень можна зробити такі висновки: у гетерогенній популяції АКЕ є клітини з ознаками СПК різного рівня диференціювання, а саме з фенотипом CD44^{hi} і CD44⁺/24⁻. СПК із зазначеним фенотипом мають потенціал самопідтримки та формування клітин наступних рівнів диференціювання. У процесі заморожування–відтавання фактори кріоконсервування по-різному змінюють функціональний статус зазначених пухлиноіндукуючих попередників АКЕ на різних етапах розвитку пухлинного процесу *in vivo*. Інгібуючі всі зазначені субпопуляції клітин у кАКЕ-7 у “старіючих” (принаймні у межах 14-ї доби) АКЕ-14, відбувається селективний добір тих стовбурових попередників, відносно яких кріовплив виявляв “ревіталізуючий” ефект. Навіть залишаючись у нАКЕ-14 у меншій, ніж у нАКЕ-7 концентрації, після кріоконсервування вони мають

більш високий, ніж у НАКЕ-7 і тим більше в КАКЕ-7 потенціал самопідтримки. Отримані нами результати вносять значне доповнення у розуміння загальнобіологічних характеристик СПК, розшифровку механізмів їхньої відповіді на дію екстремальних факторів кріоконсервування, які здатні перевести нечисленну клітинну популяцію СПК у новий функціональний статус.

Представлені результати є досить важливими для практичної медицини і можуть бути використані для оптимізації методів кріоабляції злоякісних новоутворень, повному їх інтегрувати в комплексне лікування такого роду патологій і краще орієнтуватися у виборі часу проведення кріоманіпуляцій.

**А.Н.Гольцев, О.В.Сафранчук,
М.О.Бондарович, М.В.Останков**

ИЗМЕНЕНИЕ КРИОЛАБИЛЬНОСТИ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ РОСТА АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА IN VIVO

Проведено сравнительное изучение изменений функциональной активности двух уровней дифференцировки стволовых опухолевых клеток различных сроков культивирования аденокарциномы Эрлиха АКЭ. Отмечен различный характер изменения функционального статуса опухолиндуцирующих предшественников в зависимости от степени их дифференцировки и суток культивирования. В отношении стволовых предшественников “старееющей” культуры АКЭ факторы кріоконсервирования реализуют “ревитализирующий” эффект. Полученные данные акцентируют внимание на необходимости корректного выбора сроков кріоиррадиации злокачественных новообразований в общих схемах их лечения.

Ключевые слова: стволовые опухолевые клетки, кріоконсервирование, аденокарцинома Эрлиха.

**Goltsev A.N., Safranchuk O.V., Bondarovich
N.A., Ostankov M.V.**

CHANGE IN CRYOLABILITY OF CANCER STEM CELLS DURING IN VIVO CULTURE OF ERLICH ADENOCARCINOMA

Cancer stem cells (CSC) are the main structural unit in initiation, support of in situ growth, as well as tumor metastasis during malignant development of various origin. Observed

chemo- and radio-resistance of CSC make them a potential target cell to perform cryoeradication. We have performed a comparative study of changes in functional activity after cryopreservation of CSC of two differentiation levels from Erlich adenocarcinoma (EAC) of various culture terms (EAC-7, EAC-14). It was found that in the case of EAC-7 the expression of cryosuppression in terms of cell functional state at the initial stages of development was bigger in high potency CD44^{hi} cells comparing to more differentiated cells, forming general pool of cells in peritoneal cavity. And *vice versa*, in the “eldering” EAC-14 this effect was bigger in more differentiated cells comparing to less differentiated ones, even causing in latter (CD44^{hi}) the growth stimulation. Moreover, the minimal proliferative activity of general population cells cEAC-14 during the first weeks was alternated at the next stage to its maximal expression among all the studied types of EAC cells of both culture terms. These data confirm again the fact, that during assessment of bioobject cryolability (cryostability) it is significant to determine not only cryopreservation conditions, but the initial state of the bioobject as well.

Key words: cancer stem cells, cryopreservation, Erlich adenocarcinoma.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Бабенко Н.Н., Останкова Л.В., Мацевитая И.Ю., Шатнева О.М. Модификация структурно-функциональной организации стволовых кроветворных клеток костного мозга после действия факторов низкотемпературного консервирования // Пробл. криобиологии. – 2005. – **15**, № 3. – С. 362–366.
2. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г., Опанасенко Е.В. Мембранные структуры, определяющие фенотипические характеристики и функциональное состояние кроветворных клеток; возможная их модификация под действием факторов кріоконсервирования. Часть I // Там же. – 1995. – **5**, № 3. – С. 19–30.
3. Гольцев А.Н. Дубрава Т.Г., Останкова Л.В. Особенности влияния кріоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации // Там же. – 2009. – **19**, №2. – С. 186 – 199.
4. Євтушенко О.І. Саган Д.Л., Кузьменко О.П. Кріохірургічне лікування хворих на рак ободової кишки. – К.: Вістка, 2008. – С.20.
5. Казьмин С.Д. Об изменениях в структуре популяций клеток опухоли Эрлиха // Вопр. онкологии. – 1978. – **24**, №10. – С.32–37.
6. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.

7. Новик А.В., Моисеенко В.М. Теоретические предпосылки адьювантной терапии злокачественных опухолей // *Практ. онкология*. – 2007. – **8**, № 3. – С. 109–117.
8. Федец О.И. Биоэнергетика и пролиферативная активность криоконсервированных клеток аденокарциномы Эрлиха: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1987 – 36 с.
9. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под.ред. А.А. Цуцаевой. – К.: Наук. думка, 1983. – 240 с.
10. Шапот В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста. – М.: Медицина, 1975. – 304 с.
11. Эммануэль Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. – М.: Наука, 1977. – 419 с.
12. Abraham B.K., Fritz P., McClellan M., Hauptvogel P., Athellogou M., Brauch H. Prevalence of CD44⁺/CD24^{-low} cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – **11**, №3. – P.1154–1159.
13. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – **100**, №7. – P. 3983–3989.
14. Anderson E.M., Jones D.R.E., Liu D.T.Y., Evans A.A. Gestation age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal hematopoietic progenitor cell preparations // *Fetal Diagn. Ther.* – 1996. – **11**, №6. – P. 427–432.
15. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response // *Nature.* – 2006. – **444**, №7120. – P. 756–760.
16. Chong Y.K., Toh T.B., Zaiden N., Poonepalli A., Leong S.H., Ong C.E., Yu Y., Tan P.B., See S.J., Ng W.H., Ng I., Hande M.P., Kon O.L., Ang B.T., Tang C. Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme // *Stem Cells.* – 2009. – **27**, № 1. – P. 29–39.
17. Clark D.M., Robilotto A.T., VanBuskirk R.G., Baust J.G., Gage A.A., Baust J.M. Targeted induction of apoptosis via TRAIL and cryoablation: a novel strategy for the treatment of prostate cancer // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* – 2007. – **10**, № 2. – P. 175–184.
18. Eramo A., Ricci-Vitiani L., Zeuner A., Pallini R., Lotti F., Sette G., Pilozzi E., Larocca L.M., Peschle C., De Maria R. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells // *Cell Death Differ.* – 2006. – **13**, №7. – P. 1238–1241.
19. Fillmore C., Kuperwasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? // *Breast Cancer Res.* – 2007. – **9**, №3. – P.303–306.
20. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. Ostankov M.V., Shatneva O.M. Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation // *Intern. J. Refrigeration.* – 2006. – **29**, №3. – P. 358–367.
21. Goltsev A.N., Safranchuk O.V., Bondarovich N.A. Peculiarities of effect of cryopreservation factors on morphofunctional organization of Ehrlich adenocarcinoma at different developmental stages // Possible directions for low temperature biology in the next five years: The 2008 Meeting and AGM, Copenhagen, 11-12 Sept. 2008. – C., 2008. – P.41.
22. Hattori Y., Kato H., Nitta M., Takamoto S. Decrease of L-selectin expression on human CD34-cells on freezing-thawing and rapid recovery with short-term incubation // *Exp. Hematol.* – 2001. – **29**, №1 – P. 114–122.
23. Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J.W., Guba M., Bruns C.J., Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer // *Cell Stem Cell* – 2007. – **1**, №3 – P. 313–323.
24. Liu S., Dontu G., Wicha M.S. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis // *Breast Cancer Res.* – 2005. – **7**, №3. – P.86–95.
25. Nakshatri H. Radiation resistance in breast cancer: are CD44⁺/CD24⁻ proteosome^{low}/PKH26⁺ cells to blame? // *Ibid.* – 2010. – **12**. – № 2. – P. 105.
26. O'Brien C.A., Pollet A., Gallinger S., Dick J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // *Nature.* – 2007. – **445**, №7123. – P.106–110.
27. Prall F., Maletzki C., Linnebacher M. The EpCAM^{high}/CD44^{high} colorectal carcinoma stem cell phenotype is not preferentially expressed in tumor buds // *Histopathology.* – 2010. – **56**. – № 4. – P.553–555.
28. Prince ME., Sivanadan R., Kaczorowski A., Wolf G.T., Kaplan M.J., Dalerba P., Weissman I.L., Clarke M.F., Ailles L.E. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – **104**, №3 – P. 973–978.
29. Sheridan C., Kishimoto H., Fuchs R.K., Mehrotra S., Bhat-Nakshatri P., Turner C.H., Goulet R., Badve S., Nakshatri H. CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis // *Breast Cancer Res.* – 2006. – **8**, №5. – P.R59.
30. Zhang M., Rosen J.M. Stem cells in the etiology and treatment of cancer // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2006. – **16**, №1 – P. 60–64.

П.К. Цапенко, Т.П. Лященко

Зміни мембранного потенціалу гепатоцитів щурів під впливом вазопресину

Досліджено основні електрофізіологічні властивості мембран гепатоцитів. Встановлено, що вольт-амперна характеристика клітин печінки має лінійну залежність. Це свідчить про відсутність електричної збудливості та важливу роль хемочутливих іонних каналів при розвитку електричних процесів на клітинній мембрані. Вивчали вплив вазопресину (ВП) на мембранний потенціал гепатоцитів щурів за допомогою мікроелектродної техніки. Показано, що ВП викликає гіперполяризацію мембран гепатоцитів, що відображає стимуляцію синтетичної активності клітин. Застосування ВП на тлі дії блокатора протейнінази С хелеритрину призводить до гіперполяризації мембран гепатоцитів, але меншої, ніж при застосуванні лише цього гормону. Цей факт доводить значну роль протейнінази С у реалізації ефектів ВП на гепатоцити та означає, що до цього процесу задучені й інші внутрішньоклітинні посередники. Таким чином, існує вірогідність, що аденілатциклаза опосередковує стимулювальний вплив гормону на жовчоутворювальну функцію гепатоцитів.

Ключові слова: вазопресин, гепатоцит, мембранний потенціал, протейніназа С.

ВСТУП

Функціонування найбільшої залози травного тракту – печінки, регулюється складними нейрогуморальними механізмами, серед яких важлива роль належить гормону нейрогіпофіза вазопресину (ВП). Було показано, що у культурі гепатоцитів і на ізольованій печінці ВП за фізіологічних концентрацій стимулює вихід кон'югованих жовчних кислот [9, 12]. Цей вплив здійснюється за участю вазопресинових рецепторів V_{1A} , оскільки застосування їхнього селективного антагоніста усувало стимулювальні ефекти ВП.

Наразі відомо три типи вазопресинових рецепторів: V_{1A} , зв'язування з яким викликає гідроліз інозитолтрифосфату (IP_3) та підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ; цей тип рецепторів знайдено на мембрані гепатоцитів, тромбоцитів і гладеньком'язових клітин; V_2 , зв'язування з ними активує аденілатциклазу та збільшення вмісту цАМФ; вважалося, що цей

тип рецепторів представлено лише в нирках, проте нині їх знайдено і в інших органах; V_{1B} (V_3), що також пов'язаний з системою IP_3 ; цей тип рецепторів знайдено у передньому відділі гіпофіза [6]. Згідно з джерелами літератури, гепатоцити є клітинами, котрі містять найбільшу кількість V_{1A} -рецепторів, які пов'язані з протейніназою С. Відомо, що гормони, вторинним посередником яких є остання, посилюють глікогеноліз і гліюконеогенез, а також інгібують жовчоутворення. І навпаки, гормони, які активують аденілатциклазу, послаблюють глікогеноліз і посилюють жовчоутворення [2, 3]. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що ВП має стимулювати глікогеноліз і пригнічувати жовчоутворення, що підтверджують деякі автори [5, 15]. Проте існують дані і про стимулювальний вплив ВП на жовчоутворювальну функцію печінки [9, 12]. Крім того, описана можливість взаємодії сигнальних шляхів за участю фосфоліпази

© П.К. Цапенко, Т.П. Лященко

C та аденілатциклази у клітинах, що містили V_{1A} - та V_2 -вазопресинові рецептори [8]. Враховуючи цей факт і нові відомості про локалізацію V_2 -рецепторів не лише на клітинах нирок, як вважалося раніше, можна припустити можливість залучення декількох внутрішньоклітинних механізмів дії ВП у гепатоцитах [6]. Таким чином, визначення внутрішньоклітинних шляхів дії гормону дає змогу з'ясувати його вплив на згадані процеси у гепатоцитах.

Зв'язок мембранного потенціалу (МП) клітин із їх секреторною функцією досліджується досить довго. Показано кореляцію між зростанням МП секреторних клітин і посиленням їхньої секреторної активності (в тому числі й гепатоцитів), в той час як деполаризаційні зміни пов'язані зі зниженням такої активності та активацією трансмембранного транспорту [1, 2, 13]. Таким чином, зміни МП гепатоцитів указують на їх метаболічну та секреторну активність. Саме тому метою нашої роботи стало дослідження впливу ВП на електричну активність гепатоцитів і ролі протеїнкінази C у реалізації ефектів гормону.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на 10 лабораторних білих щурах масою 200–250 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Під час експерименту тварини знаходилися під тіопенталовим наркозом (5 мг/100 г маси тіла інтраперитонеально).

Вплив ВП на МП вивчали за допомогою мікроелектродної техніки методом печінкових слайсів [11]. У наркотизованих щурів печінку відмивали від крові за методикою Сеглена [10] та робили зрізи товщиною до 3 мм. Потім їх перфузували у експериментальній камері стандартним позаклітинним оптимальним для гепатоцитів сольовим розчином, температура якого була 37°C [2]; склад розчину був таким (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4, CaCl₂ – 1,

MgCl₂ – 1, глюкоза – 10, KН₂РO₄ – 1, НЕРЕС – 10; рН 7,4 (NaOH).

Мікроелектроди виготовляли із боросилікатного скла на півавтоматі МЭ–4 та заповнювали 2,5 М розчином KCl у термостаті при 50°C протягом 10 год. Опір готових мікроелектродів становив 100–120 МОм. МП реєстрували за допомогою диференційного підсилювача, що був створений дослідно-конструкторським виробництвом Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України на основі мікросхеми K140УД8Б. Сигнал від підсилювача спрямовувався через аналогово-цифровий перетворювач до комп'ютера, на якому реєструвався за допомогою спеціальної програми.

ВП (“Sigma”, США) перфузували в максимально ефективній концентрації 100 нмоль/л [19]. Контролем був МП гепатоцитів до початку перфузії речовини. Для визначення ролі протеїнкінази C у реалізації ефектів ВП ми використовували її інгібітор хелеритрин (“Sigma”, США). Печінковий зріз перфузували розчином з інгібітором (5 мкмоль/л) протягом 20 хв, після чого мікроелектрод вводили в клітину, а в перфузат додавали ВП в зазначеній вище концентрації. Хелеритрин у використаній нами концентрації повністю пригнічує активність ферменту [20]. Ми порівнювали МП у період після введення ВП у клітинах з пригніченою активністю протеїнкінази C та інтактних клітинах.

Вольт-амперну характеристику мембран гепатоцитів визначали, подразнюючи клітини електричним імпульсом від електростимулятора ЭСУ2, тривалість імпульсу становила 1 с. Вхідний опір мембран гепатоцитів R розраховували за формулою $R = \Delta V / I$, де I – сила струму, який подається зі стимулятора на клітину, ΔV – зміна значення МП під впливом електричного імпульсу.

Результати було оброблено методами варіаційної статистики. Проводили тест

Шапіро–Уїлка, нормально розподілені результати обчислювали за критерієм t Стьюдента для залежних вибірок з урахуванням тесту Левена. Статистично значущими вважалися зміни при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Наші дослідження показали, що потенціал спокою гепатоцитів щурів становив $22 \text{ мВ} \pm 4,5 \text{ мВ}$, вхідний опір клітин – $170 \text{ МОм} \pm 10,45 \text{ МОм}$. Це узгоджується з літературними даними [4, 14]. Вольт-амперна характеристика гепатоцитів була лінійною (рис. 1), що свідчить про відсутність електричної збудливості гепатоцитів.

Проте слід відмітити деякі відхилення від лінійної залежності вольт-амперної характеристики в межах МП спокою, що говорить про певну залежність роботи іонних каналів від МП клітин у цьому діапазоні. Таке саме явище характерне і для гепатоцитів морських свинок і кролів [7]. Лінійна залежність вольт-амперної характеристики мембран гепатоцитів означає, що головну роль у змінах МП гепатоцитів відіграють не потенціалзалежні канали, а канали, асоційовані з рецепторами та внутрішньоклітинними посередниками.

Нами було встановлено, що ВП викликав статистично значущі гіперполяризаційні

зміни МП гепатоцитів з -20 до -50 мВ (рис. 2; $P < 0,05$). Потенціал залишався на рівні приблизно -50 мВ протягом усього часу дії речовини, тобто не спостерігалось реакції “вислизання”. Таким чином, наші результати свідчать, що ВП дійсно стимулює метаболічну активність гепатоцитів, активуючи процеси синтезу. Проте не можна стверджувати, що ця гіперполяризація пов’язана лише із активацією глюконогенезу чи також з інтенсифікацією жовчоутворення.

Відомо, що ВП підвищує концентрацію Ca^{2+} в гепатоцитах за допомогою його виділення з кальцієвих депо та входом у клітину через депокеровані кальцієві канали [2]. Зростання ж внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} викликає активацію кальційзалежних калієвих каналів, що й призводить до гіперполяризації мембран гепатоцитів [18]. Разом з тим такі зміни МП можуть бути викликані підвищенням внутрішньоклітинної концентрації цАМФ та активацією цАМФ-залежних хлоридних каналів [2]. Отже, постає питання, яким саме чином діє ВП на МП клітин печінки. Для його вирішення ми заблокували один з цих сигнальних механізмів, застосувавши хелеритрин.

Результати наших досліджень свідчать, що ВП викликає гіперполяризацію мембран

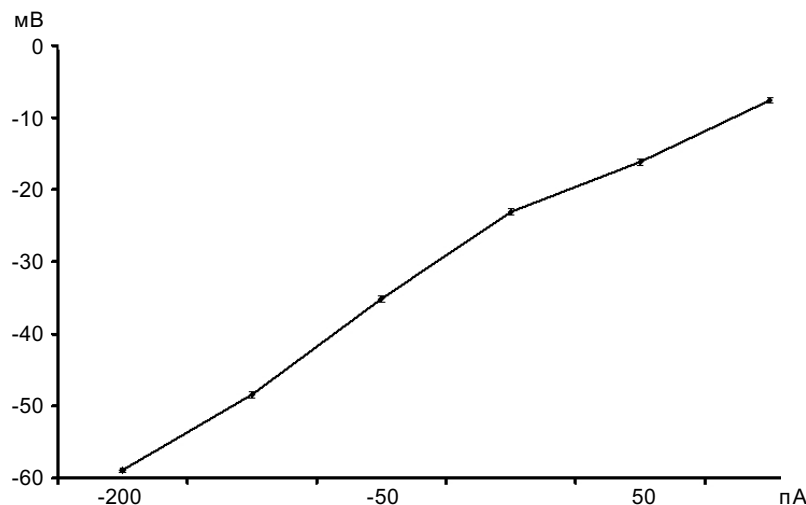


Рис. 1. Вольт-амперна характеристика мембран гепатоцитів щурів ($n=15$)

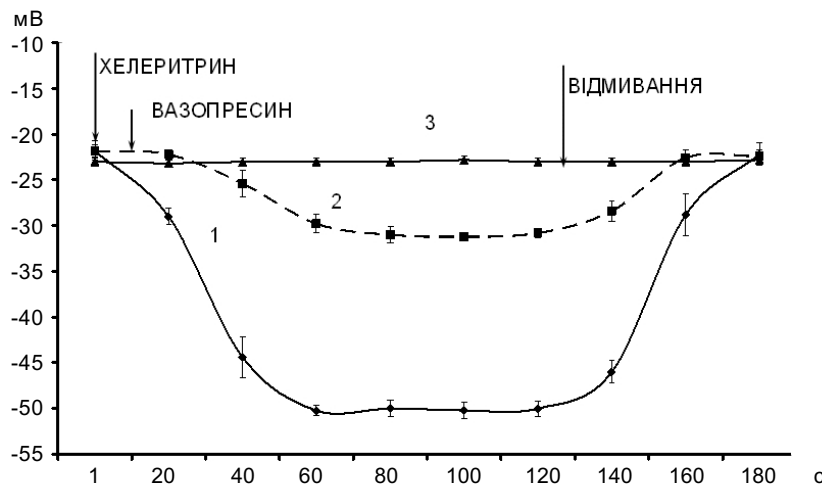


Рис. 2. Зміни мембранного потенціалу гепатоцитів щурів під впливом самого вазопресину та на тлі дії хелеритрину (n=15): 1 – перфузія вазопресину; 2 – перфузія вазопресину на тлі дії хелеритрину; 3 – перфузія хелеритрину

гепатоцитів ($P < 0,05$), попередньо оброблених хелеритрином, але гіперполяризаційні зміни були меншими, ніж за умов дії ВП на інтактні клітини (див. рис. 2). Різниця між дією самого ВП та на тлі впливу хелеритрину була статистично значущою ($P < 0,05$), що свідчить про важливу роль протеїнкінази С у реалізації впливу ВП на гепатоцити. Слід відмітити, що застосування самого хелеритрину не викликало змін МП гепатоцитів, тобто відмінності в дії ВП пов'язані саме з гормоном і його сигнальними шляхами (див. рис. 2).

Пригнічення активності протеїнкінази С не повністю усувало ефекти ВП, що вказує на залучення інших внутрішньоклітинних посередників гормону, можливо, аденілатциклази. Гіперполяризаційні зміни на мембрані гепатоцитів під впливом ВП на тлі хелеритрину свідчать про стимуляцію жовчотворення, однак така дія гормону в нормі може маскуватись або навіть повністю компенсуватись внаслідок активності протеїнкінази С, яка є інгібітором процесів утворення та виділення жовчі в гепатоцитах.

Таким чином, гормон нейрогіпофіза ВП посилює секреторну активність гепатоцитів головним чином через протеїнкіназу С, про що свідчить гіперполяризація їхніх мембран.

П.К. Цапенко, Т.П. Лященко

ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВАСОПРЕССИНА

Изучена вольт-амперная характеристика мембран гепатоцитов, показана ее линейная зависимость, что указывает на отсутствие электрической возбудимости клеток печени и важную роль хемочувствительных каналов при развитии электрических процессов на клеточной мембране. Проведены исследования влияния вазопрессина (ВП) на мембранный потенциал гепатоцитов крыс при помощи микроэлектродной техники. Оказывается ВП вызывает гиперполяризацию мембран гепатоцитов, что является показателем стимуляции гормоном синтетической активности клеток. Использование ВП на фоне действия блокатора протеинкиназы С хелеритрина вызывает гиперполяризационные изменения на мембране гепатоцитов, но меньшей величины, чем при воздействии только этого гормона. Этот факт свидетельствует о значительной роли протеинкиназы С в реализации эффектов ВП на гепатоциты и означает, что в этот процесс вовлечены и другие внутриклеточные посредники. Таким образом, существует вероятность участия в опосредовании стимулирующего действия ВП на желчеобразовательную функцию гепатоцитов аденилатциклазы.

Ключевые слова: вазопрессин, гепатоцит, мембранный потенциал, протеинкиназа С.

P.K. Tsapenko, T.P. Liashchenko

EFFECT OF VASOPRESSIN ON THE MEMBRANE POTENTIAL OF RAT HEPATOCYTES

The current-voltage relationship of rat hepatocytes was

investigated and its linear dependence was shown. On liver slices, we have investigated the effects of vasopressin on membrane potential of rat hepatocytes using microelectrode technique. Vasopressin evoked membrane hyperpolarization to -50 mV, suggesting that vasopressin activated synthetic processes in hepatocytes. Vasopressin application together with the inhibitor of protein kinase C chelerytrine also caused hyperpolarization of hepatocytes, but membrane potential changes were of smaller amplitude. This fact suggests that although protein kinase C plays an important role in the realization of effects of vasopressin, there is, however, another signal transduction pathway of vasopressin in rat hepatocytes. If that pathway activates adenylatecyclase, vasopressin can stimulate bile formation in hepatocytes. This assumption should be verified.

Key words: vasopressin, hepatocytes, membrane potential, protein kinase C.

Taras Shevchenko Kyiv National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Фролькис В.В. Влияние активации биосинтеза белка на уровень мембранного потенциала клеток // Биофизика. – 1974. – **19**. – №3. – С.470–473.
2. Aromataris E.D., Roberts M.L., Barritt G.J., Rychkov G.Y. Glucagon activates Ca²⁺ and Cl⁻ channels in rat hepatocytes // J. Physiol. – 2006. – **573**. – Issue 3. – P.611–625.
3. Boyer J.L., Nathanson M.H. Bile formation // Shif. Des. liver. – Philadelphia. – 1999. – P.119–142.
4. Cohen A.J., Burczynski F.J., Rosser B.G., Lipschitz J., Minuk G.Y. The effects of various organ preservation solutions on hepatocyte membrane potentials, intracellular calcium concentrations, and outcome following liver transplantation // Amer. J.Surg. – 2000. – **179**(2). – P.154–160.
5. Dupont G., Tordjmann T., Clair C., Swillens S., Claret M., Combettes L. Propagation mechanisms of receptor-oriented intercellular calcium waves in hepatocytes // FASEB J. – 2000. – **14**. – P.279–289.
6. Ferguson J.W., Therapondos G., Newby D.E., Hayes P.C. Therapeutic role of vasopressin receptor antagonism in patients with liver cirrhosis // Clin. Sci. – 2003. – **105**. – P.1–8.
7. Field A.C., Jenkinson J.H. The effect of noradrenaline on the ion permeability of isolated mammalian hepatocytes, studied by intracellular recording // J. Physiol. – 1987. – **392**. – P.493–512.
8. Kingler C., Ancellin N., Barrault M.B., Morel A., Corman B. Potentiation of receptor-mediated cAMP production: role in the cross-talk between vasopressin V1a and V2 receptor transduction pathways // Biochem.J. – 1998. – **330**. – P.1023–1028.
9. Kuhn W.F., Gewirtz D.A. Stimulation of taurocholate and glycocholate efflux from the rat hepatocyte by arginine vasopressin // Amer. J.Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 1990. – **254**, № 17. – P.732–740.
10. Li A.P. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development // Chem.-Biol. Interact. – 2007. – **168**(1). – P.16–29.
11. Lyall V., Croxton T.L., Armstrong W.M. Measurement of intracellular chloride activity in mouse liver slices with microelectrodes // Biochim. and Biophys. Acta. – 1987. – **903**(1). – P.56–67.
12. Nicou A., Serrier V., Prigent S., Boucherie S., Combettes L., Gillon G., Allonso G., Tordjmann Th. Hypothalamic vasopressin release and hepatocyte Ca²⁺ signaling during liver regeneration: an interplay stimulating liver growth and bile flow // FASEB J. – 2003. – **17**. – P.1901–1903.
13. Poisner R.H. The secretory process. Vol.2. The electrophysiology of the secretory cell. – Amsterdam: Elsevier, 1985. – 216 p.
14. Sawanabori T., Takanashi H., Hiraoka M., Iida Y., Kamisaka K., Maezawa H. Electrophysiological properties of isolated rat liver cells // J. Cell. Physiol. – 1989. – **139**. – № 3. – P.580–585.
15. Schmeisch A.P., de Oliveira D.S., Ide L.T., Suzuki-Kemmelmeier F., Bracht A. Zonation of the metabolic action of vasopressin in the bivascularily perfused rat liver // Regul. Pept. – 2005. – **129**. – P.233–243.
16. Serriere V., Berthon B., Boucherie S. Vasopressin receptor distribution in the liver controls calcium wave propagation and bile flow // FASEB J. – 2001. – **15**. – P.1484–1486.
17. Spruce B.A., McCulloch A.J., Burd J. The effect of vasopressin infusion on glucose metabolism in man // Clin.Endocrinol. – 1985. – **22**. – P.463–468.
18. Takanashi H., Sawanabori T., Kamisaka K., Maezawa H., Hiraoka M. Properties of single potassium channels in guinea pig hepatocytes // J. Cell Physiol. – 1994. – **161**(3). – P.537–543.
19. Tsuda A., Tanaka K.A., Huraux C., Szlam F., Sato N., Yamaguchi K., Levy J.H. The in vitro reversal of histamine-induced vasodilation in the human internal mammary artery // Anest. Analg. – 2001. – № 93. – P.1453–1459.
20. Yacoub D., Theoret J.-F., Villeneuve L., Abou-Saleh H. Mourad W., Allen B.G., Merhi Y. Essential Role of protein kinase C in platelet signaling, I1b3 activation and thromboxane A2 release // J. Biol. Chem. – 2006. – **281**. – Issue 40. – P.30024–30035.

Київ. нац. ун-т імені Тараса Шевченка
E-mail: tsapenkopetr@yahoo.com

Матеріал надійшов до редакції 05.01.2011

Н.В. Богдановська, А.В. Коцюрuba, М.В. Маліков

Утворення оксиду азоту на різних етапах змагань у високотренованих спортсменів

Обстежено 26 спортсменів високої кваліфікації (юнаків та дівчат віком від 18 до 20 років, адаптованих до тривалого виконання важкої фізичної роботи високої інтенсивності). Показано наявність статевих відмінностей в окисному (синтез оксиду азоту) і неокисному (синтез сечовини, поліамінів, γ-аміномасляної кислоти, попередників колагену) метаболізмі L-аргініну і в системі синтезу оксиду азоту (окисному de novo і неокисному реутилізаційному шляхах на різних етапах їхньої змагальної діяльності. На етапі максимальних функціональних можливостей і адаптації (початок змагального періоду) у дівчат превалював неокисний метаболізм аргініну за участю аргінази над окисною деградацією L-аргініну за участю NO-синтаз. Під час зниження функціональних можливостей (дезадаптації у середній і кінцевий періоди змагань) необхідний рівень синтезу оксиду азоту забезпечується у дівчат переважно внаслідок ресинтезу оксиду азоту із його стабільних метаболітів, тоді як у юнаків – за рахунок збільшення окисного de novo синтезу оксиду азоту (як конститутивного, так і індукційного).

Ключові слова: оксид азоту, аргінін, психологічний стрес, спортсмени, юнаки, дівчата

ВСТУП

Вивчення ролі системи синтезу оксиду азоту в забезпеченні довготривалої адаптації організму до фізичних навантажень великого обсягу та інтенсивності має не тільки важливе теоретичне значення для загальної фізіології та фізіології м'язової діяльності, але і суттєве практичне – у зв'язку з можливістю організації науково-обґрунтованого біохімічного коригування функціонального стану організму в умовах довготривалої дії екстремальних зовнішніх факторів [1, 7, 11]. На сьогодні більшість публікацій, пов'язаних з проблемою оксиду азоту, присвячена питанням оцінки ефективності його практичного використання як структурного елемента різноманітних біологічно активних добавок, але не вивченню фізіологічних механізмів впливу оксиду азоту на функціональний стан і функціональні можливості організму під час систематичного виконання м'язової роботи

© Н.В. Богдановська, А.В. Коцюрuba, М.В. Маліков

та особливостей перебудови системи синтезу NO на різних етапах тренувальної та змагальної діяльності [10, 12, 14, 16, 17, 20]. Відсутні комплексні наукові дослідження, присвячені вказаним питанням, особливо стосовно участі різних шляхів біосинтезу оксиду азоту – окисного de novo і неокисного реутилізаційного – в забезпеченні оптимальних рівнів оксиду азоту за різних функціональних станів, а також гендерні відмінності цих процесів.

Раніше ми дослідили синтез оксиду азоту у спортсменів різної статі в тренувальний період за адаптації до фізичних навантажень [2–4, 9].

Метою цієї роботи було вивчення статевих відмінностей в системі синтезу оксиду азоту у високотренованих спортсменів високої кваліфікації, адаптованих до інтенсивної та тривалої фізичної роботи великого обсягу, за різних рівнів їх функціонального стану, зумовленого наявністю психологічного стресу на різних етапах змагального процесу.

МЕТОДИКА

В експерименті взяли участь 26 спортсменів високої кваліфікації у віці від 18 до 20 років (14 дівчат – спортсменки-волейболістки та 12 юнаків – спортсмени-гандболісти), що систематично (протягом 10–12 років) виконували м'язову роботу великого обсягу та інтенсивності. Тренувальні навантаження проводилися паралельно зі змаганнями за календарним планом команд.

У плазмі крові юнаків та дівчат, збагаченій клітинами білої крові, визначали біохімічні показники, які характеризують інтенсивність обміну аргініну за двома альтернативними (неокисному аргіназному й окисному NO-синтазному) шляхами метаболізму. Інтенсивність неокисного метаболізму оцінювали, визначаючи активність аргінази та вміст сечовини, що утворюється при роботі цього ферменту. Інтенсивність окисної деградації аргініну (за якої утворюється оксид азоту шляхом *de novo* синтезу) оцінювали за активністю різних ізоферментів NOS – кальційзалежної конститутивної (визначалася сумарна активність eNOS + nNOS = cNOS,) і кальційнезалежної індуцибельної (iNOS) синтази оксиду азоту, а також за рівнем циркулюючих стабільних метаболітів оксиду азоту – нітрит- (NO_2^-) і нітрат- (NO_3^-) аніонів. Оцінювали також інтенсивність неокисної реутилізації нітрат-аніонів для ресинтезу оксиду азоту, визначаючи НАДФ-залежну нітратредуктазну активність. Всі показники (в розрахунку на 1 мг загального білка плазми) визначали в плазмі крові згідно з описаними методами [1, 3, 4].

Використовуючи визначені показники, розраховували також деякі їхні співвідношення, а саме:

1) індекс оксигенації (ІО, ум.од.) за формулою $\text{ІО} = [\text{вміст } \text{NO}_2^-] \cdot 1000 / [\text{вміст } \text{NO}_3^-] + [\text{вміст сечовини}]$;

2) частку вмісту нітрит-аніона ($\% \text{NO}_2^-$)

в сумарному пулі стабільних метаболітів оксиду азоту за формулою $\% \text{NO}_2^- = [\text{вміст } \text{NO}_2^-] \cdot 100 / [\text{вміст } \text{NO}_3^-] + [\text{вміст } \text{NO}_2^-]$;

3) частку активності iNOS ($\% \text{iNOS}$) у сумарній активності NOS за формулою: $\% \text{iNOS} = \text{активність iNOS} / \text{активність } [\text{iNOS} + \text{cNOS}]$;

4) співвідношення активностей неокисного (аргіназного) та різних шляхів окисного (NO-синтазного) метаболізму аргініну через відношення активностей аргінази та NOS (активність аргінази / активність $[\text{iNOS} + \text{cNOS}]$, активність аргінази / активність iNOS і активність аргінази / активність cNOS);

5) співвідношення окисного і неокисного (salvage) шляхів синтезу оксиду азоту, визначаючи співвідношення активностей ферментів цих різних шляхів синтезу оксиду азоту (активність нітратредуктази / сумарна активність NOS, активність нітратредуктази / активність iNOS і активність нітратредуктази / активність cNOS).

Розраховували також відносні зміни (D, %) біохімічних показників щодо певного дослідженого періоду або контролю за такою формулою:

$$D = 100 \cdot (X_i - X_n) / X_n,$$

де X_i – кінцеве значення, X_n – вихідне значення показника.

Усі біохімічні показники визначали в плазмі крові тренуваних юнаків та дівчат тричі: на початку, у середині та наприкінці змагального періоду (ЗП). У підготовчому періоді (3 міс), фізичні навантаження виконували за відсутності факторів психологічного стресу, а у період змагань (8 міс) виконували як у тренувальному безстресовому режимі, так і в додаткових стресових умовах відповідальних змагань.

Обрана схема ґрунтувалася на тому, що ми спробували оцінити зміни активності різних шляхів синтезу оксиду азоту на початку (на піку фізичної форми спортсменів, досягнутої в процесі тренувальних занять), в середині (через 8 міс після початку тренувань і через 3 міс після

початку змагань) і наприкінці (через 11 міс після початку тренувань і через 8 міс після початку змагань) ЗП.

Одночасно з біохімічними показниками у спортсменів також тричі (на початку, в середині та наприкінці ЗП) за допомогою велоергометричного субмаксимального тесту PWC_{170} визначали загальну фізичну працездатність і аеробну продуктивність (МСК) їхнього організму [5]:

$$PWC_{170} = [N_1 + (N_2 - N_1) \cdot (170 - ЧСС_1) / (ЧСС_2 - ЧСС_1)] / МТ,$$

де N_1 – потужність першого навантаження, кгм/хв; N_2 – потужність другого навантаження, кгм/хв; $ЧСС_1$ – частота серцевих скорочень наприкінці першого навантаження, уд/хв; $ЧСС_2$ – частота серцевих скорочень наприкінці другого навантаження, уд/хв; МТ – маса тіла, кг.

$$МСК = 1,7 \cdot PWC_{170} \cdot МТ + 1240,$$

де PWC_{170} – відносна величина загальної фізичної працездатності, $кгм \cdot хв^{-1} \cdot кг^{-1}$; МТ – маса тіла, кг; 1,7 та 1240 – постійні коефіцієнти.

Усі отримані результати були оброблені стандартними методами математичної статистики з використанням пакета Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У попередніх роботах нами було встановлено об'єктивне існування певних змін в системі синтезу оксиду азоту в динаміці тривалого тренувального періоду, що не залежали від статі [2–4]. Показано, що на етапі інтенсивних фізичних навантажень, не обтяжених психоемоційним стресом (період підготовки до змагального сезону), основна роль у забезпеченні організму оксидом азоту в адаптованих спортсменів (як юнаків, так і дівчат) належить в основному конститутивному *de novo* синтезу і, меншою мірою, ресинтезу NO за участю нітратредуктази при одночасній дуже високій активності неокисного аргіназного метаболізму L-аргініну. Було відзначено, що ба-

гатостадійний неокисний аргіназний метаболізм аргініну забезпечує організм спортсменів низькомолекулярними антиоксидантами і біорегуляторами (сечовина, поліаміни). Крім того, в цьому шляху синтезуються попередники основного білка сполучної тканини – колагену, що має важливе значення для повноцінної адаптації організму спортсменів до виконання фізичної роботи значного обсягу й тривалості.

Разом з тим безсумнівно значимим для нас, з точки зору практичного використання результатів у спортивній медицині, було виявлення гендерних особливостей взаємозв'язку різних рівнів функціональної підготовки високопрофесійних спортсменів і біосинтезу оксиду азоту різними шляхами (*de novo* та *salvage*).

У табл. 1 представлені результати обстеження високотренованих спортсменів різної статі протягом ЗП, що характеризується найбільш високим рівнем фізичної підготовленості організму (загальна фізична працездатність та аеробна продуктивність в юнаків були вірогідно вищі, ніж у дівчат).

Як уже було відзначено в попередніх наших роботах для всіх обстежених, незалежно від статі, домінуюча роль у забезпеченні оптимального рівня синтезу оксиду азоту на етапі підготовки до сезону належала конститутивному *de novo* (сNOS) при участі *salvage* шляху (нітратредуктаза) його утворення при одночасній високій активності неокисної деградації аргініну (аргіназа). На початку ЗП активність нітратредуктази в дівчат була вірогідно вищою, ніж у юнаків. Навпаки, серед юнаків реєструвалися більш високі значення активностей як сNOS, так і iNOS, що сягали достовірності різниці для значень сумарної активності NOS у юнаків і дівчат: $(70,83 \pm 4,00)$ $пмоль \cdot хв^{-1} \cdot мг^{-1}$ білка й $(56,55 \pm 5,42)$ $пмоль \cdot хв^{-1} \cdot мг^{-1}$ білка відповідно). Достовірно вищою була в юнаків і частка iNOS в сумарній активності NOS.

Для високотренованих дівчат, оптимально адаптованих до тривалої фізичної

роботи великої інтенсивності, були характерні статистично достовірно більш високі значення співвідношень обох неокисних ферментативних активностей (аргінази й нітратредуктази), що не потребують кисню для роботи з активностями ферментів окисного метаболізму (сNOS та іNOS), яким необхідний кисень для синтезу оксиду азоту.

У середині ЗП, що характеризується потужним зовнішнім впливом на організм тренувальних і змагальних навантажень,

обтяжених психологічним стресом, ми спостерігали одночасно зі зниженням функціональної підготовленості спортсменів певні статеві відмінності й відносно стану системи синтезу оксиду азоту. В середині ЗП, незалежно від статі, домінуюча роль у синтезі оксиду азоту належить неокисному шляху ресинтезу NO з його стабільних метаболітів при збереженні важливої ролі окисного конститутивного de novo синтезу. Водночас для спортсменів була характерна вірогідно більш висока, ніж

Таблиця 1. Біохімічні та функціональні показники у високотренованих юнаків і дівчат на початку, в середині і наприкінці змагального періоду (M±m)

Показник	Дівчата (n = 14)	Юнаки (n = 12)	D, %
Початок			
Аргіназа, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	2,69±0,32	2,09±0,28	-22,25
NO-синтаза, пмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка			
конститутивна	48,01±4,50	58,49±3,85	21,82
індуцибельна	8,54±1,47	12,34±0,878	44,53
Нітратредуктаза, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	4,62±0,25	3,47±0,19**	-25,02
Нітрит-аніон, пмоль · мг ⁻¹ білка	296,87±36,22	324,54±20,56	9,32
Нітрат-аніон, нмоль · мг ⁻¹ білка	1,36±0,14	1,67±0,15	22,63
Сечовина, нмоль · мг ⁻¹ білка	71,98±7,56	75,83±2,19	5,35
Загальна фізична працездатність, кгм · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	20,24±0,58	27,14±1,49***	34,12
Аеробна продуктивність, мл · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	59,99±1,27	71,14±3,26**	18,59
Середина			
Аргіназа, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	1,38± 0,19	1,31± 0,29	-5,03
NO-синтаза, пмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка			
конститутивна	56,45±3,05	71,67±6,42*	26,98
індуцибельна	7,90±1,55	10,43±1,36	32,00
Нітратредуктаза, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	3,47±0,18	2,37±0,28**	-31,86
Нітрит-аніон, пмоль · мг ⁻¹ білка	348,94±27,33	378,05±46,89	8,34
Нітрат-аніон, нмоль · мг ⁻¹ білка	1,76±0,07	1,02±0,13***	-42,18
Сечовина, нмоль · мг ⁻¹ білка	77,60±5,17	57,65±5,66**	-25,71
Загальна фізична працездатність, кгм · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	16,61±0,99	23,86±0,62***	43,65
Аеробна продуктивність, мл · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	52,04±2,24	63,77±1,30***	22,53
Кінець			
Аргіназа, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	1,32±0,08	1,91±0,07***	44,33
NO-синтаза, пмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка			
конститутивна	31,82±1,91	38,59±3,13	21,27
індуцибельна	15,96±1,50	20,36±1,42*	27,57
Нітратредуктаза, нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка	3,90±0,36	2,42±0,27**	-37,92
Нітрит-аніон, пмоль · мг ⁻¹ білка	340,74±20,56	309,34±13,70	-9,22
Нітрат-аніон, нмоль · мг ⁻¹ білка	3,61±0,68	1,34±0,06**	-62,99
Сечовина, нмоль · мг ⁻¹ білка	70,37±2,99	65,72±2,94	-6,61
Загальна фізична працездатність, кгм · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	12,47±0,59	20,81±1,07***	66,92
Аеробна продуктивність, мл · хв ⁻¹ · кг ⁻¹	43,31±1,50	48,64±2,12*	12,29

Примітка. У табл. 1,2 *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 стосовно значень в групі дівчат.

для спортсменок (з нижчими значеннями фізіологічних показників адаптації та тренування) активність cNOS (на 26,98 %), і, навпаки, вірогідно менші значення активності нітратредуктази (на 31,78 %) і концентрацій нітрат-аніона (на 42,18 %) і сечовини (на 25,71 %) в плазмі крові. Нітрат є маркером утворення пероксинітриту при взаємодії супероксиду та оксиду азоту. Враховуючи високі рівні синтезу останнього, можна припустити, що у спортсменів функціонує більш потужна антиоксидантна система, ніж у спортсменок, або генерується менше супероксиду.

Як показано у табл. 2, у спортсменок рееструвалися вірогідно більш високі, ніж у спортсменів значення співвідношень активностей ферментів неокисного й окисного шляхів синтезу оксиду азоту – нітратредуктаза / cNOS (на 44,46 %) та нітратредуктаза / iNOS (на 43,28 %).

У середині ЗП на фоні поєднаної дії високих фізичних і психологічних навантажень і зменшення ролі багатостадійного неокисного метаболізму аргініну для спортсменок також була характерна більш висока інтенсивність неокисного ресинтезу NO з його стабільних метаболітів, тоді як для спортсменів – окисної деградації L-аргініну за участю cNOS.

Як було відзначено в попередніх публікаціях, наприкінці змагального періоду, що характеризується інтенсивним наростанням ознак природного стомлення й відповідним суттєвим зниженням фізичної працездатності організму і рівня адаптації, домінуюча роль у синтезі оксиду азоту належить вже конститутивному окисному синтезу оксиду азоту при збереженні певної ролі його неокисного ресинтезу.

Наприкінці ЗП при дезадаптації у спортсменів (юнаків і дівчат) одночасно зі зниженням фізичної працездатності й аеробної продуктивності помітно змінювався синтез оксиду азоту. Так, у дівчат з низькими фізіологічними показниками рееструвалися

більші, ніж у юнаків, пули нітрат-аніона, а, отже, і пули його попередника пероксинітриту (на 62,99 %) та активності нітратредуктази (на 37,92 %) в плазмі крові. Навпаки, юнаки з вищими фізіологічними показниками мали перевагу в активності як iNOS (на 27,57 %), так і cNOS (на 21,27 %). Для спортсменок в цей період була характерна більш висока інтенсивність неокисного ресинтезу оксиду азоту порівняно з його окисним синтезом за участю різних ізоформ NOS.

Таким чином, результати проведеного дослідження дали змогу констатувати наявність певних статевих відмінностей в системі синтезу оксиду азоту в залежності від стадії адаптації організму тренуваних осіб до фізичних і психологічних навантажень.

Було встановлено, що під дією цих екстремальних зовнішніх впливів у тренуваних дівчат відмічається більш висока інтенсивність відновлювального ресинтезу оксиду азоту з його стабільних метаболітів, тоді як серед тренуваних юнаків – більш високий рівень активності окисного *de novo* синтезу NO різними ізоформами NOS (як конститутивною, так і індукційною).

На різних етапах (початок, середина, кінець) ЗП, необхідний рівень синтезу оксиду азоту забезпечується також внаслідок поступового підвищення активності *de novo* синтезу як для юнаків, так і для дівчат. Власне, за рахунок значного підвищення останнього (що, можливо, є першопричиною всіх змін) можна пояснити як поступове зниження активності cNOS (це давно відомий [7] феномен реципрокної взаєморегуляції активності iNOS та cNOS), так і активності неокисного синтезу NO (регулятором якого є насамперед доступність кисню [6], а не субстрату, нітрату, циркулюючі пули якого, навпаки, зростають в динаміці ЗП, як і пули нітриту внаслідок, в т.ч. обмеження швидкості їхньої реутилізації для синтезу NO).

Підвищення одночасно пулів нітрату (за рахунок зменшення реутилізації нітратредуктазою) і нітриту вказує на можливе зниження нітритредуктазної активності в плазмі крові, яку ми безпосередньо не вимірювали. Підвищенням індуцибельного синтезу NO можна пояснити зниження активності аргіназного метаболізму аргініну, а саме для обмеження утворення сечовини, яка, внаслідок утворення уреїдо-сукцинату [8] може інгібувати такий необхідний для роботи iNOS ресинтез аргініну із цитруліну в так званому цитруліновому циклі [18].

Вірогідною причиною зростання активності iNOS (майже виключно через індукцію цього ферменту) під час ЗП у спортсменів і спортсменок, може бути одночасне підвищення як пулів індукторів (прозапальних цитокінів: фактора нектозу пухлин α , γ -інтерферону, інтерлейкіну 1 β тощо),

так і генерації активатора індукції – супероксиданіона [15]. Активація цього ферменту може мати негативні наслідки для роботи серця спортсменів, підвищуючи рівень апоптозу кардіоміоцитів [13, 19].

Таким чином, результати проведеного дослідження є істотним доповненням до відомостей щодо ролі оксиду азоту в забезпеченні довготривалої адаптації організму до систематичної м'язової діяльності високого обсягу й інтенсивності.

ВИСНОВКИ

1. У спортсменів різної статі з максимальними значеннями фізичної працездатності та аеробної продуктивності (на початку ЗП) домінуюча роль у забезпеченні оптимального рівня утворення оксиду азоту належить окисному конститутивному de novo синтезу та неокисному реутиліза-

Таблиця 2. Співвідношення між біохімічними показниками у високотренованих юнаків і дівчат на початку, в середині та наприкінці змагального періоду (M \pm m)

Показник	Дівчата (n = 14)	Юнаки (n = 12)	D, %
Початок			
Аргіназа / cNOS, ум.од.	61,09 \pm 8,67	37,68 \pm 6,13*	-38,32
Аргіназа / iNOS, ум.од.	381,76 \pm 55,58	172,23 \pm 23,94***	-54,89
Нітратредуктаза/cNOS, ум.од.	107,04 \pm 11,90	62,00 \pm 5,19***	-42,08
Нітратредуктаза/iNOS, ум.од.	739,59 \pm 114,13	289,38 \pm 19,92***	-60,87
Індекс оксигенації, ум.од.	5,86 \pm 1,91	4,24 \pm 0,31	-27,66
Частка iNOS, %	14,83 \pm 1,78	17,75 \pm 1,30*	19,67
Частка NO ₂ ⁻ , %	67,02 \pm 2,64	65,92 \pm 2,37	-1,63
Середина			
Аргіназа / cNOS, ум.од.	22,37 \pm 3,49	15,25 \pm 2,80	-31,80
Аргіназа / iNOS, ум.од.	25,20 \pm 3,81	17,66 \pm 3,42	-29,90
Нітратредуктаза/cNOS, ум.од.	55,78 \pm 4,06	30,98 \pm 4,34***	-44,46
Нітратредуктаза/iNOS, ум.од.	62,97 \pm 4,31	35,71 \pm 5,15***	-43,28
Індекс оксигенації, ум.од.	4,85 \pm 0,71	6,99 \pm 0,96	44,01
Частка iNOS, %	11,52 \pm 1,60	12,66 \pm 1,15	9,95
Частка NO ₂ ⁻ , %	65,51 \pm 1,96	77,21 \pm 2,65**	17,86
Кінець			
Аргіназа / cNOS, ум.од.	28,41 \pm 2,03	33,24 \pm 1,82	17,01
Аргіназа / iNOS, ум.од.	43,87 \pm 4,51	51,58 \pm 3,21	17,59
Нітратредуктаза/cNOS, ум.од.	83,64 \pm 8,09	42,17 \pm 4,86***	-49,58
Нітратредуктаза/iNOS, ум.од.	127,28 \pm 12,90	65,68 \pm 8,11***	-48,40
Індекс оксигенації, ум.од.	4,72 \pm 0,39	4,77 \pm 0,40	1,13
Частка iNOS, %	33,33 \pm 3,06	34,82 \pm 2,08	4,48
Частка NO ₂ ⁻ , %	53,20 \pm 4,82	69,69 \pm 1,14**	30,99

ційному синтезу при одночасній високій активності деградації аргініну аргіназою.

2. У спортсменів на початку ЗП вищою була активність конститутивного й індукційного синтезу NO, як і частка iNOS в сумарній активності NOS.

3. У середині ЗП, що характеризується потужним зовнішнім впливом на організм поєднаних тренувальних і змагальних навантажень, обтяжених психологічним стресом, одночасно зі зниженням загальної фізичної працездатності й максимального споживання кисню (у юнаків меншою мірою, ніж у дівчат), незалежно від статі, домінуюча роль в утворенні оксиду азоту належить ресинтезу NO при збереженні важливої ролі конститутивного de novo синтезу. При цьому у спортсменок були вищі значення співвідношень нітратредуктаза/cNOS і нітратредуктаза/iNOS.

4. При мінімальних значеннях фізіологічних показників (наприкінці ЗП) у спортсменів, незалежно від статі, домінуюча роль в утворенні оксиду азоту належить окисному конститутивному de novo синтезу при збереженні певної ролі його неокисного ресинтезу.

5. Наприкінці ЗП у спортсменок був вищим ресинтез оксиду азоту, спортсмени мали перевагу в активності його de novo синтезу (як індукційного, так і конститутивного).

**Н.В. Богдановская, А.В. Коцюруба,
Н.В. Маликов**

ОБРАЗОВАНИЕ ОКСИДА АЗОТА НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ СОРЕВНОВАТЕЛЬНОГО ПЕРИОДА У ВЫСОКОТРЕНИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ РАЗНОГО ПОЛА

Обследовано 26 спортсменов высокой квалификации разного пола (высокоотренированных юношей и девушек в возрасте от 18 до 20 лет, адаптированных к выполнению длительной тяжёлой физической работы высокой интенсивности). Показано наличие половых отличий в уровнях окислительного (синтез оксида азота) и неокислительного (синтез мочевины, полиаминов, γ -аминомасляной кислоты, предшественников коллагена) мета-

болизма L-аргинина, в системе синтеза оксида азота (окислительном de novo и неокислительном реутилизационном путях синтеза NO) на разных этапах их соревновательной деятельности. На этапе максимальных функциональных возможностей и адаптации (начало соревновательного периода) у девушек превалировал неокислительный метаболизм аргинина за участием аргиназы над окислительной деградацией L-аргинина за участием NO-синтаз. Во время снижения функциональных возможностей (дезадаптации в середине и конце соревнований) необходимый уровень синтеза оксида азота обеспечивается у девушек преимущественно за счёт неокислительного ресинтеза оксида азота из его стабильных метаболитов, тогда как у юношей – за счёт увеличения окислительного de novo синтеза оксида азота (как конститутивного, так и индуцибельного).

Ключевые слова: оксид азота, аргинин, психологический стресс, спортсмены, юноши, девушки.

**N.V. Bogdanovskaya, A.V. Kotsuruba,
N.V. Malikov**

NITRIC OXIDE SYNTHESIS DURING DIFFERENT STAGES OF COMPETITION PERIOD IN ATHLETES OF BOTH SEXES

In the study 26 trained male and female sportsmen aged 18-20 years old have been investigated. The sex differences in the degree of the nitric oxide synthesis in various stages of their training and competitive activities were shown. In female sportsmen, at the time of maximal functional capacity and adaptation (beginning of the competition period), a multi-path nonoxidizing arginine metabolism by arginase was prevailed over the oxidative degradation of L-arginine by cNOS.

In females, during dezadaptation period (in the middle and the end of competition), the required level of NO synthesis is maintained mainly by non-oxidative resynthesis of nitric oxide from its stable metabolites. In males, however, the level of NO synthesis is maintained mainly by an increase in oxidative degradation of L-arginine with the gradual change in activity of different isoforms of NOS (cNOS as well as iNOS).

Key words: nitric oxide, arginine, psychical stress, athletes, sex differensis.

Zaporozhye State University;

O.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Базілюк О.В., Коцюруба А.В., Степаненко Л.Г., Таланов С.О., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Вікові особливості змін системи оксиду азоту в аорті та плазмі за умов адаптації до фізичних навантажень // Фізіол. журн. – 2010. – 56, № 1. – С. 3–12.
2. Богдановська Н.В., Маликов М.В. Особливості

- функціонального стану судинного ендотелію при систематичних фізичних навантаженнях // Там само. – 2008. – **54**, № 4. – С.44–46.
3. Богдановська Н.В., Святодух Г.М., Коцюрба А.В., Коркач Ю.П., Маліков М.В. Синтез оксиду азоту у період довгострокової адаптації до інтенсивної м'язової роботи у спортсменок // Там само. – 2009. – **55**, № 3. – С. 94–99.
 4. Богдановская Н.В., Маликов Н.В., Святодух А.Н. Оценка роли сосудистого эндотелия в обеспечении физической подготовленности девушек-волейболисток на этапе интенсивной соревновательной деятельности // Вісн. Запорізьк. нац. ун-ту Біол. науки. – 2008. – № 1. – С. 40–43.
 5. Карпман В.Л. Спортивная медицина: Учеб. для ин-тов физ. культ. – М.: Физкультура и спорт, 1980. – 230 с.
 6. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NOсинтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия – 1998. – **63**, вып. 7. – С. 1029–1040.
 7. Akita Y., Otani H., Matsuhisa S. Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS // Amer. J. Physiol. – 2007. – **292**, № 5. – H2051–H2059.
 8. Bianchi P.G., Saccabusi E. Use of 5(4)amino 4(5)imidazolcarboxamide ureidosuccinate in inflammatory and degenerative liver // Minerva Gastroenterol. – 1972. – **18**, № 4. – P. 245–256.
 9. Bogdanovskaya N.V., Malikov N.V. Role of the system of synthesis of nitric oxide in providing of long duration adaptation of organism to muscular work // J. Physiol. Sci. / The XXXVI International Congress of Physiological Sciences – Kyoto, 2009. – P. 442.
 10. Diwan A.D., Wang M.X., Jang D. Nitric oxide modulates fracture healing // J. Bone Miner Res., 2000. – **15**, № 2. – P. 342–351.
 11. Defron D.T., Most D., Barbul A. Role of nitric oxide in wound healing // Curr Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 2000. – **3**, № 3. – P. 197–204.
 12. Rassaf T., Lauer T., Heiss C. Nitric oxide synthase-derived plasma nitrite predicts exercise capacity // Brit. J. Sports Med. – October 1, 2007. – **41**, № 10. – P. 669–673.
 13. Kanno S. Lee P.C., Zhang Y. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase // Circulation. – 2000. – **101**, № 23. – P. 2742–2748.
 14. Sessa W.C., Pritchard K.A. Jr., Seyedi N. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression // Circ. Res. – 1994. – **74**. – P. 349–353.
 15. Sureda A., Tauler P., Aguilo A. Relation between oxidative stress and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise // Free Radic. Res. – 2005. – **39**, № 12. – P.1317–1324.
 16. Shen W., Zhang X., Zhao G. Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise // Med. Sci. Sports Exerc. – 1995. – **27**. – P. 1125–1134.
 17. Souza H.C., Penteado D.M., Martin-Pinge M.C. Nitric oxide synthesis blockade increases hypertrophy and cardiac fibrosis in rats submitted to aerobic training // Arq Bras Cardiol. – 2007. – Aug. **89**, № 2. – P. 88–93, 99–104.
 18. Swamy M., Yusot W.R., Sirajudeen K.N. Decreased glutamine synthase, increased citrulline-nitric oxide cycle activities and oxidative stress in different regions of brain in epilepsy rat model // J. Physiol. Biochem. – 2011. – **67**, № 1. – P. 105–113.
 19. Wildhirt S.M., Weismueller S., Schulze C. Inducible nitric oxidr synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury // Cardiocasc. Res. – 1999. – **43**, № 3. – P. 698–711.
 20. Ziche M., Morbidelli L., Choudhuri D.R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis // J. Clin. Invest. – 1997. – **99**, № 11. P. 2625–2634.

Запорізьк. ун-т;

Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: toliko49@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 16.01.2009

Т.Ю. Вознесенська, О.М. Сердюк, Т.В. Блашків, Р.І. Янчій

Аутоімунні механізми патології яєчників

В огляді представлені дані, що стосуються аутоімунної патології яєчників у жінок. Розглядаються експериментальні моделі аутоімунної патології яєчників з використанням тварин. Наводяться результати власних досліджень експериментальної імунної патології яєчників у мишей.

Ключові слова: аутоімунна патологія яєчників, експериментальний аутоімунний дисгенез яєчників, експериментальний аутоімунний оофорит, експериментальна імунна патологія яєчників.

Безплідність – одна з важливих проблем у жінок з аутоімунною патологією яєчників під час репродуктивного життя. Імунна безплідність, за даними різних авторів, становить 5-7 %. При її лікуванні ефективність була 44,4 % [5]. Аутоімунні захворювання жіночої репродуктивної системи, особливо яєчників, широко розповсюджені і негативно відображаються на народжуваності, що зумовлює важливість нових підходів для створення більш адекватної терапевтичної стратегії в профілактиці та лікуванні порушень репродуктивної функції. Нині актуальними стають дослідження, спрямовані на з'ясування механізмів розвитку безплідності імунного походження на експериментальних моделях з використанням тварин.

Синдром передчасного виснаження яєчників

Синдром передчасного виснаження яєчників характеризує: (1) лімфоцитарна інфільтрація яєчника й зміна субпопуляцій Т-клітин; (2) циркулюючі аутоантитіла до антигенів яєчника; (3) асоціація з іншими аутоімунними розладами; (4) відновлення

оваріальної функції після регресу аутоімунного статусу [16]. За клінічними, біологічними, гістологічними, морфологічними і генетичними дослідженнями серед 357 пацієнтів із передчасним виснаженням яєчників у період з 1997 по 2008 рр.: 76 % пацієнтів нормальної статевої зрілості були з вторинною аменореєю; 14 % із сімейним анамнезом; 56 пацієнтів із мерехтливою формою; 8 пацієнтів з Х-хромосомними відхиленнями (моносомія, трисомія або транслокації), крім синдрому Тернера; 2 – з аутоімунним поліендокринним синдромом (тип 2 і 1); 25 пацієнтів (7 %) з іншими генетичними відхиленнями [6]. Генетичні механізми включають неспецифічний ефект хромосом, пригнічення мейозу, зменшення пулу примордіальних фолікулів і збільшення атрезії як наслідок апоптозу гранульози або неповне дозрівання фолікула [23]. В 74–90 % випадках передчасне виснаження яєчників є ідіопатичною формою, може бути сімейною (4–33 %) або спорадичною [23]. Відомі такі гістопатологічні типи синдрому передчасного виснаження яєчників: афолікулярна й фолікулярна форми. Перша характеризується виснаженням фолікулів яєчника і

© Т.Ю. Вознесенська, О.М. Сердюк, Т.В. Блашків, Р.І. Янчій

втрата оваріальної функції. Повне виснаження фолікулів відбувається, головним чином, через гонадальний дисгінез, змішану гонадобластому й гермафродитизм. При фолікулярній формі існує можливість спонтанного або індукованого відновлення оваріальної функції. Вона характеризується наявністю: 1) оофорита (фолікулярне запалення); 2) декількох фолікулів в яєчнику; 3) яєчників, у яких є численні примордіальні фолікули (так званий синдром резистентних яєчників). Фолікулярний тип може прогресувати до афолікулярної стадії [15]. З використанням ультрасонографії наявність фолікулів, при даній формі патології, встановлено в 50 % пацієнтів, а гістологічно – у 29 % [6]. Фізичний стан більшості пацієнтів визнаний як такий, що підходить для застосування допоміжної репродуктивної технології (з використанням ооцита донора) [26]. Рівень спонтанних вагітностей у жінок із синдромом передчасного виснаження яєчників становив 2,17 % [26]. Нині аутоімунне ушкодження яєчника є таким, що викликане зміною субпопуляцій Т-клітин і опосередковано збільшенням титру аутоантитіл, вироблених В-клітинами й низьким числом супресорних, цитотоксичних лімфоцитів, а також зменшенням активності природних клітин-кілерів [23]. Аутоімунний механізм є складовою частиною патогенезу яєчників. Показано, що він є у 18–92 % пацієнтів з передчасним виснаженням яєчників [11]. Встановлено антиоваріальні антитіла у 16,67 % [11], клінічний аутоімунітет у 14,3 % випадків при синдромі передчасного виснаження яєчників [6].

Клінічно-лабораторними дослідженнями з'ясували патологію 74 пацієнтів із синдромом резистентних яєчників, виходячи з високого базального вмісту фолікулостимулювального гормону (ФСГ). Дані літератури свідчать, що у 12 жінок (16,2 %) виявлена генетична, у 28 (37,8 %) – аутоімунна, у 9 (12,2 %) – комбінована й у 25

(33,8 %) – ідіопатична патологія цього синдрому. У пацієток з таким захворюванням встановлено наявність антиоваріальних, антиядерних, антифосфоліпідних антитіл й антитіл до щитоподібної залози [14]. Аутоімунна патологія збільшує ризик розвитку синдрому резистентних яєчників в молодих жінок. Це призводить до передчасного зменшеного запасу ооцитів, що часто проявляється при безплідності.

Отже, із передбачуваних причин передчасного виснаження яєчників називають генетичні відхилення, аутоімунне ушкодження яєчника, антиоваріальні антитіла. Оскільки причина цього синдрому залишається невідомою в більшості випадків, а кількість жінок із такою патологією в усьому світі збільшується, актуальними стають дослідження, спрямовані на з'ясування його етіології.

Аутоімунний оофорит

Серед обстежених 266 хворих жінок із синдромом передчасного виснаження яєчників, із застосуванням імуногістохімічних лімфоцитарних маркерів, у 4 із них діагностували аутоімунний оофорит. Трансвагінальна сонографія в таких пацієнтів показала, що загальний об'єм яєчника збільшений [8]. Також підвищений вміст інгібіну А і В, що супроводжує розвиток численних фолікулів у яєчнику, зменшує співвідношення ФСГ та лютенізуючого гормону (ЛГ) незалежно від вмісту естрадіолу [25]. Визначили сироваткові концентрації інгібіну А і В у 22 жінок з аутоімунним оофоритом, у 71 жінки з неаутоімунним ідіопатичним оофоритом, у 77 жінок у період після менопаузи й у 90 здорових фертильних жінок. Діагноз аутоімунний оофорит підтверджувався наявністю аутоантитіл до стероїдпродукуючих клітин, до α -гідроксилази або до цитохрому Р450. Усі пацієнти з аутоімунним оофоритом були також позитивні до аутонаднірковозалозних антитіл. Концентрації інгібіну були значно вищі в

жінок з аутоімунним оофоритом в порівнянні з жінками з ідіопатичним оофоритом або здоровими фертильними жінками [21].

Таким чином, у жінок з аутоімунним оофоритом зберігається оваріальна функція, збільшення концентрації інгібіну, який вивільняється внаслідок руйнування текальних клітин, і збереження клітин гранульози [25].

Оскільки причини аутоімунної патології яєчників залишаються нез'ясованими, актуальними є дослідження на моделях з використанням лабораторних мишей. У літературі описано три експериментальні моделі за допомогою яких досліджуються аутоімунна патологія яєчників у жінок: 1) миші з видаленим тимусом на 3-тю добу після народження (аутоімунний дисгенез яєчників); 2) імунізовані білком прозорої оболонки ооцита ZP3 (експериментальний аутоімунний оофорит); 3) імунізовані алогенним антигеном яєчника (експериментальне імуноне ушкодження яєчників).

Експериментальний аутоімунний дисгенез

У мишей з видаленим тимусом на 3-тю добу після народження розвиваються різноманітні аутоімунно- й органоспецифічні хвороби, включаючи аутоімунний дисгенез, який характеризується наявністю антиоваріальних антитіл, оофориту й атрофії яєчника [7, 24]. У таких мишей, атрофія яєчника, але не оофорит, корелює з порушенням естрального циклу [7]. Досліджено антигенспецифічну супресію аутоімунного дисгенезу яєчників у мишей із використанням CD4⁺, CD25⁺, Т-регуляторних клітин. Встановлено, що вона залежить від ендотропічної стимуляції в ділянці акумулювання антиген-специфічних Т-регуляторних клітин, які конститутивно скасовують Т-клітинну відповідь [20]. Яєчники при аутоімунному дисгенезі інфільтровані Т-клітинами й активованими макрофагами (клітини, які продукують

прозапальні цитокіни) [7]. Показано, що потенційно патогенними для антигенів ооцитів є Т-клітини, які є й у нормальних мишей, і контролюються регуляторними CD25⁺ Т-клітинами [22].

Таким чином, дані літератури засвідчують, що нормальна оваріальна функція сумісна із сильним запаленням яєчника, опосередкованим аутореактивними Т-клітинами.

Експериментальний аутоімунний оофорит

Експериментальний аутоімунний оофорит, який викликають імунізацією тварин білком ZP3 блискучої оболонки ооцитів мишей, розглядається ще і як модель предчасного виснаження яєчника у жінок. Ушкодження яєчника відбувається під дією ZP3 специфічними, CD4⁺ Т-клітинами [18]. Досліджували вплив гонадотропінів яєчника на розвиток аутоімунного оофориту. Інфільтрація яєчника лімфоцитами спостерігалася з 3-го тижня й протягом хвороби зберігалася локалізованою в теці. Стимуляція гонадотропіном не підсилювала вже викликаний патологічний процес й не призводила до більш раннього початку самої хвороби; супресія гонадотропіну не зменшувала ступінь лімфоцитарної інфільтрації й ушкодження ооцита. Результати дають підстави припускати, що експериментальний аутоімунний оофорит у мишей розвивається незалежно від стимуляції яєчника гонадотропіном [19]. Доза антигена при введенні ZP3 зменшувала ступінь вираженості оофориту у порівнянні з контрольною групою, нормалізувала естральний цикл й збільшувала кількість CD4⁺ Т-клітин, у той час як кількість CD25⁺ Т-клітин зменшувалася, істотно зменшувався й титр аутоантитіл [12, 13]. Також оцінювали продукцію окису азоту (NO) і прогестерону гранулярних клітин яєчника на 7, 14, 21 і 28-му добу після імунізації. Застосування пептид α-меланоцитстимулювального

гормону (α -МСГ) викликало зменшення вмісту NO у мишей в еструсі й дієструсі, але не впливало на виділення прогестерону. Вміст NO значно збільшувався на 7-му і 14-ту добу і корелював зі зниженням концентрації прогестерону. На 21-шу і 28-му добу останній збільшувався тільки тоді, коли тварини були в проєструсі, у той час як продукція NO відповідала рівню початку оваріального циклу.

Встановлено, що у мишей з аутоімунним оофоритом концентрації ЛГ і прогестерону вищі під час проєструса, у порівнянні з такими в контрольних тварин. Введення α -МСГ таким мишам зменшувало вміст ЛГ [9]. Згідно з отриманими даними припускається, що α -МСГ діє як модулятор експериментального аутоімунного оофориту [10].

Експериментальне імунне ушкодження яєчників у мишей

Модель аутоімунної патології яєчників у мишей створюється введенням антигена алогенного яєчника, що викликає запуск імунної й запальної відповіді. У запропонованій нами моделі можуть бути задіяні всі типи імунокомпетентних клітин: антигенпредставляючі клітини, Т-хелпери, цитотоксичні Т-лімфоцити, В-клітини, НК-клітини, а також складний комплекс цитокінів, які, як відомо, відіграють важливу роль у фізіології й патології яєчника. У цій моделі відтворюється: 1) розвиток аутоімунного процесу до власних антигенів внаслідок антигенної їх подібності і сторонніх антигенів; 2) запуск аутоімунного процесу в результаті відкриття внутрішньоклітинних антигенів за допомогою некротичного руйнування клітин при запальних процесах [2]. Отримані дані свідчать, що при імунізації мишей алогенним яєчником спостерігалось збільшення маси регіонарних лімфовузлів і кількості клітин, що пов'язано з їхньою участю в імунній реакції. Про розвиток аутоімунної патології яєчників свідчить посилення апоптозу клітин у

тимусі, селезінці й лімфовузлах, що спрямовано на підтримку гомеостазу в імунній системі й обмеження надмірної імунної реакції. Як фолікулярні, так і клітини імунокомпетентних органів гинули через апоптоз і некроз [1]. Припускають, що некротичний шлях загибелі клітин може викликати розвиток імунної реакції [27], підсилювати запалення, викликане імунізацією. Про розвиток запальної реакції в умовах імунізації свідчила зміна лейкограми крові [4]. Також показано, що імунізація мишей антигеном алогенного яєчника викликає пригнічення оогенезу й активацію гуморальних і клітинних імунних механізмів [3]. Те, що у тварин з експериментальним імунним ушкодженням яєчника нормалізувалася оваріальна функція під впливом моноклональних антитіл до фактора некрозу пухлин- α , свідчить, насамперед, про участь цього цитокіна в порушенні оогенезу при імунному запаленні й, отже, про ефективність антицитокінової терапії при імунному ушкодженні яєчників [7].

Таким чином показано, що імунізація мишей антигеном алогенного яєчника є причиною активації імунної системи, виникнення генералізованого запалення, опосередкованого медіаторами запалення, зокрема каскадом цитокінів і монооксиду азоту, що призводить до розвитку синдрому системної реакції на запалення. Це і є причиною виникнення дисфункції органів репродуктивної системи, що проявляється в тому числі і через дисрегуляцію скоротливості яйцеводів і міометрія, а надалі до порушення розвитку ембріонів.

ВИСНОВОК

Оскільки причини аутоімунної патології яєчників нині залишаються нез'ясованими в більшості випадків, а кількість жінок з синдромом передчасного виснаження яєчників й аутоімунним оофоритом у всьому світі збільшується, актуальними

залишаються дослідження, спрямовані як на з'ясування етіології аутоімунної патології яєчників, так і механізмів їх супресії. З'ясування аспектів регуляції репродуктивної функції є також важливим для розробки науково обґрунтованих рекомендацій із проведенням гормональної терапії, зокрема оптимізації методів стимуляції фолікулогенезу та овуляції, корекції порушень оваріального циклу, а також для обґрунтування нових підходів до прогнозу імплантації та успішного перебігу вагітності при екстракорпоральному заплідненні.

**Т.Ю. Вознесенская, О.Н. Сердюк,
Т.В. Блашків, Р.И. Янчій**

АУТОИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОЛОГИИ ЯИЧНИКОВ

В обзоре представлены данные, касающиеся аутоиммунной патологии яичников у женщин. Рассматриваются экспериментальные модели аутоиммунной патологии яичников с использованием животных. Приводятся и результаты собственных исследований экспериментального иммунного поражения яичников у мышей.

Ключевые слова: аутоиммунная патология яичников, экспериментальный аутоиммунный дизгенез яичников, экспериментальный аутоиммунный оофорит, экспериментальное иммунное поражение яичников.

**T. Voznesenskaya Yu., Serdyuk O.N., Blashkiv
T.V. Yanchiy R. I.**

WOMEN OVARIAN AUTOIMMUNITY

The data about premature ovarian failure and autoimmune oophoritis are collected and analysed in the review. The data about experimental models of ovarian autoimmunity: autoimmune ovarian dysgenesis, murine experimental autoimmune oophoritis, experimental immune ovarian failure are collected and analysed in the review of the literature.

Key words: premature ovarian failure, experimental autoimmune ovarian dysgenesis, experimental autoimmune oophoritis, experimental immune ovarian failure.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексеева И., Брызгина Т., Сухина В., Макогон Н., Вознесенская Т., Грушка Н. Изменения в тимусе и лимфоузлах при иммунном повреждении яичников

у мышей // Проблемы репродукции. – 2006. – **12**, №4. – С. 38–41.

2. Алексеева И., Вознесенская Т., Макогон Н., Брызгина Т., Сухина В., Грушка Н. Створення і порівняльний аналіз двох моделей аутоімунного ушкодження яєчників у мишей. – В кн.: Тези доп. II міжнар. наук. конференції «Гомеостаз: фізіологія, патологія, фармакологія і клініка». – 2005. – С. 95–100.

3. Алесеева И., Брызгина Т., Алексюк Л., Мартинова Т., Сухина В. Роль оксиду азота в розвитку гуморальної відповіді у мишей // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, №4. – С. 13–19.

4. Макогон Н., Вознесенська Т., Брызгина Т., Сухина В., Грушка Н., Алесеева И. Протективна дія молсидоміну при імунній патології яєчників у мишей // Там само. – 2007. – **53**, №5. – С. 29–34.

5. Юзько О., Бутейко В., Стрелко Г., Лапко П., Далекорей В. Ефективність внутрішньо маткової інсмінації у подоланні жіночого безпліддя імунного генезу // Зб.наук. праць співробітників Академії післядиплом. освіти ім.Р.Л. Шупика. – 2008. – **17**, №4. – С. 144–147.

6. Bachelot A., Rouxel A., Massin N., Dulon J., Courtillot C., Matuchansky C., Badachi Y., Fortin A., Paniel B., Lecuru F., Lefgure-Belda M.A., Constancis E., Thibault E., Meduri G., Guiochon-Mantel A., Misrahi M., Kuttent F., Touraine P. Phenotyping and genetic studies of 357 consecutive patients presenting with premature ovarian failure // Eur. J. Endocrinol. – 2009. – **161**, №1. – P. 179–187.

7. Bagavant H., Adams S., Terranova P., Chang A., Kraemer F.W., Lou Y., Kasai K., Luo A.M., Tung K.S. Autoimmune ovarian inflammation triggered by proinflammatory (Th1) T cells is compatible with normal ovarian function in mice // Biol. Reprod. – 1999. – **61**, №3. – P. 635–642.

8. Bakalov V.K., Anasti J.N., Calis K.A., Vanderhoof V.H., Premkumar A., Chen S., Furmaniak J., Smith B.R., Merino M.J., Nelson L.M. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure // Fertil. Steril. – 2005. – **84**, №4. – P. 958–965.

9. Berberian V., Sánchez S., Sánchez-Borzone M., Attademo A.M., Lasaga M., Celis M.E. Effect of alpha-melanotropin hormone on serum levels of luteinizing hormone and progesterone in experimental rat autoimmune oophoritis // Peptides. – 2006. – **27**, №9. – P. 2295–2299.

10. Casalino-Matsuda S., Durando P., Celis M. Effects of alpha-MSH on progesterone and nitric oxide release by cultured ovarian granulosa cells in experimental rat autoimmune oophoritis // J. Physiol. Biochem. – 2002. – **58**, №1. – P. 25–31.

11. Chattopadhyay D., Sen M., Katiyar P. Pandey L. Antiovarian antibody in premature ovarian failure // Indian. J. Med. Sci. – 1999. – **53**, №6. – P. 254–258.

12. del Rio R., Noubade R., Subramanian M., Saligrama

- N., Diehl S., Rincon M., Teuscher C. SNPs upstream of the minimal promoter control IL-2 expression and are candidates for the autoimmune disease-susceptibility locus Aod2/Idd3/Eae3 // *Genes Immun.* – 2008. – **9**, №2. – P. 115–121.
13. Fu L., Feng W., Li S., Huang B. ZP3 peptides administered orally suppress murine experimental autoimmune ovarian disease // *J. Reprod. Immunol.* – 2007. – **75**, №1. – P. 40–47.
 14. Gleicher N., Weghofer A., Oktay K., Barad D. Do etiologies of premature ovarian aging (POA) mimic those of premature ovarian failure (POF)? // *Hum. Reprod.* – 2009. – **24**, №10. – P. 2395–2400.
 15. Hoek A., Schoemaker J., Drexhage H. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity // *Endocr. Rev.* – 1997. – **18**, №1. – P. 107–134.
 16. Kim J., Moon S., Chang Y., Lee J. Autoimmune premature ovarian failure // *J. Obstet. Gynaecol.* – 1995. – **21**, №1. – P. 59–66.
 17. Li J., Jin H., Zhang F., Du X., Zhao G., Yu Y., Wang B. Treatment of autoimmune ovarian disease by co-administration with mouse zona pellucida protein 3 and DNA vaccine through induction of adaptive regulatory T cells // *J. Gene. Med.* – 2008. – **10**, №7. – P. 810–820.
 18. Lou Y., McElveen F., Adams S., Tung K. Altered target organ. A mechanism of postrecovery resistance to murine autoimmune oophoritis // *J. Immunol.* – 1995. – **155**, №7. – P. 3667–3673.
 19. Nair S., Mastorakos G., Raj S., Nelson L. Murine experimental autoimmune oophoritis develops independently of gonadotropin stimulation and is primarily localized in the stroma and theca // *Amer. J. Reprod. Immunol.* – 1995. – **34**, №2. – P. 132–139.
 20. Samy E., Parker L., Sharp C., Tung K. Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4+CD25+ regulatory T cells in the regional lymph node // *J. Exp. Med.* – 2005. – **202**, №6. – P. 771–781.
 21. Tsigkou A., Marzotti S., Borges .L, Brozzetti A., Reis F., Candeloro P., Luisa Bacosi M., Bini V., Petraglia F., Falorni A. High serum inhibin concentration discriminates autoimmune oophoritis from other forms of primary ovarian insufficiency // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – **93**, №4. – P. 1263–1269.
 22. Tung K., Garza K., Lou Y., Bagavant H. Autoimmune ovarian disease: mechanism of induction and prevention // *J. Soc. Gynecol. Investig.* – 2001. – **8**, №1. P. 49–51.
 23. Vujovic S. Aetiology of premature ovarian failure // *Menopause. Int.* – 2009. – **15**, №2. – P. 72–75.
 24. Wardell B.B., Michael S.D., Tung K.S., Todd J.A., Blankenhorn E.P., McEntee K., Sudweeks J.D., Hansen W.K., Meeker N.D., Griffith J.S. Aod1, the immunoregulatory locus controlling abrogation of tolerance in neonatal thymectomy-induced autoimmune ovarian dysgenesis, maps to mouse chromosome 16 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – **92**, №11. – P. 4758–4762.
 25. Welt C., Falorni A., Taylor A., Martin K., Hall J. Selective theca cell dysfunction in autoimmune oophoritis results in multifollicular development, decreased estradiol, and elevated inhibin B levels // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – **90**, №5. – P. 3069–3076.
 26. Zhang P., Shi Y., Gao X., Wang S., Wang J., Chen Z.J. Clinical analysis of Chinese infertility women with premature ovarian failure // *Neuro. Endocrinol. Lett.* – 2007. – **28**, №5. – P. 580–584.
 27. Zong W., Thompson C. Necrotic death as a cell fate // *Genes Dev.* – 2006. – **20**, №1. – P. 1–15.

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

*Матеріал надійшов
до редакції 28.03.2011*

В.Ю. Гарбузова, О.В. Атаман

Матриксний Gla-протеїн та його роль у кальцифікації судинної стінки

У роботі представлено будову матриксного Gla-протеїну (MGP), його хімічні характеристики, регуляцію синтезу та посттрансляційні перетворення, інформацію про структуру гена MGP та найпоширеніші однонуклеотидні його поліморфізми. Серед факторів, що регулюють експресію та активність MGP, названо вітамін D, ретиноєву кислоту, позаклітинні іони кальцію, цитокіни та деякі гормони. Підкреслено, що MGP є важливим природним інгібітором кальцифікації м'яких тканин. Такі властивості цього білка пов'язують з наявністю в його молекулі залишків γ -карбоксиглутамінової кислоти. Описано чотири можливі механізми антикальциногенної дії MGP: зв'язування з іонами кальцію та кристалами гідроксипатиту; зв'язування з компонентами позаклітинного матриксу; взаємодія з кістковим морфогенетичним протеїном (BMP-2) і усунення впливу останнього; участь у регуляції апоптозу. Підкреслено, що вивчення алельних варіантів гена MGP має важливе значення у зв'язку з можливою їх асоціацією з розвитком серцево-судинних та інших хвороб.

Ключові слова: судинна стінка, кальцифікація, поліморфізм генів, матриксний Gla-протеїн.

Матриксний Gla-протеїн (MGP) є представником групи залежних від вітаміну К білків, що містять залишки γ -карбоксиглутамінової кислоти (Gla). До цієї групи належать білки, що беруть участь у коагуляції крові: протромбін, фактори VII, IX і X, протеїни C, S і Z. Подібним до MGP є кістковий Gla-протеїн (BGP), відомий також під назвою остеокальцин.

Уперше білок, названий MGP, було виділено в 1983 р. у лабораторії Price [51] з екстрактів демінералізованого матриксу кісток биків. Таке екстрагування здійснювали розчинами сечовини з додаванням хлориду кальцію. MGP відрізнявся від відкритого раніше BGP, хоча мав з ним дуже багато схожих рис, що свідчило про спільне еволюційне походження цих двох матриксних протеїнів. Згодом було визначено первинну структуру MGP, основні хімічні характеристики, локалізацію гена MGP та його будову [6, 53].

На відміну від BGP, який синтезується виключно в тканинах кісток і зубів (струк-

турах з фізіологічною мінералізацією), MGP утворюється в м'яких тканинах зокрема в хрящах, серці, нирках, легенях, стінках кровоносних судин тощо [15, 44]. У кожній з цих тканин експресію MGP виявляли лише в окремих, специфічних для цього органа типах клітин [15]. Здатність до синтезу MGP мають остеобласти, хондроцити, гладеньком'язові клітини (ГМК) судин, пневмоцити, клітини ниркового епітелію, фібробласти, макрофаги [8, 13, 15, 18, 44, 56, 68].

У тканинах серця та легень щурів вміст мРНК MGP у 10 разів, а в тканинах нирок – у 5 разів вищий, ніж у кістках. Натомість вміст самого MGP у цих тканинах у 40–500 разів нижчий, якщо порівнювати з кістками [15]. Мала кількість MGP на тлі високої експресії його гена наводить на думку, що цей білок навряд чи діє винятково через накопичення в позаклітинному матриксі. Очевидно, що MGP акумулюється тільки в місцях кальцифікації, а більша його частина,

що синтезована в м'яких тканинах, надходить у плазму крові, де концентрація MGP становить від 0,3 до 1 мкг/мл залежно від виду тварин [44].

Біохімія MGP

Молекула MGP людини (молекулярна маса 10 кДа) складається з 84 амінокислотних залишків, 5 з яких представлено Gla [44]. З кісток щурів виділено дві форми MGP, що мають 79 і 83 залишки, тобто в них бракує відповідно 5 і 1 амінокислот від С-кінця білкової молекули [6, 51]. На відміну від усіх відомих нині вітамін-К-залежних білків, MGP не має форми пропептиду [6]. Хоча MGP містить значний відсоток гідрофільних амінокислотних залишків, він майже не розчинний у воді, а тому його транспорт плазмою крові може відбуватися тільки в комплексі з іншими водорозчинними білками.

Щойно синтезована молекула MGP складається із 103 амінокислотних залишків (84 – це зрілий білок та 19 – трансмембранний сигнальний пептид) і містить, починаючи з N-кінця, три функціональні ділянки: трансмембранний сигнальний пептид; імовірний сайт, що його розпізнає γ -карбоксилаза; домен, що містить залишки Gla [6].

Утворений у клітинах MGP зазнає посттрансляційної модифікації, яка полягає в карбоксилюванні п'яти залишків глутамінової кислоти (Glu) з утворенням Gla. Зазначена реакція каталізується ферментом γ -глутамілкарбоксилазою (GGCX) і є спряженою з окисненням відновленої форми вітаміну К (гідрохінону) в 2,3-епоксид вітаміну К. Таким чином, без окиснення вітаміну К не може відбуватися карбоксилювання Glu-залишків молекули MGP. У свою чергу достатня кількість цього вітаміну для реакції карбоксилювання MGP залежить від стану зворотної реакції його відновлення, яка здійснюється за допомогою вітамін-К-епоксидредуктазного комплексу.

Крім γ -карбоксилювання, MGP може зазнавати й інших посттрансляційних модифікацій, зокрема, специфічного протеолітичного розщеплення в С-термінальній ділянці молекули [19, 59] і фосфорилування трьох серинових залишків у N-кінцевому хвості [46].

Після наведених вище реакцій MGP накопичується у структурах апарата Гольджі та секретується в позаклітинний простір, де і виконує свої функції.

Ген MGP і його поліморфізм

Ген MGP у людини представлено однією копією, яка міститься в короткому плечі 12-ї хромосоми (12p12.3-13.1) [6]. У ньому закодовано 84 амінокислотні залишки зрілого білка і 19 залишків трансмембранного сигнального пептиду. Довжина гена – 3900 нуклеотидів, він складається з 4 екзонів, розділених трьома великими проміжними послідовностями (інтронами), на які припадає більше ніж 80 % загальної довжини гена [6] (рис. 1). Кожна з трьох функціональних ділянок білка – трансмембранний сигнальний пептид, сайт розпізнавання γ -карбоксилази і домен, що містить залишки Gla, – кодується окремим екзоном гена MGP. Четвертий екзон кодує ділянку білка, що складається з 11 амінокислотних залишків і лежить між трансмембранним сигнальним пептидом і сайтом розпізнавання γ -карбоксилази. Функція цієї ділянки MGP поки що невідома.

Подібна чотирьохекзонна організація характерна і для BGP. Вона істотним чином відрізняється від двоекзонної організації генів, які кодують відповідні ділянки в інших відомих сьогодні вітамін-К-залежних білках.

Аналіз промоторної частини гена MGP показав, що поряд з типовими TATA і CAT-боксами, вона містить регуляторні послідовності, гомологічні раніше ідентифікованим елементам, що відповідають на дію гормонів і транскрипційних факторів.

Зокрема, окреслено дві ділянки промотору, що містять можливі сайти зв'язування рецепторів ретиноевої кислоти і вітаміну D [6].

Нині описано понад 120 видів поліморфізму поодиноких нуклеотидів (SNP) у гені MGP людини. З них найкраще досліджено, з огляду їхньої асоціації з різними хворобами, три види: $T^{-138} \rightarrow C$ (rs 1800802); $G^{-7} \rightarrow A$ (rs 1800801); $Thr_{83} \rightarrow Ala$ (rs 4236) (див. рис. 1).

Поліморфізм $T^{-138} \rightarrow C$ стосується промоторної частини гена – ділянки, яка утворює комплекси з ядерними білками і сприймає їх регуляторні впливи; $G^{-7} \rightarrow A$ локалізований у початковому відрізку промотору, з якого стартує власне процес транскрипції; $Thr_{83} \rightarrow Ala$ – у четвертому екзоні, що кодує Gla-місткий домен. Останній варіант SNP зумовлює заміну треоніну на аланін у передостанньому 83-му залишку молекули MGP.

Питання про те, як різні види поліморфізму гена MGP впливають на його експресію та здатність сприймати різні регуляторні впливи, перебуває сьогодні у центрі уваги дослідників. Як один з підходів до його розв'язання використовують введення в культивовані клітини генетичних конструкцій, що містять “нормальний” і “патологічний” варіанти промотору MGP та ген люциферази (люциферазний тест).

Перше таке дослідження було проведено Herrmann та співавт. [20]. Автори

показали, що поліморфізм $G^{-7} \rightarrow A$ не впливає на промоторну активність гена MGP, тоді, як активність промотору з мінорним алелем -138C (патологічний варіант) при порівнянні з -138T (нормальним варіантом) була менша на 20 % у ГМК судин щура і на 50 % у культивованих фібробластах людини.

Зовсім інші дані було отримано у дослідженні Farzaneh та співавт. [10]. Автори встановили, що промотори з поліморфізмами $G^{-7} \rightarrow A$ і $T^{-138} \rightarrow C$ істотно змінюють транскрипційну активність гена MGP у судинних ГМК щурів *in vitro*. Так, варіант промотору з мінорним алелем -7A виявляв активність у 1,5 раза вищу, ніж -7G, а варіант -138C був у 4 рази активніший від -138T.

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 -138T 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 промоторі з алелем -138C є дуже низькою [10].

Наведене вище підтверджує Kobayashi

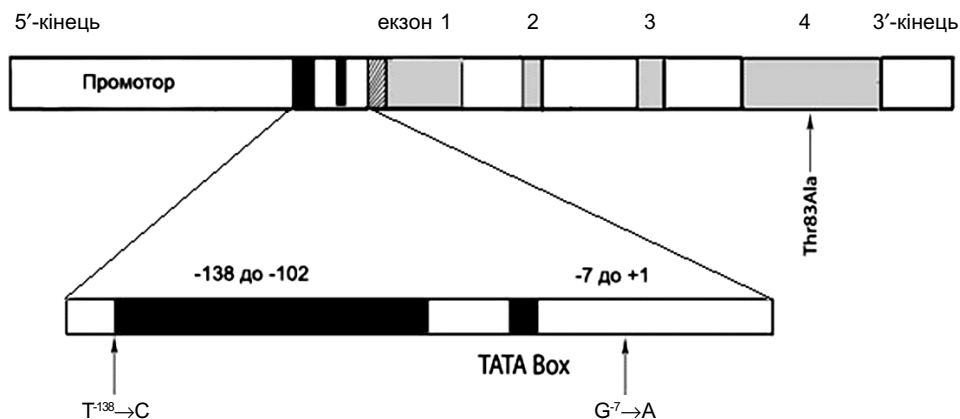


Рис. 1. Структура гена MGP і локалізація трьох його однонуклеотидних поліморфізмів

та співавт. [25], які встановили, що варіант промотору -138Т, на відміну від -138С, здатний утворювати комплекси з ядерними білками (AP-1). Проте, що стосується активності цих варіантів, то японські дослідники прийшли до зовсім інших, ніж Farzaneh та співавт., висновків: при введенні промоторів гена MGP в культивовані клітини раку молочної залози людини активність промотору з алелем -138Т була набагато вищою порівняно з алелем -138С.

Таким чином, неоднозначні результати щодо впливу різних видів поліморфізму гена MGP на його транскрипційну активність свідчать про складність проблеми і зумовлюють необхідність продовжувати дослідження в цьому напрямі.

Регуляція експресії й активності MGP

Об'єктами регуляції можуть бути експресія гена MGP і процеси посттрансляційної модифікації білка.

Як уже зазначалося, промотор гена MGP містить ділянки, що можуть сприймати різні регуляторні впливи. До таких, зокрема, відносять сайти можливого зв'язування з рецепторами вітаміну D і ретиноевої кислоти [6].

Серед вивчених *in vitro* факторів на експресію гена MGP впливають: вітамін D, ретиноева кислота, позаклітинні іони кальцію і деякі цитокіни та гормони [52].

Вітамін D. Показано, що вітамін D₃ збільшує синтез мРНК MGP в остеокластах людини, а також у хондроцитах, остеобластах і клітинах остеосаркоми щурів [13,14,38]. Він не впливає на експресію гена MGP у фібробластах, хондроцитах та остеобластах людини. У фізіологічних концентраціях вітамін D₃ посилює транскрипцію гена MGP в судинних ГМК [12].

Ретиноева кислота. Посилює утворення мРНК MGP у культивованих клітинах людини: фібробластах, хондроцитах, остеобластах; у клітинах остеосаркоми та в пневмоцитах II типу у щурів [8, 56]. Проте

вона зменшує експресію гена MGP у культивованих клітинах нирок і ГМК судин у щурів, а також у клітинах раку молочної залози людини [12, 24]. Таким чином, ретиноева кислота по-різному впливає на експресію MGP у різних типах клітин одного й того самого виду організмів.

Позаклітинні іони кальцію. При моделюванні гіперкальціємії у щурів вміст MGP у плазмі крові стрімко збільшується. Одне із запропонованих пояснень цього полягає в тому, що судинні ГМК можуть "відчувати" зміни концентрації позаклітинних іонів кальцію через кальційсенсорний механізм, пов'язаний з чутливими до кальцію рецепторами. У відповідь на сигнал ГМК збільшують експресію гена MGP [11]. Вважають, що таке збільшення при підвищенні концентрації іонізованого кальцію в тканинах є реакцією, яка запобігає розвитку патологічної кальцифікації м'яких тканин [52]. Таким чином, позаклітинний кальцій є не тільки потенційним індуктором утворення кальцієвих кристалів [58, 82], але й сигналом, що регулює кальцифікацію через стимуляцію синтезу MGP.

Цитокіни та деякі гормони. У культурі хондроцитів інсуліноподібний фактор росту 1, відомий як стимулятор диференціювання цих клітин, зумовлює зменшення синтезу мРНК MGP [72]. Натомість інгібітор диференціювання хондроцитів фактор росту фібробластів 2 посилює експресію гена MGP. На підставі цього припускають, що зазначені фактори росту змінюють диференціювання хондроцитів через вплив на MGP.

Є повідомлення про те, що трансформуючий фактор росту-β (TGF-β) збільшує синтез мРНК MGP у легневих клітинах ембріонів [84]. Проте у дослідах з введенням штучних конструкцій промотору MGP всередину культивованих судинних ГМК щурів показано, що TGF-β пригнічує транскрипцію гена MGP [21]. EGF (епідермальний фактор росту) значно послаблює

експресію MGP у культурі клітин нирок щурів [7].

Трийодтиронін посилює транскрипцію гена MGP у судинних ГМК щурів і людини [61]. Є повідомлення про те, що в щурів з гіпотиреозом вміст мРНК MGP зменшується і на цьому тлі збільшується відкладання кальцію в аорті [61].

Таким чином, багато факторів може впливати на експресію MGP, щоправда з різними ефектами на різні типи клітин. Слід, однак, зауважити, що збільшення експресії MGP найчастіше відбувається у місцях кальцифікації тканин [55, 63, 65]. У такому разі посилення синтезу MGP може бути спробою клітин відповісти на кальцифікацію способом, що інгібує цей процес. Іншими словами, експресія MGP є залежною від подій, що розвиваються в тканинах [52].

На рівні посттрансляційної модифікації основним об'єктом регуляції MGP є γ -карбоксілювання залишків Glu. Цей процес залежить від доступності відновленої форми вітаміну К (KH_2), яка у свою чергу визначається балансом між його надходженням у клітини та використанням з одного боку, та інтенсивністю відновлення окисненої форми вітаміну К (КО) – з другого.

Крім цілком зрозумілого гіповітамінозу К, зменшення необхідного пулу цього вітаміну в клітинах може бути зумовлено значним збільшенням потреб у γ -карбоксілюванні. Так, висунуто гіпотезу, відповідно до якої основні токсичні ефекти високих доз вітаміну D, у тому числі ектопічна кальцифікація паренхіматозних органів і артеріальних судин, зумовлені нестачею вітаміну К, яка настає внаслідок значного посилення синтезу білків, що потребують γ -карбоксілювання [31]. У цих умовах наявного вітаміну К недостатньо, і значна кількість новоутворених білків, у тому числі MGP, не може перейти в Gla-форму, а, отже, набути необхідної функціональної активності. Таким чином, будь-яке посилення експресії MGP вимагає збільшення

доступності відновленої форми вітаміну К, що діє як кофактор γ -карбоксілювання.

Форма, у якій вітамін К міститься в продуктах харчування є неактивною і потребує відновлення до KH_2 системою вітамін-К-епоксидредуктази. Процес окиснення KH_2 супроводжується додаванням карбоксильної групи до залишків Glu в молекулах MGP (утворюється Gla), і окиснений у цій реакції вітамін К (КО) може знову бути відновлений у циклі вітамін-К-епоксидредуктази.

Діяльність циклу вітамін-К-епоксидредуктази порушується під впливом деяких екзогенних та ендогенних факторів. До перших відносять деривати кумарину, що здатні його блокувати. Таким, зокрема, є варфарин [43, 52].

За останніми даними, в клітинах організму існує ендогенний інгібітор γ -карбоксілази, названий калюменіном [78]. Калюменін є білком, який може зв'язувати кальцій. Його вперше ідентифікували в тканинах серця мишей і виявили в ендоплазматичному ретикулумі та апараті Гольджі клітин [80]. Важливим є те, що він зв'язується з вітамін-К-епоксидредуктазою і зменшує його активність, а, отже, зумовлює менш ефективну діяльність вітамін К-залежної системи γ -карбоксілювання [78]. Припускають, що калюменін перешкоджає зв'язуванню варфарину з вітамін-К-епоксидредуктазою. Слід зазначити, що цей білок є продуктом секреції активованих тромбоцитів і його виявляють у місцях атеросклеротичних уражень у людини [9]. Калюменін, таким чином, може бути важливим фактором, що зумовлює накопичення недокарбоксілюваного (тобто неактивного) MGP в атеросклеротичних бляшках.

Механізми антикальциногенної дії MGP

Вивчення процесів кальцифікації у мишей з дефіцитом MGP показало, що для попередження мінералізації артеріальної стінки має значення походження MGP. Викорис-

товуючи методику введення гена MGP у гепатоцити, остеобласти та судинні ГМК за допомогою специфічних для цих клітин векторів, Murshed та співавт. [35] встановили, що відновлення синтезу MGP у печінці і, як результат, поява цього білка у достатній кількості в крові не мають жодного впливу на кальцифікацію артерій – вираженість її залишалася такою самою, як і в мишей з дефіцитом MGP. Натомість, тільки відновлення експресії MGP у ГМК судин запобігало розвитку медіакальцинозу. MGP печінкового походження не впливав і на мінералізацію кісток: цей процес гальмувався тільки за умов відновлення синтезу MGP остеобластами. На підставі одержаних результатів автори дійшли висновку, що антикальциногенна дія MGP *in vivo* не має системного характеру – вона залежить від місця утворення цього білка. Що стосується умов *in vitro*, то походження MGP не має значення для його інгібіторних ефектів. Так, утворений у печінці MGP пригнічував спонтанну кальцифікацію судинних ГМК у культурі клітин [52].

Описані вище спостереження свідчать про те, що циркулюючий MGP або не захоплюється судинною стінкою, або його потрапляння у кров та (чи) перенесення кров'ю робить цей білок неактивним – можливо, через зв'язування з іншими компонентами сироватки, або активність MGP залежить від взаємодії з компонентами матриксу судинної стінки, що їх синтезують і вивільнюють ГМК [52]. Крім того, MGP може діяти і перебуваючи не в позаклітинному матриксі, а всередині судинних ГМК. На думку про це наводить той факт, що MGP виявлено всередині хондроцитів *in vivo* [29], а також у судинних ГМК людини, у яких посилену експресію MGP індукували за допомогою аденовірусу [77]. При використанні MGP-специфічних антитіл значні кількості ендogenous MGP виявляли і всередині судинних ГМК у

культурі клітин людини [52]. Оскільки Gla-залишки можуть зв'язувати іони кальцію, цілком імовірно, що MGP міг би відігравати важливу роль і в підтриманні внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу [52].

Антикальциногенні властивості MGP визначаються його Gla-залишками. Доказом цього є той факт, що декарбоксілований MGP, у якому замість Gla міститься Glu, втрачає свою активність. Про це свідчить і низка імуногістохімічних досліджень з використанням конформаційно специфічних антитіл до MGP [44, 63, 73]. Так, було показано, що в кальцифікованих судинах старих щурів [73], так само як і в уражених артеріях щурів, що отримували варфарин з високими дозами вітаміну D [50], міститься погано карбоксілований (недокарбоксілований) MGP. Schurgers та співавт. [63], вивчаючи артерії людей, встановили, що в неуразених судинах MGP можна виявити тільки в карбоксілованій формі і навколо еластичних структур. Що стосується артерій з кальцифікованими атеросклеротичними бляшками і тих, що уражені артеріосклерозом Менкеберга, то MGP завжди був недокарбоксілованим і містився довкола осередків кальцифікації. На підставі цих даних було зроблено висновок, що порушення γ -карбоксілювання MGP, так само як і пригнічення його синтезу, може бути одним з механізмів кальцифікації судин.

Нині вивчають чотири можливі механізми, за допомогою яких MGP інгібує кальцифікацію судин: зв'язування з іонами кальцію та кристалами гідроксіапатиту; зв'язування з компонентами позаклітинного матриксу; взаємодія з кістковим морфогенетичним протеїном (BMP-2) і усунення ефектів останнього; участь у регуляції апоптозу.

Зв'язування іонів кальцію та кристалів гідроксіапатиту. Одна з перших гіпотез щодо антикальциногенної дії MGP ґрунтувалася на здатності Gla-залишків зв'язува-

тися з іонами кальцію та утворювати разом із залишками аргініну комплекси з гідроксіапатитом [2] (рис. 2). Зв'язування надлишку іонів кальцію в м'яких тканинах має забезпечувати їх виведення з позаклітинного матриксу у кров [17], а взаємодія з малими кристалами інгібує подальший ріст останніх [48, 60]. Така думка підтримується тим, що мРНК MGP виявляють у багатьох тканинах, але сам білок накопичується тільки в місцях кальцифікації і є в плазмі крові. Вважають, що зв'язування з іонами кальцію викликає конформаційні зміни в молекулах MGP та інших вітамін-К-залежних білків, роблячи їх активними [52].

Виявлено, що MGP є компонентом сироваткового комплексу, до складу якого входять також гідроксіапатит, фетуїн та інші білки [48]. Цей комплекс виявляли в крові шурів, що отримували один з препаратів бісфосфонатів етидронат. У цьому дослідженні показано, що в контрольних тварин (у яких гідроксіапатитного комплексу нема) значна частина MGP циркулює як компонент сироватки з молекулярною масою понад 300 кДа і тільки невелика кількість MGP входить до складу білкового комплексу з молекулярною масою меншою ніж 300 кДа. Оскільки молекулярна маса самого MGP становить лише 10 кДа, це дає підстави думати, що основна частина MGP перебуває в крові або в агрегованій формі, або зв'язана з шаперонами більшої молекулярної маси.

Відносно мало досліджень проводилося з MGP як білком. Це пояснюється тим, що його чиста форма погано розчинна і він агрегує при нейтральних значеннях рН. MGP розчинний у фізіологічних буферах тільки в дуже низьких концентраціях [37]. Це може означати, що при накопиченні MGP його молекули зв'язуються одна з одною і більше не можуть вільно переміщуватися в тканині, аж поки не зійдуться з шапероном, який попереджає агрегацію/преципітацію MGP. На сьогодні механізми,

які здійснюють транспорт MGP з клітин і тканин, а також фактори, які підтримують розчинність MGP, невідомі [52].

Зв'язування з компонентами позаклітинного матриксу. Еластин є одним з компонентів позаклітинного матриксу, з яким може зв'язуватися MGP. За допомогою імуногістологічних методів показано, що в нормальних артеріях людини молекули повністю карбоксильованого MGP містяться поблизу еластичних волокон [63]. Локалізація MGP у цих місцях може бути механізмом, що попереджає кальцифікацію, оскільки еластин є важливим субстратом для ініціювання утворення кальцієвих кристалів [42]. Еластичні волокна складаються з еластинового ядра, оточеного мікрофібрилами. Порушення структури останніх може посилювати кальцифікацію. Основним білковим компонентом мікрофібрил є фібрилін-1, дефектний ген якого зумовлює появу продукту, що утворюється в клітинах при синдромі Марфана [40]. У мишей, у яких зменшена експресія гена фібриліну-1, першою патологічною ознакою, що її виявляють, є медіакальциноз аорти [41]. Таким чином, фібрилін-1 має дуже важливе значення для запобігання кальцифікації середньої обо-

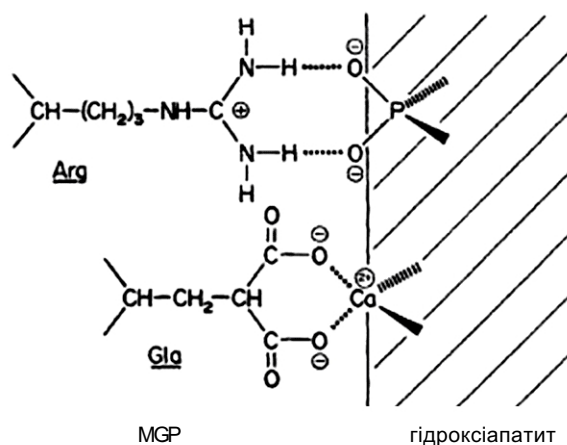


Рис. 2. Утворення комплексів між бічними ланцюгами аргініну (Arg) та γ -карбоксиглутамінової кислоти (Gla) молекул MGP і поверхневими залишками фосфату та кальцієвих кристалів гідроксіапатиту

лонки артерій. Розкриття точних механізмів взаємодії MGP з компонентами еластичних волокон без сумніву поліпшить наше розуміння того, як MGP виконує свої функції.

Ще одним компонентом позаклітинного матриксу, з яким може зв'язуватися MGP, є глікопротеїн вітронектин [37]. На відміну від зв'язування MGP з BMP-2, взаємодія з вітронектином не є кальційзалежною, вона відбувається на рівні C-термінальної ділянки молекули MGP, а тому не залежить від стану карбоксилювання MGP. Яке значення має зв'язування MGP з вітронектином у судинній стінці, ще не відомо, але є припущення, що така взаємодія може змінювати ефекти MGP щодо активності BMP-2.

Взаємодія з кістковим морфогенетичним протеїном (BMP-2). Відомо, що MGP має відношення до процесів диференціювання судинних ГМК і цей вплив здійснюється через взаємодію з BMP-2. Так, артерії, що зазнають кальцифікації в MGP-дефіцитних мишей, містять у медії подібні до хондроцитів клітини, а не типові судинні ГМК, і в них посилена експресія остеобластспецифічного транскрипційного фактора *cbfa1/Runx2* [71]; показано, що MGP зв'язується з BMP-2 і пригнічує ефекти останнього на диференціювання мультипотентних мезенхімних клітин і стовбурових клітин червоного кісткового мозку [3, 83]; посилення експресії MGP в хондроцитах затримує їх дозрівання [81]; у кальцифікованих судинах людини менше синтезується мРНК MGP, зате посилена експресія як хрящових, так і кісткових маркерів, таких, як колаген II типу і остеокальцин відповідно [66, 75].

З наведених спостережень випливає, що MGP необхідний судинним ГМК для того, щоб підтримувати їхній контрактильний фенотип і попереджати їх диференціювання у напрямі клітин, причетних до хондро/остеогенезу. За відсутності MGP ГМК

судин втягуються в різні шляхи мезенхімного диференціювання і можуть перетворюватися в клітини, подібні до хондроцитів чи остеобластів, та продукувати матрикс, який сприяє відкладанню солей кальцію у вигляді кристалів гідроксиапатиту.

Дані про те, що MGP зв'язується з BMP-2 і припиняє його функціональні ефекти, значно розширюють наші уявлення про механізми функціонування MGP. BMP-2 є дуже важливим фактором морфогенезу в кістках [57, 76], але, крім того, він здатний індукувати експресію низки остеогенних генів в судинних ГМК [22]. BMP-2 знаходять у клітинах, що містяться в ділянках атеросклеротичних уражень [4], його експресія може бути індукована оксидативним стресом, запаленням і гіперглікемією [16,39,74]. Отже, слід думати, що антагонізм MGP відносно BMP-2 має бути чинником, що попереджає чи зменшує остеогенні ефекти BMP-2 в судинній стінці. Показано, що зв'язування MGP з BMP-2 залежить від іонів кальцію і в ньому бере участь Gla-домен молекули MGP [73, 79]. Звідси випливає, що недокарбоксильовані форми MGP не можуть бути достатньо ефективними в інгібуванні ефектів BMP-2.

Участь у регуляції апоптозу. Апоптоз є важливим механізмом, що ініціює кальцифікацію судин [53,54]. Так, він передує кальцифікації багатоклітинних вузлів судинних ГМК у культурі клітин [53]. Апоптотичні тілця, що утворюються із судинних ГМК, можуть відігравати роль центрів формування кальцієвих кристалів, їх виявляють як у місцях атеросклеротичних уражень, так і при склерозі Менкеберга [62]. Вузли судинних ГМК *in vitro* містять відносно велику кількість клітин у стані апоптозу та апоптотичних тілець. Експресія MGP є найбільшою, коли апоптотичний індекс у цих вузлах сягає свого максимуму [53]. Це вказує на можливий зв'язок між MGP і апоптозом.

Крім того, MGP було виявлено в апоптотичних тільцях і матриксних везикулах, що утворюються судинними ГМК *in vivo*. Можливо, він наявний у цих везикулах для того, щоб обмежувати їхню здатність до кальцифікації [58].

Дані деяких досліджень дають підстави думати, що експресія MGP посилюється у відповідь на апоптоз. Так, утворення мРНК MGP збільшувалося, коли апоптоз індукували в клітинах гліоми чи у вентральних епітеліальних клітинах простати щурів [1, 5]. У культивованих хондроцитах мишей посилена чи послаблена експресія MGP на чітко визначених стадіях дозрівання супроводжується апоптозом [36]. Крім того, добре відомо, що позаклітинний матрикс і його конститутивні білки впливають на виживання клітин [32]. Відомості про те, що BMP-2 індукують апоптоз у судинних ГМК, а MGP є антагоністом BMP-2, добре узгоджуються з поглядами на нього як на важливий антиапоптотичний фактор. Проте відкритим залишається питання чи дійсно високі рівні експресії MGP конче необхідні для захисту судинних ГМК від апоптозу.

MGP і кальцифікація судинної стінки

Наявність Gla-вмісних білків у судинній стінці було вперше показано Lian та співавт. [28], які виділили амінокислоту Gla з лужних гідролізатів кальцифікованих атероматозних бляшок аорти людини. У гідролізатах неуразених судин і в неускладнених кальцинозом атеросклеротичних бляшках Gla не виявляли, що дало підстави для висновку про тісний зв'язок між Gla-вмісними білками та процесами ектопічної кальцифікації.

Levy та співавт. [27] за допомогою ЕДТА-екстракції виділили з атеросклеротично змінених артерій білкову фракцію, що містить Gla. Малий вміст білків цієї фракції був характерний для жирових смужок і фіброзних бляшок, проте в кальцифікованих бляшках кількість їх була

значною. Автори вважали, що вони відкрили унікальний Gla-білок, який назвали атерокальцином (молекулярна маса 80 кДа, 19 Gla-залишків на 1000 амінокислот). Але згодом самі ж автори повідомили, що атерокальцин – це артефакт, зумовлений забрудненням препаратів судин білками сироватки крові [26].

Після відкриття MGP було доведено, що у стінках кровоносних судин Gla-вмісні білки представлено саме цим протеїном [68]. В артеріальній стінці MGP синтезується ГМК медії та інтими, а в місцях атеросклеротичних уражень – і макрофагами [67]. За допомогою моноклональних антитіл було показано, що в стінці нормальних артерій людини MGP асоційований з ГМК та еластичними мембранами в медії і з позаклітинним матриксом в адвентиції [70]. Було встановлено, що MGP має відношення до різних видів кальцифікації артеріальних судин.

MGP і атеросклероз. Кальцифікація атероматозних бляшок є одним з процесів, що завершує розвиток дегенеративних змін в інтимі [2, 4, 23]. Вивчення накопичення та експресії MGP у таких бляшках людини показало, що молекули цього білка мають тісний просторовий зв'язок з місцями відкладання гідроксіапатиту: їх виявляли на межі з осередками кальцифікації [67, 70]. Проте експресія гена MGP (утворення відповідної мРНК) у ГМК атероматозних бляшок була нижчою, якщо порівнювати з ГМК нормальних судин, які конститутивно експресують цей білок. Водночас у бляшках ГМК починали утворюватися протеїни, що мають відношення до процесів остео/хондрогенезу (остеокальцин, кістковий сіалопротеїн, лужна фосфатаза), і в нормі в артеріальній стінці не синтезуються. Ці спостереження дали підстави думати, що мінералізація структур судинної стінки може бути результатом порушення балансу між прокальциногенними (остео/хондрогенними) і антикальциногенними чинни-

ками. До останніх було віднесено MGP [67].

MGP і артеріосклероз Менкеберга. Тісний просторовий зв'язок MGP з осередками кальцифікації було виявлено і при вивченні артерій ампутованих кінцівок у хворих на цукровий діабет. Відкладання солей кальцію у середню оболонку таких артерій (артеріосклероз Менкеберга) супроводжувалося, як і при атеросклерозі, зменшенням експресії гена MGP у ГМК судин [66, 67]. На тлі таких змін ГМК починали експресувати остеогенні білки. При артеріосклерозі Менкеберга зникає тісний зв'язок MGP з еластичними мембранами в місцях кальцифікації судинної стінки, натомість і в людей і в щурів значну кількість MGP виявляли в позаклітинному матриксі медії на межі з осередками мінералізації [70].

MGP і кальцифікація ГМК судин in vitro. При культивуванні судинні ГМК втрачають ознаки свого контрактильного фенотипу і набувають рис модифікованих (міграція, проліферація, синтез компонентів сполучної тканини), характерних для ГМК атеросклеротичних бляшок. З часом судинні ГМК in vitro утворюють багатоклітинні вузли, які через 30 діб спонтанно кальцифікуються. З моменту появи перших ознак цього процесу в ГМК збільшується експресія гена MGP і деяких остеогенних білків (остекальцину, кісткового сіалопротеїну) [55, 64, 67]. З другого боку, є дані про те, що при моделюванні кальцифікації судинних ГМК біків експресія MGP у цих клітинах, навпаки, зменшується [33]. Вона повертається до вихідного рівня, якщо процес мінералізації інгібувати за допомогою бісфосфонатів.

Таким чином, на підставі того, що експресія MGP в процесі кальцифікації може як зменшуватися, так і зростати, було зроблено припущення про два можливі варіанти розвитку подій. Перший з них полягає в тому, що чинники, які пригнічують

експресію гена MGP, можуть сприяти розвитку мінералізації судинної стінки. Другий – у разі ініціювання кальцифікації іншими механізмами може посилюватися експресія адаптивних білків, які обмежують цей процес. До таких білків автори віднесли MGP [66].

Докази того, що MGP є важливим природним інгібітором кальцифікації in vivo було отримано в трьох групах досліджень, а саме при вивченні генетично нокаутованих мишей; при експериментальному відтворенні варфаринової моделі уражень судин; при виявленні причин синдрому Кейтеля у людей.

Миші з дефіцитом MGP. Використовуючи методику генетичного нокауту, Luo та співавт. [30] вивели лінію мишей, позбавлених гена MGP – MGP(-/-)-миші. Через два тижні після народження у таких тварин значно збільшувалася частота серцевих скорочень, вони відставали в рості, якщо порівнювати з нормальними мишами відповідного віку. Протягом двох місяців від народження “генетично нокаутовані” миші помирали через кровотечі, спричинені розривом грудної або черевної аорти. При вивченні кровоносних судин (фарбування макропрепаратів алізарином червоним і гістологічних препаратів методом фон Косса) виявляли сильно виражену кальцифікацію аорти та її гілок. Солі кальцію відкладалися у всіх артеріях еластичного та м'язового типу, але не в артеріолах, капілярах чи венах. Перші ознаки кальцифікації артерій з'являлися через два тижні від народження тварин. Мінералізації насамперед зазнавали еластичні мембрани медії аортальної стінки. За цією ознакою ураження артерій у “генетично нокаутованих” мишей були характерні для артеріосклерозу Менкеберга у людей (медіакальциноз). Крім того, у таких тварин виявляли кальцифікацію вінцевих артерій серця та аортальних клапанів, але не міокарда. В уражених артеріях не було

жодних проявів атеросклерозу: ні жирових смужок, ні атероматозних бляшок. У стінках судин можна було знайти клітини з властивостями хондроцитів. Вони продукували позаклітинний матрикс, за складом схожий до хрящової тканини (тип II колагену, протеоглікани). Поблизу таких хондроцитів виявляли матриксні везикули, з яких, як вважають, починається кальцифікація.

У MGP-дефіцитних мишей істотних змін зазнавав і скелет. Патологічна кальцифікація хрящових пластинок росту в кістках призводила до появи ознак низького зросту, остеопенії і переломів кісток. Поєднані ураження артерій і скелета у таких мишей нагадували фенотип рідкісної хвороби у людини – синдрому Синглетона–Мертена [69], що характеризується кальцифікацією артерій без атеросклерозу, низьким зростом, остеопенією кінцівок і смертю на першому десятилітті життя.

Пізніше було показано, що відновлення утворення MGP клітинами судинної стінки у MGP(-/-)-мишей попереджає кальцифікацію артерій [35]. У цих дослідженнях (з використанням методики мутагенезу *in vivo*) встановлено, що антикальциногенна активність MGP залежить від 4 з 5 Gla-залишків.

Варфаринова модель кальцифікації судин у щурів. Синтетичне похідне дикумаролу варфарин – є антикоагулянтном непрямої дії. Ще з 50-х років минулого століття цей препарат використовується в клініці як ефективний засіб запобігання тромбоутворенню. Антикоагулянтна дія варфарину ґрунтується на інгібуванні вітамін-К-епоксидредуктази – ферменту, який перетворює окиснену форму вітаміну К у відновлену, після того як відбудеться карбоксилювання залишків Glu в молекулах протромбіну та інших факторах зсідання крові. Таким чином, під впливом варфарину зменшується пул відновленого вітаміну К, а, отже, і утворення карбоксилюваних, функціонально активних факторів коагуляції крові. Іншими словами, варфарин виступає антагоністом вітаміну К: його антикоа-

гулянтну дію можна звести нанівець введенням ззовні препаратів відновленого вітаміну К [21].

Антагоністичні взаємовідносини варфарину та вітаміну К мають свої особливості в печінці та позапечінкових органах і тканинах. З'ясувалося, що можна підібрати такі дози відновленого вітаміну К, які повністю припиняють антикоагулянтну дію варфарину, але не впливають на його ефекти в інших, крім печінки, органах і тканинах, зокрема в кістках і стінках кровоносних судин [45]. Це дає змогу тривалий час вводити тваринам варфарин разом з вітаміном К, завдяки чому вдається запобігти спонтанних кровотеч при збереженні впливу варфарину на карбоксилювання білків, у тому числі MGP, у позапечінкових тканинах [47, 50].

Price та співавт. [43], показали, що при введенні щурам високих доз варфарину разом з препаратами вітаміну К розвивається кальцифікація еластичних мембран в медії великих артерій і в тканинах аортальних клапанів. Перші ознаки кальцифікації аорти виявляли через 2 тиж від початку експерименту, а вже через 5 тиж відкладання солей кальцію були настільки значними, що їх можна було бачити на рентгенівських знімках і просто оком. За всіма ознаками ураження судин, що їх спостерігали у “варфаринових” щурів, були дуже схожими на зміни артерій у мишей з дефіцитом MGP. Це дало підставу думати, що індукована варфарином кальцифікація є наслідком порушення γ -карбоксилювання MGP і вимиканням у такий спосіб його антикальциногенних функцій.

Порушення основної посттрансляційної модифікації MGP призводить до підвищення експресії та вмісту гена MGP (некарбоксилюваного) у кальцифікованих артеріях [43]. Водночас зменшується його концентрація у сироватці крові.

Розвиток індукованих варфарином уражень артерій залежить від віку тварин. Ознаки медіакальцинозу аорти легко

виникають у молодих 20- і 42-добових (меншою мірою) щурів, і зовсім не розвиваються у 10-місячних щурів [44]. При цьому має значення не сам вік тварин, а процес їх росту. Якщо уповільнити ріст щурів переведенням на раціон з недостатнім вмістом білків, то розвиток кальцифікації артерій уповільнюється.

Введення щурам варфарину разом з високими дозами вітаміну D значно посилює кальциногенний ефект кожного з цих чинників: кальцифікація артерій у таких тварин настає значно раніше і є більш вираженою, якщо порівнювати з окремою дією варфарину і вітаміну D [44].

Кальциногенний вплив варфарину виявляє себе і в культурі судинних ГМК людини [67]. Під впливом цього препарату значно прискорюється спонтанна кальцифікація багатоклітинних вузлів.

Синдром Кейтеля у людей. Рідкісна аутосомно-рецесивна хвороба – синдром Кейтеля – характеризується патологічною кальцифікацією хрящів; периферичним стенозом легеневої артерії і гіпоплазією середньої зони обличчя. У таких хворих розвивається виражена кальцифікація кровоносних судин. Встановлено, що хвороба пов'язана з хромосомою 12 – саме з тим її локусом, де знаходиться ген MGP (12p12.3-13.1) [34]. Три мутації гена MGP (с.69delG; IVS1-2A→G; с.113T→A) призводять або до вкорочення молекули MGP, або до якісних її змін, унаслідок чого вона втрачає свою функціональну активність. Виявлений зв'язок між такими дефектами MGP і розвитком кальцифікації судин може свідчити про те, що цей білок є важливим антикальциногенним фактором і в організмі людини. Проте, на відміну від мишей з

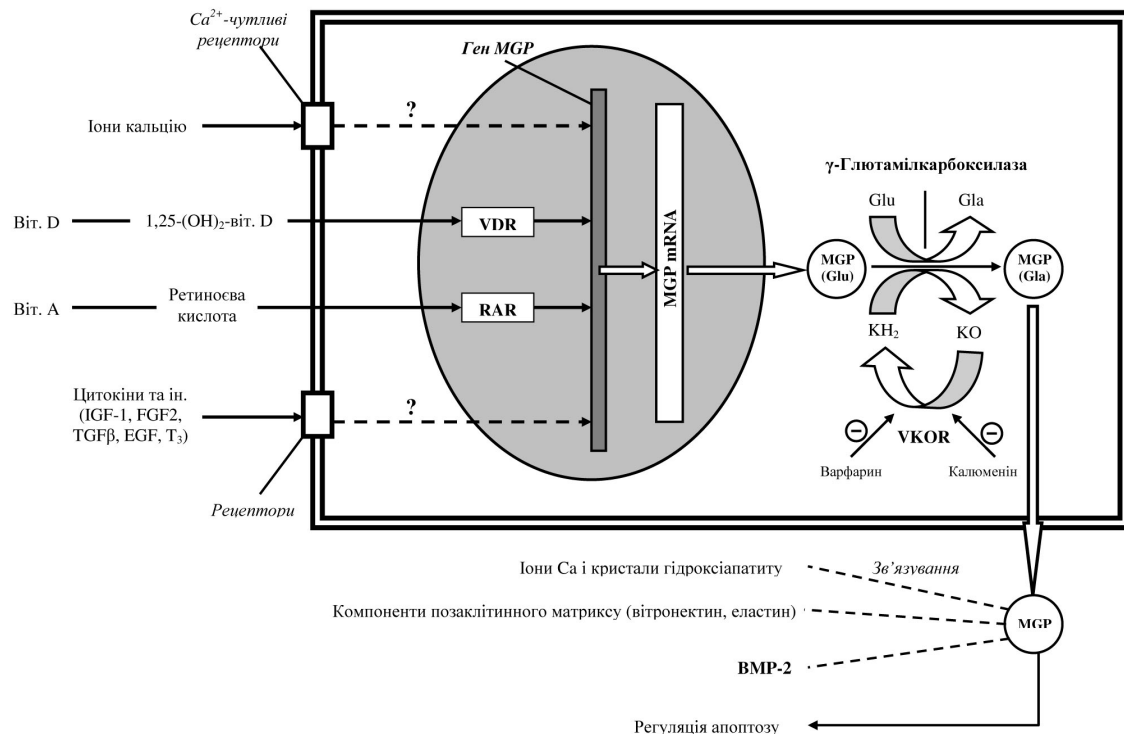


Рис.3. Схема, що ілюструє процеси, пов'язані з утворенням і функціонуванням матричного Gla-протеїну (MGP). VDR – рецептор вітаміну D; RAR – рецептор ретиноєвої кислоти; VKOR – вітамін-К-епоксидредуктаза; KH₂, KO – відновлена і окиснена форми вітаміну K відповідно; BMP-2 – морфогенетичний кістковий протеїн; MGP (Glu) – некарбоксільований MGP; MGP (Gla) – карбоксільований MGP

дефіцитом MGP, хворі на синдром Кейтеля доживають до зрілого віку. Це означає, що в людей існують й інші фактори, які функціонують як інгібітори кальцифікації судин. Крім того, якісно змінені молекули MGP, котрі продукуються у таких хворих, мабуть, можуть зберігати хоча б частину своїх антикальциногенних властивостей у судинній стінці [52].

Таким чином, на рис. 3 у вигляді схеми представлено основні складові процесу, що забезпечує функціонування MGP в тканинах організму, зокрема в стінках кровоносних судин. Такими складовими є: регуляція експресії гена MGP, яка здійснюється іонами кальцію, вітамінами D і A, цілою низкою цитокінів; експресія гена MGP, завдяки якій у клітинах синтезується цей білок; посттрансляційна модифікація молекул MGP, яка полягає в γ -карбоксилюванні Glu-залишків протеїну і потребує участі вітаміну K і ферментів, що його відновлюють; секреція MGP клітинами в позаклітинний простір; власне функціональні ефекти MGP, серед яких зв'язування з іонами кальцію та кристалами гідроксиапатиту; взаємодія з компонентами позаклітинного матриксу; зв'язування з BMP-2; участь у регуляції апоптозу. Загалом зазначені ефекти зумовлюють антикальциногенну дію MGP, що проявляється в інгібуванні мінералізації м'яких тканин в умовах, коли концентрація іонів кальцію і фосфатів у крові та міжклітинній рідині перевищує поріг, необхідний для осадження солей і початку кристалізації. У разі розладів наведених вище процесів порушуються функції MGP, аж до повного їх зникнення, що може спричинити кальцифікацію судинної стінки – важливого компонента як атеросклеротичних уражень, так і артеріосклерозу Менкеберга. Яке це має значення для дальшого розвитку подій, зокрема для виникнення тяжких ускладнень (інфарктів, інсультів, утворення аневризми та їх розриву), ще слід вивчати, досліджуючи зв'язок

MGP і різних варіантів його гена з хворобами людини.

В.Ю. Гарбузова, А.В. Атаман

МАТРИКСНЫЙ GLA-ПРОТЕИН И ЕГО РОЛЬ В КАЛЬЦИФИКАЦИИ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ

Представлены данные о строении матриксного Gla-протеина (MGP), его химических характеристиках, регуляции синтеза и посттрансляционных превращениях, информация о структуре гена MGP и самых распространенных его полиморфизмах. Среди факторов, которые регулируют экспрессию и активность MGP, названы витамин D, ретиноевую кислоту, внеклеточные ионы кальция, цитокины и некоторые гормоны. Подчеркнуто, что MGP является важным ингибитором кальцификации мягких тканей. Такие свойства этого белка связывают с наличием в его молекуле остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты. Описаны четыре возможные механизмы антикальциногенного действия MGP: связывание с ионами кальция и кристаллами гидроксиапатита; связывание с компонентами внеклеточного матрикса; взаимодействие с костным морфогенетическим протеином (BMP-2) и устранение эффектов последнего; участие в регуляции апоптоза. Показано, что изучение аллельных вариантов гена MGP имеет важное значение в связи с возможной их ассоциацией с развитием сердечно-сосудистых и других болезней. Ключевые слова: сосудистая стенка, кальцификация, полиморфизм генов, матриксный Gla-протеин.

V.Yu. Garbuzova, O.V. Ataman

MATRIX GLA-PROTEIN AND ITS ROLE IN VASCULAR CALCIFICATION

Data on the structure of matrix Gla-protein (MGP), its chemical characteristics, regulation of synthesis and post-translational modifications are described. The information on the structure of the MGP gene, its well distributed polymorphisms are presented. Factors that regulate expression and activity of MGP include vitamin D, retinoic acid, extracellular calcium ions, cytokines, and some hormones. It is emphasized that MGP is an important inhibitor of calcification of soft tissues. These properties of this protein are associated with the presence of residues of γ -carboxyglutamic acid of its molecule. Four possible mechanisms of anticalcinogenic action of MGP are described: binding with calcium ions and crystals of hydroxyapatite, binding to extracellular matrix components, interaction with bone morphogenetic protein (BMP-2) and elimination the effects of the latter, participation in the regulation of apoptosis. It is emphasized that the study of allelic variants of the MGP gene is important in the context of their possible association with the development of cardiovascular and other diseases.

Key words: vascular wall, calcification, gene polymorphisms, matrix Gla-protein.

Sumy State University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Baudet C., Perret E., Delpech B., Kaghad M., Brachet P., Wion D., Caput D. Differentially expressed genes in C6.9 glioma cells during vitamin D-induced cell death program // *Cell Death Diff.* – 1998. – **5**. – P. 116–125.
- Bobryshev Y. Calcification of elastic fibers in human atherosclerotic plaque // *Atherosclerosis.* – 2005. – **180**. – P. 293–303.
- Bostrom K., Tsao D., Shen S., Wang Y., Demer L.L. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 14044–14052.
- Bostrom K., Watson K.E., Horn S., Wortham C., Herman I.M., Demer L.L. Bone morphogenetic expression in human atherosclerotic lesions // *J. Clin. Invest.* – 1993. – **91**. – P. 1800–1809.
- Briehl M.M., Miesfeld R.L. Isolation and characterization of transcripts induced by androgen withdrawal and apoptotic cell death in the rat ventral prostate // *Mol. Endocrinol.* – 1991. – **5**. – P. 1318–1388.
- 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.
- Cancela M.L., Hu B., Price P.A. Effect of cell density and growth factors on matrix Gla protein expression by normal rat kidney cells // *J. Cell. Physiol.* – 1997. – **171**. – P. 125–134.
- Cancela M.L., Price P.A. Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human bone cells // *Endocrinology.* – 1992. – **130**. – P. 102–108.
- Coppinger J.A., Cagney G., Toomey S. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions // *Blood.* – 2004. – **103**. – P. 2096–2104.
- 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.
- Farzaneh-Far A., Proudfoot D., Weissberg P.L., Shanahan C.M. Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2000. – **277**. – P. 736–740.
- Farzaneh-Far A., Weissberg P.L., Proudfoot D., Shanahan C.M. Transcriptional regulation of matrix gla protein // *Z. Kardiol.* – 2001. – **90**, Suppl. 3. – P. 38–42.
- Fraser J.D., Otawara Y., Price P.A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the synthesis of matrix r-carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**. – P. 911–916.
- Fraser J.D., Price P.A. Induction of matrix Gla protein synthesis during prolonged 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment of osteosarcoma cells // *Calcif. Tissue Int.* – 1990. – **46**. – P. 270–279.
- 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.
- Fukui N., Zhu Y., Maloney W.J., Clohisy J., Sandell L.J. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes // *J. Bone Joint Surg. Amer.* – 2003. – **85** (A Suppl. 3). – P. 59–66.
- Hackeng T.M., Rosing J., Spronk H.M., Vermeer C. Total chemical synthesis of human matrix Gla protein // *Protein Sci.* – 2001. – **10**. – P. 864–870.
- Hale J.E., Fraser J.D., Price P.A. The identification of matrix Gla protein in cartilage // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**. – P. 5820–5824.
- Hale J.E., Williamson M.K., Price P.A. Carboxyl-terminal proteolytic processing of matrix Gla protein // *Ibid.* – 1991. – **266**. – P. 21145–21149.
- Herrmann S.M., Whatling C., Brand E., Nikaud, 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.
- Holbrook A.M., Pereira J.A., Labiris R. McDonald H., Douketis J.D., Crowther M., Wells P.S. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions // *Arch. Intern. Med.* – 2005. – **165**. – P. 1095–1106.
- Hruska K.A., Mathew S., Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification // *Circulat. Res.* – 2005. – **97**. – P. 105–114.
- Jeziorska M., McCollum C., Wooley D.E. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries // *Virchows Arch.* – 1998. – **433**. – P. 559–565.
- Kirfel J., Kelter M., Cancela L.M., Price P.A., Schule R. Identification of a novel negative retinoic acid responsive element in the promoter of the human matrix Gla protein gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P. 2227–2232.
- 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.
26. Levy R.J., Howard S.L., Oshry L.J. Carboxylglutamic acid (Gla) containing proteins of human calcified atherosclerotic plaque solubilized by EDTA // *Atherosclerosis*. – 1986. – 59. – P.155–160.
27. Levy R.J., Lian J.B., Gallop P. Atherocalcin, a γ -carboxylglutamic acid containing protein from atherosclerotic plaque // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1979. – 91. – P. 41–49.
28. Lian J.B., Skinner M., Glimcher M.J., Gallop P. The presence of γ -carboxylglutamic acid in the proteins associated with ectopic calcification // *Ibid.* – 1976. – 73. – P. 349–356.
29. Loeser R., Carlson C.S., Tulli H., Jerome W.G., Miller L., Wallin R. Articular-cartilage matrix gamma-carboxylglutamic acid-containing protein. Characterization and immunolocalization // *Biochem. J.* – 1992. – 282 (Pt 1). – P. 1–6.
30. Luo G., Ducey P., McKee M.D., Pinero G.J., Loyer E., Behringer R.R., Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein // *Nature*. – 1997. – 386. – P. 78–81.
31. Masterjohn C. Vitamin D toxicity redefined: vitamin K and the molecular mechanism // *Med. Hypoth.* – 2007. – 68. – P. 1026–1034.
32. Meredith J.E., Fazeli B., Schwartz M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor // *Mol. Biol. Cell.* – 1993. – 4. – P. 953–961.
33. Mori K., Shioi A., Jono S., Nishizawa Y., Morii H. Expression of matrix Gla protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification // *FEBS Lett.* – 1998. – 433. – P. 19–22.
34. Munroe P.B., Olgunturk R.O., Fryns J.P., Van Maldergem L., Ziereisen F., Yuksel B., Gardiner R.M., Chung E. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome // *Nat. Genet.* – 1999. – 21. – P. 142–144.
35. Murshed M., Schinke T., McKee M.D., Karsenty G. Extra cellular matrix mineralization is regulated locally: different roles of two gla-containing proteins // *J. Cell. Biol.* – 2004. – 165. – P. 625–630.
36. Newman B., Gigout L.I., Sudre L., Grant M.E., Wallis G.A. Coordinated expression of matrix Gla protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival // *J. Cell Biol.* – 2001. – 154. – P. 659–666.
37. Nishimoto S.K., Nishimoto M. Matrix Gla protein C-terminal region binds to vitronectin. Co-localization suggests binding occurs during tissue development // *Matrix Biol.* – 2005. – 24. – P. 353–361.
38. Owen T.A., Aronow M.S., Barone L.M., Bettencourt B., Stein G.S., Lian J.B. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: Dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures // *Endocrinology*. – 1991. – 128. – P. 1496–1504.
39. Parhami F., Morrow A.D., Balucan J., Leitinger N., Watson A.D., Tintut Y., Berliner J.A., Demer L.L. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – 17. – P. 680–687.
40. Pereira L., Andrikopoulos K., Tian J., Lee S.Y., Keene D.R., Ono R., Reinhardt D.P., Sakai L.Y., Biery N.J., Bunton T., Dietz H.C., Ramirez F. Targeting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome // *Nat. Genet.* – 1997. – 17. – P. 218–222.
41. Pereira L., Lee S.Y., Gayraud B., Andrikopoulos K., Shapiro S.D., Bunton T., Biery N.J., Dietz H.C., Sakai L.Y., Ramirez F. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – 96. – P. 3819–3823.
42. Price P.A., Chan W.S., Jolson D.M., Williamson M.K. The elastic lamellae of devitalized arteries calcify when incubated in serum. Evidence for a serum calcification factor // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – 26. – P. 1079–1085.
43. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves // *Ibid.* – 1998. – 18. – P. 1400–1407.
44. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D // *Ibid.* – 2000. – 20. – P. 317–327.
45. Price P.A., Kaneda Y. Vitamin K counteracts the effect of warfarin in liver but not in bone // *Thrombosis*. – 1987. – 46. – P. 121–131.
46. Price P.A., Rice J.S., Williamson M.K. Conserved phosphorylation of serines in the Ser-X-Glu/Ser(P) sequences of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from shark, lamb, rat, cow, and human // *Protein Sci.* – 1994. – 3. – P. 822–830.
47. Price P.A., Sloper S.A. Concurrent warfarin treatment further reduces bone mineral levels in 1,25-dihydroxyvitamin D₃-treated rats // *J. Biol. Chem.* – 1983. – 258. – P. 6004–6007.
48. Price P.A., Thomas G.R., Pardini A.W., Figueira W.F., Caputo J.M., Williamson M.K. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxylglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats // *Ibid.* – 2002. – 277. – P. 3926–3934.
49. Price P.A., Urist M.R., Otawara Y. Matrix Gla protein, a new γ -carboxylglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1983. – 117. – P. 765–771.
50. Price P.A., Williamson M.K. Effects of warfarin on bone: studies on the vitamin K-dependent protein of rat bone // *J. Biol. Chem.* – 1981. – 256. – P. 12754–12759.
51. 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.
52. Proudfoot D., Shanahan C.M. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein // *Nephrology (Carlton)*. – 2006. – **11**. – P. 455–461.
 53. Proudfoot D., Skepper J.N., Hegyi L., Bennett M.R., Shanahan C.M., Peter L., Weissberg P.L. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro. Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies // *Circulat. Res.* – 2000. – **87**. – P. 1055–1062.
 54. Proudfoot D., Skepper J.N., Hegyi L., Farzaneh-Far A., Shanahan C.M., Weissberg P.L. The role of apoptosis in the initiation of vascular calcification // *Z. Kardiol.* – 2001. – **90**. – P. 43–46.
 55. Proudfoot D., Skepper J.N., Shanahan C.M., Weissberg P.L. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteonin expression // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1998. – **18**. – P. 379–388.
 56. Rannels S.R., Cancela M.L., Wolpert E.B., Price P.A. Matrix Gla protein mRNA expression in cultured type II pneumocytes // *Amer. J. Physiol.* – 1993. – **265**. – P. L270–L278.
 57. Reddi A.H., Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens // *Cytokine Growth Factor Re.* – 2009. – **20**. – P. 341–342.
 58. Reynolds J.L., Joannides A.J., Skepper J.N., McNair R., Schurgers L.J., Proudfoot D., Jahnen-Dechent W., Weissberg P.L., Shanahan C.M. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD // *J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2004. – **15**. – P. 2857–2867.
 59. Rice J.S., Williamson M.K., Price P.A. Isolation and sequence of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from the calcified cartilage of the soupfin shark // *J. Bone Min. Res.* – 1994. – **9**. – P. 567–576.
 60. Roy M.E., Nishimoto S.K. Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: Calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity // *Bone*. – 2002. – **31**. – P. 296–302.
 61. Sato Y., Nakamura R., Satoh M., Fujishita K., Mori S., Ishida S., Yamaguchi T., Inoue K., Nagao T., Ohno Y. Thyroid hormone targets matrix Gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification // *Circulat. Res.* – 2005. – **97**. – P. 550–557.
 62. Schoppet M., Al-Fakhri N., Franke F.E., Katz N., Barth P.J., Maisch B., Preissner K.T., Hofbauer L.C. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* – 2004. – **89**. – P. 4104–4112.
 63. Schurgers L.J., Teunissen K.J., Knapen M.H., Kwaijtaal M., van Diest R., Appels A., Reutelingsperger C.P., Cleutjens J.P., Vermeer C. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – **25**. – P. 1629–1633.
 64. Severson A.R., Ingram R.T., Fitzpatrick L.A. Matrix proteins associated with bone calcification are present in human vascular smooth muscle cells grown in vitro // *In Vitro Cell. De Biol.* – 1995. – **31**. – P. 853–857.
 65. Shanahan C.M., Cary N.R., Metcalfe J.C., Weissberg P.L. High expression of genes for calcification regulating proteins in human atherosclerotic plaques // *J. Clin. Invest.* – 1994. – **93**. – P. 2393–2402.
 66. Shanahan C.M., Cary N.R., Salisbury J.R., Proudfoot D., Weissberg P.L., Edmonds M.E. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification // *Circulation*. – 1999. – **100**. – P. 2168–2176.
 67. 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.
 68. Shanahan C.M., Weissberg P.L., Metcalfe J.C. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells // *Circulat. Res.* – 1993. – **73**. – P. 193–204.
 69. Singleton E.B., Merten D.F. An unusual syndrome of widened medullary cavities of the metacarpals and phalanges, aortic calcification and abnormal dentition // *Pediatr. Radiol.* – 1973. – **1**. – P. 2–7.
 70. Spronk H.M., Soute B.A., Schurgers L.J., Cleutjens J.P., Thijssen H.H., De Mey J.G., Vermeer C. Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2001. – **289**. – P. 485–490.
 71. Steitz S.A., Speer M.Y., McKee M.D., Liaw L., Almeida M., Yang H., Giachelli C.M. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification // *Amer. J. Pathol.* – 2002. – **161**. – P. 2035–2046.
 72. Stheneur C., Dumontier M.F., Guedes C. Fulchignoni-Lataud M.C., Tahiri K., Karsenty G., Corvol M.T. Basic fibroblast growth factor as a selective inducer of matrix Gla protein gene expression in proliferative chondrocytes // *Biochem. J.* – 2003. – **369**. – P. 63–70.
 73. Sweatt A., Sane D.C., Hutson S.M., Wallin L. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats // *J. Thromb. Haemost.* – 2003. – **1**. – P. 178–185.
 74. Towler D.A., Bidder M., Latifi T., Coleman T., Semenkovich C.F. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice // *J.*

- Biol. Chem. – 1998. – **273**. – P. 30427–30434.
75. Tyson K.L., Reynolds J.L., McNair R., Zhang Q., Weissberg P.L., Shanahan C.M. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – **23**. – P. 489–494.
76. Urist M.R. Bone: formation by autoinduction // *Science*. – 1965. – **150**. – P. 893–899.
77. Wajih N., Borrás T., Xue W., Hutson S.M., Wallin R. Processing and transport of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein and bone morphogenetic protein-2 in cultured human vascular smooth muscle cells: Evidence for an uptake mechanism for serum fetuin // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 43052–43060.
78. Wajih N., Sane D.C., Hutson S.M., Wallin R. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats // *Ibid.* – P. 276–283.
79. 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.
80. Yabe D., Nakamura T., Kanazawa N., Tashiro K., Honjo T. Calumenin, a Ca²⁺-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**. – P. 232–239.
81. Yagami K., Suh J.Y., Enomoto-Iwamoto M., Koyama E., Abrams W.R., Shapiro I.M., Pacifici M., Iwamoto M. Matrix Gla protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb // *J. Cell. Biol.* – 1999. – **147**. – P. 1097–1108.
82. Yang H., Curinga G., Giachelli C.M. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro // *Kidney Int.* – 2004. – **66**. – P. 2293–2299.
83. Zebboudj A.F., Imura M., Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 4388–4394.
84. Zhao J., Warburton D. Matrix Gla protein gene expression is induced by transforming growth factor-beta in embryonic lung culture // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – **273**, Pt.1. – P. L282–L287.

Сум. ун-т М-ва освіти і науки України
E-mail: vikgarbuzova@yandex.ru

Матеріал надійшов до редакції 11.03.2011

**А.В. Кубишкін, І.І. Зінкович, Т.В. Звягінцева,
І.І. Фомочкіна, Є.П. Коваленко, О.П. Шатова**

Нові інструменти патофізіологічних досліджень

(Інформація про VI Всесвітній конгрес з патофізіології в Монреалі)

Кожні чотири роки протягом уже 20 років патофізіологи світу регулярно зустрічаються на своїх конгресах. Ця традиція була закладена на Московському установчому конгресі з патофізіології, який був організований за ініціативою засновника Міжнародного товариства патофізіологів (МТП) академіка Г.М. Крижановського в 1990 р. Черговий, уже VI Всесвітній конгрес МТП уперше проходив на американському континенті з 22 по 25 вересня 2010 р. у Палаці конгресів у Монреалі (Квебек, Канада).

Президентом VI конгресу був затверджений професор Університету Монреалю Павло Хамет (Pavel Hamet), а його заступниками стали професори: Жуан Тремблей (Johanne Tremblay) – генеральний секретар, Мішель Тремблей (Michel Tremblay) – голова програмного комітету і Сергій Орлов – відповідальний за проведення спеціалізованих робочих засідань. Міжнародний оргкомітет, що налічував близько 40 провідних патофізіологів, очолили Президент МТП професор Чиде Хан (Qide Han, Китай) і экс-президент Американського товариства фізіологів професор Аллен Коулі (Allen Cowley, США).

На сьогоднішній день вища професійна організація патофізіологів, якою є МТП, об'єднує фахівців 53 країн світу. На VI конгрес прибули представники з 31 країни світу (понад 500 патофізіологів). Представ-

ники ще понад 10 країн опублікували свої повідомлення заочно. У кінцевому підсумку понад 500 наукових робіт, включаючи 87 усних і 469 стендових доповідей, були представлені під час лекцій, симпозіумів і стендових сесій.

Українська делегація на конгресі в Монреалі включала патофізіологів із Сімферополя, Донецька, Харкова, які опублікували в матеріалах конгресу 29 повідомлень і репрезентували в цілому 14 доповідей. Широко була представлена російська делегація, у складі якої були науковці Москви (МДУ і Інститут загальної патології і патологічної фізіології РАМН), Санкт-Петербурзького державного університету, а також співробітники медичних університетів і наукових установ Новосибірська, Іркутська і Челябінська.

Вчені розповідали про досягнення у вивченні причин і механізмів захворювань, використання нових моделей патологічних процесів, обговорили найважливіші напрями наукових досліджень і сучасні методи викладання патофізіології. Спектр висвітлених питань поширювався від досліджень популярній впливу зовнішніх чинників середовища на формування патології до тонких генетичних механізмів розвитку патологічних процесів.

Причому слід зазначити, що основна частина доповідей була зосереджена на ге-

нетичних і молекулярних механізмах розвитку патології. Цьому сприяла програма конгресу, яка була спрямована на два напрями основної тематики: «Взаємодія генів і навколишнього середовища в нормі і при патології» і «Екогеномні моделі кардіометаболічних хвороб». Ще три напрями («Патофізіологічні основи хвороб», «Нові патофізіологічні підходи і методи» і «Нові патофізіологічні мішені в терапії і діагностиці») логічно доповнювали основні наукові напрями. Крім того, у межах конгресу був проведений XIV Міжнародний симпозіум стосовно досліджень у лінійних щурів SHR, присвячений патофізіологічним аспектам артеріальної гіпертензії і пов'язаним із нею хворобам серцево-судинної системи та нирок. Привернула увагу учасників і виставка, на якій були представлені інноваційні діагностичні розробки таких фірм, як "Servier", "Bristol-Myers-Squibb" (Канада), "AstraZeneca", "Pfizer", "Novartis", "Lilly" і деяких інших. Завдяки спонсорським внескам цих компаній, а також засобам, що поступили від цілої низки урядових і неурядових організацій Канади і США, до роботи VI конгресу вдалося залучити доповідачами в десятки провідних учених.

Конгрес відкрився пленарною лекцією професора Така Маку ("Tak W. Mak", Торонто, Канада), який разом із новітніми молекулярно-генетичними аспектами патогенезу злоякісних новоутворень особливу увагу приділив сучасному розвитку класичних уявлень про порушення співвідношення гліколізу й окиснювального фосфорування. У своїй лекції він показав, що вказані порушення складають не тільки основу для біохімічного атипізму пухлин, але і є ключовими для регуляції проліферації та інгібування програмованої смерті пухлинних клітин. Ці дослідження відкривають широкі перспективи в плані розробки нової генерації протипухлинних препаратів. У пленарній лекції професора Розеза (Allen D. Roses, Дархем, США) на прикладі хвороби Альцгеймера були розглянуті генетичні й

патофізіологічні аспекти старіння. Лекція професора Іня (Yuixin Yin, Пекін, Китай) була присвячена новітнім досягненням системно-біологічного підходу у визначенні ролі білка p53 при пригніченні неоплазії. Дві пленарні доповіді професорів Ліббі (Peter Libby, Бостон, США) і Куртца (Theodore Kurtz, Сан-Франциско, США) були відзначені під час конгресу преміями імені Кодзо Окамото (1908–1993), установленими Японським товариством із вивчення хвороб серцево-судинної системи (Okamoto Award). Ці лекції були присвячені внеску ядерного і мітохондріального генома в патогенез гіпертонічної хвороби і метаболічного синдрому, а також ролі запалення і пов'язаних із ним системних реакцій у патофізіології серцево-судинної системи.

Крім пленарних лекцій у рамках конгресу було організовано 13 симпозіумів. Як правило, кожний з яких включав по 2–3 півгодинних доповіді запрошених лекторів і по 2–3 коротких повідомлення, відібраних міжнародним оргкомітетом із числа поданих. Серед проведених симпозіумів слід виділити засідання, присвячені патофізіологічним аспектам шлунково-кишкових і бронхо-легеневих захворювань (голови: проф. Аденійі; Kayode Adeniyi, Ібадан, Нігерія) і проф. Яковльевич (Vladimir Jakovljevic, Крагуевац, Сербія), патофізіології імунної системи (голови: проф. Морой; Tarik Mouroy, Монреаль, Канада) і проф. Седова (Lucie Sedova, Монреаль, Канада), процесам старіння (голова - проф. Циха; Josef Zicha, Прага, Чехія), новим біомаркерами і мішеням ліків у діабетології і кардіології (голови: проф. Макманус; Bruce MacManus, Ванкувер, Канада) і проф. Шиффрін; Ernesto Shiffrin, Монреаль, Канада), патології репродуктивної системи (голова – проф. Пападопулос; Vassillios Papadopoulos, Монреаль, Канада).

Особливий інтерес викликали симпозіуми, присвячені новим методам патофізіологічних досліджень, оснований на генетичних дослідженнях. Зокрема такому напря-

му, як «Omics» були присвячені симпозиуми «Нові патофізіологічні підходи та інструменти «Omics-технологій» (голови: проф. Розівал; Laszlo Rosivall, Будапешт, Угорщина і проф. Аларко; Anne-Marie Alarco, Монреаль, Канада) і «Від генів до системної біології» (голови: проф. Хубнер; Norbert Hubner, Берлін, Німеччина) і проф. Яморі; Yukio Yamori, Нішиномія, Японія). Поняття «Omics» – це загальний термін для позначення аналізу взаємодії біологічних об'єктів в інформаційному ланцюжку, що об'єднуються суфіксом «Omics» (www.omics.org). До основних компонентів цього ланцюжка відносяться genome (геном), transcriptomics (транскрипція сигналу через РНК), proteomics (синтез білків), cytomics (формування клітин), metabolomics (формування метаболічних процесів), expressomics (експресія генів), interactomics (взаємодія генів, білків, метаболітів), аж до реакцій формування органів і організму в цілому (organomics). Основна увага в дослідженні цих ланцюжків зосереджена насамперед на вивченні об'єктів, що є носіями інформації (гени, білки і ліганди); вивчення взаємодії цих об'єктів; вивчення взаємодії в ланцюжку для розуміння регуляторних механізмів і розвитку в них пошкоджень; дослідження інтеграції порушень, що розвиваються на різних рівнях. Інтерес викликали представлені на симпозиумі доповіді з використання в патофізіології нових методів модифікації генома (голови: проф. Тремблей; Johanne Tremblay, Монреаль, Канада і проф. Курц; Theodore Kurtz, Сан-Франциско, США).

Слід відмітити симпозиум з питань ролі геномів і епігеномних змін у патогенезі гіпертонічної хвороби (голови: проф. Ягіль; Yoram Yagil, Ашкелон, Ізраїль і проф. Колецький; Richard Koletsky, Клівленд, США). Особлива увага була приділена ролі епігеномних (epigenomic) порушень, пов'язаних зі зміною експресії генів без зміни їх структури. Великий інтерес представляв симпозиум, який наголосив на успіхи регенеративної медицини і терапевтичні мішені у

кардіології (голови: проф. Нуазо; Nicholas Noiseux, Монреаль, Канада і проф. Адарічев; Vyacheslav Adarichev, Бронкс, США).

Жваву дискусію викликала пленарна лекція Алберта-Ласло Барабасі (Albert-Laszlo Barabasi, Бостон, США) «Мережева медицина: від клітинних мереж до дізисоме (diseasome) людини». Diseasome – новий підхід у систематиці захворювань, заснований на графічному відображенні взаємодії захворювань і генів, що їх викликають (www.diseasome.eu). Саме інтерпретації великого клініко-генетичного й експериментального матеріалу про патогенетичні зв'язки генів (Disease Gene Network) і захворювань (Human disease Network) була присвячена представлена лекція, що демонструє несподіваний генетичний зв'язок і можливу коморбідність різних хвороб.

Відзначаючи велику кількість генетичних досліджень, висвітлених у різних аспектах на конгресі з патофізіології в Монреалі, слід особливо відзначити, що, на наш погляд, ці дослідження важливі для розуміння загальних механізмів розвитку патологічних процесів. У будь-якому разі, зміна окремого гена або його експресії зрештою супроводжуватиметься великою кількістю патогенетичних механізмів, які призведуть до формування патологічного процесу. Ми вважаємо, що вдосконалення методичних підходів повинне залишатися тільки інструментом у руках патофізіологів для розуміння й інтерпретації загальних механізмів розвитку патології. Водночас для того щоб залишатися на передових рубежах світової медичної науки, розвиток молекулярно-генетичних досліджень повинен бути пріоритетним напрямом фундаментальних досліджень.

Не можна обійти увагою проведений 23 вересня 2010 р. спеціальний симпозиум, присвячений проблемам викладання. У ньому взяли участь патофізіологи Аргентини, Угорщини, Німеччини, Китаю, Канади, Литви, Росії, Папуа-Нової Гвінеї, Туреччини, України, Фінляндії, Хорватії,

Чехії і низки інших країн. Торкнулися проблеми викладання патофізіології в різних країнах світу, питання міжпредметної взаємодії, зв'язку з клінічними та суміжними медико-біологічними науками. Обговорювались інновації в цій галузі медичної освіти, у тому числі досвід інтегрованого міждисциплінарного викладання патофізіології, розвитку клінічної патофізіології.

З основними доповідями на симпозіумі виступили віце-президент МТП, голова навчальної комісії проф. Зденко Ковач (Zdenko Kovac, Загреб, Хорватія), («Методологія синтетичного вивчення/навчання патофізіології на основі виписок з історій хвороби») і Л. П. Чурилов (Санкт-Петербург, Росія), («Наука про погрішність організму: від патофізіології до патобіології через інноваційне міждисциплінарне викладання»).

У доповіді З. Ковача був представлений досвід викладання патофізіології в Загребському університеті, де на підставі аналізу виписок майже з 1000 історій хвороб 30 співробітників кафедри патофізіології і клінічних кафедр підготували базу даних, у якій представлені в графічній формі так звані «етіопатогенетичні кластери». Ці кластери є схемами етіології і патогенезу 105 типових патологічних процесів, основних синдромів і найбільш поширених і значущих симптомів і окремих нозологічних одиниць. Застосований підхід практично об'єднує загальну і клінічну патофізіологію, вирішуючи завдання їх викладання інтегрально, на основі союзу з клінічними дисциплінами.

У дуже образній і насиченій доповіді Л. П. Чурилова описувався досвід міждисциплінарного викладання патофізіології, патоморфології і клінічних дисциплін у Санкт-Петербурзькому державному університеті, питання поєднання традиційних і інноваційних засобів навчання, роль і місце патофізіології в системі підготовки лікаря в медичному університеті.

У кінцевому підсумку учасники монреальського конгресу обговорили і схвалили рекомендації щодо викладання патофізіології, які спочатку були підготовлені навчальною комісією МОН ще в кінці 2009 р. на нараді в Шанхаї (www.ispathophysiology.org) [2, 3].

На завершення монреальський конгрес вирішив організаційні питання роботи МТП. Під час роботи конгресу було проведено декілька засідань президії МТП. Президія відзначила великий внесок китайських колег, що сприяли фінансуванню протягом цього періоду офіційного органу МТП, – журналу «Pathophysiology» (редактор проф. Ханінен) і високо оцінила роботу, проведену виконавчим комітетом МОН на чолі з проф. Хан Чиде. Був обраний новий склад президії МТП із 30 учених, у тому числі 4 представників Російської Федерації (проф. Ю. Архіпенко, С. Грачов, Р. Мейгал і С. Орлов). На жаль, до складу президії не увійшли представники України. Президентом і генеральним секретарем відповідно до статуту МТП були обрані канадські вчені (проф. П. Хамет і проф. М. Тремблей). VII конгрес МТП вирішено провести з 4 по 7 вересня 2014 р. у м. Рабаті (Марокко) під девізом «Diagnosis and Therapeutic Challenges». Л. П. Чурилов вніс пропозицію про можливість проведення VIII Конгресу 2018 р. у Росії у м. Санкт-Петербург. Ця пропозиція була підтримана делегацією України і низкою інших країн. Почесним президентом МОН залишається засновник цього товариства академік РАМН професор Г.М. Крижановський.

Таким був VI Всесвітній конгрес із патофізіології в Монреалі, у місті, нерозривно пов'язаному з життям і творчістю Ганса Сельє (1907–1982), – найбільшого патофізіолога ХХ століття і Уільяма Ослера (1849–1919) – видатного клініциста, одного з основоположників клінічної патофізіології.

Крим. мед. ун-т, Сімферополь;
Донец. нац. мед. ун-т;
Харків. нац. мед. ун-т

ПАМ'ЯТНІ ДАТИ



Пам'яті Пилипа Миколайовича Серкова

1 серпня 2011 р. на 103-му році життя помер видатний учений-нейрофізіолог, професор, академік НАН України, двічі лауреат Державної премії України (1978, 2000), лауреат державних премій ім. І.М. Сеченова та О.О. Богомольця, заслужений діяч науки Пилип Миколайович Серков.

Пилип Миколайович народився на Смоленщині в селянській сім'ї. Після закінчення школи з 1926 по 1931 рр. навчався в Смоленському медичному інституті. Вже з другого курсу він зацікавився дослідженням гальмування в нейронах спинного мозку. Закінчивши навчання, працював практичним лікарем, але вже в 1932 р. вступив до аспірантури при кафедрі фізіології тварин і людини Казанського університету, на якій займався нервово-м'язовою фізіологією під керівництвом Д.С. Воронцова. Після закінчення аспірантури в

1935 р. П.М. Серков переїжджає до Києва та починає працювати асистентом кафедри нормальної фізіології Київського медичного інституту. У 1937 р. Пилип Миколайович успішно захистив кандидатську дисертацію на тему “Електрофізіологічні дослідження процесів збудження, гальмування та скорочення м'язів ракоподібних”. Продовжуючи дослідження фізіології м'язових волокон, Пилип Миколайович розробив оригінальну методику ізоляції окремих м'язових волокон жаби, їх електричного подразнення та оптичної реєстрації скорочення. Ним уперше було показано існування різних типів м'язових волокон, а саме: товстих тетанічних, які реагують за законом “все або нічого” та тонких тонічних, інтенсивність збудження та скорочення яких залежить від сили подразнення. Був зроблений важливий на той час для фізіології висновок, що цей закон не є загальним законом збудження, а властивий лише процесу збудження, що розповсюджується в нервових і тетанічних м'язових волокнах. Пилип Миколайович розробив оригінальну методику, яка давала можливість визначити тривалість абсолютного та відносного рефракторного періоду після одного чи декількох стимулів, що наносилися з різними інтервалами. Результати досліджень були узагальнені в докторській дисертації “Фізіологія ізольованого м'язового волокна”, яку Пилип Миколайович захистив у травні 1941 р.

У роки Великої Вітчизняної війни П.М. Серков як лікар брав участь у боях, потрапив у полон, проживав на окупованій території. Після звільнення окупованої території працював лікарем фронтового госпіталю. З 1944 по 1953 рр. Пилип Миколайович очолював кафедру нормальної фізіології Вінницького медичного інституту та був замісником директора

інституту з навчальної та наукової роботи, а з 1953 по 1966 рр. очолював кафедру нормальної фізіології та був проректором з наукової роботи Одеського медичного інституту. В обох інститутах він при кафедрах нормальної фізіології організував електрофізіологічні лабораторії, що давало можливість, крім навчального процесу, проводити серйозну дослідницьку роботу. Особлива увага приділялася вивченню механізму переходу збудження з нерва на структуру, яка його отримує. Зокрема, було показано, що ефект експериментальної аплікації на скелетні м'язи хімічного передавача – ацетилхоліну – та дія нервового імпульсу ідентичні за результатами. В електрофізіологічній лабораторії, крім теоретичних нейрофізіологічних розробок, виконували комплексні клініко-фізіологічні дослідження з електроренцефалографії, досліджували й аналізували вікову динаміку ЕЕГ у дітей, а також у пацієнтів з різними патологічними відхиленнями. Разом із співробітниками В.В. Русевим і Р.Ф. Макулькіним була проаналізована роль сенсорних систем та окремих структур головного мозку в формуванні α -ритму та реакції десинхронізації.

З урахуванням результатів дослідів з гемісферектомією та попередньо виробленими захисними умовними рефlekсами у тварин П.М. Серков дійшов важливого для нейрофізіології висновку про білатеральне представництво в корі вищих тварин рецепторних і ефекторних функцій та про дубльоване формування умовних рефлексів у обох півкулях мозку.

З 1966 р. Пилип Миколайович став завідувачем відділу електрофізіології нервової системи Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР, реорганізованого пізніше у відділ фізіології головного мозку. Пилип Миколайович сформулював нові уявлення про генез компонентів викликаного потенціалу та розповсюдження збудження в корі мозку при надходженні до

кори аферентних імпульсів. Аналіз реакцій нейронів кори на стимуляцію таламо-кіркових волокон свідчить, що частина аферентних імпульсів приходять на нейрони входу після двох-п'яти синаптичних переключень у внутрішньокіркових нейронних ланцюгах.

Внутрішньоклітинні відведення від нейронів кори та підкіркових структур дали можливість кількісно та якісно оцінити і показати динаміку процесів збудження та гальмування, які виникають у нейронах головного мозку у відповідь на аферентний стимул. Особливо детально в цьому відношенні досліджували слухову систему. Зокрема, було звернуто увагу на роль гальмування в аналізі та переробці звукових сигналів. Ці результати П.М. Серков узагальнив у монографії “Електрофізіологія вищих отделов слуховой системы.” Аналіз слухової системи продовжувався і в дослідях з локальним подразненням волокон різних ділянок базилярної мембрани завитка внутрішнього вуха. Це дало можливість уперше визначити розміри та розташування рецептивних полів нейронів слухової кори з різними характеристичними частотами. Ці комплексні дослідження фізіології слуху були відзначені в 1978 р. Державною премією СРСР.

Важливі факти отримані П.М. Серковим та його співробітниками при дослідженні таламуса та таламо-кіркових взаємовідносин. Наприклад, були визначені аферентні та еферентні, а також міжядерні зв'язки різних структур таламуса та специфічні особливості їх функціональної організації. Було показано, що релейна й інтегративна функція релейних ядер здійснюється за участю спеціалізованих внутрішньоталамічних гальмівних нейронів. Отримані факти узагальнені в книзі П.М. Серкова та В.М. Казакова “Нейрофізіологія таламуса”, яка в 1982 р. була відмічена премією ім. О.О. Богомольця АН УРСР.

Особливу увагу в наукових дослідженнях П.М. Серкова та керованого ним

колективу було звернуто на виявлення й аналіз нейронних і синаптичних механізмів гальмування в структурах кори головного мозку та таламуса. Результати цих досліджень дали змогу зробити висновок про те, що після надходження збуджувальних аферентних імпульсів у кору в реакцію швидко включаються спеціалізовані гальмівні нейрони, які створюють синапси на великій кількості клітин кори. Це забезпечує концентрацію збудження відповідно конкретному подразненню, обмежуючи його розповсюдження в корі просторово та в часі. Важливим був висновок про існування двох типів кіркового гальмування. Гальмування першого типу зумовлене активацією гальмівних синапсів, розташованих на тілі клітини та прилеглих до нього дендритах. Гальмування другого типу пов'язано з виникненням гальмівних потенціалів на віддалених ділянках дендритів. Вони мають локальний характер. Це створює можливість диференційного пригнічення аферентного входу на нейрон через одні гілки дендритного дерева, в той час як інші залишаються "відкритими". Багаторічна праця П.М. Серкова та його співробітників була узагальнена в монографії "Корковое торможение". За цикл праць "Нейронные и синаптические механизмы торможения в коре головного мозга" П.М. Серкову було присуджено премію ім. І.М. Сеченова АН ССРСР.

Пилип Миколайович автор і співавтор декількох книг і статей, присвячених історії біології та фізіології в Україні, а також праць про життя та діяльність видатних вітчизняних учених. Його перу належить понад 250 наукових праць, у тому числі п'ять монографій. П.М. Серков – патріарх вітчизняної школи дослідників, які працюють у галузі нейронаук. Серед його учнів 16

докторів і 64 кандидати наук. Багато з них завідують кафедрами в вузах або відділами та лабораторіями в науково-дослідних інститутах.

Пилип Миколайович завжди брав активну участь у науково-організаційній роботі інститутів, роботі редколегій наукових журналів та Українського фізіологічного товариства. З 1966 по 1988 рр. він займав посаду заступника директора з наукової роботи Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, а з 1979 по 1997 рр. був головним редактором "Фізіологічного журналу". Всі, хто спілкувався з П.М. Серковим, відзначають його енциклопедичну ерудицію, енергійність, емоційність, які поєднуються з високою принциповістю в оцінках, у поведінці, скромністю та доступністю в спілкуванні, доброзичливості до колег.

Пилип Миколайович – неперевершений педагог, який самою організацією лекцій з одночасною широкою демонстрацією різних типів фізіологічних експериментів перед студентською молоддю під час лекцій, а також при організації лабораторних робіт перетворював слухачів у дослідників, ентузіастів активного оволодіння технікою фізіологічного експерименту. Саме завдяки цьому чимало його слухачів стали не лише медпрацівниками, а й фізіологами-експериментаторами.

За особистий науковий внесок у розвиток вітчизняної науки, за відданість обраній справі та на честь 100-річчя з дня народження Пилипа Миколайовича було нагороджено орденом Ярослава Мудрого V ступеня, його ім'ям названо одну з вулиць міста Києва.

Не стало Пилипа Миколайовича – старійшини вітчизняної науки, принципової, ерудованої, доброзичливої, емоційної, наполегливої людини, людини – легенди. Сумуємо, любимо, завжди пам'ятатимемо.

Головний редактор "Фізіологічного журналу"
В.Ф. Сагач

CONTENTS

O.M. Semenikhina, O.V. Bazilyuk, Yu.P. Korkach, V.F. Sagach. The role and mechanisms of the effect of hydrogen sulfide on contractile activity of vascular smooth muscles in rats	3
A.Reznikov, L.Chaykovskaya, L.Polyakova, O.Sachynska. Effects of cytokine-like polypeptide emap ii and flutamide on testosterone-stimulated prostate of castrated rats	12
I.A.Vladimirova, I.B. Phylippov, E.M. Kulieva, A. Jurkiewicz, R. Skryma, P. Prevarskaya, Y.M. Shuba. Comparison of the effects of menthol and ilicin on the kcl- and agonist-induced contraction of the smooth muscles strips of the vas deferens of normal and castrated rats.	21
Y.V. Goshovska, T.V. Shimanskaya, O.M. Rudyk, Y.P. Korkach, V.F. Sagach. Mitochondria permeability transition as a target for ischemic preconditioning	34
I.V.Ivanova, O.V.Kislova, A.I. Soloviev. The endothelium – derived hyperpolarizing factor: a reserve defence mechanism of vasodilatation under radiation impact	46
E.F. Kakhanovskyy, V.F. Sagach. Study of changes in the parametres of oxidative stress, anti-oxidative defence and endothelial dysfunction in acute ischemia/reperfusion in lower extremities of the man	57
A.N. Goltsev, O.V. Safranchuk, N.A. Bondarovich, M.V. Ostankov. Change in cryolability of cancer stem cells during in vivo culture of Erlich adenocarcinoma.	68
P.K. Tsapenko, T.P. Liashchenko. Effect of vasopressin on the membrane potential of rat hepatocytes	77
N.V. Bogdanovskaya, A.V. Kotsuruba, N.V. Malikov. Peculiarities of the nitric oxide synthesis during different stages of competition period in athletes of both sexes	82
T. Voznesenskaya Yu., Serdyuk O.N., Blashkiv T.V. Yanchiy R. I. Women ovarian autoimmunity	90
Yu. Garbuzova, O. Ataman. Matrix gla-protein and its role in vascular calcification	96

CHRONIC