

# Фізіологічний журнал

ТОМ 58 № 1 2012

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

Виходить 1 раз на 2 місяці

## Зміст

- Akopova O.V., Kolchinskaya L.I., Nosar V.I., Bouryi V.A., Mankovska I.N., Sagach V.F.*  
Cytochrome *c* as an amplifier of ROS release in mitochondria . . . . . 3
- Струтинський Р.Б., Коцюрuba А.В., Нецерет О.П., Ровенець Р.А., Мойбенко О.О.*  
Зміни метаболізму в міокарді при ішемії–реперфузії та активації  
аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів . . . . . 13
- Коцюрuba А.В., Коркач Ю.П., Таланов С.О., Базілюк О.В., Степаненко Л.Г., Сагач В.Ф.*  
Вікові особливості змін аргіназо-NO-синтазної системи в серці щурів в умовах  
адаптації до тривалих фізичних навантажень плаванням . . . . . 27
- Богорад-Кобельська О.С., Жолобак Н.М., Олевінська З.М., Снівак М.Я.* Активність  
похідних дифенілу на різних модельних системах вірус–клітина . . . . . 36
- Верецака І.В., Горковенко А.В.* Суперпозиція моторних команд у перебігу створення  
“двосуглобових” статичних зусиль м’язами руки людини . . . . . 43
- Fartushok N.V., Khavrona O.P., Fedevych Yu.M., Sklyarov O.Ya.*  
Changes in the antioxidant system and level of proinflammatory cytokin IL-1 $\beta$  in the  
blood patients of sufferi . . . . . 51
- Гарькавенко В.В., Стороженко Г.В., Краснікова О.М., Бабенко Н.О.* Корекція вікових  
порушень вмісту сфінголіпідів у тканинах щурів за допомогою інгібування кислій  
сфінгомієлінази . . . . . 56
- Шахова О.Г., Краснікова О.М., Бабенко Н.О.* Вплив хронічного обмеження  
калорійності раціону на вікові особливості орієнтувально-дослідницької  
поведінки щурів . . . . . 61
- Станішевська Т.І., Соколов В.І.* Характеристика латентних періодів збудження і  
скорочення скелетного м’яза білих щурів залежно від вмісту циркулюючого  
трийодтироніну . . . . . 68
- Панченко О.А., Радченко С.М.* Психофізіологічний аналіз ефективності церебральної  
гемодинаміки за допомогою доплерографічної та реоенцефалографічної  
візуалізації . . . . . 76

<i>Верещака В.В.</i> Особливості системних змін гемомікроциркуляції при хронічних дерматозах . . . . .	81
<i>Вадзюк О.Б.</i> Вплив діазоксиду на мембранний потенціал мітохондрій та утворення активних форм кисню в клітинах матки щурів . . . . .	86
ОГЛЯДИ	
<i>Кайдашев І.П.</i> Активація NF-κB при метаболічному синдромі . . . . .	93
ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ	
В.М. Мороз (до 70-річчя з дня народження) . . . . .	102
М.В. Макаренко: життєвий та творчий шлях (до 75-річчя з дня народження) . . . . .	104
Р.Ф. Макулькін (до 80-річчя з дня народження) . . . . .	107

**O.V. Akopova, L.I. Kolchinskaya, V.I. Nosar, V.A. Bouryi,  
I.N. Mankovska, V.F. Sagach**

## **Cytochrome *c* as an amplifier of ROS release in mitochondria**

*The influence of exogenous cytochrome *c* on reactive oxygen species (ROS) formation and its dependence on mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening is studied in rat liver mitochondria. Fluorescent probe dichlorofluorescein (DCF) was used. It was shown that MPTP activation by increasing concentrations of  $Ca^{2+}$  in the medium results in the increase in mitochondrial ROS production and oxygen consumption, but the decrease in matrix calcium retention, dependent on the amount of added  $Ca^{2+}$ . Cytochrome *c* in the incubation medium does not much influence ROS formation when MPTP opening is blocked by cyclosporine A. However, in the presence of cytochrome *c* MPTP opening is accompanied by dramatic increase in ROS production. Steep rise in DCF fluorescence because of matrix ROS formation is sensitive to MPTP opening and is not resulted from the direct interaction between the probe and cytochrome *c* outside the mitochondria. To explain obtained data the hypothesis is put forward that MPTP could serve for ROS exchange between the matrix and the medium where heme iron of cytochrome *c* would act as a catalytic center to enhance ROS production. We suppose that apart of its conventional function, cytochrome *c* which is not involved in electron transport, could serve in such way as the amplifier of ROS production which in turn would provide a background for the development of apoptosis due to MPTP opening.*

*Key words: mitochondria,  $Ca^{2+}$ , mitochondrial permeability transition pore, ROS, cytochrome *c*.*

### **INTRODUCTION**

At the beginning of 90<sup>th</sup> it was well established that not only NO and its derivatives, but also free-radical and other highly reactive oxygen derivatives (reactive oxygen species, ROS) are active participants in cellular signal transduction [19]. However, mitochondria, the potent source of ROS, received relatively little attention, and their role in cellular ROS signaling for long time have been underestimated. In the late 90<sup>th</sup> convincing evidences were obtained that mitochondria could behave as excitable organelles which convey and exchange  $Ca^{2+}$  and other signals [12].

$Ca^{2+}$ -signalling between the mitochondria and other cellular structures such as plasma membrane and sarcoplasmic reticulum (SR) is now well established fact in cell biology. Effectiveness in the transduction of  $Ca^{2+}$ -sig-

nals is provided by the  $Ca^{2+}$ -transporting system of mitochondria, as well as intracellular localization of the organelles – near the plasma membrane, near SR and near the core. Signal transduction is facilitated also by the existence of the contact sites between mitochondria and the neighboring structures [16].

There is increasing amount of evidence that not only  $Ca^{2+}$  but also ROS signals could propagate between the cells [20]. Well known is the phenomenon of ROS-induced ROS-release [22] which is tightly connected to the opening of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) and spreading of ROS between mitochondrial populations. It is tempting to speculate a possibility of ROS (as well as  $Ca^{2+}$ -) signaling between mitochondria, SR, plasma membrane, and the core, as the foreground for the induction of cellular apoptosis. The mechanisms of ROS signaling in the cell

© O.V. Akopova, L.I. Kolchinskaya, Nosar V.I., Bouryi V.A., Mankovska I.N., V.F. Sagach

are not well understood, in spite of their intensive study over last decades.

Impaired  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling, the opening of mitochondrial pore accompanied by the uncoupling and the decreased effectiveness of ATP synthesis, massive release of ROS and the release of cytochrome *c* from the intermembrane space into cytosol are often considered as the first step in the induction of cellular apoptosis [17]. Although cytochrome *c* is indispensable participant in the electron transfer between the complexes of respiratory chain, its role in regulation of the level of ROS generated as by-products in the course of oxygen reduction have not been fully elucidated. It is well known that positively charged cytochrome *c* is retained by weak electrostatic forces on the outer surface of the inner membrane and is at equilibrium with unbound protein in the bulk solution of intermembrane space [10]. Normally, cytochrome *c* serves for electron transport between III and IV complexes of respiratory chain. After the rupture of the outer membrane due to MPTP opening, cytochrome *c* would release from the intermembrane space into cytosol and adsorbed protein would dissociate from the surface due to the decrease of its concentration in the bulk solution. The loss of cytochrome *c*, in turn, would lead to the inhibition of respiration which could be reversed by the addition of exogenous cytochrome *c* [13]. However, it is known that gating of electron flow between the complexes of respiratory chain upon the loss of cytochrome *c* makes the conditions highly favorable for ROS production by mitochondria because the transition of the sites of ROS production "upstream" of the inhibition of electron flow to more reduced state favors one-electron reduction of oxygen with consequent increase in ROS formation [18].

In its normal function cytochrome *c* could exhibit antioxidant properties as an acceptor of electrons [14]. The role of cytochrome *c* outside the mitochondria in regulation of the redox reactions in the cell, however, is contro-

versial. In the literature, there is plenty of evidence for prooxidant as well as antioxidant action of cytochrome *c* [6,7,14]. Dramatic increase in ROS production, not dependent on MPTP opening, after the loss of cytochrome *c* in mitochondria was shown by many authors [7,21]. Release of cytochrome *c* from mitochondria could be provoked by different stimuli, such as calcium and potassium uptake [8,9], translocation of proapoptotic protein Bax to mitochondrial outer membrane [21] and many others.

MPTP is often considered as the way of a massive ROS release from mitochondria [22]. After MPTP opening the release of ROS from the matrix takes place together with the release of cytochrome *c* from the intermembrane space. The role of cytochrome *c* in mitochondrial ROS production under conditions of MPTP opening, however, received relatively little attention in the literature. The aim of our work was to estimate the influence of exogenous cytochrome *c*, which does not take part in the electron transfer in the respiratory chain, on ROS formation in mitochondria and its dependence on the permeability transition pore opening.

## MATERIALS AND METHODS

Adult Wistar rats with average body weight 200 g were used. Rat liver was homogenized in a medium (1): 250 mM sucrose in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7,4), 1 mM EDTA and centrifuged at 700g x 8 min (4°C). Mitochondria were sedimented by centrifugation of supernatant at 11000g x 15 min (4°C), suspended in a small volume of medium (1) without EDTA and stored on ice until use. The experiments were carried out at 37°C in standard incubation medium: 120 mM KCl, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 mM of sodium glutamate, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). Cytochrome *c* was added at 1  $\mu\text{M}$ .

The data on ROS formation were obtained from dichlorofluorescein (DCF) fluorescence.

Non-fluorescent probe, (2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate, DCFHDA) at 200  $\mu\text{M}$  was added to stock mitochondrial suspensions and loaded for 20 min at 37°C. Then stock suspension was placed on ice, and the aliquots were sampled in 1cm cuvette of spectrofluorimeter. The probe was excited at 504 nm, and the emission registered at 525 nm [23].  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake was studied spectrophotometrically with arsenazo-III by conventional double-wavelength technique at 654/690 nm as described earlier [1]. Mitochondrial swelling was studied based on light absorbance at 525 nm [1,2]. Oxygen consumption was studied polarographically, according to conventional protocol, in 1 ml of standard incubation medium in a closed cell with a platinum electrode at 26°C.

Cytochrome c was inactivated by heating at 90°C. Inactivation was proven polarographically by the inability of inactivated protein to restore respiration inhibited by cytochrome c loss.

All reagents were from Sigma. The data represent mean  $\pm$  S.D. Paired Students t-test was used for estimation of significance; minimum significance level was  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Membrane permeable compound DCFHDA is widely used as a probe on ROS formation in cells and organelles [23]. In mitochondria it is readily deacetylated to form membrane-impermeable non-fluorescent derivative,  $\text{H}_2\text{DCF}$  which is then further oxidized to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by mitochondrial ROS. To be ascertained that all fluorescent signal detected in the course of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake comes from inside the mitochondria the experiment was carried out in parallel in mitochondria preloaded with DCFHDA and in the course of DCFHDA loading together with  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake.

The time dependence of ROS formation in mitochondria induced by  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake is shown on fig.1. In mitochondria preloaded with the probe DCF fluorescence rises immediately after the beginning of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake. The time dependence of the change in DCF fluorescence due to ROS formation is close to that of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake (fig. 1A, 1,2). On the contrary, under conditions of DCFHDA loading together with  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake, the fluorescence rises only

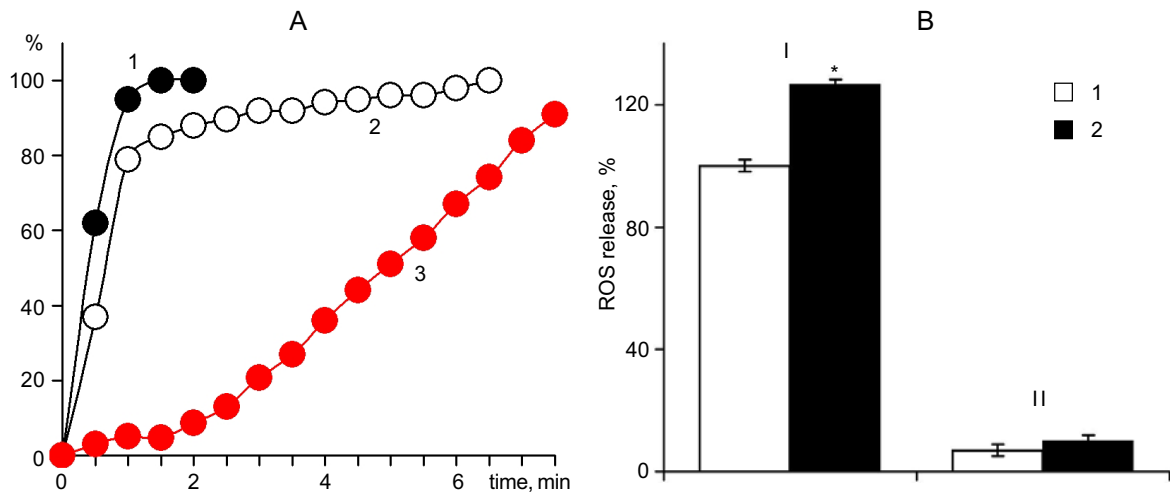


Fig. 1. The time dependence of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake (A, 1) and DCF fluorescence (A, 2-3) in mitochondria in cases of closed (B, I) and open (B, II) state of mitochondrial pore. Mitochondria were preloaded with the probe (A, 2; B, I) or loaded simultaneously with  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake (A, 3; B, II). In case B, fluorescence was determined after 1 min incubation of mitochondria. Incubation medium: 120 mM KCl, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 mM of sodium glutamate, 20 mM Tris-HCl, 30  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  buffer (pH 7.4). Cyclosporine A was added at 1  $\mu\text{M}$  (A; B, I). In case of DCFHDA loading in the course of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake, 20  $\mu\text{M}$  of the probe was added into incubation medium.  $M \pm m$ ,  $n=4$ ; circles represent  $M \pm m$  (A); \*  $P < 0.05$  relative to control (B, I, 1). On the abscissa: time, min (A); on the ordinate: percent change of parameters (A); % change in fluorescence (B)

after prolonged lag-phase (fig. 1A, 3). According to the data, over time of DCFHDA loading DCF concentration in mitochondria is too low to give a detectable signal (fig. 1A, 3), in spite of the observation that most part of ROS production takes place in the course of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake (fig. 1A, 1,2) and ROS formation in mitochondria due to  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake is completed long before the rise in fluorescence signal in case of probe loading together with added  $\text{Ca}^{2+}$  (fig. 1A, 2,3). Thus, the rate of fluorescence increase is limited by the rate of DCFHDA loading, and reflects kinetics of the probe loading in mitochondria. The data obtained show that in spite of high concentration of DCFDA in the medium, all fluorescence registered in the course of  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation is due to DCF formation within mitochondria (fig. 1A, 1,2; 1B, I). The probe outside the mitochondria does not give any detectable signal, at least within the timeframes of the experiment (fig. 1A, 3; 1B, II). This observation remains valid, independent of the open/closed state of the mitochondrial pore (fig. 1B, I-II, 1,2) or the presence of cytochrome *c* in the incubation medium. Thus DCFHDA under conditions of the experiment is a reliable probe on ROS formation in the matrix, inside the mitochondria, and supposed oxidation of this probe by cytochrome *c* outside the mitochondria [6] would not give detectable signal interfering with mitochondrial ROS production.

The time dependences of the change in mitochondrial matrix volume and ROS production, as well as matrix  $\text{Ca}^{2+}$ -retention, and the differences in the rates of oxygen consumption and ROS production, dependent on the open/closed state of MPTP at different amounts of added calcium, are shown on fig. 2. As show the data, MPTP opening (in the absence of cyclosporine A) leads to the matrix swelling (fig. 2A, 2), the increase in ROS production (fig. 2B, 1), decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake and  $\text{Ca}^{2+}$ -retention capacity (fig. 2C, 2,3) as well as the increase in the rate differences of oxygen

consumption and ROS production in metabolic state 2, dependent on the presence or the absence of cyclosporine A (fig. 2D). According to data, MPTP activation by the increasing amounts of added calcium results in the increase in MPTP contribution to oxygen consumption and ROS production (fig. 2D), in spite of the diminishing in  $\text{Ca}^{2+}$ -retention capacity and the amount of matrix  $\text{Ca}^{2+}$  (fig. 2C, 2,3).

When pore opening is blocked by cyclosporine A, all added  $\text{Ca}^{2+}$  is taken up by mitochondria (fig. 2C, 1). In the absence of the MPTP blocker,  $\text{Ca}^{2+}$  which is initially sequestered by mitochondria, is then released through mitochondrial pore (fig. 2C, 2,3) and MPTP opening results in the decrease of  $\text{Ca}^{2+}$  content in mitochondria. The greater is the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  taken up by mitochondria, the faster is its release and the less  $\text{Ca}^{2+}$  remains in the matrix due to MPTP activation. With the increase in the amount of added  $\text{Ca}^{2+}$  in the medium, progressive decrease in matrix of  $\text{Ca}^{2+}$  content is observed (fig. 2C, 2,3). However, in spite of the less matrix calcium, MPTP activation is accompanied by the increase in mitochondrial ROS production (fig. 2B,D, 1) and oxygen consumption rate (fig. 2D, 2).

To explain such reverse dependence between the  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake and matrix  $\text{Ca}^{2+}$  content, on the one hand, and matrix  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS formation, on the other, high proton conductance of the mitochondrial pore should be taken into consideration which facilitates  $\text{Ca}^{2+}$ -release and would account for the increase in oxygen consumption rate in rat liver mitochondria (fig. 2D, 2). The background for observed increase in respiration rate is the increase in proton conductance due to MPTP opening which, as we have shown earlier [1], leads to the activation of cyclosporine A-sensitive  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -exchange and the increase in the rate of  $\text{Ca}^{2+}$ -cycling. Main components of  $\text{Ca}^{2+}$ -cycling under MPTP opening are potential-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake through the  $\text{Ca}^{2+}$ -uniporter, accompanied by oxygen consumption in a stoichiometric proportion, and cyclo-

sporine A-sensitive release of  $\text{Ca}^{2+}$ , in exchange for cyclosporine A-sensitive proton influx into matrix space [1]. After the efflux of  $\text{Ca}^{2+}$  from the matrix under steady-state conditions  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake is continually equilibrated with  $\text{Ca}^{2+}$ -efflux in the course of  $\text{Ca}^{2+}$ -

cycling, which could be reversed by the addition of cyclosporine A [2]. Acceleration of the transmembrane exchange of  $\text{Ca}^{2+}$  results in the increase in the respiration rate and electron transport, consistent with the increase in ROS production in mitochondria (fig. 2B,D, 1).

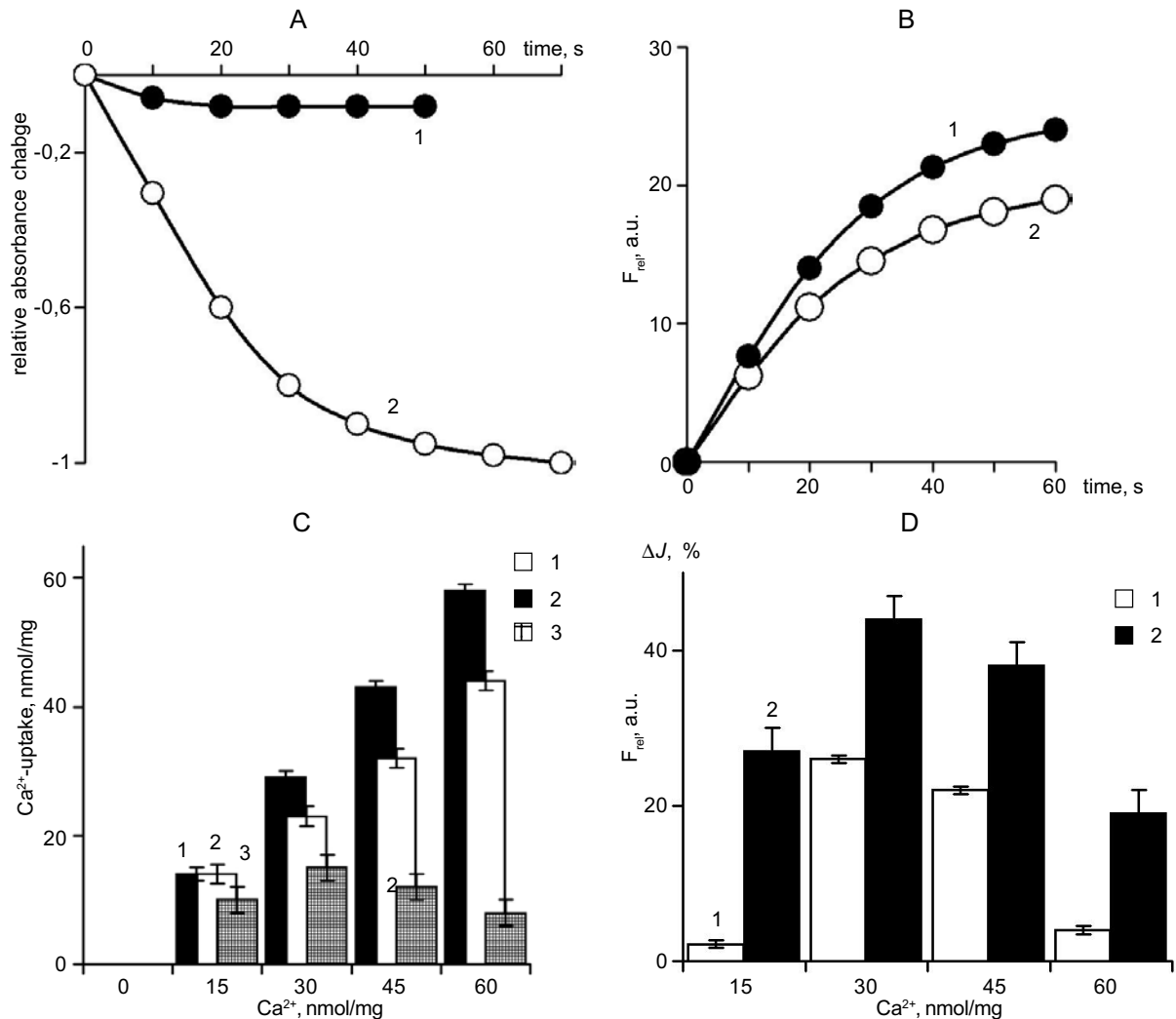


Fig. 2. The influence of MPTP opening in mitochondria on mitochondrial volume (A, 2), DCF fluorescence (B, 1) and  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake (C, 2,3). Incubation medium: 120 mM KCl, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 mM of sodium glutamate, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). Cyclosporine A was added at  $1\mu\text{M}$  (A, 1; B, 2; C, 1). Relative fluorescence,  $F_{rel}$ , is the differences between fluorescence at different times and initial fluorescence values at zero time.  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake in mitochondria was determined in the presence of cyclosporine A (C, 1) or in the absence of cyclosporine A after 1 and 3 min incubation (C, 2,3). MPTP contribution to the rates of ROS production and respiration,  $\Delta J$ , was estimated as the rate differences in the absence and the presence of cyclosporine A, in % of maximum values (D, 1,2).  $\text{CaCl}_2$  was added into incubation medium at  $30\mu\text{M}$  (A,B) or at concentrations shown on the abscissa (C,D).  $M\pm m$ ,  $n=6$ ,  $P<0.05$  relative to control:  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake in the presence of cyclosporine A (C,1) and zero rate differences in the presence of cyclosporine A (D).

On the abscissa: time, s (A,B), amount of added  $\text{Ca}^{2+}$  in nmol/mg protein (C,D). On the ordinate: relative absorbance change at 520 nm (A); relative fluorescence, in arbitrary units (B);  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake, in nmol/mg protein (C); rate differences,  $\Delta J$ , in % of maximum (D)

It is well known that charge transfer across mitochondrial membrane is in a stoichiometric proportion with the electron transport and oxygen consumption in the respiratory chain [3]. Then, the increase in the rate of transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$ -exchange due to MPTP opening would result in the increase in the rates of one- as well as two-electron reduction of oxygen. Thus, the rate of ROS production would be proportional to the rate of oxygen consumption, and the increase in the rate of  $\text{Ca}^{2+}$ -cycling would result in the increase in ROS production, both sensitive to cyclosporine A, in spite of the decrease in matrix  $\text{Ca}^{2+}$ -content in mitochondria. The data obtained show the increase in ROS production with the increase in  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake either in presence or in the absence of cyclosporine A (fig. 2B). Under MPTP opening ROS production in rat liver mitochondria is higher than in the case of MPTP blockage (fig. 2B, 1). It well correlates with the increase in electron transport due to the acceleration of  $\text{Ca}^{2+}$ -cycling with MPTP opening and suggests a direct proportionality between the rate of ROS formation and the rate of electron flow under experimental conditions.

Increase in ROS production induced by  $\text{Ca}^{2+}$ -, as well as  $\text{K}^{+}$ -uptake, was observed by many authors [5,8] but has not received a satisfactory explanation. A decrease in ROS formation would rather be expected under conditions of acceleration of  $\text{Ca}^{2+}$ - (and proton) cycling after MPTP opening which is close to the phenomenon of so-called "mild uncoupling" of respiratory chain [4]. As it was shown in the literature, the increase in ROS release often correlates either with high proton potential [15] or with the inhibition of electron flow [18,21] and, in both cases, with more reduced state of the sites responsible for taking up the electrons from free radicals.

As a plausible explanation of the rise in ROS production after  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake and MPTP opening which was observed independently by many authors [5], we assume that amount of ROS released from mitochondria would be not

only under control of the redox-state of the sites and species that accept and donate electrons [18], but possibly, under kinetic control dependent on the equilibrium between the rates of ROS formation and scavenging. It means that under certain conditions the rate of ROS formation should be much faster than that of ROS removal. Thus, observed increase in ROS release after MPTP opening would be a direct result of the increase in the rate of electron transport in the respiratory chain due to activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -cycling under MPTP opening. Increase in electron transport rate, in turn, would limit the rate of ROS production due to the increase in the rate of electron transfer in the respiratory chain. Consequently, linear increase in time of oxidized fluorescent product, DCF, is observed, in accord with constant rate of ROS formation in the course of substrate oxidation and oxygen reduction (fig. 3A).

However, relative to moderate increase in ROS release due to MPTP opening alone (fig. 3B, 1), dramatic increase in ROS production in the presence of exogenous cytochrome *c* in the incubation medium is observed (fig. 3B, 2). The data obtained first 10 min from the beginning of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake show, with a reliable approximation, a linear in time increase in DCF formation both in the absence and the presence of cytochrome *c* (fig. 3A, 1,2), and the transition to steep exponential time dependence of ROS production in case of MPTP opening in the presence of cytochrome *c* (fig. 3B, 2). In this last case the rate of ROS formation in mitochondria with cytochrome *c* added into incubation medium far exceeds that of mitochondria without addition of cytochrome *c* (fig. 3C, bars 2,4).

It is known from the literature [6] that DCFDA in alkaline medium could undergo deacetylation with following direct oxidation by cytochrome *c* to DCF. Sharp increase in ROS production which is observed in the presence of cytochrome *c* in the incubation medium only under MPTP opening, however, could not be explained by a direct oxidation



of the probe by cytochrome *c*, because both of them are separated by the mitochondrial membrane which serves as a barrier to prevent the direct contact of cytochrome *c* with the probe inside the mitochondria. Moreover, it should be taken into account that presence of cytochrome *c* in the medium in case of MPTP blockage does not result in such steep rise of DCF fluorescence (fig. 3A, 2) which would also suggest another mechanism of DCF formation than direct oxidation of the probe by cytochrome *c*.

There is sufficient amount of evidence [14] that cytochrome *c* could behave as an effective antioxidant taking up one electron from superoxide and thus scavenging superoxide anion. It should be pointed out, however, that

not only superoxide but large amounts of hydroperoxide and other ROS are released from mitochondria [21], and these ROS products also would interact with cytochrome *c*. An interaction of released ROS with cytochrome *c* by a mechanism of Fenton reaction type would result not only in novel ROS formation but possibly in the amplification of ROS products.

Both forms of a heme protein cytochrome *c*, that is oxidized (ferricytochrome) and reduced (ferrocytochrome), could interact with ROS in the reactions of Fenton or Haber-Weiss-type [11]:

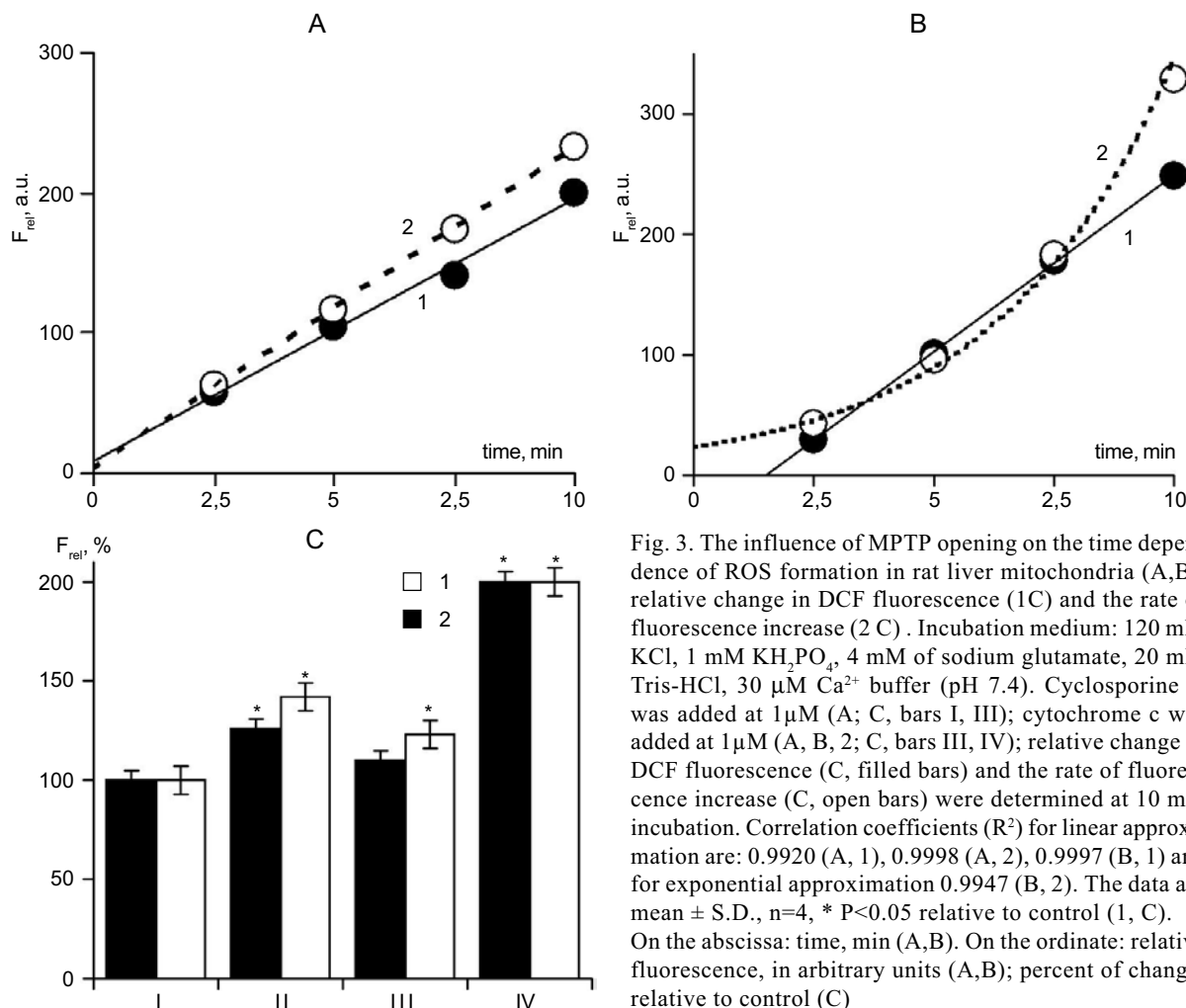
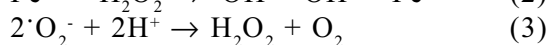
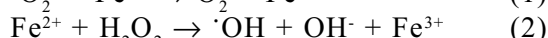


Fig. 3. The influence of MPTP opening on the time dependence of ROS formation in rat liver mitochondria (A,B), relative change in DCF fluorescence (1C) and the rate of fluorescence increase (2 C). Incubation medium: 120 mM KCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM of sodium glutamate, 20 mM Tris-HCl, 30 μM Ca<sup>2+</sup> buffer (pH 7.4). Cyclosporine A was added at 1 μM (A; C, bars I, III); cytochrome *c* was added at 1 μM (A, B, 2; C, bars III, IV); relative change in DCF fluorescence (C, filled bars) and the rate of fluorescence increase (C, open bars) were determined at 10 min incubation. Correlation coefficients (R<sup>2</sup>) for linear approximation are: 0.9920 (A, 1), 0.9998 (A, 2), 0.9997 (B, 1) and for exponential approximation 0.9947 (B, 2). The data are mean ± S.D., n=4, \* P<0.05 relative to control (1, C). On the abscissa: time, min (A,B). On the ordinate: relative fluorescence, in arbitrary units (A,B); percent of change, relative to control (C)

Ferricytochrome could accept one electron from superoxide (1) and thus behave itself as a scavenger of superoxide and an effective antioxidant [14]. But on the other hand, reduced form of cytochrome *c*, ferrocytochrome, could react with hydroperoxide (2) which in large quantities is released from mitochondria [21]. Cytochrome *c* which is reduced in the reaction with superoxide (1) could then interact with hydroperoxide (2) resulting in the formation of highly toxic hydroxyl-radical. In the course of this last reaction heme iron of cytochrome *c* would undergo transition to more oxidized form which, in turn, could again take up electrons from superoxide, after which ferrocytochrome could once again interact with hydroperoxide. It is worth mentioning that a large quantity of hydroperoxide, the main source of hydroxyl-radical, is supplied by superoxide itself which would be readily disproportionated in the relatively (to the matrix) acidic milieu of the intermembrane space (3). Thus, in such interactions with ROS which in large quantities are released from mitochondria, cytochrome *c* would behave as a catalyst which itself undergoes repeated transitions from oxidized to reduced form, being both a scavenger of superoxide and a potent generator of ROS. It should be expected that total amount of ROS released in the course of such Fe-cycling would depend on a complex equilibrium between redox states of the heme iron of cytochrome *c*, the quantity of individual free radicals, and the rate of their release from mitochondrial matrix. Most probably, that proposed catalytic Fe-cycling mechanism would result not only in novel ROS formation but possibly in the amplification of ROS products.

To explain observed rise in matrix ROS formation induced by cytochrome *c* outside the matrix space, we propose that mitochondrial pore would facilitate ROS exchange between the matrix and the medium. ROS generated in the matrix would be at first released through the pore into intermembrane space where ROS metabolism could be manifold

activated by Fe-complex of cytochrome *c* which would act as a catalyst in the amplification of ROS production by Fenton-type reactions. In turn, even transient increase in ROS concentration would lead to their flow back into matrix space through the same mitochondrial pore which is in its open state and would increase the level of ROS inside the mitochondria. It worth mentioning that catalase added to incubation medium was not able to prevent the rise in ROS production, thus, free-radical reactions, resulting in ROS production are localized to the matrix and intermembrane space, but not to the bulk solution. Thus, we suppose that apart of its conventional function, cytochrome *c* could serve in such a way as an amplifier of ROS production in mitochondria which would provide a background for the development of apoptosis induced by MPTP opening.

## CONCLUSIONS:

1. Exogenous cytochrome *c* could serve as an amplifier of ROS production in mitochondrial matrix in a way sensitive to MPTP opening.
2. Such amplification of ROS production takes place only under conditions of ROS release from mitochondria through mitochondrial pore to interact with cytochrome *c* outside the matrix space.
3. Heme iron complex of cytochrome *c* would act as a catalyst in amplification of ROS production by Fenton-type reactions.
4. Increase in the ROS concentration outside the matrix, even transient, would result in their flow back to the matrix, increase in probe oxidation and DCF fluorescence inside the mitochondria.
5. MPTP opening is necessary for ROS exchange between the mitochondrial matrix and the heme iron of cytochrome *c*. If MPTP is closed, cytochrome *c* would not significantly increase ROS production in mitochondria. Thus, exogenous cytochrome *c* might serve as potent amplifier of ROS signaling between

mitochondria in several pathological states accompanied by MPTP opening.

**О. В. Аكوпова, Л. И. Колчинская, В. И. Носарь, В. А. Бурый, И. Н. Маньковская, В. Ф. Сагач**

### **ЦИТОХРОМ С КАК УСИЛИТЕЛЬ ГЕНЕРАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ**

Изучено влияние экзогенного цитохрома *c* на образование активных форм кислорода (АФК) под действием  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени крыс в условиях открывания и блокирования митохондриальной поры (МП). О генерации АФК судили по изменению флуоресценции дихлорофлуоресцеина (ДХФ). Показано, что активация МП приводит к повышению потребления кислорода и продукции АФК, несмотря на снижение содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе с повышением концентрации катионов в среде инкубации. В присутствии цитохрома *c* в инкубационной среде происходит прогрессирующее возрастание количества АФК, чувствительное к открыванию поры. Показано, что наблюдаемое резкое нарастание флуоресценции ДХФ соответствует генерации АФК в матриксе и не вызвано непосредственным взаимодействием цитохрома *c* с зондом. В условиях подавления МП присутствие цитохрома *c* в инкубационной среде не влияет существенным образом на содержание АФК в митохондриях. Полученные результаты свидетельствуют, что наблюдаемое влияние экзогенного цитохрома *c* на продукцию АФК обусловлено открыванием МП. Предполагается, что в условиях открывания поры цитохром *c* играет роль катализатора в реакции превращения АФК, высвобождающихся из митохондриального матрикса, причем обмен свободнорадикальных продуктов между матриксом и средой осуществляется через пору, находящуюся в открытом состоянии. Подобный механизм амплификации продуктов превращения кислорода с участием гемового железа цитохрома *c* и образованием токсичных свободнорадикальных производных может создавать благоприятные предпосылки индукции клеточного апоптоза и развития окислительного стресса вследствие избыточной генерации АФК.

Ключевые слова: митохондрии,  $\text{Ca}^{2+}$ , митохондриальная пора, активные формы кислорода, цитохром *c*.

**О.В. Аكوпова, Л.И. Колчинська, В.І. Носар, В.А. Бурый, І.М. Маньковська, В.Ф. Сагач**

### **ЦИТОХРОМ С ПОСИЛЮЄ ГЕНЕРАЦІЮ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У МИТОХОНДРИЯХ**

Досліджено вплив екзогенного цитохрому *c* на утворення активних форм кисню (АФК) під дією  $\text{Ca}^{2+}$  у митохондриях печінки шурів за умов відкриття та блокування митохонд-

ріальної пори (МП). Утворення АФК реєстрували за зміною флуоресценції дихлорофлуоресцеїну (ДХФ). Показано, що активація МП призводить до підвищення споживання кисню та продукції АФК, попри зниження вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у митохондриях із збільшенням концентрації катионів у середовищі інкубації. За наявності екзогенного цитохрому *c* в інкубаційному середовищі відбувається стрімке підвищення продукції АФК, яка є чутливою до відкриття пори. За умов блокування останньої цитохром *c* суттєво не впливає на утворення АФК. Показано, що флуоресцентний сигнал відповідає генерції АФК у митохондриальному матриксі, і зростання флуоресценції ДХФ не зумовлене безпосередньою взаємодією зонду з цитохромом *c*. Одержані результати свідчать, що вплив екзогенного цитохрому *c* на продукцію АФК у митохондриях спричинений відкриттям МП. Запропоновано механізм, згідно з яким цитохром *c* може відігравати роль катализатора у реакціях перетворень АФК, що вивільнюються з митохондрий, причому обмін вільнорадикальних продуктів між матриксом і середовищем відбувається за посередництвом пори, яка знаходиться у відкритому стані. Подібний механізм ампліфікації продуктів перетворення кисню за участі гемового заліза цитохрому *c* з утворенням токсичних вільнорадикальних похідних може створювати сприятливі передумови для подальшої індукції клітинного апоптозу і розвитку окислативного стресу внаслідок надлишкової продукції АФК.

Ключові слова: митохондрії,  $\text{Ca}^{2+}$ , митохондриальна пора, активні форми кисню, цитохром *c*.

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

### **REFERENCES**

1. Akopova O.V. The role of permeability transition pore in transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$ -exchange in mitochondria //Ukr. Biochim. J. – 2008. – **80**, №3. – P.40-47.
2. Akopova O.V. The influence of ATP-dependent  $\text{K}^{+}$ -channel opener on the opening of mitochondrial permeability transition pore in rat liver mitochondria // Ibid. – 2011. – **83**, №3. – P.37-47
3. Beavis A.D. Upper and lower limits of the charge translocation stoichiometry of mitochondrial electron transport //J. Biol. Chem. – 1987. – **262**, № 13. – P. 6165-6173.
4. Brand M.D., Affourtit Ch., Esteves T., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J., Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins //Free Radical Biol. Med. – 2004. – **37**, №6. – P.755-767.
5. Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L., Anders M.W., Sheu Sh.-Sh. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle //Amer. J. Physiol. – 2004. – **287** – P.C817-C833.
6. Burkitt M.J., Wardman P. Cytochrome c is a potent catalyst of dichlorofluorescein oxidation: implications for the role of reactive oxygen species in apoptosis //

- Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – **282** – P.329-333.
7. Cai J., Jones D.P. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome *c* loss // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**. – P.11401-11404.
  8. Costa D.T.A., Quinlan C.L., Andrukhiv A., West I.C., Jaburek M., Garlid K.D. The direct physiological effects of mito<sub>KATP</sub> opening on heart mitochondria // Amer. J. Physiol. – 2006. – **290**. – P. H406-H415.
  9. Gogvadze V., Robertson J.D., Enoksson M., Zhivotovskiy B., Orrhenius S. Mitochondrial cytochrome *c* release may occur by volume-dependent mechanisms not involving permeability transition // Biochem. J. – 2004. – **378** – P.213-217.
  10. Hackenbrock C.R. Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1968. – **61**. – P.598-605.
  11. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts // FASEB J. – 1987. – **1**, №5. – P.358-364.
  12. Ichas F., Jouaville L.S., Mazat J.-P. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals // Cell. – 1997. – **89**. – P.1145-1153.
  13. Jacobs E.E., Sanadi D.R. Phosphorylation couples to electron transport mediated by high potential electron carriers // Biochim. Biophys. Acta. – 1960. – **38**. – P.12-33.
  14. Korshunov S.S., Krasnikov B.F., Pereverzev M.O., Skulachev V.P. The antioxidant functions of cytochrome *c* // FEBS Lett. – 1999. – **462**. – P.192-198.
  15. Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // FEBS Lett. – 1997. – **416** – P.15-18.
  16. Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.-L., Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death // FASEB J. – 1995. – **9**. – P. 1277-1287.
  17. Knowles M.K., Guenza M.G., Capaldi R.A., Marcus A.H. Cytoskeletal-assisted dynamics of the mitochondrial reticulum in living cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – **99**. – P.14772-14777.
  18. Kushnareva Y., Murphy A.N., Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome *c* and NAD(P) oxidation-reduction state // Biochem. J. – 2002. – **368**. – P.545-553.
  19. Lander H.M. An essential role for free radicals in signal transduction // FASEB J. – 1997. – **11**. – P.118-124.
  20. Pletjushkina O.Yu., Fetisova E.K., Lyamzaev K.G., Ivanova O.Yu., Domnina L.V., Vysokih M.Yu., Pustovidko A.V., Alekseevsky A.V., Alekseevsky D.A., Vasilyev Yu.M., Murphy M.P., Chernyak B.V., Skulachev V.P. Hydrogen peroxide produced inside mitochondria takes part in cell-to-cell transmission of apoptogenic signal // Biochemistry (Moscow). – 2006. – **71**, N1. – P.75-84.
  21. Starkov A.A., Polster B.M., Fiskum G. Regulation of hydrogen peroxide production by calcium and Bax // J. Neurochem. – 2002. – **83**. – P.220-228.
  22. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – **1757**. – P.509-517.
  23. Zorov D.B., Kobrinsky E., Juhaszova M., Sollott S. Examining intracellular organelle function using fluorescent probes // Circulat. Res. – 2004. – **95**. – P.239-252.

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*  
*E-mail: luko@biph.kiev.ua*

*Received 12.09.2011*

Р.Б. Струтинський, А.В. Коцюруба, О.П. Нещерет, Р.А. Ровенець, О.О. Мойбенко

## Зміни метаболізму в міокарді при ішемії–реперфузії та активації аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів

У досліджах на собаках з відтворенням експериментальної ішемії (90 хв) та реперфузії (180 хв) вивчено зміни біохімічних показників різних ділянок серця: інтактної, ризику та некрозу, при внутрішньошлунковому введенні лікарської форми (таблетки) фторвмісного активатора аденозинтрифосфат(АТФ)-чутливих калієвих ( $K_{\text{АТФ}}$ ) каналів флокаліну в дозі 2,2 мг/кг. Досліджували біохімічні показники, що характеризують можливі механізми дії флокаліну – окисний метаболізм (пули  $H_2O_2$ , сечової кислоти, дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, ейкозаноїдів  $LTC_4$  і  $TxB_2$ ), біосинтез NO різними шляхами – окисним *de novo* (активність індукцйбельної та конститутивної NO-синтази і пули цитруліну) та неокисним реутилізаційним (активність нітратредуктази), пули стабільних метаболітів NO (нітрит- і нітрат-аніонів, низько- та високомолекулярних нітрозотіолів), неорганічний фосфат та інші продукти деградації АТФ і гуадинінтрифосфату (ГТФ), зміни в гемоксигеназній реакції (пули білірубину і заліза), неокисний катаболізм L-аргініну (активність аргінази і пули сечовини) і вміст вільної арахідонової кислоти. Аналіз результатів дав змогу окреслити декілька можливих кардіопротекторних механізмів флокаліну. Вони полягають в інгібуванні окисного метаболізму внаслідок обмеження генерації вільних радикалів кисню та азоту, інгібуванні гідролізу фосфоліпідів і, тим самим, утворення вільної арахідонової кислоти та патогенних в умовах ішемії міокарда ейкозаноїдів, інгібуванні деградації АТФ і ГТФ та, можливо, в стимуляції захисної гемоксигеназної реакції. Одним із важливих кардіопротекторних механізмів можна вважати пригнічення індукцйбельного *de novo* і реутилізаційного синтезу оксиду азоту та деградації аргініну аргіназою і, навпаки, збереження достатніх рівнів конститутивного *de novo* синтезу оксиду азоту. Поряд з цим збереження останнього на високому рівні та вищезгадані зміни в окисному метаболізмі, що унеможливають утворення токсичного пероксинітриту, вказують на можливість участі в кардіопротекторному ефекті флокаліну мітохондріальної транспортної пори за рахунок попередження її відкриття та, як наслідок, інгібування індукваного нею апоптозу і/чи некрозу кардіоміоцитів.

*Ключові слова:* аденозинтрифосфатчутливі калієві канали, флокалін, ішемія–реперфузія, оксидативний стрес, нітрозативний стрес, перекисне окиснення ліпідів, *de novo* синтез NO, реутилізаційний синтез NO.

### ВСТУП

Одним із найважливіших ендogenous механізмів кардіопротекції при ішемії й інфаркті міокарда є система аденозинтрифосфат-(АТФ)-чутливих калієвих ( $K_{\text{АТФ}}$ ) каналів – сарколемальних і мітохондріальних, відкритих Noma [18] та Inoue [17]. Їх загальною характеристикою й основним механізмом

протекції є швидка реакція на зниження енергетичного потенціалу (вмісту АТФ) у кардіоміоциті – неминучий наслідок порушення кровообігу серця. При ішемії міокарда плазматичні канали відкриваються, що призводить до гіперполяризації та послідовно до скорочення потенціалу дії, тривалості його плато, зменшення входу кальцію в саркоплазму, гальмування метаболічних

© Р.Б. Струтинський, А.В. Коцюруба, О.П. Нещерет, Р.А. Ровенець, О.О. Мойбенко

процесів у клітині та відповідно до зменшення її потреби в кисні та збереженні енергоресурсів (зокрема, АТФ), що дуже важливо в умовах дефіциту кровопостачання серця [2, 6, 22]. Наслідком цього є відносне збереження та краще відновлення показників скоротливої активності міокарда ішемізованого серця, попередження розвитку констрикторних реакцій у коронарних судинах і підвищення загальнопериферичного опору в період реперфузії [7, 8, 21]. Поряд з цим активація  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів пригнічує вільнорадикальні реакції та має антиокиснювальні властивості: зменшує вміст вільних радикалів і запобігає зниженню активності ферментів антиоксидантної системи – каталази та супероксиддисмутази [20]. Цілком імовірно, що гальмування входу кальцію повинно зменшувати активність катаболітичних ферментів, що з одного боку, може попереджати деградацію фосфоліпідів мембран (мембраностабілізуювальна дія), з іншого – зменшувати утворення патогенних в умовах ішемії міокарда ейкозаноїдів, зокрема пептидолейкотриєну  $C_4(LTC_4)$ .

Метою нашої роботи було вивчення впливу вітчизняного фторвмісного активатора  $K_{\text{АТФ}}$ -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран флокаліну на зміну біохімічних показників метаболізму в міокарді як на можливий механізм його кардіопротекторної дії при ішемії–реперфузії в експериментах *in vivo*.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на 19 безпородних собаках масою від 15 до 24 кг під хлоралозо-уретановим наркозом (0,07 та 0,7 г/кг внутрішньовенно). Використано метод ретроградної катетеризації, аутоперфузії та прицільної емболізації гілки лівої коронарної артерії, який дає змогу відтворювати локальну ішемію (90 хв) і реперфузію (180 хв) міокарда без розтину грудної порожнини

та зі збереженням спонтанного дихання [8]. Тварин було поділено на три групи. До I групи ввійшли інтактні тварини (n=5). У тварин II групи (контрольна, n=7) і III групи (n=7) моделювали регіональну ішемію міокарда та наступну реперфузію. Собакам III групи за 60 хв до початку ішемії за допомогою зонда внутрішньошлунково вводили лікарську форму (таблетки) флокаліну в дозі 2,2 мг/кг. Після експерименту у тварин II і III груп вилучали шматочки міокарда трьох ділянок лівого шлуночка – інтактної, зон ризику та некрозу. Для порівняння з умовами нормоксії шматочки лівого шлуночка вирізали і у інтактних собак (I група). Їх негайно заморожували у рідкому азоті, розтирали в ступці та готували суцільні гомогенати на дистильованій воді.

У гомогенатах лівого шлуночка серця інтактних собак і різних ділянок лівого шлуночка серця собак після ішемії–реперфузії досліджували показники, що характеризують можливі біохімічні механізми кардіопротекторної дії флокаліну. Оцінювали вплив ішемії–реперфузії та флокаліну на окисний метаболізм (пули  $H_2O_2$ , сечової кислоти, дієнових кон'югатів (ДК), малонового діальдегіду (МДА), ейкозаноїдів  $LTC_4$  та  $TxB_2$ , інтенсивність біосинтезу NO різними шляхами – окисним *de novo* (активність індукцибельної і конститутивної NO-синтази (iNOS), cNOS) і пули цитруліну) та неокисним реутилізаційним (активність нітратредуктази), пули стабільних метаболітів NO (нітрит- та нітрат-аніонів, низько- та високомолекулярних нітрозотіолів – НМНТ і ВМНТ відповідно), неорганічний фосфат та інші продукти деградації АТФ і ГТФ, зміни в гемоксигеназній реакції (пули білірубину та заліза), неокисний катаболізм L-аргініну (активність аргінази і пули сечовини) і вміст вільної арахідонової кислоти.

Інтенсивність оксидативного стресу оцінювали за вмістом пероксиду водню та

продуктів вільнорадикальної ланцюгової реакції перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) як ранніх (ДК), так і пізніх (МДА) [1, 5, 13]. Концентрацію сечової кислоти та сечовини визначали в колориметричній реакції в аліквотах гомогенатів серця за допомогою реактивів фірми «Філіст-Діагностика» (Україна). Вміст ейкозаноїдів LTC<sub>4</sub> і TxV<sub>2</sub> і їх попередника – арахідонової кислоти вимірювали в спиртових екстрактах із заморожених у рідкому азоті та розтертих у порошок кусочків серця. Концентрацію арахідонової кислоти визначали методом тонкошарової хроматографії на пластинках силікагелю з наступною елюцією та спектроскопією елюатів в 1-сантиметрових кварцевих кюветах при довжині хвилі 210 нм. Ейкозаноїди – за допомогою радіоімунного методу, користуючись стандартними добірками реактивів фірми «Amersham» (Англія). Радіоактивність проб вимірювали на лічильнику фірми «Beckman» (Німеччина). Активність кальційзалежних конститутивних (cNOS=eNOS+nNOS) та кальційнезалежної iNOS оцінювали за комбінацію класичного методу [19] та сучасну його модифікацію [11], пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. Останній визначали високочутливим колориметричним методом [10]. Вміст нітрит (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) та нітрат-аніона (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) – в безбілкових аліквотах гомогенатів серця в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [15] та бруциновим методом за допомогою спектрофотометрії [19]. Вміст нітрозотіолів – за Saville [16], з незалежним виявленням як пулів НМНТ, в основному нітрозоглутатіону в безбілкових аліквотах проб після гідролізу ковалентного зв'язку S-NO в молекулі нітрозоглутатіону двовалентним катіоном ртуті, так і ВМНТ – в основному нітрозильованих білків міокарда, після гідролізу аліквот цільних гомогенатів проб. Базальну аргіназну активність оцінювали [19] за

утворенням сечовини в інкубаційній суміші (1 мл), що містила L-аргінін і аліквоти проб в тріс-НСІ (“Calbiochem”) буфері (рН 8,0). Для визначення пулів сумарних продуктів деградації АТФ і ГТФ у плазмі крові спектрофотометрично вимірювали поглинання безбілкових аліквот крові при довжині хвилі 254 нм (D<sub>254</sub>), що характеризує наявність у розчині інозину, ксантину та гіпоксантину, що здійснювали на спектрофотометрі СФ-26 ЛОМО у кварцевих односантиметрових кюветах. Вміст неорганічного фосфату, що утворюється при послідовній деградації як АТФ, так і ГТФ фіксували колориметричним методом Островського [4]. Активність деградації гему захисним ферментом гемоксигеназою – за змінами концентрації двох продуктів його деградації: білірубіну і загального заліза. Білірубін визначали методом Яндрашика з використанням стандартної добірки реактивів (АТ «Реагент», Україна). Залізо – фотометричним методом з використанням добірки реактивів фірми «Філіст-Діагностика» (Україна). Загальний білок – за методом Бредфорд з використанням барвника Cumassi G-250 (“Ferrak”, Німеччина).

Отримані результати обробляли математично методом варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Origin 7.0. Достовірність результатів визначали за критерієм t Стьюдента. Значення P<0,05 розглядали як статистично достовірні.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У контрольних експериментах після ішемії–реперфузії міокарда показано, що в лівому шлуночку серця собак значно збільшується швидкість індукбельного de novo синтезу оксиду азоту (ферментом iNOS), зокрема в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу вона збільшується у 2,8, 6,7 і 18,2 раза відповідно порівняно із такою за умов нормоксії (рис. 1,а). Натомість швидкість сумарного конститутивного синтезу оксиду азоту (в

основному цитозольними ізоферментами eNOS і nNOS у мітохондріях), навпаки, після ішемії–реперфузії міокарда пригнічена, зокрема у зоні некрозу більше ніж удвічі (див. рис. 1,б). Після ішемії–реперфузії міокарда достовірно підвищується також неокисна деградація L-аргініну ферментом аргіназою (див. рис. 1,в), зокрема в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу активність аргінази збільшується порівняно з контролем у лівому шлуночку за умов нормоксії у 1,8, 4,1 та у 6,5 раза відповідно, що внаслідок обмеження пулів спільного субстрату (L-аргініну) створює умови для одночасної генерації суперок-

сиду й оксиду азоту всіма ізоферментами NOS, що у свою чергу призводить до утворення пероксинітриду та пошкоджувальної дії в кардіоміоцитах і порушення роботи серця. Після ішемії–реперфузії в лівому шлуночку активізується також реутилізаційний шлях синтезу оксиду азоту за дії різних нітрит- і нітратредуктаз. Зокрема, в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу активність НАДФ-залежної нітратредуктази збільшується порівняно з контролем за умов нормоксії у 9,4, 19,4 та у 52,7 раза відповідно (див. рис. 1,г). Водночас передішемічне активування  $K_{ATP}$ -каналів, у т.ч. мітохондріальних, за допомогою

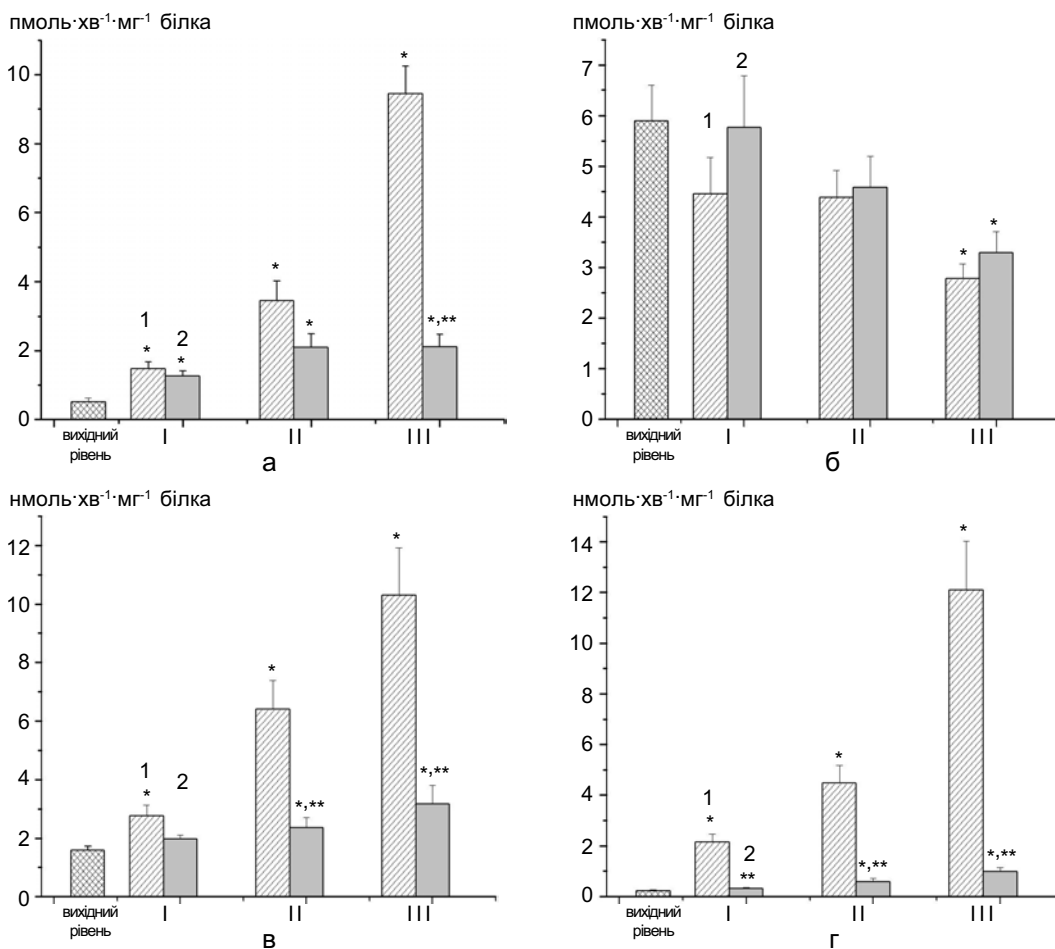


Рис. 1. Вплив флокаліну на активність ферментів індукційної (а), конститутивної (б) NO-синтази, аргінази (в) і нітратредуктази (г) при ішемії–реперфузії міокарда за умов нормоксії (вихідний рівень), у інтактній зоні (I), зоні ризику (II) та некрозу (III); 1 – ішемія–реперфузія, 2 – ішемія–реперфузія після введення флокаліну. \* P<0,05 порівняно з вихідним рівнем, \*\* P<0,05 порівняно з контролем (ішемія–реперфузія)



флокаліну інгібує стимульовані ішемією–реперфузією біохімічні реакції в міокарді. Так, активність iNOS за дії флокаліну зменшується в зоні некрозу порівняно з ішемією–реперфузією без його введення (див. рис. 1,а), у 4,5 раза. Аналогічні зміни при введенні флокаліну відбуваються і з активністю таких ферментів, як аргіназа та нітратредуктаза (див. рис. 1,в,г). Активність аргінази порівняно з експериментами без введення флокаліну достовірно зменшується в зоні ризику та некрозу в 2,7 та 3,3 раза відповідно. Активність нітратредуктази зменшується в інтактній зоні, ризику та некрозу у 6,8, 7,6 та 12,4 раза відповідно. Дещо кращими при введенні флокаліну є також показники активності cNOS (див. рис. 1,б). Зокрема, в інтактній зоні та зоні некрозу вона є збільшеною порівняно з експериментами з ішемією–реперфузією без введення флокаліну на 29,4 та 18,8 % відповідно. Раніше, в аналогічних експериментах при дослідженні дії флокаліну на динаміку біохімічних показників артеріальної крові в період ішемії та реперфузії теж було показано, що під час ішемії він не тільки запобігає зменшенню активності фермента cNOS, а навіть дещо підвищує її. Водночас під час реперфузії активність цього ферменту значно збільшувалася [3].

Таким чином, один із можливих кардіопротекторних механізмів дії флокаліну може полягати в інгібуванні надлишкового індукбельного *de novo* синтезу оксиду азоту та деградації L-аргініну аргіназою, що забезпечує збереження субстрату для конститутивного *de novo* синтезу оксиду азоту. Ще одним механізмом кардіопротекторного впливу флокаліну може бути його сильна антиішемічна дія, що підтверджується значним інгібуванням реутилізаційного синтезу NO, який відбувається винятково в умовах ішемії (збереження достатньої кількості молекул кисню в міокарді, його оксигенації, знову ж таки для

збереження конститутивного синтезу NO, дуже важливого для інгібування мітохондріальної пори і, тим самим, для зменшення загибелі кардіоміоцитів).

На рис. 2 показано вплив активації  $K_{ATP}$ -каналів флокаліном на зміни вмісту в різних ділянках ішемізованого серця пулів стабільних метаболітів оксиду азоту – нітрит- та нітрат-аніонів, НМНТ і ВМНТ, які утворюються за дії пероксинітриту і є маркерами його утворення, а також цитруліну.

У контрольних експериментах показано, що в лівому шлуночку серця собак достовірно зменшується вміст нітрит-аніона (у 7,3 раза) лише в зоні некрозу, де він знижується від  $514,6 \pm 39,4$  за умов нормоксії до  $70,2$  пмоль/мг білка  $\pm 13,5$  пмоль/мг білка (див. рис. 2,а). Введення флокаліну не тільки запобігає зменшенню цього показника, який утворюється спонтанно при окисненні оксиду азоту лише в окисненованих розчинах, а навпаки, сприяє деякому підвищенню його (див. рис. 2,а). Зокрема, в інтактній зоні він має тенденцію до збільшення порівняно з умовами нормоксії (на 79,0 %), можливо, завдяки властивості флокаліну розширювати коронарні судини серця та збільшувати приток крові, кисню та енергоресурсів до міокарда. Відмінність вмісту нітрит-аніона в різних зонах серця після ішемії–реперфузії при введенні флокаліну та без введення ще більша. При активації  $K_{ATP}$ -каналів вміст нітриту в згаданій зоні та зоні некрозу достовірно вищий (у 2,0 та у 8,6 раза відповідно). Таким чином, підвищення за дії флокаліну пулів нітрит-аніона в різних зонах лівого шлуночка серця є ще одним, додатковим до інгібування активності нітратредуктази, доказом потужної антиішемічної дії цього активатора  $K_{ATP}$ -каналів.

Цитрулін є супутнім продуктом *de novo* синтезу NO при окисненні L-аргініну за дії всіх ізоферментів NOS, а також метаболітом орнітинового та цитрулінового циклів, останній з яких активно функціонує в

кардіоміоцитах для ресинтезу L-аргініну. Синтезований у цьому циклі цитрулін використовується переважно ізоферментом iNOS для індукційного синтезу NO. В період ішемії–реперфузії в серці ми спосте-

рігали зниження пулів цитруліну (див. рис. 2,д). Це може бути зумовлено інтенсивною його утилізацією для ресинтезу аргініну, який використовується не лише для синтезу NO de novo (iNOS), але і аргіназою. 3

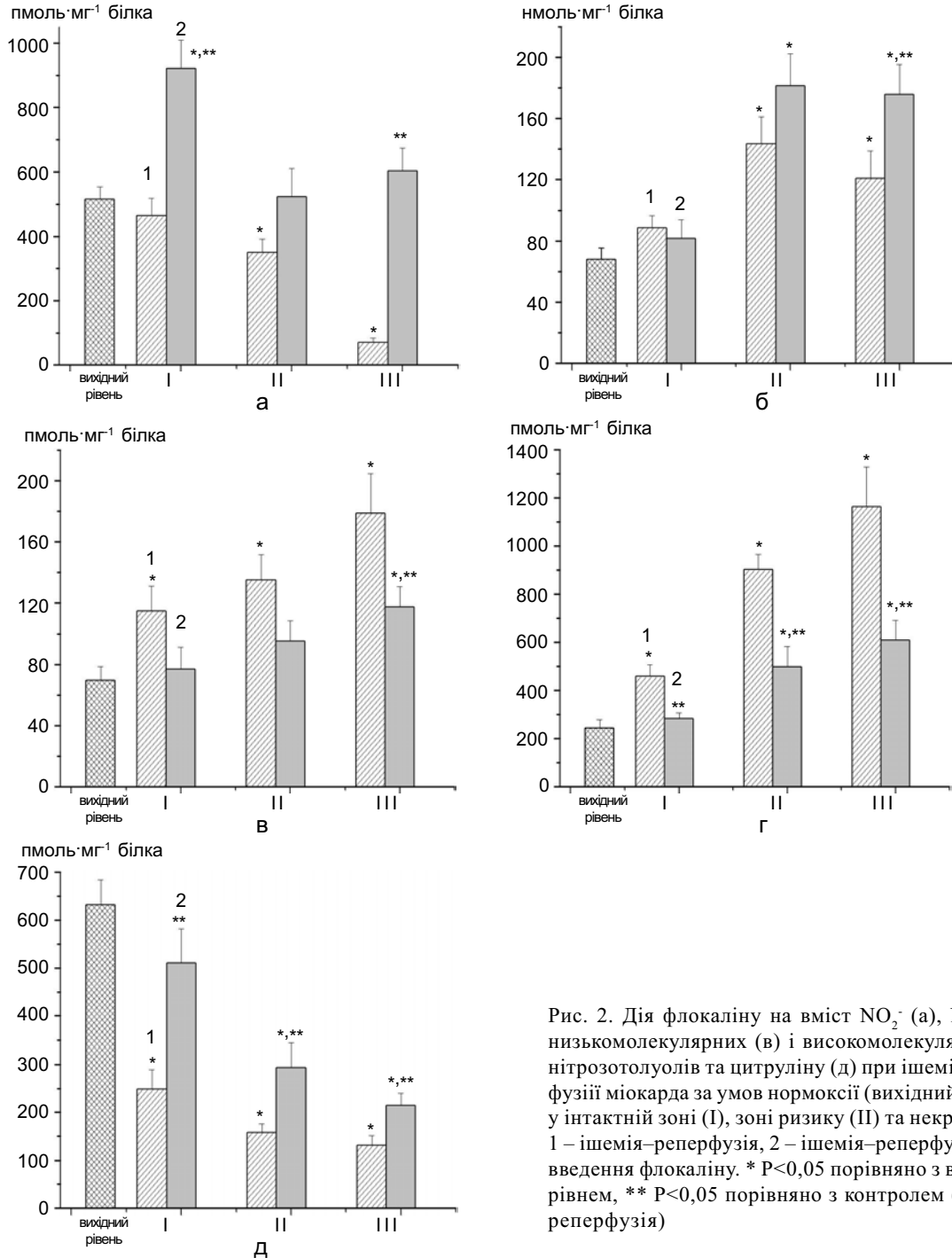


Рис. 2. Дія флокаліну на вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (а), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (б), низькомолекулярних (в) і високомолекулярних (г) нітрозотолуолів та цитруліну (д) при ішемії–реперфузії міокарда за умов нормоксії (вихідний рівень), у інтактній зоні (I), зоні ризику (II) та некрозу (III); 1 – ішемія–реперфузія, 2 – ішемія–реперфузія після введення флокаліну. \* P<0,05 порівняно з вихідним рівнем, \*\* P<0,05 порівняно з контролем (ішемія–реперфузія)

іншого боку, зниження вмісту цитруліну, що є природним інгібітором NOS (за механізмом зворотного зв'язку) за ішемії–реперфузії створює умови для більш інтенсивного індукцибельного синтезу NO. Флокалін запобігав значному зниженню вмісту цитруліну в міокарді (див. рис. 2,д), що корелює як із збереженням високої активності конститутивного синтезу оксиду азоту, особливо в інтактній зоні, так і зі зниженням активності аргінази, як було показано раніше (див. рис. 1,а,в).

Таким чином, активування  $K_{ATP}$ -каналів флокаліном при ішемії–реперфузії сприяє збереженню конститутивного біосинтезу NO на високому рівні, що може бути одним з механізмів його кардіопротекторної дії. А однією із вагомих протекторних функцій NO, що було синтезоване конститутивним шляхом, як відомо, є інгібування відкриття мітохондріальної пори та індукції апоптозу, в т.ч. іонами кальцію та вільними радикалами кисню [6, 14, 23].

У попередній роботі з субстанцією флокаліну [20] ми показали, що при ішемії–реперфузії в артеріальній крові при інгібуванні  $K_{ATP}$ -каналів пригнічуються вільнорадикальні реакції та підсилюються антиокиснювальні властивості крові: зменшується вміст  $H_2O_2$  і стабілізується активність ферментів антиоксидантної системи: каталази та супероксиддисмутази. Відомо, що утворення нітрозотіолів, як НМНТ (в основному це нітрозильований глутатіон), так і ВМНТ (нітрозильовані білки) корелює з пулами пероксинітриду і, таким чином, як і вміст нітрат-аніона є маркером на інтенсивність його утворення. У різних ділянках лівого шлуночка серця після ішемії–реперфузії міокарда вміст нітрозотіолів збільшується (див. рис. 2,в,г). Зокрема, в зоні некрозу вміст НМНТ підвищувався у 2,6 раза порівняно з контролем, а ВМНТ – у 3,7 та 4,8 раза відповідно і в зоні ризику, і в зоні некрозу. Водночас при введенні флокаліну пули НМНТ і ВМНТ (див. рис. 2,в,г) мали тенденцію до зниження. Акти-

ватор  $K_{ATP}$ -каналів стабілізував рівні нітрозотіолів, можливо, внаслідок інгібування генерації пероксинітриду. Про обмеження його утворення флокаліном можуть свідчити також дещо вища (див. рис. 2,б), на відміну від експериментів без нього, концентрація нітрат-аніона, який генерується в основному неферментативно при нерадикальному розпаді пероксинітриду. Збільшення пулів нітрату при активації калієвих каналів може вказувати на те, що пероксинітрид меншою мірою розпадається на токсичні радикали –  $\cdot OH$  і  $\cdot NO_2$ , які є ініціаторами ПОЛ, а більшою мірою на нетоксичний нітрат. Підтвердженням цьому є також зниження вмісту НМНТ і ВМНТ (див. рис. 2,в,г). Підвищення пулів нітрат-аніона є додатковим доказом інгібування флокаліном активності нітратредуктази, адже його зменшення при ішемії–реперфузії може відбуватися внаслідок інтенсивної утилізації нітрату вищезазначеним ферментом для реутилізаційного синтезу NO.

Таким чином, ці результати, як і дані щодо пригнічення утворення супероксиду, необхідного для утворення пероксинітриду, про що може свідчити зниження пулів як сечової кислоти (рис. 3,г) за дії активованої при реперфузії ксантинооксидази (нуклеотидного генератора супероксиду), так і ейкозаноїдів (рис. 4,б,в), що утворюються паралельно з супероксидом його ліпідними генераторами (ліпоксигеназою і циклооксигеназою при утворенні  $LTC_4$  і  $TxB_2$  відповідно), вказують на ще один можливий механізм кардіопротекторної дії флокаліну, який полягає у інгібуванні генерації супероксиду, індукцибельного *de novo* та реутилізаційного синтезу оксиду азоту, що зумовлює обмеження утворення токсичного пероксинітриду (в т.ч. активатора мітохондріальної пори і апоптозу) в кардіоміоцитах за ішемії–реперфузії.

Про обмеження як оксидативного (генерація активних форм кисню (АФК)), так і нітративного (утворення пероксинітриду) стресу за дії флокаліну можуть свідчити

також зміни вмісту стабільної активної форми кисню ( $H_2O_2$ ) і продуктів неферментативного (ДК і МДА) та ферментативного ( $LTC_4$  і  $TxB_2$ ) окиснення ліпідів (див. рис. 3, 4). Пероксид водню утворюється в основному ферментативно із супероксид-аніона за дії супероксиддисмутази (СОД) і є маркером на окисний стрес, який розвивається за ішемії–реперфузії. Зокрема, в експериментах без флокаліну вміст  $H_2O_2$  в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу збільшувався порівняно з нормоксією у 2,4; 5,2 та 7,2 рази відповідно (див. рис. 3,а), вказуючи на значне зростання генерації супероксиду, про що ми згадували раніше.

Водночас введення флокаліну достовірно зменшувало пули пероксиду водню в зонах ризику і некрозу серця у 2,2 та майже в 3 рази відповідно. Зниження вмісту  $H_2O_2$  у ділянках лівого шлуночка ішемізованого серця свідчить про зменшення утворення в них супероксид-аніона та потужну антиоксидантну дію флокаліну, можливо, через активацію  $K_{ATP}$ -каналів (див. рис. 3,а). Підтвердженням цього може бути і менше зростання в різних ділянках серця порівняно з ішемією–реперфузією пулів як ДК, так і МДА продуктів ПОЛ (див. рис. 3,б,в). Зокрема, в експериментах без флокаліну вміст ДК в інтактній зоні, зоні ризику та

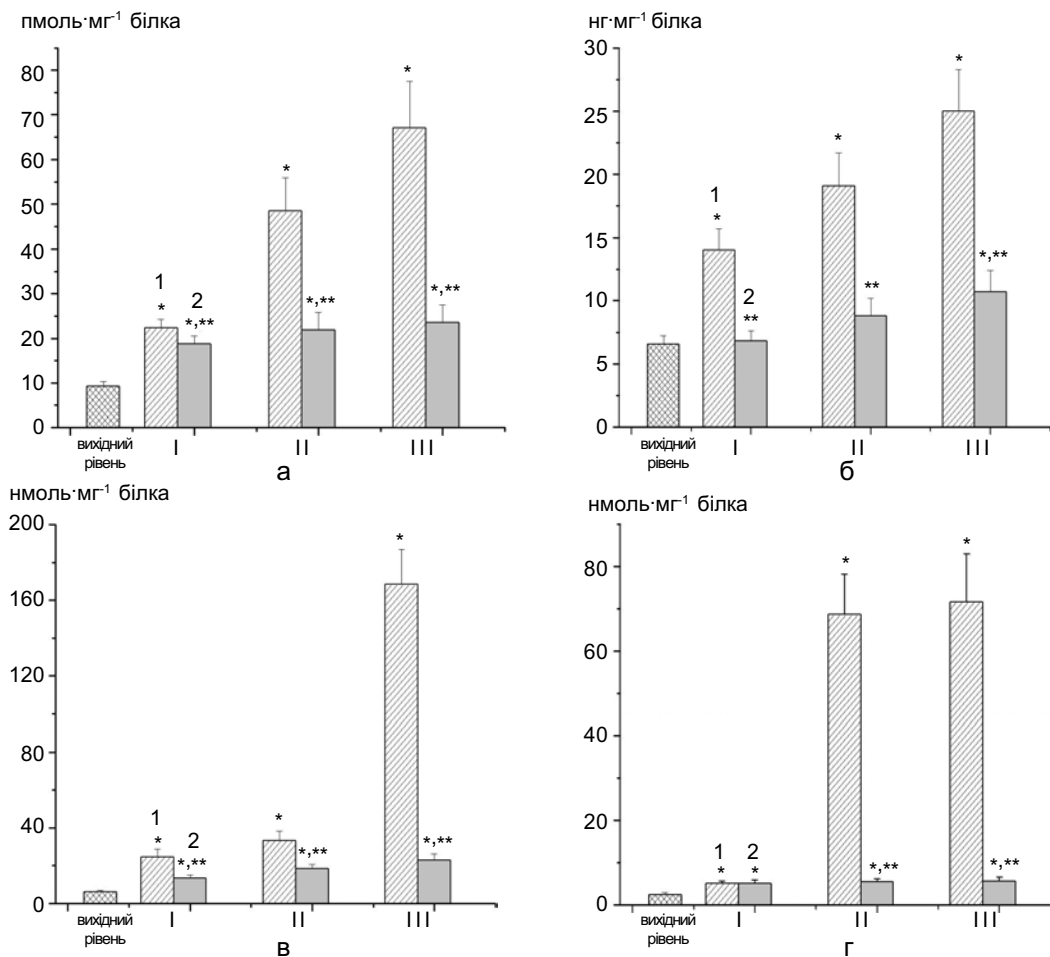


Рис. 3. Залежність вмісту  $H_2O_2$  (а), дієнових кон'югатів (б), малонового діальдегіду (в) та сечової кислоти (г) при ішемії–реперфузії міокарда за умов нормоксії (вихідний рівень), у інтактній зоні (I), зоні ризику (II) та некрозу (III); 1 – ішемія–реперфузія, 2 – ішемія–реперфузія після введення флокаліну. \*  $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем, \*\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем (ішемія–реперфузія)

некрозу достовірно збільшувався порівняно з вихідним контролем (нормоксія) у 2,1, 2,9 та 3,8 рази відповідно (див. рис. 3,б). Водночас активація цих каналів попереджувала утворення ДК – зокрема, в інтактній зоні їх вміст становив ( $6,8 \pm 0,8$ ) нг/мг білка, будучи таким же як і за нормоксії ( $6,56 \pm 0,66$ ) нг/мг білка, тоді як без активації  $K_{ATP}$ -каналів флокаліном пули ДК у цій зоні зростали більш ніж удвічі. Аналогічні зміни відбувались і в зоні ризику та некрозу (див. рис. 3,б). ДК утворюються при неферментативному окисненні ліпідів, а зниження їх вмісту свідчить про потужну антиоксидантну дію флокаліну та інгібування утворення ініціаторів ПОЛ:  $\cdot OH$ -радикала (при перетворенні  $H_2O_2$  в реакціях Фентона і Хабер–Вайса за наявності заліза) та  $\cdot OH$  і  $\cdot NO_2$ , що можуть утворюватися при розпаді пероксинітриту.

Подібні зміни відбувались і зі вмістом кінцевого продукту ПОЛ – МДА (див. рис. 3,в). При ішемії–реперфузії його пули в інтактній зоні та зоні ризику збільшувалися порівняно з нормоксією у 4,0 та 5,4 рази відповідно, у зоні некрозу – істотно у 27,1 рази (див. рис. 3,в). Водночас при введенні флокаліну та активації  $K_{ATP}$ -каналів значно укорочувалися вільнорадикальні ланцюги ПОЛ, про що свідчить потужне зменшення утворення МДА в протектованому міокарді порівняно з непротектованим (за ішемії–реперфузії), а саме в інтактній зоні у 2,2 рази, зоні ризику майже у 3 рази, а у зоні некрозу у 7,3 рази. Отже, флокалін може чинити не лише антиоксидантну, але і антирадикальну дію, укорочуючи (обриваючи) ланцюги реакції ПОЛ.

Флокалін чинить виражену антиоксидантну дію, інгібуючи ПОЛ зменшенням пулів не лише  $H_2O_2$ , але, і супероксид-аніона ( $O_2^{\cdot -}$ ), інгібуючи такі його генератори, як ксантиноксидаза (про що свідчить зниження вмісту сечової кислоти; див. рис. 3,г), ліпоксигеназа (зниження вмісту  $LT C_4$ ; див. рис. 4,б) і циклооксигеназа (зниження вмісту  $TxB_2$ ; див. рис. 4,в).

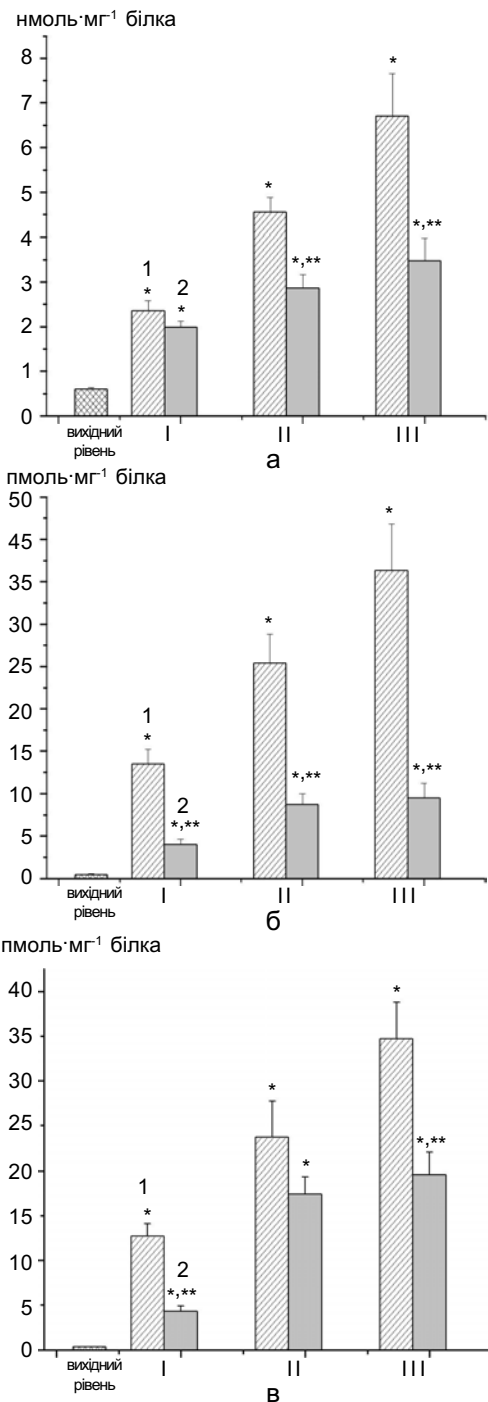


Рис. 4 Вплив флокаліну на вміст арахідонової кислоти (а), пептидолейкотриєну  $C_4$  (б) та тромбоксану  $B_2$  (в) при ішемії–реперфузії міокарда за умов нормоксії (вихідний рівень), у інтактній зоні (I), зоні ризику (II) та некрозу (III); 1 – ішемія–реперфузія, 2 – ішемія–реперфузія після введення флокаліну. \*  $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем, \*\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем (ішемія–реперфузія)

Концентрація сечової кислоти після ішемії–реперфузії порівняно з нормоксією в інтактній зоні збільшувалася у 2,1 раза, тоді як у зоні ризику та некрозу – майже у 30 разів, (див. рис. 3,г). Активування калієвих каналів флокаліном значно зменшувало утворення сечової кислоти (а, отже, і супероксиду) у зоні ризику та некрозу в 12,5 раза. При цьому її вміст залишався практично однаковим у різних ділянках ішемізованого серця (див. рис. 3,г), будучи лише приблизно удвічі вищим, ніж за умов нормоксії. Сечова кислота утворюється в ксантинооксидазній реакції, коли одночасно з нею генерується супероксид і, таким чином, вона є тестом на активність цього процесу. Він є дуже важливим з огляду на те, що за ішемії–реперфузії одночасно активується не лише синтез супероксиду, що відомо давно, але і відбувається інтенсивний синтез NO ізоферментом iNOS (див. рис. 1,а), що є передумовою для утворення пероксинітриду ( $\text{NO} + \text{O}_2^- = \text{ONOO}^-$ ). Концентрація сечової кислоти у крові – важливий тест для встановлення пошкодження роботи серця. Як і сечовина, сечова кислота в низьких концентраціях є потентним водорозчинним антиоксидантом внаслідок зв'язування пероксинітриду і OH- та внаслідок інгібування ксантинооксидазної реакції за механізмом зворотного зв'язку. У високих концентраціях вона, є токсичною, і тому її зниження може бути тестом на нормалізацію роботи серця в процесі реперфузії після тривалої ішемії, а також одним із механізмів кардіопротекторної дії флокаліну.

За ішемії–реперфузії в міокарді значно підвищується вміст LTC<sub>4</sub>, а саме в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу він збільшується у 31,4; 59,1 та 84,4 раза відповідно (див. рис. 4,б). Аналогічно збільшується і вміст TxV<sub>2</sub> – у 35,3 та 65,8 раза в інтактній зоні та зоні ризику, та майже на два порядки у зоні некрозу (див. рис. 4,в). Передішемічне активування K<sub>ATФ</sub>-каналів флокаліном

значно зменшувало утворення як LTC<sub>4</sub>, так і TxV<sub>2</sub>. Зокрема, вміст LTC<sub>4</sub> у 3,4; 2,9 та 3,8 раза в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу відповідно (від 0,43 пмоль/мг білка ± 0,11 пмоль/мг білка за нормоксії до 4,0 ± 0,6; 8,7 ± 1,3 та 9,5 пмоль/мг білка ± 1,7 пмоль/мг білка), а вміст TxV<sub>2</sub> майже у 3 рази був меншим від контрольного (після ішемії–реперфузії без флокаліну) лише в інтактній зоні (4,3 пмоль/мг білка ± 0,6 пмоль/мг білка за кардіопротекції щодо 12,7 пмоль/мг білка ± 1,4 пмоль/мг білка без неї).

Зменшення утворення окиснених метаболітів арахідонової кислоти за дії флокаліну, можливо, відбувається не тільки через пригнічення ліпоксинази та циклооксигеназного шляхів її метаболізму, а і внаслідок зменшення пулів самої кислоти, які за допомогою активації K<sub>ATФ</sub>-каналів флокаліном за ішемії–реперфузії міокарда мають тенденцію до зниження у зонах ризику та некрозу ішемізованого серця у 1,6 та 1,9 раза відповідно (див. рис. 4,а). Зменшення вмісту вільної арахідонової кислоти при активації K<sub>ATФ</sub>-каналів, можливо, відбувається завдяки інгібуванню L-типу кальцієвих каналів цитоплазматичної мембрани, що супроводжується зниженням концентрації вільного кальцію у цитоплазмі та пригніченням активності кальційзалежних ферментів, зокрема фосфоліпази A<sub>2</sub>. Властивість інгібувати високопорогові кальцієві канали була описана і для флокаліну [2].

При ішемії–реперфузії міокарда в зоні ризику та особливо некрозу значно збільшується вміст пулів сечовини (рис. 5,а). У низьких концентраціях вона є хелатором вільного заліза, тим самим проявляючи антиоксидантні властивості внаслідок інгібування генерації ·OH, та інгібітором ресинтезу аргініну в цитруліновому циклі. Пряме її включення в цикл замість аспартату призводить до утворення токсичного уреїдосукцинату, який блокує цикл. При ішемії–реперфузії активність аргінази (див. рис. 1,в) і пули сечовини значно зростають,

передбачаючи можливість інтенсивного утворення уреїдосукцинату. В таких високих концентраціях сечовина може чинити кардіотоксичну дію. При фармакологічному прекодиціюванні міокарда флокаліном (активуванні  $K_{ATP}$ -каналів) вміст сечовини в різних зонах серця після ішемії–реперфузії статистично не відрізняється від такого в умовах нормоксії. Таким чином, кардіопротекторна дія активації  $K_{ATP}$ -каналів флокаліном може також полягати у інгібуванні утворення високого вмісту сечовини внаслідок зниження активності аргінази.

Відомо, що за ішемії–реперфузії в кардіоміоцитах та мітохондріях посилюється деградація гему, яка здійснюється захисним стрес-ферментом гемоксигеназою (гем = білірубін + CO + Fe). В наших дослідах про це свідчить значне збільшення як вмісту білірубіну (в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу у 7,1, 8,3 та 9 разів відповідно), так і заліза (у 4,6 і 6,3 раза у зоні ризику та некрозу). Флокалін не тільки не інгібував цей процес, але навіть його посилював (вміст білірубіну в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу порівняно з нормоксією збільшувався у 8,9; 11,3 і 17,8 раза відповідно, а заліза у зоні ризику та некрозу у 9,5 і 20,1 раза відповідно), що також може бути одним із механізмів його кардіопротекторного впливу, оскільки відомо про значну нейро- і кардіопротекторну дію двох продуктів гемоксигеназної реакції – білірубіну і CO (оксиду вуглецю). Зокрема, останній, що може генеруватись, як показують результати його копродуктів, у великих кількостях при деградації гему при фармакологічному прекодиціюванні та за допомогою флокаліну, може чинити протекторну дію при ішемії–реперфузії подібно до оксиду азоту [6, 12].

При ішемії–реперфузії міокарда також значно підвищується вміст продуктів деградації пуринових нуклеотидів: АТФ і ГТФ – ксантину, гіпоксантину та інозину (речовин, що мають оптичну густина при

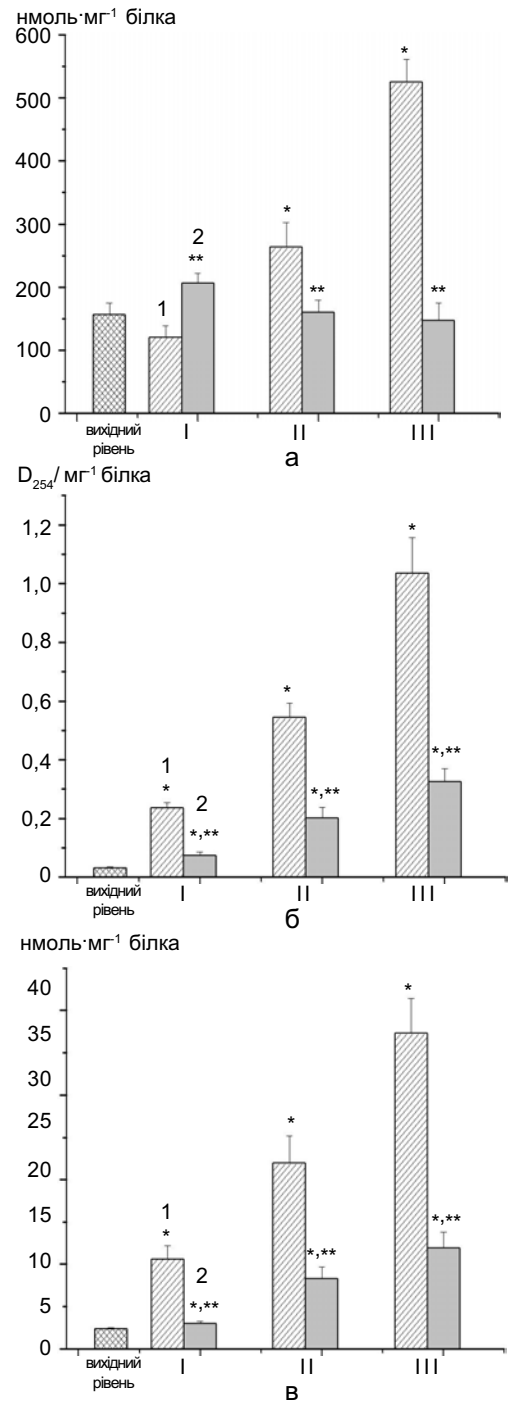


Рис. 5. Дія флокаліну на вміст сечовини (а), продуктів деградації пуринових нуклеотидів (б) та неорганічного фосфату (в) при ішемії–реперфузії міокарда за умов нормоксії (вихідний рівень), у інтактній зоні (I), зоні ризику (II) та некрозу (III); 1 – ішемія–реперфузія, 2 – ішемія–реперфузія після введення флокаліну. \*  $P < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем, \*\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем (ішемія–реперфузія)

$\lambda = 254$  нм), а саме у 7,4, 17,0 та 32,4 рази, та неорганічного фосфату – у 4,5, 9,2 та 15,7 рази в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу відповідно (див. рис. 5,б,в). Зменшення вмісту АТФ, з одного боку, погіршує роботу серця, з іншого, спричиняє, залежно від ступеня зниження його вмісту і ГТФ у мітохондріях апоптоз чи некроз кардіоміоцитів та ушкодження міокарда. Відомо, що активація  $K_{ATP}$ -каналів призводить до зменшення використання енергоресурсів клітини та до збереження запасів АТФ, що є особливо важливо перед ішемією. Введення флокаліну значно знижувало вміст продуктів деградації пуринових нуклеотидів ( $D_{254}$ ) в міокарді, а саме у 3,2 рази в інтактній зоні та зоні некрозу та у 2,7 рази в зоні ризику порівняно з непротектованим контролем (ішемія–реперфузія), при цьому вміст неорганічного фосфату знижувався в цих зонах у 3,6, 2,6 та 3,1 рази (в інтактній зоні, зоні ризику та некрозу відповідно) порівняно з ішемією–реперфузією без його введення (див. рис. 5,в). Отже, за фармакологічного прекодиціювання флокаліном знижувалася деградація молекул АТФ (шлях до апоптозу) і ГТФ (шлях до некрозу) в кардіоміоцитах, що може бути ще одним важливим механізмом кардіопротекторної дії флокаліну.

Таким чином, дослідження змін біохімічних показників у різних зонах серця за ішемії–реперфузії та дії флокаліну дало змогу ідентифікувати декілька можливих кардіопротекторних механізмів, що розвиваються при відкриванні  $K_{ATP}$ -каналів сарколемальної та мітохондріальної мембран. Вони полягають в інгібуванні окисного метаболізму внаслідок обмеження генерації АФК – супероксид-аніона, пероксиду водню та гідроксил-радикала (оксидативного стресу, в т.ч. ПОЛ); інгібуванні надлишкового індукційного і реутилізаційного синтезу оксиду азоту й утворення пероксинітриту (нітрозативного стресу, що також призводить до активації ПОЛ через вільнорадикальний розпад пероксинітриту);

інгібуванні утворення вільної арахідонової кислоти та ейкозаноїдів; інгібуванні деградації АТФ і ГТФ; та, навпаки, в стимуляції гемоксигеназної реакції. Одним із кардіопротекторних механізмів можна вважати також пригнічення деградації L-аргініну аргіназою й утворення сечовини. Дуже важливим, можливо, одним із головних механізмів кардіопротекторної дії флокаліну є стабілізація конститутивного *de novo* синтезу оксиду азоту, що разом зі зменшенням навантаження мітохондрії кальцієм попереджує відкривання мітохондріальної транспортної пори та індукваного нею некрозу та апоптозу кардіоміоцитів.

**Р.Б. Струтинский, А.В. Коцюрба,  
А.П. Нещерет, Р.А. Ровенец, А.А. Мойбенко**

#### **ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА В МИОКАРДЕ ПРИ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ И АКТИВАЦИИ АТФ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ**

В опытах на анестезированных собаках с воспроизведением экспериментальной ишемии (90 мин) и реперфузии (180 мин) исследовано изменения биохимических показателей в разных зонах сердца: интактной, риска и некроза, при внутрижелудочном введении лекарственной формы (таблетки) фторсодержащего активатора АТФ-чувствительных калиевых каналов флокалина в дозе 2,2 мг/кг. Исследовали биохимические показатели, которые характеризуют возможные механизмы действия флокалина – окислительный метаболизм (пулы  $H_2O_2$ , мочево́й кислоты, диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, ейкозаноидов  $LTC_4$  и  $TxB_2$ ), биосинтез NO различными путями – окислительным *de novo* (активность индуцибельной, конститутивной NO-синтаз и пулы цитрулина) и неокислительным реутилизативным (активность нитрат-редуктазы), пулы стабильных метаболитов NO (нитрит- и нитрат-анионов, низко- и высоко-молекулярных нитрозотиолов), неорганический фосфат и другие продукты деградации АТФ и ГТФ, изменения в гемоксигеназной реакции (пулы билирубина и железа), неокислительный метаболизм L-аргинаина (активность аргиназы и пулы мочевины) и содержание свободной арахидонової кислоти. Анализ полученных данных позволил очертить несколько возможных кардиопротекторных механизмов флокалина. Они заключаются в ингибировании окислительного метаболизма за счет ограничения генерации свободных радикалов кислорода и азота, ингибировании гидролиза фосфолипидов и, тем самым, образования свободной арахидонової кислоти и патогенных в условиях ишемии



миокарда эйкозаноидов, ингибировании деградации АТФ и ГТФ и, возможно, в стимуляции защитной гемоксигеназной реакции. Одним из важных кардиопротекторных механизмов можно считать угнетение индуцибельного *de novo* и реутилизативного синтеза оксида азота и деградации аргинина аргиназой и, напротив, в сохранении конститутивного *de novo* синтеза оксида азота. Сохранение последнего на высоком уровне и вышеупомянутые изменения в окислительном метаболизме, предотвращающие образование токсического пероксинитрита, указывают на возможность участия в кардиопротекторном эффекте флокалина митохондриальной транспортной поры за счет предупреждения ее открытия и, как следствие, ингибирование индуцируемого ею апоптоза и/или некроза кардиомиоцитов.

Ключевые слова: аденозинтрифосфатчувствительные калиевые каналы, флокалин, ишемия–реперфузия, оксидативный стресс, нитрозативный стресс, перекисное окисление липидов, *de novo* синтез NO, реутилизационный синтез NO.

**R.B. Strutynskiy, A.V. Kotsuruba,  
A.P. Neshcheret, R.A. Rovenets, A.A. Moibenko**

#### **THE CHANGES OF METABOLISM IN MYOCARDIUM AT ISCHEMIA- REPERFUSION AND ACTIVATING OF THE ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS**

In experiments on the anaesthetized dogs with modeling of experimental ischemia (90 min) and reperfusion (180 min) it was investigated the changes of biochemical processes in the different areas of heart (intact, risk and necrotic zone) during intragastric introduction of medicinal form (tablets) of flocalin (the fluorine-containing opener of ATP-sensitive potassium channels) in a dose 2,2 mg/kg. The data analysis allowed to define a few possible cardioprotective mechanisms of flocalin action at ischemia-reperfusion conditions: the preservation of sufficient levels of *de novo* (by eNOS) NO synthesis, an inhibition of *de novo* (by iNOS) and salvage (by NADH-dependent nitratoreductase) NO synthesis, an inhibition of L-arginine degradation by arginase, an inhibition of oxidizing metabolism due to limitation of ROS and RNS generation, inhibition of free arachidonic acid and eicosanoids synthesis, inhibition of ATP and GTP degradations and, possibly, stimulation of protective haem degradation. These changes may prevent formation of toxic peroxynitrite and suggest the possibility of participating in flocalin-mediated cardioprotective effects of warning a mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening and inhibition of apoptosis and/or necrosis of cardiomyocytes induced by it.

Key words:  $K_{ATP}$  channels, flocalin, ischemia-reperfusion, oxidative stress, nitrozative stress, lipid peroxidation, *de novo* synthesis of NO, salvage synthesis of NO

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

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело. – 1988. – №2. – С. 60–64.
2. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Ю.Л., Войтичук О.И., Шуба Я.М. Возможные механизмы кардиопротекторных эффектов активации  $K_{ATP}$ -каналов при ишемии–реперфузии миокарда // Бюл. ХХ-читань ім. В.В. Підвисоцького (26–27 трав. 2011). – Одеса, 2011. – С. 135–136.
3. Мойбенко О.О., Струтинський Р.Б., Ягупольський Л.М., Мохорт М.А., Шаламай А.С. Організація заводського виготовлення препарату Флокалін – нового вітчизняного міотропного спазмолітика і кардіопротектора // Наука та інновації. – 2009. – 5, №1. – С. 80–84.
4. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике – М.: Медицина, 1969. – 437 с.
5. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. – В кн.: Совр. методы в биохимии / Под ред. Ореховича В.Н. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–67.
6. Струтинський Р.Б., Пивовар С.Н., Мойбенко А.А. АТФ–зависимые калиевые каналы и их роль как центрального звена кардиопротекции при ишемии–реперфузии миокарда. – В кн.: Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008. – С. 206–252.
7. Струтинський Р.Б., Пивовар С.М., Тумановська Л.В., Мойбенко О.О. Кардіопротекторні ефекти флокаліну: відносна роль активації сарколемальних та мітохондріальних аденозинтрифосфатзалежних калієвих  $K_{ATP}$ -каналів // Фізіол. журн. – 2008. – 54, №6. – С. 15–23.
8. Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Нещерет О.П., Тумановська Л.В., Бойчук Т.М., Джуран Б.В., Мойбенко О.О. Вплив лікарської форми флокаліну на перебіг ішемії–реперфузії міокарда // Там само. – 2011. – 57, №1. – С. 55–65.
9. 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
10. 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.
11. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. Increased activity and expression of  $Ca^{2+}$ -dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277, № 5. – P. 797–804.
12. Coceani F. Carbon monoxide in vasoregulation: The promise and the challenge // Circulat. Res. – 2000. – 86, №12. – P. 1184–1186.

13. Conte D., Narindrasorasa K.S., Sarkar B. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – **271**, №9. – P. 5125–5130.
14. Das A., Smolenski A., Lohmann SM, Kukreja RC. Cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in adult cardiomyocyte // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, №50. – P. 38644–38652.
15. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* – 1982. – **126**, № 1. – P.131–138.
16. Gerdel D., Cederbaum A.J. Inhibition of the catalytic activity of alkoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc // *Biochemistry.* – 1996. – **35**, № 50. – P. 16186–16194.
17. Inoue I., Nagase H., Kishi K., Higuti T. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the mitochondrial inner membrane // *Nature.* – 1991. – **352**, №6332. – P. 244–247.
18. Noma A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle // *Ibid.* – 1983. – **305**, №5930. – P. 147–148.
19. Salter M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide syntases // *FEBS Lett.* – 1991. – **291**, № 1. – P. 145–149.
20. Strutynskiy R.B., Kotsuruba A.V., Neshcheret A.P., Shysh A.N., Rovenets R.A., Moibenko A.A. Cardioprotective effects of ATP-sensitive potassium channels activation in experiments in vivo: influence on biochemical parameters of blood following ischemia-reperfusion of myocardium // *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* – 2010. – **1**, №4. – P. 305–313.
21. Strutynskiy R.B., Neshcheret A.P., Tumanovska L.V., Rovenets R.A., Moibenko A.A. Cardioprotective effects of flocalin in *in vivo* experiments: influence of the hemodynamic and on the damage of myocardium under ischemia-reperfusion // *Ibid.* – №3. – C. 211–218.
22. Voitychuk O.I., Strutynskiy R.B., Yagupolskii L.M., Tinker A., Moibenko O.O., Shuba Y.M. Sarcolemmal cardiac KATP channels as a target for the cardioprotective effects of the fluorine-containing pinacidil analogue flocalin // *Brit. J. Pharmacol.* – 2011.– **162**, №3. – P. 701–711.
23. West M., Rokosh G., Clark D. Nitric oxide prevent mitochondrial permeability transition during ischemic-reperfusion: implication for the cardioprotective effects of late preconditioning // *Circulation.* – 2004. – 110. – P.III236.

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

*Матеріал надійшов до  
редакції 26.04.2011*

А.В. Коцюрuba, Ю.П.Коркач, С.О. Таланов, О.В.Базілюк, Л.Г. Степаненко, В.Ф.Сагач

## Вікові особливості змін аргіназо-NO-синтазної системи в серці щурів в умовах адаптації до тривалих фізичних навантажень плаванням

*Вивчали скоротливу активність ізольованого серця дорослих щурів в умовах адаптації до тривалих фізичних навантажень плаванням. Показано, що завдяки стимуляції продукції NO у мітохондріальному компартменті серця тренуваних дорослих щурів збільшується сила скорочень лівого шлуночка, зменшується жорсткість міокарда, поліпшується як систолічна, так і діастолічна функція серця. У мітохондріях серця тренуваних плаванням дорослих щурів встановлена стимуляція активності усіх досліджуваних ферментів синтезу оксиду азоту – індукцйбельної, конститутивної NO-синтази (de novo синтез) і нітратредуктази (неокисний реутилізаційний синтез), а у старих – лише ферментів окисного шляху de novo. Тренування достовірно знижувало мітохондріальні пули нітрат-аніона у дорослих щурів, а у старих – вміст сечовини; пули нітрит-аніона при цьому не змінювалися. Мітохондріальні пули  $H_2O_2$  після тренування у дорослих щурів підвищувалися, тоді як у старих, навпаки, знижувалися, вміст сечової кислоти (маркера активності ксантиноксидази) у щурів обох вікових груп після курсу тренувань зменшувався. Фізичне навантаження призводило до значного збільшення індексу оксигенації в мітохондріях дорослих щурів і до зниження активності мітохондріальної аргінази II. Отримані результати дають підставу вважати, що плавання як один із видів фізичних навантажень стимулює продукцію NO в мітохондріях дорослих і старих щурів, а відтак може розглядатися ефективним засобом немедикаментозної корекції вікової дисфункції серця.*

*Ключові слова: тренування, старіння, серце, мітохондрії, оксид азоту, окисний метаболізм.*

### ВСТУП

Відомо, що регулярні помірні фізичні навантаження, як і хронічна чи періодична помірна гіпоксія та фармакологічне прекондиціонування, сприяють покращенню функціонального стану серцево-судинної системи, особливо у людей похилого віку, завдяки стимуляції внутрішньомітохондріальних факторів, що регулюють мітохондріальну пору (МП). Ендогенна протективна дія на мітохондрії має свої вікові особливості, виявлення яких є актуальною проблемою. Протягом тривалого часу проводився пошук причин позитивних ефектів ішемічного [9], фармакологічного прекондиціонування [11, 13, 14], тривалих тренувань [4, 15],

інтервальної та хронічної помірної гіпоксії [5, 8] серед показників, що характеризують систему синтезу оксиду азоту – одного із ключових регуляторів цього процесу, особливо транспорту кальцію та відкриття МП [2, 3]. Ми навчилися тестувати інтенсивність двох шляхів de novo синтезу NO – конститутивного та індукцйбельного, що потребують кисню, та безкисневого реутилізаційного його синтезу. Ми вивчали не лише NO-синтазну систему (NOS), а розпочали комплексно досліджувати аргіназо-NO-синтазну систему як нерозривне ціле [1, 6, 10, 12]. Причини цього були вагомими, оскільки дія фармакологічних і фізіологічних регуляторів процесу прекондиціонування/сигналювання мітохондрій і загалом вазо-

© А.В. Коцюрuba, Ю.П.Коркач, С.О. Таланов, О.В.Базілюк, Л.Г. Степаненко, В.Ф.Сагач

і кардіопротектування не обмежується окисним (синтез оксиду азоту), але поширюється і на неокисний (синтез сечовини) метаболізм L-аргініну. Останній у свою чергу конкурує з окисним його метаболізмом, особливо у мітохондріальному компартменті, де локалізована високоактивна індукцибельна ізоформа аргінази – аргіназа II. Ця ізоформа може забезпечувати синтез глутамату в мітохондріях [7], який при декарбоксілюванні утворює  $\gamma$ -аміномасляну кислоту (ГАМК). Вона може бути інгібітором відкриття МП завдяки взаємодії з периферичним (мітохондріальним) бенздіазепіновим рецептором, що є структурним компонентом цієї пори а, отже, сприяти ефективності адаптації і прекодиціюванню кардіоміоцитів, у т.ч. і до тривалих фізичних навантажень.

Нещодавно ми показали, що в умовах адаптації до плавання в аорті щурів різного віку підвищується синтез NO і, навпаки, інгібується синтез сечовини, внаслідок чого суттєво поліпшуються її скорочувальні властивості [21]. При цьому набухання мітохондрій серця дорослих щурів після тривалих фізичних навантажень було меншим у 1,4 раза, а у старих тварин аж удвічі порівняно з контрольними нетренованими щурами [14].

Метою цієї роботи було дослідити дію тривалих помірних фізичних навантажень плаванням на функцію серця, окисний метаболізм і аргіназо-NO-синтазну систему у мітохондріях серця щурів різного віку.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на щурах-самцях лінії Вістар віком 6–7 міс (дорослі) і 21 міс (старі) до (контроль) та після курсу фізичного навантаження плаванням (дослід). Умови підготовки проб для біохімічних досліджень і схему тренування описано нами раніше [16].

*Фізіологічні дослідження.* Ізольоване серце для тимчасової зупинки занурювали у

холодний (5°C) розчин Кребса–Хензеляйта, потім за аорту підвішували на канюлю термостатованої камери. Перфузію коронарних судин проводили при постійному тиску (75–80 мм рт. ст.) модифікованим розчином Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 118,0; KCl – 4,7; MgSO<sub>4</sub> – 1,2; NaHCO<sub>3</sub> – 24,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; глюкоза – 10,0. Цей розчин насичували карбогеном (O<sub>2</sub> 95 %, CO<sub>2</sub> 5 %); рН 7,4 при 37°C. у порожнину лівого шлуночка вводили поліетиленовий балончик, з'єднаний з тензодатчиком. Для оцінки діастолічної жорсткості міокарда та залежності сили скорочення лівого шлуночка від його попереднього розтягнення дозовано збільшували об'єм балончика на 33 мкл. Реєстрували зміни кінцевого діастолічного тиску та тиску, що розвивається в лівому шлуночку. діастолічну жорсткість міокарда розраховували як співвідношення приростів діастолічного тиску до об'єму балончика.

*Біохімічні дослідження.* У аліквотах проб, виділених із серця мітохондрій, визначали, як описано раніше [11, 13] активність ферментів кальційзалежного (конститутивного, cNOS=eNOS+nNOS) і кальційнезалежного (індукцибельного, iNOS) шляхів de novo синтезу NO, активність нітратредуктази, що характеризує інтенсивність реутилізаційного шляху синтезу NO, а також активність аргінази – ключового ферменту неокисного шляху деградації L-аргініну.

У безбілкових аліквотах проб визначали пули стабільних метаболітів NO – нітрит (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) та нітрат (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-аніонів [11, 13], пули стабільного метаболіту активного кисню – пероксиду водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [17] і пули сечовини – продукту аргіназної реакції. За концентраціями сечової кислоти оцінювали також інтенсивність повної деградації ксантиоксидазою продуктів розпаду АТФ – гіпоксантину і ксантину, що супроводжується генерацією супероксид-радикала. Пули сечової кислоти визначали за допомогою

набору реактивів (“Філісіт-Діагностика”, Україна). Використовуючи концентрації нітрит- та нітрат-аніонів і сечовини розраховували індекс оксигенації (ІО) в мітохондріях за формулою:  $IO = 1000 \cdot [NO_2^-] / ([NO_3^-] + [сечовина])$ , ум. од.

Розраховували також активність сумарної NOS у пікомолях за 1 хв на 1 мг білка, відношення активностей неокисного й окисного метаболізму аргініну (активність аргінази/активність NOS) і відношень неокисного реутилізаційного і окисного de novo шляхів синтезу NO (активність нітратредуктази/активність NOS) у мітохондріях, які виражали в умовних одиницях. Вміст загального білка мітохондрій визначали методом Бредфорд з використанням барвника Сumassi G-250 (“Ferrak”, Німеччина).

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP) та Origin 6.0 (Microcall Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Фізіологічні дослідження (дорослі щури).* Тренування плаванням покращує скоротливу активність міокарда. Дозоване розтягнення лівого шлуночка призводило до зростання тиску, що розвивається (ТР) міокардом, як у контрольних (n=8), так і у тренуваних плаванням (n=5) дорослих щурів (рис.1). Максимальний ТР становив  $120,0 \pm 33,4$  і  $137,1$  мм рт. ст.  $\pm 22,4$  мм рт. ст. при навантаженні 264 і 330 мкл відповідно. З подальшим збільшенням об’єму балончика ТР починав зменшуватися через переростягнення міокарда. При цьому фаза плато кривої реакції Франка–Старлінга у тренуваних тварин виявилася більш тривалою, ніж у контрольних. Паралельно з цим підвищувався кінцевий діастолічний тиск (КДТ). Слід зазначити, що при додатковому навантаженні 462 мкл у контрольних і 561 мкл у тренуваних щурів значення ТР і КДТ вирівнювалися (див. рис. 1). Цей феномен був результатом як більш повільного зменшення ТР, так і меншого нахилу кривої приросту КДТ.

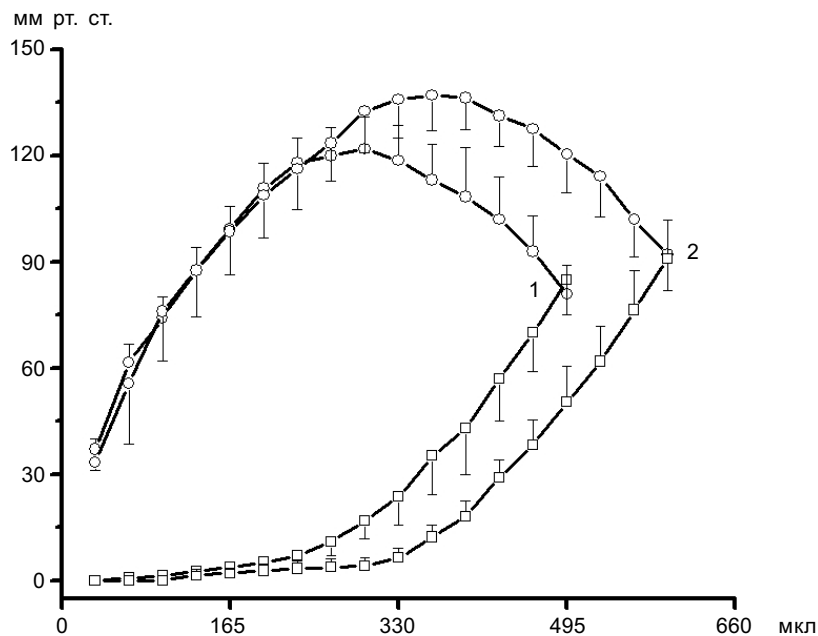


Рис. 1. Залежність кінцевого діастолічного тиску (квадратики) та тиску у лівому шлуночку (кружечки) серця від навантаження об’ємом у контрольних (1) і тренуваних плаванням (2) дорослих щурів

Установлено також, що тривале тренування плаванням призводило до вірогідного зменшення діастолічної жорсткості міокарда лівого шлуночка. Так, якщо при додатковому навантаженні об'ємом 462 мкл цей показник у контрольних щурів становив  $(1,82 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$  мм рт. ст./л, то у тренуваних –  $(1,08 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$  мм рт. ст./л (рис.2).

Таким чином, тренування дорослих щурів плаванням збільшувало силу серцевих скорочень і витривалість міокарда до попереднього розтягнення, а також зменшувало жорсткість лівого шлуночка. Все це свідчить про поліпшення систолічної та діастолічної функції серця.

За даними інших авторів, у тренуваних плаванням старих щурів знижувалися систолічний, діастолічний тиск і вміст лактату [18]. За таких самих умов тренування у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією виявлено пригнічення симпатoadреналової системи та вазоконстрикторних впливів простагландинів, а відтак, невелике зниження системного артеріального тиску [20].

*Біохімічні дослідження (дорослі та старі щури).* Тренування плаванням стимулює

синтез NO в мітохондріях серця дорослих щурів порівняно з нетренованими тваринами. Так, зростала активність усіх трьох шляхів синтезу NO, проте не однаковою мірою – iNOS і cNOS майже вдвічі, тоді як нітратредуктази – аж у 4,5 раза (табл.1). У старих щурів після тренування достовірно зростав лише *de novo* синтез NO (як конститутивний, так і індукційний), тоді як реутилізаційний (за вихідними значеннями більш інтенсивний, ніж у дорослих) достовірно не змінювався. Однією з причин зниження активності cNOS у старих щурів є зменшення рівня експресії eNOS [24].

У мітохондріальному компартменті серця після тренування достовірно знижувався вміст нітрат-аніона тільки у дорослих щурів, а сечовини – у старих щурів (див. табл. 2). Пули нітрит-аніона при цьому не змінювалися.

Після курсу тренувань плаванням розрахунковий індекс оксигенації збільшувався лише в мітохондріях серця дорослих щурів (табл. 3).

Отже, в умовах адаптації до плавання у мітохондріях серця потенціюється синтез NO, що залежить від віку тварини. Курс

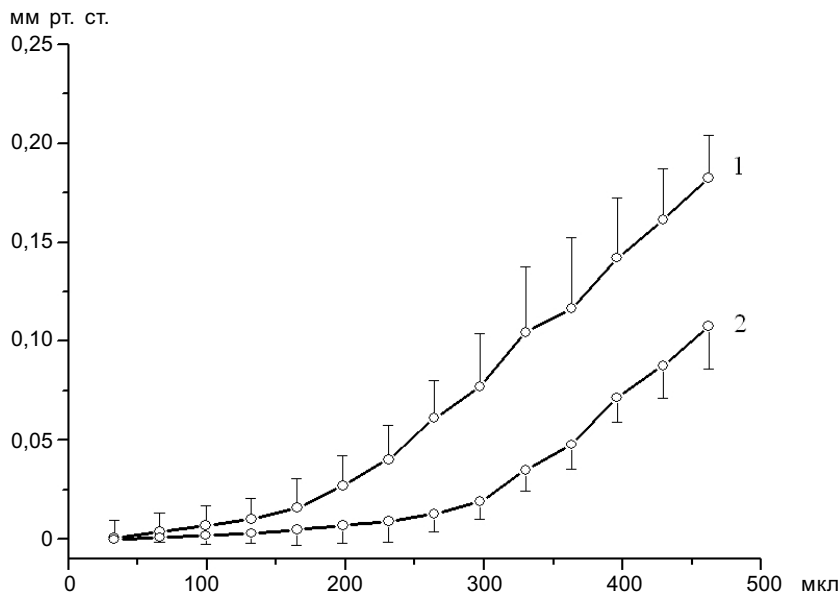


Рис. 2. Залежність діастолічної жорсткості міокарда від навантаження об'ємом у контрольних (1) і тренуваних плаванням (2) дорослих щурів

**Таблиця 1. Вплив тренування плаванням на активність ферментів синтезу оксиду азоту в мітохондріях серця щурів (M ± m)**

Група тварин	Індуцибельна NO-синтаза, пмоль · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка	Конститутивна NO-синтаза, пмоль · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка	Нітратредуктаза, нмоль · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка
Дорослі (n=16)	1,73 ± 0,24	3,64 ± 0,27	0,36 ± 0,05
Дорослі треновані (n=5)	3,07 ± 0,21*	6,02 ± 0,80*	1,67 ± 0,10*
Старі (n=10)	2,00 ± 0,28	1,84 ± 0,26*	3,31 ± 0,82*
Старі треновані (n=6)	4,64 ± 0,45*,**	3,54 ± 0,26**	2,79 ± 0,09*

Примітка. В табл. 1–3 \*P < 0,05 відносно дорослих нетренованих щурів; \*\*P<0,01 відносно старих нетренованих щурів.

тренування плаванням поліпшував систолічну та діастолічну функцію серця (див. рис. 1, 2) дорослих щурів одночасно з підвищенням синтезу NO. Можна припустити, що пригнічувальна дія тривалих тренувань плаванням у старих щурів на кальційіндуковане відкриття МП, про яке ми згадували раніше, опосередковується саме підвищеним синтезом NO. Серед

показників аргіназо-NO-синтазної системи в мітохондріях серця дорослих і старих тварин, а саме серед показників, що характеризують інтенсивність різних шляхів синтезу оксиду азоту (як de novo при окисному метаболізмі аргініну, так і реутилізаційного) та сечовини (неокисного метаболізму аргініну), як видно з табл. 1-2, ми зафіксували такі відмінності: трену-

**Таблиця 2. Вплив тренувань на стаціонарні пули стабільних метаболітів окисної і неокисної деградації аргініну в мітохондріях серця щурів (M ± m)**

Група тварин	Нітрит-аніон, пмоль · мг <sup>-1</sup> білка	Нітрат-аніон, нмоль · мг <sup>-1</sup> білка	Сечовина, нмоль · мг <sup>-1</sup> білка
Дорослі (n=16)	126,0 ± 17,2	76,3 ± 4,1	6,4 ± 0,5
Дорослі треновані (n=5)	134,3 ± 3,3	48,9 ± 0,6*	5,0 ± 0,4
Старі (n=10)	94,0 ± 6,1	89,4 ± 9,3	4,5 ± 0,4*
Старі треновані (n=6)	109,7 ± 6,7	91,3 ± 4,2*	2,7 ± 0,2*,**

вання підвищують швидкість реутилізаційного синтезу NO та знижують пули нітрат-аніона (засвідчує зниження утворення та розпаду пероксинітриту, а, отже, генерації супероксиду і в цілому виникнення оксидативного стресу, що є основним індуктором відкриття МП, загибелі кардіоміоцитів, і дезадаптації серця) лише в мітохондріях дорослих щурів.

Перша відмінність при розрахунках дала такі відносні значення (якщо за 100 % прийняти відношення активності нітратредуктази до сумарної NOS у мітохондріях серця дорослих нетренованих щурів): у тренованих дорослих тварин – 275 % (підвищення швидкості реутилізаційного над de novo синтезом NO майже в 3 рази); у нетренованих старих тварин – 1306 %

**Таблиця 3. Вплив тренувань на окисний метаболізм та індекс оксигенації в мітохондріях серця щурів (M ± m)**

Група тварин	Сечова кислота, нмоль · мг <sup>-1</sup> білка	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , пмоль · мг <sup>-1</sup> білка	Індекс оксигенації, ум.од.
Дорослі (n=16)	1,24 ± 0,06	1,52 ± 0,30	1,52 ± 0,10
Дорослі треновані (n=5)	1,11 ± 0,03	2,27 ± 0,14	2,49 ± 0,18*
Старі, n=10	3,77 ± 0,39*	3,42 ± 0,28*	1,00 ± 0,07*
Старі треновані (n=6)	1,78 ± 0,32**	1,34 ± 0,10**	1,17 ± 0,10*

(більше ніж у 10 разів), а після тренувань – 510 %, тобто спостерігається реципрокне підвищення відносного значення цього співвідношення у мітохондріях серця дорослих щурів і, навпаки, суттєве зниження у старих тварин.

Тренування плаванням значно вплинуло на окисний метаболізм у мітохондріях серця (див. табл. 3). Так, вміст  $H_2O_2$  (підсилювач експресії eNOS) у мітохондріях серця дорослих щурів після тренування мав тенденцію до зростання (більше ніж на 40 %), тоді як у старих (вихідні значення вдвічі більші, ніж у дорослих) він, навпаки, достовірно знижувався і майже сягав контрольних значень у дорослих тварин (табл. 3). У мітохондріях старих щурів після тривалих тренувань пули  $H_2O_2$  знижувалися достовірно. На відміну від  $H_2O_2$ , концентрація сечової кислоти (див. табл. 3), що є маркером активності ксантиноксидази, а, отже, і деградації пуринових нуклеотидів і генерації супероксид-аніона після тренування у дорослих щурів не змінювалася, а у старих достовірно знижувалася більш ніж удвічі. Таким чином, очікуваного пригнічення окисного метаболізму в мітохондріях серця дорослих щурів після курсу тренувань плаванням внаслідок значного зниження пулів нітрат-аніона, ми не спостерігали.

Серед найбільш вірогідних причин зниження пулів нітрат-аніона при стабільних рівнях генерації супероксиду і, очевидного, утворення пероксинітриту, може бути підвищення частки вільнорадикального розпаду останнього. Пероксинітрит розпадається на два вільні радикали – гідроксильний і діоксид азоту, які є ініціаторами спонтанної ланцюгової реакції перекисного окиснення ліпідів. Слід було б очікувати підвищення активності аргінази в мітохондріях внаслідок підвищеної генерації ·ОН-радикала, але ми спостерігали зниження активності цього ферменту. Це вказує на певну функціональну особливість

·ОН використання, який утворений не класично при відновленні  $H_2O_2$  у реакціях Хабер–Вайса, а при розпаді пероксинітриту. Ми припускаємо, що утворений таким чином ·ОН-радикал може використовуватися для інгібування HIF-1 $\alpha$ -фактора транскрипції.

Іншим поясненням зниження внутрішньомітохондріальних пулів нітрат-аніона міг би бути вихід цього аніона, за розмірами близького до фосфат-аніона, разом з катіонами кальцію при роботі антипортера [22] або при симпорті з протоном, як у рослин [23]. Один або декілька із цих процесів і забезпечують ефективні фізіологічні механізми адаптації серця до фізичних навантажень, в т.ч. значне інгібування кальційіндукованого відкриття МП у тренуваних старих щурів, що було встановлено нами раніше [15].

Виявлено, що з віком активується неокисний метаболізм L-аргініну. Так, у мітохондріях серця старих щурів активність аргінази була у 4 рази вищою, ніж у дорослих. Після тренування плаванням спостерігалось зниження активності цього ферменту у дорослих щурів майже у 1,6 раза, а у старих – у 2,8 раза.

Отже, фізичне навантаження сприяє нормалізації неокисного шляху метаболізму L-аргініну у мітохондріальному компартменті, де локалізована переважно аргіназа II. Функцією її, на відміну від конститутивної ізоформи аргінази – аргінази I, є не синтез орнітину з наступним його використанням для біосинтезу поліамінів, а утворення орнітину для синтезу з нього проліну, глутамату та ГАМК [21]. Цікаво, що посттренувальна активність аргінази, а, значить, і можливості синтезу ГАМК (можливий ефективний інгібітор МП [19]) у мітохондріях старих щурів вища, ніж у дорослих, що корелює з більшою ефективністю інгібування МП саме у старих тварин. Відношення активності аргінази/NOS, що показує співвідношення неокисного й



окисного метаболізму аргініну, мала такі значення в мітохондріях серця: у дорослих нетренованих – 100 %, у тренуваних – 36 % (зниження активності неокисного метаболізму майже в 3 рази!); у старих нетренованих – 563 % (значне превалювання неокисного над окисним метаболізмом!), у старих тренуваних – 93 % (повна нормалізація співвідношення окисного й неокисного метаболізму аргініну після курсу тренувань!!).

Таким чином, причиною більш ефективного у старих тварин зменшення чутливості МП до  $Ca^{2+}$  після тривалих помірних фізичних навантажень є підвищення конститутивного синтезу NO та інгібування окисного стресу в мітохондріях. Очевидно, що реутилізаційний синтез NO в мітохондріях напряму не включено до програми регуляції МП, як і те, що вагому регуляторну, а не лише патофізіологічну роль, виконує пероксинітрит. Можливо, висунуте нами припущення про участь в інгібуванні фактора N1F-1 $\alpha$  може стати новою функцією OH.

Отримані результати підтверджують наше припущення про важливість продуктів аргіназного метаболізму аргініну в мітохондріях, у т.ч. для регуляції МП і про можливість участі як аніонів нітрату, так і фосфату, в функціонуванні мітохондріального антипортера (транслокації іонів кальцію із мітохондріального компартмента в цитозольний).

## ВИСНОВКИ

1. Завдяки стимуляції продукції NO, передусім у мітохондріальному компартменті серця тренуваних дорослих щурів, збільшується сила скорочень лівого шлуночка, зменшується жорсткість міокарда та поліпшується скоротлива активність ізольованого серця щурів.

2. У мітохондріях серця тренуваних плаванням дорослих щурів встановлено достовірну стимуляцію активності усіх

досліджуваних ферментів синтезу оксиду азоту – iNOS, cNOS і нітратредуктази, тоді як у старих – лише ферментів окисного шляху de novo.

3. У мітохондріальному компартменті серця тренування призводило до достовірного зниження вмісту нітрат-аніона тільки у дорослих щурів, а сечовини – у старих щурів. Пули нітрит-аніона при цьому майже не змінювалися.

4. Встановлено, що у мітохондріях серця дорослих щурів вміст  $H_2O_2$  після тренування підвищувався, тоді як у старих, навпаки, знижувався і майже сягав контрольних значень у дорослих тварин, концентрація сечової кислоти у щурів обох вікових груп зменшувалася. Тренування плаванням значно збільшувало індекс оксигенації в мітохондріях серця дорослих щурів.

5. Після тренування плаванням спостерігалось зниження активності аргінази у мітохондріях серця як дорослих, так і старих щурів.

6. Отримані результати дають підставу вважати, що плавання як один з методів фізичного навантаження стимулює конститутивний синтез NO і, навпаки, інгібує індукцибельну активність аргінази II в мітохондріях серця дорослих і старих щурів, а відтак може розглядатися як ефективний засіб немедикаментозної корекції вікової дисфункції мітохондрій, запобігання відкриття МП, попередження ініційованого іонами кальцію і окисним стресом апоптозу.

**А.В. Коцюруба, Ю.П. Коркач, С.А.Таланов, О.В.Базилук, Л.Г. Степаненко, В.Ф. Сагач**

## **ВЕКОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ АРГИНАЗО-NO-СИНТАЗНОЙ СИСТЕМЫ В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ АДАПТАЦИИ К ПЛАВАНИЮ**

Изучали сократительную активность изолированного сердца взрослых крыс в условиях адаптации к длительным физическим нагрузкам плаванием. Показано, что благодаря стимуляции продукции NO в митохондриальном компарт-

менте сердца тренированных взрослых крыс увеличивается сила сокращений левого желудочка, уменьшается жесткость миокарда, улучшается как систолическая, так и диастолическая функция сердца. У тренированных плаванием взрослых крыс в митохондриях сердца установлена достоверная стимуляция активности всех исследованных ферментов синтеза оксида азота – индуцибельной, конститутивной NOS (de novo синтез) и нитратредуктазы (неокислительный реутилизационный синтез), тогда как у старых – только ферментов окислительного пути de novo. Тренировки приводили к достоверному снижению митохондриальных пулов нитрат-аниона только у взрослых крыс, мочевины – у старых крыс, внутримитохондриальные пулы нитрит-аниона при этом не изменились. Митохондриальные пулы  $H_2O_2$  после тренировки у взрослых крыс повышались, тогда как у старых животных, наоборот, снижались. Концентрация мочевой кислоты (маркера активности ксантиноксидазы) у крыс обеих возрастных групп после периода тренировок плаванием снижалась. Тренировки приводили к значительному увеличению “индекса оксигенации” в митохондриях сердца взрослых крыс и к снижению активности митохондриальной аргиназы II. Полученные результаты дают основание считать, что плавание как один из методов физической нагрузки стимулирует продукцию NO как в митохондриях сердца взрослых, так и старых крыс и поэтому может рассматриваться как эффективное средство немедикаментозной коррекции возрастной дисфункции митохондрий сердца.

Ключевые слова: тренировки, старение, сердце, митохондрии, оксид азота, окислительный метаболизм.

**A. Kotsuruba, Yu. Korkach, S. Talanov,  
O. Baziluk, L. Stepanenko, V. Sahach**

#### **ARGINASE-NITRIC OXIDE SYNTHASE SYSTEM CHANGES DUE TO ADAPTATION TO SWIMMING IN ADULT AND AGED RAT HEARTS**

We tested the physiological indices of adult rat heart beat for the adaptation to prolonged physical exercise (swimming). It was shown that the stimulation of NO-production in the heart mitochondria of trained adult rats improves both systolic and diastolic heart function. In adult rats trained by swimming the activity of both de novo and salvage enzymes of nitric oxide synthesis studied (iNOS, cNOS, nitratoreductase) were increased in heart mitochondria, whereas in the old rats only the activity of oxidative de novo enzymes. Training reduced the nitrate pools only in the mitochondria from adult rats and the urea pools in mitochondria from old rats. Intramitochondrial nitrite pools were unchanged. In adult rats, mitochondrial  $H_2O_2$  pools increased after training, whereas in the old rats they were reduced, the level of uric acid (a marker of xanthinoxidase activity) in ageing rats after training period was declined. Swimming training resulted in a significant increase in the value

of «oxygenation index» in mitochondria of adult rats and decreased the activity of mitochondrial arginase II. The results suggest that swimming is one of the methods of physical load stimulates NO production in the mitochondria of adult and old rats and therefore could be considered as an effective non-pharmacological tool for correction of mitochondrial dysfunction in adults and aging heart.

Key words: training, aging, heart, mitochondria, nitric oxide, oxidative metabolism.

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

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Акопова О.В., Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Влияние оксида азота *in vivo* на метаболизм АФК и АФА в митохондриях сердца крыс // Дисфункция. эндотелия – Витебск, 2010. – С. 3–7.
2. Акопова О.В., Коцюруба А.В., Ткаченко Ю.П., Сагач В.Ф. Оксид азоту пригнічує відкриття мітохондріальної пори і збільшує кальцієву ємність мітохондрій *in vivo* // Фізіол. журн. – 2005. – 51. – № 3. – С. 3–11.
3. Бадова Т.А., Безруков В.В., Коркач Ю.П., Коцюруба А.В. Возрастные особенности влияния ишемического preconditionирования изолированного сердца крыс на метаболизм NO // Пробл. старения и долголетия – 2006. – 15, № 4. – С. 291–300.
4. Богдановська Н.В., Святодуч Г.М., Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Маліков М.В. Синтез оксиду азоту в процесі тривалої адаптації до інтенсивних фізичних навантажень у спортсменів // Фізіол. журн. – 2009. – 55, № 3. – С. 94–99.
5. Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Коцюруба А.В., Сагач В.Ф. Чутливість феніларсиноксид – індикованого відкриття мітохондріальної пори в серці старих щурів за умов впливу на них інтервальних гіпоксичних тренувань // Фізіол. журн. – 2004. – 50, № 5. – С. 29–37.
6. Говсеева Н.М., Коцюруба А.В., Буханевич О.М., Артамонов М.М., Мегедь О.Ф., Гула Н.М. Зміна вмісту нітриту та сечовини у тканинах при морфінній залежності // Архів психіатрії. – 1998. – 1, № 16. – С. 112–114.
7. Горпинченко І.І., Гула Н.М., Мірошников Я.О., Коцюруба А.В., Буханевич О.М. Вміст L-аргініну і амінокислот, що утворюються за його метаболізму по окисному та неокисному шляхах в крові пацієнтів з еректильною дисфункцією // Урологія. – 2002. – № 3. – С. 85–90.
8. Доломан Л.Б., Коцюруба А.В., Косякова Г.В., Петренко О.В., Сагач В.Ф. Робота серця та функціональна активність ендотелію в залежності від віку і статі людини // Фізіол. журн. – 2004. – 50, № 5. – С. 19–28.

9. Рудык Е.В., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф., Коцюруба А.В. Интервальные гипоксические тренировки снижают некоторые показатели оксидативного стресса и чувствительность к индукторам митохондриальной поры в сердце старых крыс // Гипоксия. – Москва–Нальчик. – 2005. – 2. – С. 52–55.
10. Сагач В.Ф., Базилук О.В., Коцюруба А.В., Буханевич О.М. Порушення ендотелій-залежних реакцій, аргіназного та NO-синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії // Фізіол. журн. – 2000. – 46, № 3. – С. 3–13.
11. Сагач В.Ф., Коркач Ю.П., Коцюруба А.В., Рудик О.В. Пригнічення відкриття митохондриальної пори екдистероном у серці старих щурів // Там само. – 2008. – 54, № 4. – С. 3–10.
12. Сагач В.Ф., Коцюруба А.В., Базилук О.В., Мегедь О.Ф., Буханевич О.М., Гула Н.М., Степаненко Л.Г. Інгібітори аргіназного шляху метаболізму L-аргініну як новий клас антигіпертензивних сполук: дія карбаміду на окисний метаболізм ліпідів і судинний тонус при артеріальній гіпертензії // Там само. – 2001. – 47, № 5. – С. 3–11.
13. Сагач В.Ф., Рудик О.В., Вавилова Г.Л., Коцюруба А.В., Ткаченко Ю.П. Мелатонін відновлює ішемічну толерантність і зменшує чутливість до відкриття митохондриальної пори в серці старих щурів // Там само. – 2006. – 52, № 3. – С. 3–14.
14. Струтинська Н.А., Тимошук С.В., Вавилова Н.Л., Коцюруба А.В., Сагач В.Ф. Експресія UCP3 і чутливість МРТР до відкриття іонами Ca<sup>2+</sup> у серці старих щурів при активації біосинтезу коензиму Q // Там само. – 2009. – 55, № 3. – С. 44–54.
15. Чорна С.В., Таланов С.А., Струтинська Н.А., Вавилова Г.Л., Коцюруба А.В., Гайдай М.І., Сагач В.Ф. Вплив тривалих фізичних навантажень на зміни функції серця щурів при ішемії-реперфузії, чутливість кальцій індукованої митохондриальної пори та експресію роз'єднувального білка 3 // Там само. – 2010. – 56, № 1. – С. 13–21.
16. Baziluk O., Kotsuruba A., Stepanenko L., Talanov S., Korkach Yu., Sahach V. Age-dependence in alteration in nitric oxide synthesis in cardiovascular system during adaptation to physical training // Int. J. Physiol. and Phatophysiol. – 2010. – 1, № 4. – P. 345–356.
17. Cohen D.M., Gullans S.R., Chin W.W. Urea-inducible Erg-1 in murine inner medullary collecting duct cell is mediated by the serum response element and adjacent Ets motifs // J. Biol. Chem. – 1996. – 271, № 22. – P. 12903–12908.
18. Cox R.H., Hubbard J.W., Lawler J.E., Sanders B.J., Mitchell V.P. Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats // J. Appl. Physiol. – 1985. – 58, № 4. – P. 1207–1214.
19. Dave K.R., Lange-Asschenfeldt C., Raval A.P., Prado R, Busto R, Saul I, Pйrez-Pinzyn M.A. Ischemic preconditioning ameliorates excitotoxicity by shifting glutamate/gamma-aminobutyric acid release and biosynthesis // J. Neurosci Res. – 2005. – 82, № 5. – P. 665–673.
20. Ikeda T., Gomi T., Sasaki Y. Effects of swim training on blood pressure, catecholamines and prostaglandins in spontaneously hypertensive rats // Jpn. Heart J. – 1994. – 35, № 2. – P. 205–211.
21. Maarsingh H., Zaagsma J., Meurs H. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives // Brit. J. Pharmacol. – 2009. – 158, № 3. – P. 652–664.
22. Malli R., Graier W.F. Mitochondrial calcium channels: Great unknowns with important functions // FEBS Letts. – 2010. – 584. – P. 1942–1947.
23. Miller A.J., Fan X., Orsel M., Smith S.J., Wells D.M. Nitrate transport and signaling // J. Exp. Bot. – 2007. – 85, № 9. – P. 2297–2306.
24. Tanabe T., Maeda S., Miyachi T., Iemitsu M., Takanashi M., Irukayama-Tomobe Y., Yokota T., Ohmori H., Matsuda M. Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta // Acta Physiol. Scand. – 2003. – 178, № 9. – P. 3–10.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;  
E-mail: toliko49@ukr.net*

*Матеріал надійшов  
до редакції 01.08.2011*

О.С. Богорад-Кобельська, Н.М. Жолобак, З.М. Олевінська, М.Я.Співак

## Ативність похідних дифенілу на різних модельних системах вірус–клітина

*На двох модельних системах L929/BBC та RF/ВПГ-1 в умовах in vitro вивчали протівірусну активність нових структурних аналогів тилорону дигідрохлориду: 4,4'-біс-[2-(діетиламіно)етокси]дифеніл дигідрохлориду та 2-метоксикарбоніл-4-4'-біс-[2-(діетиламіно)етокси]дифеніл дигідрохлориду. Використовували дві схеми внесення дослідних сполук: профілактичну та лікувальну. Застосування профілактичної схеми внесення дослідних сполук підтверджує існування кореляції між продукцією інтерферону під дією сполук та їх протівірусною активністю. Показано, що дифеніли здатні пригнічувати розвиток вірусного цитопатичного ефекту, спричиненого ДНК- і РНК-вмісними вірусами. Похідні дифенілу значно менш токсичні, ніж тилорон, і можуть розглядатися як сполуки, перспективні для подальших досліджень при створенні нових протівірусних препаратів.*

*Ключові слова:* аміксин ІС, тилорон, похідні дифенілу, протівірусна активність, ДНК- та РНК-вмісні віруси.

### ВСТУП

Незважаючи на інтенсивні дослідження, що ведуться в усьому світі, кількість протівірусних препаратів обмежена, а для окремих інфекційних захворювань їх зовсім немає. Це пов'язано із особливостями життєвого циклу вірусів. Зокрема, за умови тривалої персистенції в організмі віруси (віруси грипу, інфекційної анемії коней тощо) здатні змінювати свої властивості. Інтенсивне використання етіотропних протівірусних речовин з вузьконаправленим механізмом дії супроводжується селекцією резистентних штамів як серед ДНК- [13, 18, 23], так і РНК-вмісних вірусів [14, 16].

Епідемії грипу, викликаються РНК-вмісними вірусами грипу різних типів. Серед ДНК-вмісних одними із найбільш поширених і неконтрольованих є віруси групи герпесу, які здатні вражати практично всі органи та системи людського організму, передаватися різноманітними шляхами, а також викликати різні форми інфекції – гостру, латентну та хронічну. Відомо, що

хвороби, зумовлені вірусом простого герпесу (ВПГ) посідають друге місце після грипу як причина смертності від вірусних інфекцій.

Вибір протівірусного препарату пов'язаний з особливостями процесів репродукції вірусів в ураженому організмі. Так, при терапії герпесу шкіри, очей, статевих органів, цитомегалії та інфекцій, спричинених вірусами віспи, особливого поширення набули аномальні нуклеозиди. Важливо відмітити, що протівірусна дія аномальних нуклеозидів значно посилюється при використанні препаратів з різними мішенями дії. Для терапії інфекції грипу розроблені та пропонуються препарати з вузьким спектром дії, які впливають тільки на певний тип вірусу грипу. У разі циркуляції в процесі епідемії вірусів грипу різного типу такий підхід значно обмежує можливості ефективного лікування.

Альтернативою пошуку нових вузько-специфічних протівірусних засобів є відкриття нових препаратів, здатних індукувати продукцію організмом хворого

© О.С. Богорад-Кобельська, Н.М. Жолобак, З.М. Олевінська, М.Я.Співак

власного (ендогенного) інтерферону (ІФН). Такі препарати мають широкий спектр противірусної дії та високу ефективність. Застосування його індукторів зводить нанівець основні побічні ефекти використання екзогенного ІФН – лімфопенію, грипоподібні симптоми (головний біль, лихоманку, болі у суглобах і м'язах), а також не провокують, на відміну від рекомбінантного ІФН, утворення антиінтерферонових антитіл, що нейтралізують екзогенний ІФН [7, 21].

Серед низькомолекулярних синтетичних препаратів-індукторів ІФН одним з широко відомих є аміксин ІС (тилорон дигідрохлорид). Завдяки противірусній, інтерфероніндукувальній та імунотулювальній активності, його застосовують при інфекційних захворюваннях різноманітної етіології, у клінічній імунології, онкології [1, 6, 17, 20]. Проте при використанні тилорону (як і будь-якої іншої біологічно активної сполуки) існують певні обмеження. Введення препарату у надвисоких дозах може викликати порушення ліпідного та вуглеводного обміну [11, 15, 22], які зникають після припинення терапії.

Для того щоб мати великий арсенал противірусних засобів у боротьбі з ДНК- і РНК-вмісними вірусами та для розширення можливості вирішення проблеми їх резистентності слід досліджувати нові противірусні речовини. До таких перспективних сполук відносяться аналоги тилорону – похідні дифенілу. Так, противірусну активність гліюксильованих похідних останнього було показано *in vivo* на моделі вірусів грипу А-PR8 і мишачого гепатиту MHV<sub>3</sub> [12].

У наших експериментах *in vivo* продемонстровано, що сполуки, які містять у своїй структурі дифенільний фрагмент замість флуоренового, менш токсичні, ніж тилорон гідрохлорид та індукують вищий титр ІФН в організмі експериментальних тварин [10], а також проявляють противірусну активність на моделі герпе-

тичного менінгоенцефаліту мишей [9]. Варто відзначити, що формування інтерферонові відповіді та противірусної резистентності в організмі пов'язане з каскадом імунологічних реакцій, до яких залучені всі системи та органи. Для культури клітин ефект пов'язаний із безпосереднім впливом речовини на модельну систему вірус-клітина-господар. Такий підхід дає змогу наблизитися до розуміння механізму дії речовини, визначити на які етапи репродукції вірусу вона впливає, через активацію яких сигнальних шляхів.

Метою нашої роботи було вивчення противірусної активності похідних дифенілу в культурі перещеплюваних клітин мишей і щурів на моделі РНК- і ДНК-вмісних вірусів.

## МЕТОДИКА

У роботі використовували 2,7-біс-[2-(діетиламіно)етокси]флуоренон-9 дигідрохлорид (тилорон дигідрохлорид, препарат аміксин ІС) [2], а також його аналоги – 4,4'-біс-[2-(діетиламіно)етокси]дифеніл дигідрохлорид (1) та 2-метоксикарбоніл-4-4'-біс-[2-(діетиламіно)етокси]дифеніл дигідрохлорид (2) [8], люб'язно надані для дослідження С.О. Фернандес де Рівас та к.х.н. С.А. Ляховим (Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України). Для приготування базового розчину вказані сполуки розчиняли у дистильованій воді до концентрації 2,0 мг/мл.

В експериментах використовували лінії клітин L929 (перевивні фібробласти зі сполучної тканини миші СЗН/An, сублінія "а") та RF (іморталізовані ембріональні клітини щура лінії Вістар), отримані з Клітинного Банку Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Клітини вирощували у моношаровій культурі у скляних флаконах з площею дна 38,5 см<sup>2</sup> у поживному середовищі 199,

що містить 0,68 ммоль/л L-глутаміну (НВП «Біо-Тест-Лабораторія», Україна) з додаванням 10%-ї ембріональної телячої сироватки («Sigma», США), 25 ммоль/л НЕРЕС (рН 7,4; «Serva», Німеччина) та 1,0 мкг/мл канаміцину при 37 °С в умовах постійного рівня CO<sub>2</sub> (5 %). Клітини пересівали кожні 2–3 доби. Оптимальна щільність клітин при пересіванні становила 1–3 · 10<sup>4</sup> клітин/см<sup>2</sup>.

Для вивчення токсичності та проти-вірусної активності використовували клітини, що знаходяться у логарифмічній фазі росту. Їх знімали з поверхні флаконів за допомогою 0,02%-го розчину Версена, ресуспендували у поживному середовищі та доводили до концентрації у суспензії до 5 · 10<sup>4</sup> клітин/мл. У 96-лункові плоскодонні планшети («Sarstedt», Німеччина) вносили 0,1 мл вказаної суспензії та інкубували в термостаті з постійним рівнем CO<sub>2</sub> (5 %) при 37 °С до утворення моношару клітин. У вказаних умовах моношар клітин утворювався впродовж 24 год.

Для вивчення токсичності дослідних сполук їх додавали до моношару клітин у концентраціях 1,0–2,0 мг/мл з послідовним двократним розведенням. Планшети інкубували впродовж 24 год при 37 °С. Цілісність плазматичної мембрани досліджуваних клітин визначали за відсутністю їх забарвлення 0,5%-м розчином трипанового синього. Токсичність сполуки оцінювали за її максимально витримуваною концентрацією (МВК). За МВК приймали таку концентрацію сполуки (мікрограм на мілілітр), що призводила до загибелі не більше ніж 10 % клітин порівняно з контролем. Як контроль використовували клітини, не оброблені дослідними сполуками.

Противірусну активність обраних речовин досліджували на двох модельних системах: клітини лінії L929 проти тест-вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) і клітини лінії RF проти тест-вірусу простого герпесу 1 типу (ВПГ-1). Також використо-

ували дві стандартні схеми внесення дослідних препаратів [5]. Сполуки додавали до середовища культивування у концентрації, що не перевищувала МВК, з послідовним двократним розведенням за 24 год до (профілактична схема) або через 30–60 хв після (для РНК- чи ДНК- вмісного вірусу відповідно, лікувальна схема) інфікування клітин тест-вірусом (100 ТЦД<sub>50</sub> – тканинна цитопатична доза вірусу, яка спричинює ураження 50 % клітин моношару у 50,0 мкл середовища 199). Планшети інкубували у термостаті при 37 °С до настання повної деструкції клітин у контролі вірусу (для ВВС – 1 доба, для ВПГ-1–3 доби). Як позитивний контроль використовували клітини, не оброблені дослідними сполуками, інфіковані відповідним тест-вірусом. Кількість живих клітин (для визначення ступеня пригнічення вірусоспецифічного цитопатичного ефекту) підраховували після їх фарбування кристалічним-фіолетовим [19]. Для цього з лунок видаляли надосадову рідину, а до клітин на 15 хв вносили 0,2%-й розчин фарбника Crystal Violet («Sigma», США) у 2%-му етанолі. Фарбник видаляли, зафарбований моношар клітин промивали водою. Оптичну густину зафарбованих клітин вимірювали на спектрофотометрі з вертикальним променем Multiskan Ascent («Thermo Labsystems», Фінляндія) при довжині хвилі 540 нм.

Для оцінки противірусної активності дослідних сполук використовували значення ефективних концентрацій: ED<sub>50</sub> та ED<sub>100</sub>. За значення ED<sub>50</sub> та ED<sub>100</sub> приймали такі концентрації сполуки (у мікрограмах на 1 мл), при яких спостерігали пригнічення цитопатичного ефекту вірусу на 50 та 100 % відповідно порівняно з повною деструкцією клітин у контролі вірусу.

Отримані експериментальні результати представлені у вигляді медіани та інтерквартильного інтервалу Me(LQ–UQ), де Me – медіана, (LQ–UQ) – нижній і верхній квартилі. У всіх серіях було по 3 досліди.

Нульову гіпотезу для контрольної та відповідно кожної з дослідних груп порівняння перевіряли за допомогою непараметричного критерію Манна–Уїтні. Відмінності між групами вважали статистично значущими при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інтегральним показником токсичності сполук є МВК. Отримані значення МВК тилорону дигідрохлориду та похідних дифенілу наведені у табл. 1. Фібробласти щура виявилися більш чутливими до дії сполук, ніж миші. Для обох типів досліджених клітин сполуки 1 та 2 характеризуються значно меншою токсичністю, ніж аміксин ІС ( $P < 0,05$ ). Ряд МВК для тилорону та сполук – його структурних аналогів – має вигляд:  $2 > 1 >$  тилорон. Зважаючи на отримані результати, у подальших експериментах сполуки використовували у концентраціях, що не перевищують МВК.

Як видно з табл. 2, у клітинах L929 та FR сполука 1 та тилорон інгібують ЦПД тест-вірусу як при профілактичній, так і при лікувальній схемах застосування. Слід зазначити, що для обох типів клітин в обох схемах експерименту протівірусний ефект тилорону спостерігали за нижчої, ніж для сполук 1 та 2, концентрації.

Важливо відзначити, що діапазон ефективних протівірусних концентрацій сполуки 1 за умови профілактичної схеми застосування збігається як для ВВС, так і для ВПГ-1. За лікувальної схеми для 100%-го

пригнічення розвитку цитопатичної дози (ЦПД) ВПГ-1 в культурі клітин потрібні нижчі (більше ніж у 4 рази) її концентрації порівняно з модельною системою L929/ВВС. Сполука 2 на моделі L929/ВВС виявилася малоефективною: було знайдено концентрації, які забезпечували тільки 50%-ве пригнічення розвитку ЦПД вірусу, тоді як на моделі RF/ВПГ-1 ефективні концентрації сполуки були, незалежно від схеми застосування, більше, ніж у 4 рази нижчі. Тилорон викликав гальмування розвитку ЦПД вірусів у обох досліджених системах як за профілактичної, так і лікувальної схем, хоча для отримання протівірусного ефекту на моделі RF/ВПГ-1 було достатньо в 2 рази нижчих концентрацій, ніж для L929/ВВС. Таким чином, досліджені сполуки виявились більш ефективними на моделі RF/ВПГ-1. Можливо, виявлений ефект пов'язаний із специфікою розвитку внутрішньоклітинного вірусіндукованого процесу.

Надзвичайно цікавими є результати, отримані за умови застосування сполук за профілактичною схемою. Якщо для тилорону характерна така сама різниця в ефективності для моделей L929/ВВС та RF/ВПГ-1, як і за лікувальної схеми, то для сполуки 1 такої різниці немає:  $ED_{100}$  та  $ED_{50}$  за умови профілактичного застосування для моделей РНК- і ДНК-вмісних вірусів збігаються. Для сполуки 2 взагалі не визначено  $ED_{100}$  для моделі L929/ВВС, тоді як на моделі RF/ВПГ-1 ефективні протівірусні концентрації сполуки однаково незалежно від застосованої схеми. Отри-

**Таблиця 1. Максимально витримувані концентрації (мкг/мл) тилорону та похідних дифенілу для клітин різних ліній: фібробластів миші (L929), фібробласти щура (RF) (n = 3)**

Сполука	L929	RF
1	50,0 [25,0–50,0]	25,0 [12,5–25,0]
2	125,0 [100,0–125,0]	100,0 [50,0–100,0]
Тилорон	10,0 [5,0–10,0]	6,2 [3,1–6,2]

Примітка. Результати представлені як медіана та інтерквартильний інтервал Me [LQ–UQ].

**Таблиця 2. Протівірусна активність тилорону та похідних дифенілу на різних модельних системах: фібробласти миші (L929) проти 100 ТЦД<sub>50</sub> вірусу везикулярного стоматиту та фібробласти щура (RF) проти 100 ТЦД<sub>50</sub> вірусу простого герпесу 1-го типу**

Сполука	L929				RF			
	Профілактична схема		Лікувальна схема		Профілактична схема		Лікувальна схема	
	ED <sub>100</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>100</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>100</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>100</sub>	ED <sub>50</sub>
1	12,5 [6,2–12,5]	6,2 [6,2–12,5]	25,0 [25,0–50,0]	6,2 [6,2–12,5]	12,5 [6,2–12,5]	6,2 [6,2–12,5]	6,2 [6,2–12,5]	3,1 [1,6–3,1]
2	–	100,0 [50,0–100,0]	–	100,0 [50,0–100,0]	25,0 [25,0–50,0]	12,5 [6,2–12,5]	25,0 [25,0–50,0]	12,5 [6,2–12,5]
Тилорон	6,2 [3,1–6,2]	3,1 [3,1–3,1]	6,2 [3,1–6,2]	3,1 [1,6–3,1]	3,1 [1,6–3,1]	1,6 [0,8–1,6]	3,1 [1,6–3,1]	1,6 [0,8–1,6]

Примітка. ED<sub>100</sub> та ED<sub>50</sub> – ефективні дози сполуки (мкг/мл), потрібні для пригнічення цитопатичного ефекту вірусу на 50 та 100 % відповідно, порівняно з повною деструкцією клітин у контролі вірусу. ТЦД<sub>50</sub> – тканинна цитопатична доза вірусу, яка спричинює ураження 50 % клітин моношару.

мані відмінності в протівірусній ефективності досліджених сполук за умови профілактичного застосування можна пояснити на підставі вивченої нами раніше [3] їх здатності до індукції ІФН у культурі клітин. Якщо здатність до індукції ІФН показана для сполуки 1 та відома для тилорону [1, 6], то сполука 2 не індуктор ІФН у культурі клітин. Оскільки модельна система L929/BBC є класичною для детекції ІФН і дії сполук його індукторів, її застосування дало змогу виявити відмінності в ефективності сполук 1, 2 та тилорону гідрохлориду, що пов'язані, в тому числі, з їх впливом (чи його відсутністю) на синтез ІФН у клітині.

Для характеристики протівірусної дії вказаних речовин визначали індекс селективності (ІС) як відношення  $CC_{50}$  (50 % цитотоксична концентрація) до ED<sub>50</sub>. Відповідно до методичних рекомендацій [4] речовину або препарат вважають такими, що виявляють значну протівірусну активність при значеннях ІС 8 та вище. Оскільки для тилорону та сполуки 1 у досліджених модельних системах ІС знаходиться в межах 8,6 – 17,1, а для сполуки 2 – 16,7 – 33,3, зроблено висновок, що взяті у дослідження похідні дифенілу є активними протівірусними сполуками.

Отже, нами показано, що структурні аналоги тилорону – дифеніли – мають високу біологічну активність, вони, як і препарат порівняння тилорон, здатні пригнічувати розвиток вірусного цитопатичного ефекту, спричиненого ДНК- і РНК-вмісними вірусами. Похідні дифенілу значно менш токсичні, ніж тилорон і можуть розглядатися як сполуки, перспективні для подальших досліджень при створенні нових протівірусних препаратів.

**О.С. Богорад-Кобельская, Н.М. Жолобак, З.М. Олевинская, М.Я.Спивак**

**АТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ДИФЕНИЛА НА РАЗНЫХ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ ВИРУС–КЛЕТКА**

В работе на двух модельных системах L929/BBC и RF/ВПГ-1 в условиях *in vitro* изучали противовирусную активность новых структурных аналогов тилорона дигидрохлорида: 4,4'-бис-[2-(диэтиламино)этокси]дифенил дигидрохлорида и 2-метоксикарбонил-4-4'-бис-[2-(диэтиламино)этокси]дифенил дигидрохлорида. В экспериментах использовали две схемы внесения исследуемых веществ: профилактическую и лечебную. Использование профилактической схемы внесения веществ подтверждает факт существования корреляции между продукцией ИФН под воздействием веществ и их противовирусной активностью. Показано, что дифенилы способны угнетать развитие вирусного цитопатического эффекта, вызванного ДНК- и РНК-содержащими вирусами. Производные



дифенила значительно менее токсичны, чем тилорон, и могут рассматриваться как вещества, перспективные для дальнейших исследований с целью создания новых противовирусных препаратов.

Ключевые слова: амиксин IC, тилорон, производные дифенила, противовирусная активность, ДНК- и РНК-содержащие вирусы.

**O.S. Bogorad-Kobelska, N.M. Zholobak,  
Z.M. Olevinska, M.Ya. Spivak**

### THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF DIPHENYL DERIVATIVES IN DIFFERENT MODEL SYSTEMS

In experiments on two model systems L929/VSV and RF/HSV-1 in vitro we have studied the antiviral activity of new structural analogues of tilorone – 4,4'-bis[2-(diethylamino)ethoxy]diphenyl dihydrochloride and 2-methoxycarbonyl-4-4'-bis[2-(diethylamino)ethoxy]diphenyl dihydrochloride. In experiments the tested substances were administered in preventive and therapeutic schemes. The preventive scheme confirms the existence of a correlation between IFN production under the influence of tested substances and their antiviral activity. It is shown that diphenyls are able to inhibit the development of viral cytopathic effect induced by DNA- and RNA-containing viruses. Diphenyl derivatives are less toxic than tilorone and could be considered as promising substances for further research to develop new antiviral drugs.

Key words: amixine IC, tilorone, diphenyl derivatives, antiviral activity, DNA-containing viruses, RNA-containing viruses.

*D.K. Zabolotnyi Institute of microbiology and virusology  
NAS of Ukraine, Kyiv.*

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андронати С.А., Литвинова Л.А., Головенко Н.Я. Пероральный индуктор эндогенного интерферона «Амиксин» и его аналоги // Журн. АМН України. – 1999. – 5, №1. – С. 53–66.
2. Богатський О.В., Грень А.І., Литвинова Л.О., Лемпарт Г.В. Про синтез 2,7-біс-[2-(диетиламіно)етокси]-флуорен-9-ону // Доп. АН УРСР. Сер. Б. – 1976. – №7. – С. 610–612.
3. Вотьяков В.И., Бореко Е.И., Владыко Г.В., Карако Н.И., Галегов Г.А., Леонтьева Н.А. Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений // Метод. рекомендации. – Минск, 1986. – 25 с.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Метод. Рекомендації / За ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К., 2001. – С. 379–385.
5. Ершов Ф.И. Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2005. – 368 с.
6. Співак Н.Я., Белоцкий С.М. Интерферон – от молекулы до лекарства // Фізіол. журн. – 2007. – 53, №2. – С. 98–104.
7. Шай Д.С., Жолобак Н.М., Ляхов С.А., Мальцев Г.В., Фернандес де Ривас С.О., Литвинова Л.О., Андронати С.А., Співак М.Я. Інтерферогенна активність аналогів аміксину і похідних дифенілу // Мікробіол. журн. – 2007. – 69, №5. – С. 59–64.
8. Шай Д.С., Жолобак Н.М., Співак М.Я. Протигерпетична та інтерферогенна дія нових оригінальних індукторів інтерферону – аналогів аміксину // Імунологія та алергологія. – 2007. – №2. – С. 74.
9. Шай Д.С., Жолобак Н.М., Співак М.Я. Стан системи інтерферону у мишей, оброблених аміксином та його аналогами // Там само. – 2007. – №1. – С. 22 – 23.
10. Bogorad-Kobelska O.S., Zholobak N.M., Dolga O.V., Maltzev G.M., Lyakhov S.A., Andronati S.A., Spivak M.Ya. Diphenyl derivatives: cytotoxicity, antiviral and IFN-inducing activities in vitro // Intern. J. Biomedic. – 2011. – 1, №3. – P. 153–157.
11. Bredehorn T., Duncker G.I. Tilorone-induced functional changes in the rat retina // Klin. Monbl. Augenheilkd. – 2000. – 216, №4. – P. 219–222.
12. Cavallini G., Massarani E. The concept of a supporting moiety as applied to the synthesis of anti-viral compounds // J. Med. and Pharm. Chem. – 1959. – 1, №4. – P. 365–370.
13. Danve-Szatanek C., Aymard M., Thouvenot D., Morfin F., Agius G., Bertin I., Billaudel S., Chanzy B., Coste-Burel M., Finkielstejn L., Fleury H., Hadou T., Henquell C., Lafeuille H., Lafon M.E., Le Faou A., Legrand M.C., Maille L., Mengelle C., Morand P., Morinet F., Nicand E., Omar S., Picard B., Pozzetto B., Puel J., Raoult D., Scieux C., Segondy M., Seigneurin J.M., Teyssou R., Zandotti C. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up // J. Clin. Microbiol. – 2004. – 42. – P. 242–249.
14. Delogu I., Pastorino B., Baronti C., Nougairde A., Bonnet E., de Lamballerie X. In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant // Antivir. Res. – 2011. – 90, №3. – P. 99 – 107.
15. Fischer J., Lüllmann H., Lüllmann-Rauch R. Drug-induced lysosomal storage of sulphated glycosaminoglycans // Gen. Pharmacol.: Vasc. Syst. – 1996. – 27, №8. – P. 1317–1324.
16. He G., Qiao J., Dong C., He C., Zhao L., Tian Y. Amantadine-resistance among H5N1 avian influenza viruses isolated in Northern China // Antivir. Res. – 2008. – 77, № 1. – P. 72–76.
17. Katz E., Margalith E., Winer B. Inhibition of herpes virus deoxyribonucleic acid and protein synthesis by tilorone hydrochloride // Antimicrob. Agents Chemother. – 1976. – 9, №1. – P. 189–195.
18. Malvy D., Treilhard M., Bouee S., Crochard A., Vallee D., Hasnaoui A.E., Aymard M. and the RESSAC Study Group. A retrospective, case-control study of acyclovir

- resistance in herpes simplex virus // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – **41**. – P. 320–326.
19. Medvedev A.E., Fuchs B.B., Rankhmilevich A.L. A study of the action of immunosuppressive factors from tumour cells on lymphocytes and macrophages in vitro and on the graft-versus-host reaction in mice // *Biomed. Sci.* – 1990. – №1. – P. 261–266.
20. Morahan P.S., Munson J.A, Baird L.G., Kaplan A.M., Regelson W. Antitumor action of pyran copolymer and tilorone against Lewis lung carcinoma and B-16 melanoma // *Cancer Res.* – 1974. – **34**. – P. 506–511.
21. Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn // *J. Biol. Chem.* – 2007. – **282**, №28. – P. 20047–20051.
22. Prokopek M. The tilorone-induced mucopolysaccharidosis in rats: Biochemical investigations // *Biochem. Pharmacol.* – 1991. – **42**, №11. – P. 2187–2191.
23. Safrin S., Crumpacker C., Chatis P., Davis R., Hafner R., Rush J., Kessler H.A., Landry B., Mills J., and other members of the AIDS Clinical Trials Group. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – **325**, №8. – P. 551–555.

*Ин-т мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного  
НАН України, Київ  
E-mail: alenask-13@rambler.ru*

*Матеріал надійшов до  
редакції 29.04.2011*

І.В. Верещака, А.В. Горковенко

## Суперпозиція моторних команд у перебігу створення “двосуглобових” статичних зусиль м’язами руки людини

*Вивчали особливості суперпозиції центральних моторних команд (ЦМК), які надходять до м’язів руки при створенні передпліччям ізометричних зусиль різного напрямку. Як оцінки інтенсивності ЦМК використовували амплітуди випрямлених електроміограм (ЕМГ), які відводилися від м’язів плечового пояса та плеча. Зусилля розвивались у горизонтальній площині операційного простору в умовах фіксованого положення руки. Порівнювалися два вектори сили рівної амплітуди та близьких напрямків, а також їх геометрична сума. Перевірялася гіпотеза щодо встановлення суперпозиції ЦМК у задачах сумачії вищевказаних векторів сили. Визначено напрямки складових і результативних зусиль, для яких була задовільною суперпозиція ЦМК. Показано відмінності у патернах коактивації екстензорних м’язів плечового пояса та плеча. При розгинальних зусиллях спостерігався досить високий рівень активності флексорів, тоді як екстензори під час згинаючих зусиль здебільшого були розслабленими.*

*Ключові слова:* рука людини, “двосуглобове” ізометричне зусилля, суперпозиція центральних моторних команд, напрямки зусилля, що збігаються і не збігаються.

### ВСТУП

М’язи, які забезпечують той або інший рух багатосегментної кінцівки або її фіксацію у певному положенні, як правило, функціонують групами. Взаємодія м’язів відбувається як у межах груп (синергізм), так між групами м’язів, що є згиначами та розгиначами відповідних суглобів (антагонізм). Коли рівноважний стан кінцівки порушується зовнішньою силою, м’язи звичайно генерують відповідні зусилля для відновлення її вихідної позиції [11, 12]. У механіці відомий принцип суперпозиції сил, відповідно до якого сумація двох сил відбувається векторно вгідно з правилом паралелограма. Під час виконання довільних рухів ЦНС вимушена вирішувати проблему надлишку ступенів свободи [1]. Не виключено, що подібна задача може спостерігатись і при формуванні статичних зусиль, які у місці їх прикладення можуть

створюватися завдяки різним комбінаціям силових реакцій більшості м’язів кінцівки.

Базуючись на тому факті, що здійснення просторових рухів потребує координованої зміни суглобових кутів, деякі автори припускають, що напрямок руху кінцівки насамперед визначають моноартикулярні м’язи, тоді як біартикулярні додатково розподіляють моменти сил між суглобами [6, 8]. Дані досліджень щодо підтримання пози тварин, свідчать про те, що головна роль у визначенні напрямку реакції відносно опори належить біартикулярним м’язам [9, 10]. Відомо, що у статичних умовах потрібний постійний контроль загальної механічної жорсткості кінцівки, який залежить від тонічної коактивації м’язів, які обертають той чи інший суглоб [2, 7 13].

Мета нашої роботи – проаналізувати особливості суперпозиції центральних моторних команд (ЦМК), які надходять до м’язів плечового пояса та плеча при гене-

рації передпліччям статичних зусиль у трьох напрямках, один з яких є векторною сумою двох інших.

## МЕТОДИКА

Тести були проведені на чотирьох здорових обстежених віком від 21 до 29 років.

Деталі методики були наведені у нашій попередній праці [3]. Під час експерименту обстежуваний кистю правої руки утримував руків'я механічного пристрою, яке давало змогу реєструвати величину та напрямок ізометричного зусилля, що розвивається передпліччям з використанням тензометричних датчиків. Плече та передпліччя тестованого знаходились у горизонтальній площині. Кут у плечовому суглобі становив  $30^\circ$ , а у ліктьовому –  $90^\circ$ ; при цьому зап'ясток було знерухомлено спеціальним механічним бандажем, а плече у дистальній частині підтримувалося на тросовому підвісі. У кожному експерименті було проведено десять серій тестів. Обстежуваний повинен був відтворювати еталонне зусилля, відстежуючи положення маркерів силового та командного сигналу на моніторі комп'ютера. Командний сигнал складався з трьох елементів – вихідного стаціонарного стану, лінійного наростання зусилля та кінцевого цільового стаціонарного рівня зусилля. Аналізували значення показників електроміограми (ЕМГ) тільки останньої стадії. Кожна серія складалася з реалізацій зусиль, орієнтованих у трьох напрямках щодо осі, перпендикулярної передпліччю. Друге з цих зусиль являло собою сумачію першого та третього. Напрямок відповідних зусиль наведено нижче, причому другий (результативний) відмічено жирним шрифтом: 280, 300, 320; 340, 0, 20; 5, 25, 45; 50, 70, 90; 90, 110, 130; 120, 140, 160; 170, 190, 210; 230, 250, 270; 110, 155, 200; 300, 345, 30°. Кути відкладали проти руху годинникової стрілки. ЕМГ-сигнали аналізували в межах інтервалу 3,0–5,0 с від початку досягнення стаціонарного рівня зусилля. Амплі-

туди першого та третього тест-зусилля (складові результативного) становили 30 Н, а друге (результативне) – 42,4 Н (для близько орієнтованих складових зусиль) та 56,4 Н (з ширшим відхилом векторів).

*Реєстрація ЕМГ.*

ЕМГ-сигнали відводили поверхневими електродами («Віорас System EL 503», США). Реєстрували від восьми м'язів руки: *m. brachioradialis* (Br), *m. biceps brachii*, *caput breve* (BB cb), *m. biceps brachii*, *caput longum* (BB cl), *m. triceps brachii*, *caput laterale* (TB clat), *m. triceps brachii*, *caput longum* (TB cl), *m. pectoralis major* (Pm), *m. deltoideus*, *pars clavicularis* (D pc), *m. deltoideus*, *pars scapularis* (D ps). Використовували підсилювачі зі смугою пропускання 0,1–1000 Гц. Після підсилення сигнали реєстрували з використанням другого комп'ютера та плат вводу/виводу PCI 6071E та 6023E («National Instruments», США). У режимі off-line сигнали ЕМГ піддавали двонапівперіодному випрямленню та низькочастотній фільтрації (цифровий фільтр Баттерворта четвертого порядку з частотою зрізу 15 Гц).

Нормування всіх ЕМГ-сигналів проводили відносно активності відповідних м'язів, яка була зареєстрована під час розвитку максимального ізометричного напруження м'язів (рис. 1).

Амплітуди випрямлених і підданих низькочастотній фільтрації ЕМГ використовували як оцінки моторних команд, що надходять до відповідних м'язів.

Для оцінки адекватності суперпозиції ЦМК аналізували різницю між середніми рівнями ЕМГ при реалізації двох складових і результативного зусиль. Для оцінювання статистичної вірогідності різниці між середніми рівнями ЕМГ використовували непарний критерій *t* Стьюдента; при цьому граничний рівень вірогідності для нульової гіпотези становив 0,05. Зазначимо, що суперпозиція вважалася досить адекватною, коли критерій *t* не давав статистично значимої різниці.

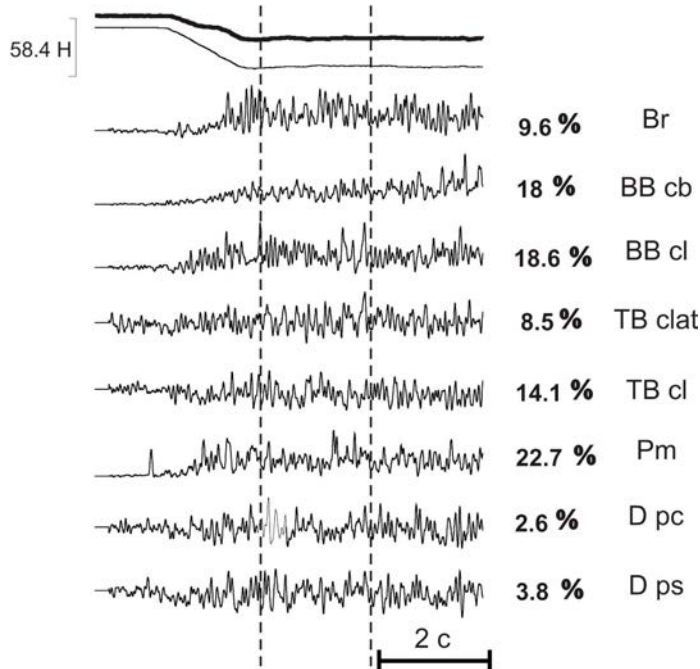


Рис. 1. Електроміографічна (ЕМГ)-активність м'язів плечового пояса та плеча при генерації зусилля внаслідок спроб паралельного згинання плечового та ліктьового суглобів. Наведені записи часового перебігу зусилля при напрямку його вектора  $190^\circ$  та відповідні записи ЕМГ-активності, що відводилася від м'язів: m. brachioradialis (Br), m. biceps brachii, caput breve (BB cb), m. biceps brachii, caput longum (BB cl), m. triceps brachii, caput laterale (TB clat), m. triceps brachii, caput longum (TB cl), m. pectoralis major (Pm), m. deltoideus, pars clavicularis (D pc), m. deltoideus, pars scapularis (D ps). Вертикальними пунктирними лініями позначена ділянка стаціонарної фази розвитку зусилля в межах якої проводилася сумація сигналів ЕМГ. 56,4 Н – стаціонарний цільовий рівень зусилля

## РЕЗУЛЬТАТИ

На рис. 2 зіставлені зміни ЕМГ-активності м'язів плечового пояса та плеча в умовах близько розташованих напрямків генерації зусиль у напрямків можливих рухів, які збігалися в обох суглобах (тобто намагання одночасного згинання або розгинання обох суглобів – а, б) та не збігаються (намагання згинання ліктьового та розгинання плечового суглобів – в, розгинання ліктьового та згинання плечового суглобів – г) секторах орієнтації зусилля. Формування згинального зусилля (вектор зусилля – ВЗ  $120, 140, 160^\circ$  – а) відбувалося переважно внаслідок істотного збільшення рівня активності односуглобового згинача передпліччя (BB cl), двосуглобового флексора ліктьового та плечового суглобів (BB cb) і згинача плеча (Pm), тоді як активність екстензорних м'язів (TB cl, TB clat, D pc, D ps) була мало

помітною. Для перевірки адекватності суперпозиції ЦМК після сумації відповідних ЕМГ-сигналів проводився статистичний аналіз ЕМГ, отриманих під час реалізації складових і результативних зусиль. Нас цікавили значення ЕМГ-активності, які між собою статистично не відрізнялись. Якщо в таких експериментальних умовах спостерігалися статистично достовірні відмінності між рівнями ЕМГ досліджуваних м'язів ( $P < 0,05$ ) суперпозиція ЦМК вважалася незадовільною. Таким чином, слід відзначити, що у перебігу реалізації зусилля (результативне зусилля, ВЗ  $140^\circ$ ) ЕМГ-активність двосуглобового флексора досить добре описувалася сумою відповідної ЕМГ у результаті генерації близько розташованих згинаючих зусиль (складові зусилля, ВЗ  $120$  та  $160^\circ$ ). У вказаній позиції ланки руки сума ЕМГ-сигналів складових зусиль для інших досліджуваних флексорних м'язів

ліктьового (Br, BB cl) і плечового (Pm) суглобів достовірно відрізнялися від активності цих м'язів при генерації результативного зусилля (B3 140 °).

В умовах зміни напрямку реалізації зусилля (рис. 2,б), коли воно почало забезпечуватися спробою розгинання обох суглобів (B3 280, 300, 320 °) суттєво збільшувалась активність екстензорних м'язів (TB clat, TB cl, D ps, D ps). Водночас подібна ситуація супроводжувалася помітною коактивацією деяких флексорів (BB cl, Pm). Такі результати про відмінність коактивації м'язів-антагоністів підтверджують дані, які були отримані нами раніше при дослідженнях формування повільних і

швидких “двосуглобових” ізометричних зусиль [2–4]. Під час проведення статистичної оцінки отриманих даних встановлено, що сумація ЕМГ (B3 280, 320 °) була досить адекватною для двосуглобового екстензора (TB cl) і згиначів плечового суглоба (D ps, D ps), на що вказує відсутність статистично значимих змін їх ЕМГ-активності. Найбільш суттєві (статистично достовірні) відмінності між реальними ЕМГ сумарного B3 (300 °) та сумою ЕМГ складових B3 (280 та 320 °) спостерігалися для м'язів-антагоністів (Br, BB cb, BB cl, Pm) і згинача ліктьового суглоба (TB clat).

Дещо інакше виглядала картина в умовах орієнтації зусиль, які забезпечу-

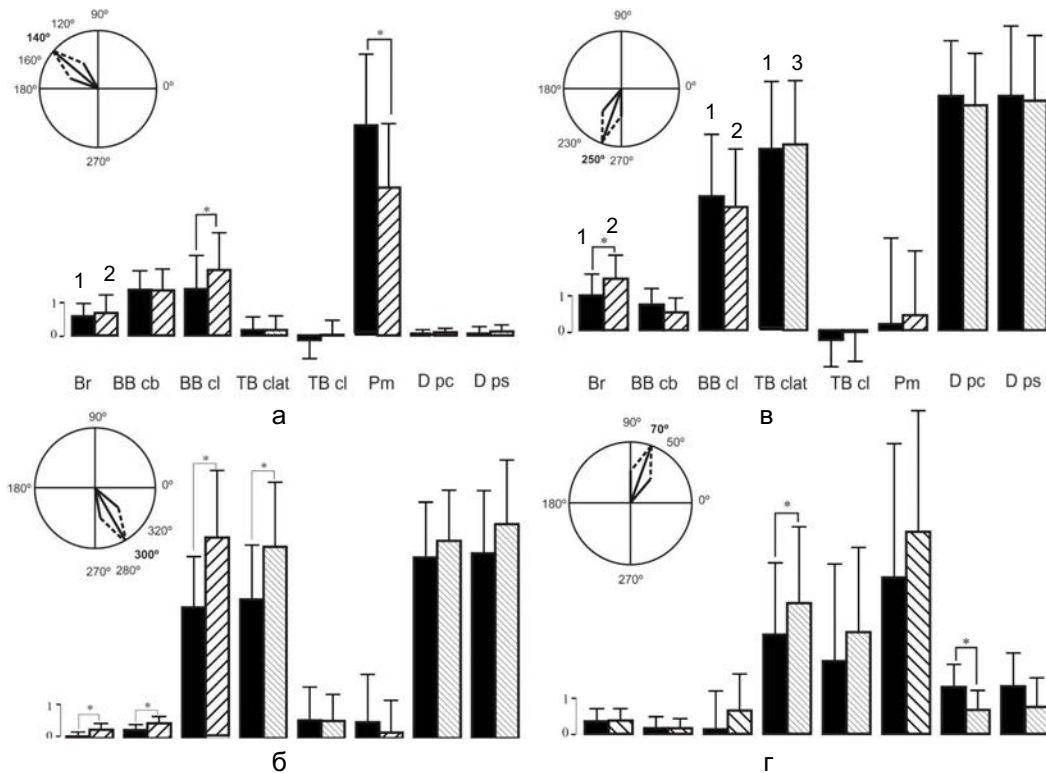


Рис. 2. Зіставлення електроміографічної (ЕМГ)-активності м'язів плечового пояса та плеча при генерації близько розташованих напрямків складових і результативних ізометричних зусиль. Ілюструється порівняння ЕМГ-активності м'язів-згиначів (Br, BB cb, BB cl, Pm – 2), і розгиначів (TB clat, TB cl, D ps, D ps – 3), що відводилися під час реалізації зусилля у напрямку: згинання (а) та розгинання (б) плечового та ліктьового суглобів, згинання ліктьового та розгинання плечового суглоба (в), розгинання ліктьового та згинання плечового суглоба (г), з сумою записів їх ЕМГ-активності (1), які відповідали генерації близько розташованих напрямків зусиль. Рівень ЕМГ-активності наведено у відсотках по відношенню до максимального довільного зусилля. \*P < 0,05 між значеннями рівня ЕМГ-активності окремого м'яза та сумою її ЕМГ-сигналів при реалізації близько розташованих орієнтацій зусилля. Зверху зліва напівжирним шрифтом виділені напрямки сумарного вектора зусилля

валися протилежною спрямованістю можливих рухів у суглобах (намагання згинання ліктьового та розгинання плечового суглобів – розгинання ліктьового та згинання плечового суглобів – див. рис. 2, в, г). Записи ЕМГ досліджуваних м'язів при генерації зусилля намаганням згинання ліктьового та розгинання плечового суглобів вказують на високу активність і взаємодію флексорів ліктьового (BB cb, BB cl) та екстензорів плечового (D pc, D ps) суглобів. У цьому секторі спрямованості результативного зусилля сумація ЕМГ-активності також була задовільною. При такій орієнтації зусилля була помітна паралельна коактивація розгинача ліктьового суглоба (TB clat). Статистично достовірні відмінності між ЕМГ-активністю під час створення сумарного та складових ВЗ спостерігалися лише для згинача ліктьового суглоба (Br). Генерація зусилля намаганням розгинання ліктьового та згинання плечового суглобів (г) відповідно забезпечувалася головним чином за рахунок переважної активації м'язів-екстензорів (TB clat, TB cl) і флексорів (Pm) цих суглобів. Оскільки для цих м'язів були відсутні статистично значимі зміни їх сумарної ЕМГ-активності – можна також говорити про наявність суперпозицій ЦМК, що до них надходять. Реалізація цього тест-зусилля супроводжувалася деякою коактивацією екстензорів плечового суглоба (D pc і D ps).

Досить задовільною сумація ЕМГ-активності згиначів та розгиначів (рис. 3, а, б) була, коли відстань між складовими векторами генерованого зусилля збільшувалась. У разі орієнтації ВЗ у напрямку згинання обох суглобів відмічалася переважна активація флексорних м'язів (Br, BB cb, BB cl, Pm) за відсутності такої м'язів-розгиначів. Водночас реалізація передпліччям розгинальних зусиль забезпечувалася за рахунок значної активації екстензорів (TB clat, TB cl, D pc, D ps). Проте у цьому разі на відміну від згинаючих зусиль,

спостерігався також помітний рівень активації м'язів-антагоністів (BB cl, Pm). Таким чином, у результаті розташування складових векторів дії сили м'язів і більших значень кута між ними генерується активність у частині м'язів плечового пояса та плеча.

Кількісні результати, які були отримані під час проведення решти експериментальних серій наведено в табл. 1 і 2. У табл. 1 наведено зіставлення ЕМГ-активності м'язів, які згинають плечовий (Br, BB cb, BB cl) і ліктьовий (Pm) суглоби при генерації основного та складових ВЗ. Статистично значимі зміни цього показника спостерігалися для Br, BB cb та BB cl ( $P < 0,05$ ). Для Br такі відмінності виникали в умовах

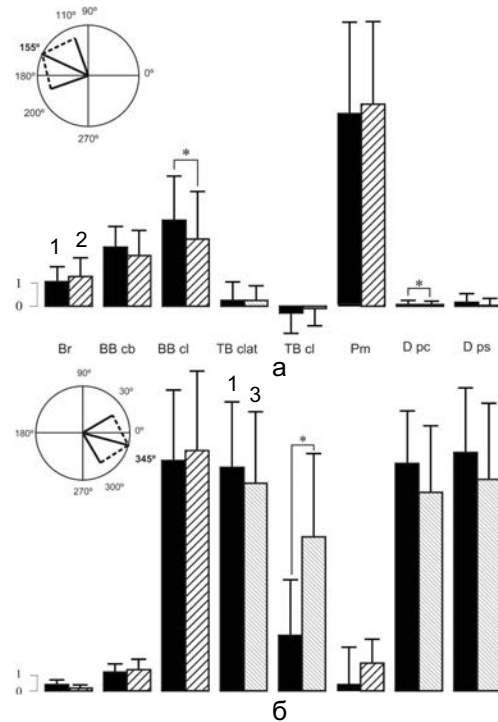


Рис. 3. Зіставлення електроміографічної (ЕМГ)-активності м'язів плечового пояса та плеча при більших значеннях кутів між векторами складових і результативних ізометричних зусиль, генерованих передпліччям. Ілюструється порівняння ЕМГ-активності м'язів-згиначів (Br, BB cb, BB cl, Pm – 2), і розгиначів (TB clat, TB cl, D pc, D ps – 3), що відводилися під час реалізації зусилля у напрямку: згинання (а) та розгинання (б) плечового та ліктьового суглобів з сумою записів їх ЕМГ-активності (1)

**Таблиця 1. Зіставлення рівня активності м'язів, які згинають плечовий і ліктьовий суглоби, при генерації складових і результативних напрямків зусилля**

М'язи	Вектор зусилля		Сума векторів зусилля		t	P
	Напрямки, °	%	Напрямки, °	%		
Br	0	3,1 ± 0,4	340 і 20	0,3 ± 0,4	-2,743	0,008
	25	0,4 ± 0,3	5 і 45	0,8 ± 0,4	5,243	0,000*
	110	0,2 ± 0,3	90 і 130	0,4 ± 0,4	2,99	0,004*
	190	2,4 ± 1,3	170 і 210	1,9 ± 0,9	1,999	0,052
BB cb	0	2,9 ± 0,5	340 і 20	0,4 ± 0,3	-4,686	0,000*
	25	0,6 ± 0,4	5 і 45	0,7 ± 0,3	-3,257	0,02*
	110	1,1 ± 0,6	90 і 130	0,9 ± 0,6	0,800	0,472
	190	4,4 ± 2,3	170 і 210	2,8 ± 1,2	0,625	0,012*
BB cl	0	16,5 ± 4	340 і 20	4,6 ± 1,9	-8,186	0,000*
	25	5,9 ± 2,9	5 і 45	8,5 ± 2,2	-2,992	0,004*
	110	1 ± 1,1	90 і 130	1 ± 1,4	0,325	0,747
	190	3,5 ± 2,1	170 і 210	4,3 ± 2,4	1,300	1,199
Pm	0	4,6 ± 2	340 і 20	1,3 ± 3	-0,279	0,781
	25	0,4 ± 1,6	5 і 45	-0,5 ± 2,7	1,148	0,256
	110	7,2 ± 3,3	90 і 130	7,2 ± 3,1	1,687	0,098
	190	5,9 ± 2,9	170 і 210	6,5 ± 3,2	1,836	0,072

реалізації розгинальних зусиль, коли значення кута ВЗ становило 25 та 110 ° (результативне зусилля), а складові зусилля створювались у напрямках 5 і 45 та 90 і 130° відповідно. Орієнтація результативного зусилля для BB cb і BB cl становила 0, 25, та 190 °, а його складових – 340 і 20, 5 і 45

та 170 і 210° відповідно. У всіх інших випадках зберігалися особливості суперпозиції ЦМК, які надходять до флексорних м'язів плечового пояса та плеча залежно від напрямку ВЗ.

Активність екстензорних м'язів, здебільшого при створенні результативного

**Таблиця 2. Зіставлення рівня активності м'язів, які розгинають плечовий і ліктьовий суглоби, при генерації складових і результативних напрямків зусилля**

М'язи	Вектор зусилля		Сума векторів зусилля		t	P
	Напрямки, °	%	Напрямки, °	%		
TB clat	0	14,3 ± 2,8	340 і 20	9,4 ± 2,5	-0,583	0,562
	25	8,2 ± 3,2	5 і 45	9,7 ± 2,2	-2,433	0,018*
	110	-0,03 ± 0,5	90 і 130	0,2 ± 0,6	1,639	0,107
	190	0,5 ± 0,8	170 і 210	0,8 ± 0,9	1,868	0,067
TB cl	0	17,5 ± 5,1	340 і 20	3,3 ± 2,6	-4,896	0,000*
	25	6 ± 4,1	5 і 45	4,6 ± 2,9	-1,748	0,086
	110	-0,1 ± 0,6	90 і 130	0,5 ± 1	3,339	0,002*
	190	-0,4 ± 1	170 і 210	-0,6 ± 1	2,468	-0,006*
D pc	0	9,7 ± 2,3	340 і 20	11,3 ± 2,3	4,921	0,000*
	25	6 ± 1,9	5 і 45	11,3 ± 2,1	0,214	0,831
	110	0,07 ± 0,2	90 і 130	0,2 ± 0,2	0,536	0,594
	190	0,03 ± 0,2	170 і 210	0,1 ± 0,2	1,432	0,158
D ps	0	11 ± 2,9	340 і 20	12 ± 2,9	3,533	0,001*
	25	6,5 ± 2,4	5 і 45	11,5 ± 2,4	-0,642	0,524
	110	0,2 ± 0,4	90 і 130	0,3 ± 0,4	0,885	0,380
	190	0,1 ± 0,4	170 і 210	0,2 ± 0,4	0,198	0,844



зусилля, також досить добре описувалась сумою їх відповідних ЕМГ (див. табл. 2). Виняток становила генерація розгинальних (ВЗ 0 ° для ТВ с1, D ps, D ps) і згинальних (ВЗ 110, 190 ° для ТВ с1) зусиль.

## ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Ми досліджували особливості центральної активації м'язів плечового пояса та плеча при створенні передпліччям руки людини "двосуглобових" ізометричних зусиль різного напрямку. Виникає питання, якою мірою механічна сумація векторів зусилля може узгоджуватися з суперпозицією центральних команд, які супроводжують їх генерацію.

Слід відмітити, що центральні програми ізометричних зусиль, які збігаються (спрямованих на одночасне розгинання або згинання обох суглобів) і, які не збігаються (спрямованих на згинання ліктьового та розгинання плечового суглобів, і навпаки) можуть бути описані сумою відповідних ЕМГ досліджуваних м'язів. Якщо розглядати ЕМГ-реакції м'язів, отримані внаслідок розвитку зусилля у одному з заданих напрямків (результативне) та їх сумації (тобто суму ЕМГ-сигналів м'язів під час генерації близько розташованих орієнтацій зусиль), можна говорити про адекватну суперпозицію ЦМК в умовах розвитку передпліччям ізометричних зусиль. Такі особливості формування ЦМК, які керують м'язами-згиначами та розгиначами ліктьового та плечового суглобів, спостерігалися також при виконанні довільних просторових рухів руки [5].

Істотною відмінністю між отриманими патернами активності досліджуваних м'язів був рівень коактивації останніх. У цьому разі під час розвитку зусилля, які були спрямовані до розгинання плечового та ліктьового суглобів, спостерігається значна коактивація м'язів-згиначів ліктьового (Br, BB сb, BB с1) та плечового (Pm) суглобів.

Водночас активність екстензорів в умовах згинальних зусиль була незначною або взагалі відсутньою. Виникнення такої коактивації флексорних м'язів під час розгинальних зусиль, імовірно, потрібне для певної компенсації виникаючих обертальних моментів у плечовому та ліктьовому суглобах при підвищеній активності двосуглобового екстензора (ТВ с1). Такі результати узгоджуються з експериментальними даними, отриманими раніше [2–4]. Не виключено, що високий рівень коактивації флексорних м'язів, на відміну від екстензорних, може вказувати на ту обставину, що розгинальні зусилля є більш складними для виконання, ніж згинальні. Така додаткова активація м'язів-згиначів при розгинальних зусиллях сприяє створенню необхідної механічної жорсткості кінцівки як такої та системи тулуб–плече–передпліччя у цілому.

Досить цікавими є патерн центральної координації м'язової активності в умовах здійснення більш складних, ізометричних зусиль, які не збігаються. Програма їх формування потребувала координованої взаємодії м'язів-агоністів та антагоністів. Відмічалася сумація сил, які розвивалися м'язами-агоністами. Така сумація напевно, необхідна для більш ефективної силової дії та створення загальної механічної жорсткості кінцівки.

Отже, отримані результати дають змогу припустити, що для деяких напрямків "двосуглобових" зусиль пряма суперпозиція моторних команд є адекватною. Це, очевидно, полегшує контроль моторних актів, який здійснюється ЦНС. Проте питання наскільки широко подібна проста стратегія може використовуватися ЦНС, потребує подальшого вивчення. Виявлені особливості коактивації м'язів, котрі згинають і розгинають ліктьовий і плечовий суглоби, вказують на складний характер ЦМК, які контролюють довільні ізометричні скорочення м'язів верхньої кінцівки.

**И.В. Верещака, А.В. Горковенко**

**СУПЕРПОЗИЦИЯ МОТОРНЫХ КОМАНД В ТЕЧЕНИЕ СОЗДАНИЯ “ДВУХСУСТАВНЫХ” СТАТИЧЕСКИХ УСИЛИЙ МЫШЦАМИ РУКИ ЧЕЛОВЕКА**

Изучали особенности суперпозиции центральных моторных команд (ЦМК), поступающих к мышцам руки при создании предплечьем “двухсуставных” изометрических усилий различного направления. В качестве оценки интенсивности ЦМК использовали амплитуды электромиограм (ЭМГ), которые отводились от мышц плечевого пояса и плеча. Усилие развивалось в горизонтальной плоскости операционного пространства в условиях фиксированного положения руки. Сравнивали два вектора силы одинаковой амплитуды и близких направлений, а также их геометрическую сумму. Проверялась гипотеза относительно суперпозиции ЦМК в задачах суммации вышеуказанных векторов силы. Определены направления составляющих и результирующих усилий, для которых суперпозиция ЦМК была удовлетворительной. Показаны отличия в паттернах коактивации экстензорных и флексорных мышц обоих суставов. При разгибательных усилиях наблюдался достаточно высокий уровень активности флексоров, тогда как экстензоры во время сгибательных усилий, в основном, расслаблялись.

Ключевые слова: рука человека, “двухсуставное” изометрическое усилие, суперпозиция центральных моторных команд, “совпадающие” и “несовпадающие” направления усилия.

**I. V. Vereshchaka, A. V. Gorkovenko**

**SUPERPOSITION OF THE MOTOR COMMANDS DURING CREATION OF STATIC EFFORTS BY HUMAN HAND MUSCLES**

The features of superposition of central motor commands (CMCs) have been studied during generation of the “two-joint” isometric efforts by hand. The electromyogram (EMG) amplitudes which were recorded from the humeral belt and shoulder muscles have been used for estimation of the CMCs intensity. The forces were generated in the horizontal plane of the work space; the position of arm was fixed. Two vectors of equal amplitudes and close direction and their geometrical sum were compared. The hypothesis of the CMCs’ superposition in the task of the force vector summation has been examined. The directions of the constituent and resulting forces with satisfactory superposition of the CMCs were defined. Differences in the co-activation patterns for flexor and extensor muscles of both joints were shown. The high level of the flexor muscles activity has been observed during extension efforts, while the flexion directions demonstrated much weaker activation of the extensor muscles.

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

Keywords: human hand, “two-joint” isometric force, superposition of central motor commands, “coincident” and “non-coincident” force direction.

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

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бернштейн Н.А. Физиология движений и активность. – М.: Наука, 1990. – С. 193.
2. Верещака И.В., Горковенко А.В. Центральная активация мышц руки человека при создании предплечьем изометрического усилия: зависимость от положения точки приложения силы в операционном пространстве // *Нейрофизиология / Neurophysiology.* – 2011. – **43**, № 3. – С. 197–199.
3. Верещака И.В., Горковенко А.В., Хоревин В.И., Тальнов А.Н., Корнеев В.В., А.И. Костюков. Особенности активации мышц плечевого пояса и плеча при “двухсуставном” создании предплечьем изометрических усилий различного направления // Там же. – 2010. – **42**, № 4. – С. 316–327.
4. Верещака И.В. Активация мышц плечевого пояса и плеча человека при различных скоростях развития предплечьем “двухсуставных” изометрических усилий // Там же. – 2010. – **42**, № 6. – С. 500–509.
5. Горковенко А.В., Тальнов А.Н., Корнеев В.В., Костюков А.И. Особенности активации мышц плеча и плечевого пояса человека при выполнении произвольных двухсуставных движений руки // Там же. – 2009. – **41**, № 1. – С. 48–56.
6. Gribble P.L., Ostry D.J. Compensation for interaction torques during single- and multijoint limb movement // *J. Neurophysiol.* – 1999. – **82**. – P. 2310–2326.
7. Hof A. L. The force resulting from the action of mono- and biarticular muscles in a limb // *J. Biomechan.* – 2001. – **34**. – P. 1085–1089.
8. Karst G.M., Hasan Z. Direction dependent strategy for control of multi-joint arm movements. Multiple muscle system // Springer Verlag. – 1990. – P. 268–281.
9. Macpherson J.M. Strategies that simplify the control of quadrupedal stance. II. Forces at the ground // *J. Neurophysiol.* – 1988 b. – **60**. – P. 218–231.
10. Milner T.E. Contribution of geometry and joint stiffness to mechanical stability of the human arm // *Exp. Brain Res.* – 2002. – **143**. – P. 515–519.
11. Osu R., Gomi H. Multijoint muscle regulation mechanisms examined by measured human arm stiffness and EMG signals // *J. Neurophysiol.* – 1999. – **81**. – P. 1458–1468.
12. Perreault E.J., Kirsch R.F., Crago P.E. Effects of voluntary force generation on the elastic components of endpoint stiffness // *Exp. Brain Res.* – 2001. – **141**. – P. 312–323.
13. Perreault E.J., Kirsch R.F., Crago P.E. Multijoint dynamics and postural stability of the human arm // *Jbid.* – 2004. – **157** – P. 507–517.

*Матеріал надійшов до редакції 12.06.2011*

N.V. Fartushok, O.P. Khavrona, Yu.M. Fedevych, O.Ya Sklyarov

## Changes in the antioxidant system and level of proinflammatory cytokin IL-1 $\beta$ in the blood patients of sufferi

*Diabetes mellitus type 1 provokes the development of the oxidative stress, accompanied by the increased level of TBA-active products, activation of NO-synthases and increased production of nitric oxide. Activation of glutathione reductase, decrease of the glutathione peroxidase and superoxide dismutases activity was observed. This shows a specific disturbance in the functioning of the antioxidant defense system and the augmentation in the concentration of one of the major first line reacting cytokin (IL-1 $\beta$ ).*

*Key words: antioxidant system, pro-inflammatory cytokin (IL-1 $\beta$ ), type 1 diabetes mellitus, blood.*

### INTRODUCTION

Type 1 diabetes mellitus is a chronic autoimmune disease, caused by the selective organospecific destruction occurring in insulin producing  $\beta$ -cells of Langerhans islets cells of pancreas [18]. As a result of the gradual destruction or decrease in the functional activity of about 80-90 % of  $\beta$ -cells insulin insufficiency occurs, causing alterations of glucose metabolism and occurrence of clinical symptoms specific to type 1 diabetes mellitus.

Although the actual trigger of the  $\beta$ -cell destruction is still unknown, various external (chemicals, viruses) or internal factors (free radicals, cytokines) have been proposed to initiate a deleterious chain of events leading to immune cell infiltration, release of free radicals and immune mediators such as cytokines, and eventually the destruction of  $\beta$ -cells. It appears that NO and various related free radicals and oxidant species are major effectors of  $\beta$ -cell death. The increased production of NO is due to the infiltrating macrophages and also various cell types of the islets overexpressing iNOS as a result of exposure to inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  [12].

Exposure of isolated rat, mouse, and human islets of Langerhans (in vitro models of type 1 diabetes) to various combinations of pro-inflammatory cytokines leads to inhibition of insulin secretion via NOS induction and subsequent free radical formation [6] and consequent poly (ADP – ribose) polymerase (PARP) – receptors activation and depletion of islet ATP and NAD sources, eventually culminating in apoptosis or necrosis [14].

Nowadays, this process is considered as the universal mechanism uniting the basic biochemical pathway of toxic effect of hyperglycemia on the organism. As a result structural changes of the membranes, permeability disturbances and loss of elastic properties up to their destruction occur.

For the protection of Langerhans' islets of pancreas from the damage caused by the superfluous quantity of free radicals of oxygen species, a powerful antioxidant protection exists. Damage and destruction of  $\beta$ -cells is observed only in cases of oxidative stress. Oxidative stress is supposed to be a disbalance between prooxidant and the components of antioxidant protection system and if it is not restored insufficiency of protective antioxi-

dant enzyme complex develops, leading to the development of diabetes mellitus.

Aim: to investigate the changes in antioxidant system and the level of interleukin (IL-1 $\beta$ ) in type 1 diabetes mellitus.

## METHODS

Hemolysate of erythrocytes and plasma from type 1 diabetes mellitus patients were used. The research group included 25 patients with insulin dependent diabetes. Middle age of all patients was between 30-40 years. Among them there were 10 (40 %) men and 15 (60 %) women. Glicemic level (sugar in blood) ranged in 8.5 – 10.7 mmol/l. The control group included 10 healthy persons. Blood for biochemical research was taken from the ulnar vein at the first day of the hospital stay, 12 hours after last meal.

Intensity of lipid peroxidation processes was evaluated by measuring the level of malonyl dialdehyde (MDA), TBA (Thiobarbituric acid)-active substances on Beruheim F. method (modified by Timirbulatov R.A. and Selezneva's E.I.) [1]. Maintenance of the stability of metabolite NO<sub>2</sub><sup>-</sup> was defined by the method of Green L.C., David A.V.[7]. Activity of NO-synthase determined by the method of Sumbaeva V.V., Jasinska I.M. [13]. Activity of superoxidedismutase (SOD) was measured by means of restoration reaction of Nitrotetrazoline blue (NTB) to Nitro-

formazane [11]. Activity of glutathion-reductase (GR) was defined by the level of decrease in the level of NADH+H<sup>+</sup> in the course of glutathionreductase reactions, activity of glutathionperoxidase (GP) by the method [16] modified by Pereslegina I.A. Level of pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  was defined by means of ELISA method (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). The received results were processed statistically based on the Student's criteria with the help of software program Microsoft Excel 8.0.

## RESULTS AND DISCUSSION

Type 1 diabetes mellitus (or insulin-dependent diabetes mellitus) is characterized by autoimmune destruction of the pancreatic islets insulin producing  $\beta$ -cells resulting in prolonged periods of hyperglycaemia via reduced uptake of glucose and relative increase in glucagon secretion and gluconeogenesis [3].

Results shows that patients with type 1 diabetes mellitus had increased activity of peroxidative processes which was confirmed by 1,6-fold rise of the TBA-active products (P<0.05; table).

Such a considerable growth is an indicator of finishing process of free radical damage caused by polyunsaturated fatty acids (PUFA) and their elimination from the lipid bilayer of cell membrane [11]. Simultaneously there is rising of the maintenance a nitrite-

**Indicators of the levels pro- and antioxidant system type 1 diabetes mellitus in blood patients**

Investigated indicators	Control	Research
TBA-reacting substances, mmol MDA/ml, plasma blood	12.01±0.09	19.82±0.56*
SOD $\mu$ mol NTB/ml · min, hemolysate of erythrocytes	3.21±0.69	1.32±0.88*
GR, $\mu$ mol NADPH+H <sup>+</sup> /ml · min, hemolysate of erythrocytes	6.02±0.60	10.19±1.83*
GP, $\mu$ mol GSH/ml · min, hemolysate of erythrocytes	27.81±2.50	11.93±2.43*
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , $\mu$ mol/l, plasma blood	5.84±0.36	10.59±0.78*
INOS, nmol NADPH+H <sup>+</sup> /min · mg Hb, hemolysate of erythrocytes	78.8±0.42	97.07±0.98*
IL-1 $\beta$ , pg/ml, plasma blood	3. ±0.62	11.71±0.69*

Note: \* P<0.05 – is significant with the changes that are probable concerning the value from the control group.

anion in 1,8 times ( $P < 0.05$ ).

It leads to a condition in which NO losses its protective functions and renders vaso-depressor and cytotoxic action. According to the changes of  $\text{NO}_2^-$  there was an increase in activity of iNOS in 1,2 times ( $P < 0.05$ ) for the account of inducible form which is capable to produce NO in increased activity. Activity of the rising iNOS can be a result of an gene expression of the enzyme that proves to be a true augmentation of intracellular level of mRNA enzyme at hyperglycemia [12].

In conditions of oxidative stress which are elucidated by excessive generation of free radicals, especially-active forms of oxygen, oppression antioxidant protection system activity which is related to respective alterations of its components. Enzymatic protection is possible with the help of SOD, catalase and enzymes of glutathione systems-glutathion-peroxidase, glutathionreductase and glutathiontransferase. These enzymes consistently reduce superoxide-radicals,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and organic hydroperoxides.

The primary form of active oxygen is superoxide anion that is detoxicated by superoxidodismutase. Activity of the last one was decreased 2,4-fold ( $P < 0.05$ ). This may be a result of its modification both as active oxygen and its metabolites (peroxynitrite-anion) and glucose [13]. As a result of SOD inactivation the significant amount of superoxide anion is produced. Through the non - enzymatic pathway superoxid anion transforms into hydrogen peroxide which in turn activates the process of lipid peroxidation.

As a result of accumulation of these products and hydrogen peroxide, activity of glutathionperoxidase is decreased 2.3-fold as well, using the substrate which is reduced by glutathione, transforming it into the oxidized form. The glutathionreductase activity increased 1,7-fold and is referred on maintenance of glutathionperoxidase with reduced glutathione. This enzyme is plays a central role in protection against negative influence of oxidative stress at development of type 1 diabetes mellitus.

Increasing levels of NO considerably enhances the effect of free radicals oxidation. NO in such situation shows cytotoxic action, co-operating with  $\text{O}_2$  and forming a powerful oxidant nitro peroxide ( $\text{ONOO}^-$ ) which induces the damage of DNA, mutations and inhibition of functions different enzymes. Therefore NO in high concentration can be the factor of endogenous intoxication which plays an essential role in the course of pathogenesis.

Type 1 diabetes mellitus is always connected with hyperglycemia witch triggers oxidative stress via multiple mechanisms including activation of the polyol pathway, glucose autooxidation, alterations of cellular redox state. Superoxide anion appears to play a particularly important role in the pathogenesis of diabetic cardiovascular dysfunction, and this reactive oxidant was reported to activate many of the above-mentioned pathways [14].

The cellular sources of superoxide anion are multiple and include NAD(P)H and xanthine oxidases, the arachidonic acid cascade (including cyclooxygenase and lipoxygenase), microsomal enzymes, and the mitochondrial respiratory chain, with the latter being the most important source in diabetes [15].

Hyperglycemia-induced superoxide production leads to increased expression of NAD(P)H oxidases, which in turn generate more superoxide anion. Through the activation of NF- $\kappa$ B, hyperglycemia favors increased expression of iNOS which can increase the generation of NO [16]. Multiple lines of evidence support the pathogenetic role of endogenous peroxynitrite formation in diabetic cardiovascular complications both in experimental animals and in humans [17].

Superoxide activates protein kinase C, polyol (sorbitol), hexosamine, and stress-signaling pathways leading to increased expression of inflammatory cytokines, angiotensin II, endothelin-1, and NAD(P)H oxidases, which in turn generate more ( $\text{ONOO}^-$ ), which induces cell damage via lipid peroxidation, inactivation of enzymes and other proteins by oxidation and nitration.

Peroxynitrite also acts on mitochondria, triggering the release of proapoptotic factors such as pathways. Peroxynitrite, in concert with other oxidants ( $H_2O_2$ ), causes strand breaks in DNA, activating the nuclear enzyme poly (ADP-ribose) [15].

According to the experimental researches IL-1 $\beta$  is considered as a key mediator which causes inhibition of insulin secretion and stimulates the expression of gene, responsible for coding the inducible nitric oxide synthase and NOS. The last one synthesizes NO and thus initiates necrosis and apoptosis of  $\beta$ -cells in rodents with spontaneous autoimmune diabetes [18].

Researches of pro-inflammatory cytokines in type 1 Diabetes mellitus patients showed compensation of the system inflammatory response due to hyper activation of cytokine's cascade and a condition of immunosuppression status that proves to be true with the authentic rising of concentration of IL-1 $\beta$  in 3.2 times.

## CONCLUSION

1. Diabetes mellitus results in the development of oxidative stress as a course of 1.6-fold increase of TBA active products, 1.8-fold increase of nitric anion content and 1.2-fold increase of iNOS activity.

2. We observed 1.7-fold increase of glutathionreductase activity, 2.3-fold decrease of glutathionperoxidase activity and 2.4-fold decrease of activity that is a result of damage of antioxidant system.

3. Increase in the content of one of the main cytokines IL-1 $\beta$  helps to in secretion of secondary cytokines and activation of inflammatory process in pancreas.

**Н.В. Фартушок, О.П. Хаврона, Ю.М. Федевич, О.Я. Склярв**

## **ЗМІНИ В АНТИОКСИДАНТНІЙ СИСТЕМІ ТА ВМІСТ ПРОЗАПАЛЬНОГО ЦИТОКІНУ (IL-1 $\beta$ ) У КРОВІ ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 1-ГО ТИПУ**

За умов цукрового діабету 1-го типу відбувається

окиснювальний стрес, що підтверджується збільшенням рівня ТБК-реагуючих продуктів, оксиду азоту та активації синтезу NO-синтази. Це підтверджується специфічними змінами у функціонуванні антиоксидантної системи захисту та збільшенням концентрації цитокіну (IL-1 $\beta$ ) як першої головної лінії реагування.

Ключові слова: антиоксидантна система, прозапальний цитокін (IL-1 $\beta$ ), цукровий діабет 1 типу, кров.

**Н.В. Фартушок, О.П. Хаврона, Ю.М. Федевич, А.Я. Склярв**

## **ИЗМЕНЕНИЯ В АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЕ И УРОВЕНЬ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНА (IL-1 $\beta$ ) В КРОВИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА**

Сахарный диабет 1-го типа сопровождается окислительным стрессом, что подтверждается увеличением содержания ТБК-реагирующих продуктов, оксида азота и активацией синтеза NO-синтазы. Это проявляется специфическими изменениями в функционировании антиоксидантной системы защиты и увеличением концентрации цитокина (IL-1 $\beta$ ) как первой главной линии реагирования.

Ключевые слова: антиоксидантная система, провоспалительный цитокин (IL-1 $\beta$ ), сахарный диабет 1-го типа, кровь.

## REFERENCES

1. Beruheim F., Mary L.C. Beruheim, Karl M. Wilbur: The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids // J. Biol. Chem. – 1948. – **174**. – P.257–264.
2. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications // Nature. – 2001. – **414**. – P.813–820.
3. Ceriello A., Quagliaro L., DrAmico M., Di Filippo C., Marfella R., Nappo F., Beriino L., Rossi F., Giugliano D. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat // Diabetes. – 2002. – **51**. – P.1076–1082.
4. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetes complications may lead to a “causa” antioxidant therapy // Diabetes Care. – 2003. – **26**. – P. 1589–1596.
5. Ceriello A., Piconi L., Quagliaro L., Wang Y., Schnabel C.A., Ruggles J.A., Gloster M.A., Maggs D.G., Weyer C. Effects of pramlintide on postprandial glucose excursions and measures of oxidative stress in patients with type 1 diabetes // Diabetes Care. – 2005. – **28**. – P.632–637.
6. Corbett J.A., Wang J.L., Sweetland M.A., Lancaster J.R., Mc-Daniel M.L. Interleukin 1 beta induces the formation of nitric oxide by beta-cells purified from

- rodent islets of Langerhans. Evidence for the beta-cell as a source and site of action of nitric oxide // *J. Clin. Invest.* – 1992. – **90**. – P. 2384–2391.
7. Green L.C., David A.W. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* – 1982. – **126**. – P. 131–138.
  8. Mazzanti L., Rabini R.A. Altered platelet membrane dynamic properties in type 1 diabetes // *Diabetes.* – 2005. – **46**, № 12. – P. 2069–2074.
  9. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease *Physiol // Physiol. Rev.* – 2007. – **87**. – P. 315–424.
  10. Pacher P., Szabo C. Role of preoxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes // *Curr. Opin Pharmacol.* – 2006. – **6**. – P.136–141.
  11. Sandstrom J., Nilsson P., Karlsson R. 10-Told increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by amutation in heparin-binding domain // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**, №29. – P. 19163–19166.
  12. Suchek C., Fehsel K., Kroncke K.D., Sommer A., Kolb-Bachofen V. Primary cultures of rat islet capillary endothelial cells. Constitutive and cytokine-inducible macrophagelike nitric oxide synthases are expressed and activities regulated by glucose concentration // *Amer. J. Pathol.* 1994. – **145**. – P. 685–695.
  13. Sumbajev V.V. Jasinskaja I.M. Vlijanije DDT na aktivnost' sintazy oksida azota v pecheni, ljohkih i golovnom mozge krysa // *Sovr. probl. toksikologii.* – 2000. – **3**. – P. 3–7.
  14. Szabo C. Roles of poly (ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications // *Pharmacol Res.* – 2005. – **52**. – P. 60–71.
  15. Spitaler M.M., Graier W.F. Vasular targets of redox signalling in diabete mellitus // *Diabetologia.* – 2002. – **45**. – P.476–494.
  16. Ursini E., Maiorino M., Gregolin C. The selenoenzyme phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase // *Biochem. and Biophys. Acta.* – 1985. – **839**. – P.62–70.
  17. Wu G., Bazer F.W., Davis T.A., Kim S.W., Li P., Rhoads J.M., Satterfield M.C., Smith S.B., Spencer T.E., Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease // *Amino Acids.* – 2009. – **37**. – P. 153–168.
  18. Zak K.P., Popova W.W. Cytokin and Diabetes type 1 in human body // *Ukr. Med. Newspaper.* – 2006. – 1, № 51, I/II. – P. 78–88.

*Danylo Halytskyi Lviv National Medical University*  
*E-mail: sklyarov@meduniv.lviv.ua*

*Received 08.07.2011*

В.В. Гарькавенко, Г.В. Стороженко, О.М. Краснікова, Н.О. Бабенко

## Корекція вікових порушень вмісту сфінголіпідів у тканинах щурів за допомогою інгібування кислоти сфінгомелінази

*Оскільки зниження вмісту сфінгомеліну та накопичення кераміду в клітинах у старості пов'язані з розвитком деяких патологічних станів, актуальним є пошук шляхів нормалізації обміну сфінголіпідів. Враховуючи те, що кислота сфінгомеліназа є ключовим ферментом сфінголіпідів, ми вивчали вплив інгібітора кислоти сфінгомелінази на вміст кераміду та сфінгомеліну у тканинах старих щурів. Введення меліпраміну викликає підвищення вмісту сфінгомеліну та зниження співвідношення керамід/сфінгомелінін у печінці, серці та головному мозку старих щурів. Найбільш чутливим до впливу меліпраміну є гіпокамп. Отримані результати свідчать про те, що меліпрамін є ефективним модулятором вмісту сфінголіпідів. Вікові зміни вмісту кераміду та сфінгомеліну у тканинах багато в чому визначаються активацією кислоти сфінгомелінази у процесі старіння.*

*Ключові слова: сфінгомелінін, керамід, сфінгомеліназа, меліпрамін, старіння.*

### ВСТУП

Відомо, що сфінголіпіди – важливі структуроутворювальні фосfolіпіди мембран, метаболіти яких відіграють роль медіаторів клітинного сигналу у процесах апоптозу, проліферації, клітинної міграції, регуляції тону судин, розвитку атеросклерозу, що зумовлено їх участю у формуванні рафтів – мембранних мікродоменів [1]. Існує тісна інтеграція у метаболізмі та мембранній локалізації сфінголіпідів і холестерину – ще одного важливого компонента рафтів [8]. Сфінголіпіди сфінгомелінін (СФМ) і його метаболіт керамід (ЦЕР) ушільнюють ділянку рафта та сприяють кластеризації таких її рецепторів, як CD95/Fas. Вплив СФМ і ЦЕР на кластеризацію мембранних білків може бути ключовим у розвитку апоптотичних сигналів. Однак встановлено, що крім структурування рецепторних білків, ЦЕР, поряд із деякими іншими активними метаболітами СФМ, може і сам бути вторинним месенджером [1, 8].

Практично будь-який стресорний стан у клітинах різноманітних тканин еукариотних організмів супроводжується альтераціями в обміні СФМ, і, зокрема, накопиченням ЦЕР [8, 9]. Крім синтезу ЦЕР де novo в мітохондріях та ендоплазматичному ретикулумі за участю керамідсинтази, значна його частина є продуктом деградації мембранного СФМ групою ферментів сфінгомеліназ (СФМаз). Основна маса ЦЕР у клітині утворюється внаслідок дії кислоти СФМазі [КФ-3.1.4.12]. Відзначається, що зміщення балансу в обміні сфінголіпідів у бік накопичення ЦЕР може призводити до індукції апоптозу як через кластеризацію рецепторів, задіяних у передачі апоптотичних сигналів на мембрані, так і за рахунок активації каспаз, що призводить до утворення мітохондріальних пор. Водночас накопичення СФМ, зниження співвідношення ЦЕР/СФМ, а також утворення сфінгозин-1-фосфату внаслідок деградації ЦЕР, навпаки, може стимулювати процеси проліферації та підвищення

© В.В. Гарькавенко, Г.В. Стороженко, О.М. Краснікова, Н.О. Бабенко



життєздатності клітин [1, 8, 9, 15].

Встановлено, що накопичення ЦЕР та підвищення співвідношення ЦЕР/СФМ, що відбувається в різних типах клітин старіючого організму, може призводити до розвитку такої вікової патології, як хвороба Альцгеймера. Ключовим ферментом регуляції співвідношення ЦЕР/СФМ вважається кисла СФМаза, надмірна активація якої призводить до підвищення вмісту ЦЕР, а зниження її активності може спричинити синдром Німана – Піка внаслідок накопичення сфінгомієліну у лізосомах [1, 3, 4, 10]. Водночас механізми вікового порушення функціонування сфінгомієлінового циклу залишаються неостаточно з'ясованими.

Згідно з останніми дослідженнями, підвищення активності кислоти СФМази в різних тканинах є характерним також для депресивних станів людини. Так, Kornhuber і співавт. [11] встановили підвищення активності кислоти СФМази у мононуклеарних клітинах периферичної крові пацієнтів з депресивними психічними розладами. Антидепресанти меліпрамін (іміпрамін, дисіпрамін) та амітриптилін є ефективними інгібіторами кислоти СФМази [7, 9, 11]. Саме пригнічення активності СФМази і зміна співвідношення сфінголіпідів може відігравати ключову роль у корекції депресивних станів при клінічному застосуванні меліпраміну та амітриптиліну. Вважають, що меліпрамін інгібує активність СФМази через порушення її зв'язку з негативно зарядженими ліпідами лізосомальних мембран, після чого СФМаза піддається протеолізу. Jenkins та співавт. [9] на клітинах MCF7 продемонстрували дозозалежне пригнічення активності кислоти СФМази дисіпраміном (меліпраміном) в експериментах як *in vivo*, так і *in vitro*.

Відомо, що введення меліпраміну та аналогічних йому антидепресантів – блокторів кислоти СФМази здоровим тваринам може імітувати ефекти, які спостерігаються у тварин з природженою її відсутністю.

Також, встановлено що меліпрамін пригнічує індукцію апоптозу фактором некрозу пухлин (ФНП- $\alpha$ ) в гепатоцитах щурів і мишей. Показано, що ЦЕР, що виробляється у клітині під дією ФНП- $\alpha$ , може відігравати роль вторинного месенджера, активуючого каспази, які запускають апоптоз. Підвищення активності СФМази під дією ФНП- $\alpha$  також порушує нормальне співвідношення ЦЕР/СФМ у клітинах. Відзначається, що меліпрамін пригнічує активність кислоти СФМази, порушуючи деградацію СФМ до ЦЕР, внаслідок чого гепатоцити набувають стійкості до дії ФНП [14].

Дані літератури [7, 9, 11] щодо здатності меліпраміну інгібувати кислу СФМазу дають змогу припустити можливість корекції за допомогою цього препарату вікових порушень обміну сфінголіпідів, що мають велике значення у розвитку вікових патологій. Тому метою нашої роботи була корекція вікових змін у тканинах старих щурів лінії Вістар через інгібування кислоти СФМази за допомогою меліпраміну.

## МЕТОДИКА

Дослідження виконані на 18 старих (24-місячних) щурах-самцях лінії Вістар [7]. Дослідні тварини отримували внутрішньом'язові ін'єкції меліпраміну у дозі 10 мг/кг протягом 7 або 14 діб, яка є оптимальною для пригнічення активності кислоти СФМази. Контрольна група щурів у ці самі терміни отримувала внутрішньом'язову ін'єкцію 0,9%-го розчину NaCl. Тварин декапітували під ефірним наркозом. Екстракцію фосфоліпідів з гіпокампа та великих півкуль головного мозку, печінки та серця здійснювали за методом Bligh, Dyer [6]. Розподіл ліпідів на фракції проводили методом одномірної хроматографії в тонкому шарі силікагелю (пластини "Sorbfil", Росія). Наявність ліпідів виявляли у випарах йоду та ідентифікували за допомо-

гою стандартів [2]. Кількісний вміст сфінголіпідів у хроматографічних фракціях визначали за неорганічним фосфором [5]. Вміст білка в суспензіях мозку, печінки та серця визначали за методом Lowry та співавт. [12]. Результати експериментів представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна помилка. Для порівняння значень вмісту ліпідів контрольної та дослідних груп використовували однофакторний дисперсійний аналіз one-way Anova, за критерієм Фішера, та для порівняння вмісту білка в дослідних групах – критерій t Стьюдента. Відмінності між групами вважали статистично достовірними при  $P < 0,05$ .

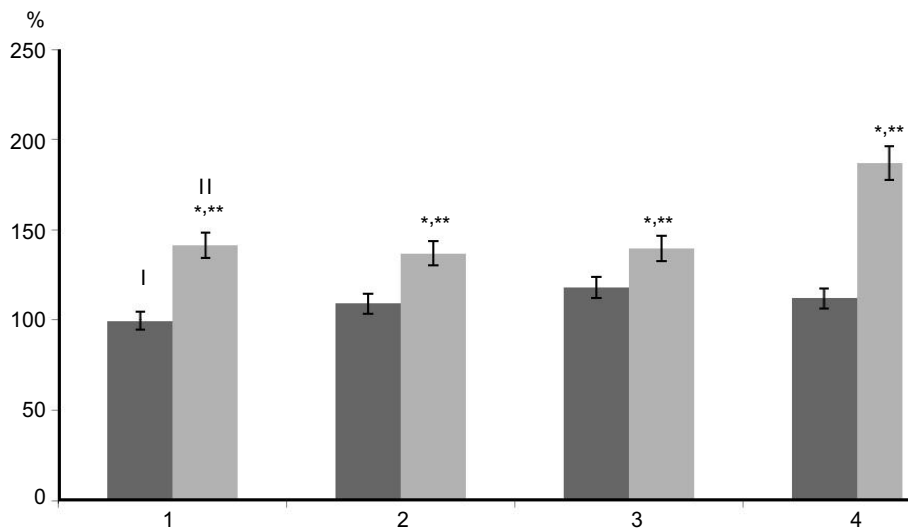
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час 7-добового введення дослідним щурам меліпраміну спостерігалася лише тенденція до підвищення вмісту СФМ у тканинах головного мозку і печінки відносно контрольної групи (рисунок). Водночас більш тривале введення препарату (14 діб) індукувало достовірне підвищення цього показника як у тканинах печінки та головного мозку, так і в серці (див. рисунок). Найбільший ефект спостерігався в гіпо-

кампі, де вміст СФМ підвищився на 186 % щодо значень у контрольній групі. Отримані результати можуть свідчити про пригнічувальну дію меліпраміну на гідроліз СФМ. Це узгоджується з даними сучасних досліджень, що демонструють ефективне пригнічення меліпраміном активності кислоти СММази у печінці, ізольованих гепатоцитах, мононуклеарних клітинах крові, ізольованих тканинах серця та артерій [7, 16].

У нашій роботі не спостерігалось достовірних змін співвідношення ЦЕР/СФМ у гіпокампі, неокортексі, тканинах печінки та серця щурів після 7-добового введення препарату (таблиця), а після 14-добового впливу воно знижувалося, що на тлі зростаючого в часі накопичення СФМ може свідчити про пригнічення активності кислоти СФМази.

Зміна співвідношення ЦЕР/СФМ у клітинах може бути важливим показником зміни активності СФМаз. Підвищення співвідношення ЦЕР/СФМ у клітинній мембрані може викликати збільшення чутливості клітини до апоптотичних сигналів, а відносно підвищення вмісту ЦЕР може індукувати загибель клітини як за апоптотичним, так і за некротичним шляхом [2, 3, 8]. Так, порушення нормаль-



Вплив меліпраміну на вміст сфінгомеліну у тканинах 24-місячних щурів: 1 – серце, 2 – печінка, 3 – кора півкуль головного мозку, 4 – гіпокамп. I – 7 діб, II – 14 діб. \* $P < 0,05$  щодо контролю, \*\* $P < 0,05$  щодо значень у тварин, які отримували препарат упродовж 7 діб

**Вплив меліпраміну на відношення цераміду до сфінгомієліну у тканинах 24-місячних щурів**

Тканина	7 діб		14 діб	
	Контроль	Меліпрамін	Контроль	Меліпрамін
Печінка	0,65 ± 0,05	0,66 ± 0,07	0,64 ± 0,05	0,56 ± 0,02 ***
Серце	1,01 ± 0,10	1,24 ± 0,10	0,93 ± 0,07	0,75 ± 0,06 ***
Неокортекс	1,07 ± 0,07	1,08 ± 0,08	0,59 ± 0,05	0,42 ± 0,03 ***
Гіпокамп	0,60 ± 0,05	0,60 ± 0,09	0,78 ± 0,05	0,48 ± 0,02 ***

\*P<0,05 порівняно з контролем, \*\*P <0,05 порівняно зі впливом меліпраміну протягом 7 діб.

ного співвідношення ЦЕР/СФМ у клітинах печінки на фоні підвищеної активності СФМази може призводити до розвитку стеатозів різної етіології (жирової дистрофії печінки) та відіграє важливу роль в ураженні печінки при гепатитах. Подібні порушення обміну сфінголіпідів у нервових клітинах відповідно до сучасних досліджень можуть бути причиною такої вікової патології, як хвороба Альцгеймера [8]. Zhang і співавт. [16], висловлюють припущення щодо зв'язку підвищеної СФМазної активності в ендотеліальних клітинах серця і великих судин з розвитком різноманітних патологій серцево-судинної системи. У попередніх наших працях показано підвищення вмісту ЦЕР у різних тканинах (зокрема, старіючого організму) і підвищення співвідношення ЦЕР/СФМ у печінці та гіпокампі старих тварин [3, 4].

Відомо, що зниження співвідношення ЦЕР/СФМ у клітинах сприяє підвищенню життєздатності клітин різних тканин, зниженню чутливості CD-95/Fas-рецепторів, а також сприйнятливості клітин до впливу апоптотичних сигналів, наприклад, ФНП-α [2, 8, 9, 16]. Підвищення життєздатності клітин може перешкоджати розвитку деяких патологій печінки та головного мозку, викликаних посиленням апоптотичних процесів.

Численними дослідженнями показано, що меліпрамін та аналогічні йому трициклічні антидепресанти вибірково інгібують кислу, але не нейтральну СФМазу [10, 11, 14]. Отримані в нашій роботі під впливом меліпраміну значні та прогресуючі у часі підвищення вмісту СФМ і зниження співвідношення ЦЕР/СФМ у печінці, мозку та

серці відносно контролю, можуть свідчити про успішну корекцію вікових змін у різних тканинах старих тварин.

Таким чином, слід зазначити, що меліпрамін є ефективним регулятором вмісту СФМ і ЦЕР у тканинах старих щурів. Дія препарату щодо вмісту сфінголіпідів може бути пов'язана з його здатністю пригнічувати активність кислої СФМази і залежить від тривалості його застосування. Найбільш інтенсивні зміни в обміні сфінголіпідів, що проявляються у збільшенні вмісту СФМ і зниженні співвідношення ЦЕР/СФМ, спостерігаються при тривалому, протягом 14 діб, введенні препарату старим тваринам. Найбільш чутливим до дії меліпраміну виявився гіпокамп, що дає змогу припустити тканинну специфічність дії препарату на обмін сфінголіпідів. Враховуючи те, що інгібітор кислої СФМази меліпрамін підвищує вміст СФМ і знижує співвідношення ЦЕР/СФМ у досліджуваних тканинах старих щурів до рівня, що спостерігається у молодих тварин [3, 4], можна заключити, що вікові зміни вмісту сфінголіпідів багато в чому визначаються активністю кислої СФМази.

**В.В. Гарькавенко, Г.В. Стороженко,  
О.Н. Краснікова, Н.А. Бабенко**

### **КОРРЕКЦИЯ ВОЗРАСТНЫХ НАРУШЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ СФИНГОЛИПИДОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПУТЕМ ИНГИБИРОВАНИЯ КИСЛОЙ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ**

Поскольку снижение содержания сфингомиелина и накопление церамида в клетках в старости сопряжены с развитием ряда патологических состояний, актуальным является поиск путей нормализации обмена сфинго-

липидов. Учитывая то, что кислая сфингомиелиназа является ключевым ферментом обмена сфинголипидов в настоящей работе изучали влияние ингибитора кислой сфингомиелиназы на содержание церамида и сфингомиелина в тканях старых крыс. Введение мелипрамина вызывает повышение содержания сфингомиелина и снижение соотношения церамид/сфингомиелин, в печени, сердце и головном мозгу старых крыс. Наиболее чувствительным к воздействию мелипрамина является гиппокамп. Полученные данные свидетельствуют о том, что мелипрамин является эффективным модулятором содержания сфинголипидов. Возрастные изменения содержания церамида и сфингомиелина в тканях во многом определены активацией кислой сфингомиелиназы в процессе старения.

Ключевые слова: сфингомиелин, церамид, сфингомиелиназа, мелипрамин, старение.

**V.V. Garkavenko, G.V. Storozhenko,  
O.N. Krasnikova, N.A. Babenko**

### **CORRECTION OF AGE-RELATED CHANGES IN SPHINGOLIPID CONTENT IN RAT TISSUES BY ACID SPHINGOMYELINASE INHIBITION**

Because reduction of sphingomyelin and ceramide accumulation in aging are associated with the development of a wide variety of pathologies, finding the ways of normalizing the sphingolipid exchange is becoming actual. As the ASM is a key enzyme of the sphingolipid exchange, in the present study we have investigated the effect of an ASM inhibitor imipramine on the ceramide and sphingomyelin content in the tissues of old rats. The introduction of imipramine elevates the sphingomyelin level and reduces the ceramide/sphingomyelin ratio in the liver, heart and brain of old rats. The hippocampus is most sensitive to the imipramine effects. These data suggest that imipramine is an effective modulator of sphingolipid content in the body of old rats. The age-related changes in the ceramide and sphingomyelin content in the tissues are highly determined by the activation of acid sphingomyelinase in the process of aging.

Keywords: sphingomyelin, ceramide, sphingomyelinase, aging, imipramine.

*Institute of Biology, Kharkiv Karazin National University*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Ипатова О.М., Торховская Т.И., Захарова Т.С. Сфинголипиды и клеточная сигнализация: участие в апоптозе и атерогенезе // Биохимия. – 2006. – 71, вып. 7. – С. 882–893.
2. Финдлей Дж. Б., Эванз У. Г. Биологические мембраны. Методы: Пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 424 с.

3. Babenko N., Shakhova E. Effects of Chamomilla recutita flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats // *Exp. Gerontol.* – 2006. – 41, № 1. – P. 32–39.
4. Babenko N.A., Semenova Y.A. Effects of long-term fish oil-enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats // *Ibid.* – 2010 – 45, № 5. – P. 375–380.
5. Bartlett G.R. Phosphorus assay in column chromatography // *J. Biol. Chem.* – 1959. – 234, № 3. – P. 466–468.
6. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* – 1959. – 37, № 8. – C. 911–917.
7. Deupree J.D., Reed A.L., Bylund D.B. Differential effects of the tricyclic antidepressant, desipramine, on the density of adrenergic receptors in juvenile and adult rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – 321, № 2. – P. 770–776.
8. Hannun Y.A., Obeid L.M. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind // *J. Biol. Chem.* – 2002. – 277, № 29. – P. 25847–25850.
9. Jenkins R.W., Canals D., Idkowiak-Baldys J., Simbari F., Roddy P., Perry D.M., Kitatani K., Luberto C., Hannun Y.A. Regulated secretion of acid sphingomyelinase – implications for selectivity of ceramide formation // *Ibid.* – 2010. – 285, № 46. – P. 35706–35718.
10. Kirschnek S., Paris F., Weller M., Grassme H., Ferlinz K., Riehle A., Fuks Z., Kolesnick R., Gulbins E. CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase // *Ibid.* – 2000. – 275, № 35. – P. 27316–7323.
11. Kornhuber J, Medlin A, Bleich S, Jendrossek V, Henkel AW, Wiltfang J, Gulbins E. High activity of acid sphingomyelinase in major depression // *J. Neural. Transm.* – 2005. – 112. – P. 1583–1590.
12. Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – 193. – P. 365–375.
13. March J.B. Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // *J. Lipid Res.* – 1966. – 7, №4. – P. 574–580.
14. Osawa Y., Uchinami H., Bielawski J., Schwabe R.F., Hannun Y.A., Brenner D. A. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor  $\beta$  // *J. Biol. Chem.* – 2005. – 280, №30. – P. 27879–27887.
15. Siskind L.J., Colombini M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 2000. – 275, № 49. – P. 38640–38644.
16. Zhang D. X., Fu-Xian Yi, Ai-Ping Zou, Pin-Lan Li Role of ceramide in TNF- $\beta$ -induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in coronary arteries // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – 283. – P. H1785–H1794.

*Харків. нац. ун-т ім. В.Н. Каразіна МОН України*

*Матеріал надійшов до редакції 13.01.2011*

О.Г. Шахова, О.М., Краснікова, Н.О. Бабенко

## Вплив хронічного обмеження калорійності раціону на вікові особливості орієнтувально-дослідницької поведінки щурів

*Вивчали вплив обмеження калорійності раціону на орієнтувально-дослідницький компонент поведінки 3-, 12-, 24–25-, 28–29- і 35–44-місячних щурів лінії Вістар. У контрольних тварин встановлене прогресуюче вікове зниження рівня локомоторної активності. Переведення і довічне утримування щурів на раціоні з обмеженням калорійності супроводжується пригніченням орієнтувально-дослідницької активності тварин у віці 3 міс і деякою її активацією в 24–25 міс у порівнянні з контрольними тваринами такого самого віку. Обмеження калорійності раціону формує особливий паттерн поведінки тварин у тесті “відкритого поля”, що практично не змінюється з віком.*

*Ключові слова: обмеження калорійності раціону, орієнтувально-дослідницька поведінка, тест “відкрите поле”.*

### ВСТУП

Численні дані літератури свідчать про розвиток когнітивної дисфункції в процесі старіння людини та тварин, що відбувається на тлі вікових нейродегенеративних змін [16, 17, 22, 23]. Важливими її поведінковими проявами вважають: порушення орієнтації в просторі, зміну рівня локомоторної активності, зниження швидкості реагування, а також зміну емоційних реакцій – підвищення тривожності, дратівливості й агресивності [22, 23].

Однією з небагатьох ефективних експериментальних моделей зниження ризику розвитку вікових патологій та підвищення тривалості життя є обмеження калорійності дієти [9, 15, 17]. Тривале обмеження калорійності раціону підвищує опір мозку до старіння та уповільнює зниження когнітивних функцій організму, що відбувається на фоні стимуляції експресії стресорних білків, нейротрофічних факторів і нейрогенезу [15, 17, 24]. Однак є експериментальні дані, які свідчать про те, що деякі

моделі зниження калорійності раціону подовжують життя, але призводять до пригнічення когнітивних функцій [26]. Отримання таких суперечливих відомостей може бути пов'язано з розбіжностями у складі дієт, ступені обмеження калорійності раціону, віці та лініях тварин.

Відповідно до даних багаторічних досліджень Нікітіна та співавт. [9], довічне утримання щурів в особливих умовах на повноцінній за складом, але калорійно обмеженій дієті (КОД), супроводжується збільшенням тривалості їх життя на 40–50 %, а в деяких випадках навіть на 100 %. Однак поведінкові реакції та, зокрема, дослідницька поведінка тварин, що утримуються на такій дієті, невивчені.

Для оцінки орієнтовно-дослідницького компоненту поведінки тварин широко використовують тест “відкритого поля” [25]. Вважають, що різні рівні рухової активності (горизонтальної та вертикальної) та емоційного реагування, які реєструють в цьому тесті, відображають функціональний стан відділів нервової

системи, що мають безпосереднє відношення до процесів навчання та пам'яті [3, 5].

Неоднозначність даних літератури щодо впливу обмеження калорійності раціону на когнітивні функції тварин і актуальність пошуку шляхів запобігання розвитку вікових порушень функцій мозку та їх поведінкових проявів зумовили мету нашого дослідження: вивчення впливу КОД на орієнтувально-дослідницький компонент поведінки щурів.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 142 щурах, яких було розподілено на 5 вікових груп: I – молоді 3-місячні, II – дорослі 12-місячні, III – старі 24–25-місячні, IV – дуже старі 28–29 місячні та V – найстаріші 35–44-місячні. Вік 28–29 міс близький до максимальної тривалості життя контрольних тварин, а 35–44 міс – тварин, що утримувалися на КОД. У групі “контроль” немає тварин віком від 35 до 44 міс, тому що вони, як правило, до нього не доживали.

Дослідних тварин віком 1 міс ізолювали, переводили на КОД (дієта С.М. McCaу в модифікації Нікітіна) [9] та утримували на цьому раціоні довічно. По закінченні кожних 100 діб протягом експерименту тваринам давали можливість підвищити масу на 10 г, збільшуючи кількість їжі, та знову протягом наступних 100 діб утримували на раціоні, який стримував їх зростання. Загальне зниження калорійності раціону сягало 60 % від норми та відбувалося за рахунок ліпідного компонента. Контрольні щури протягом життя отримували звичайний раціон *ad libitum*.

Орієнтувально-дослідницький компонент поведінки щурів вивчали в умовах “відкритого поля” за стандартною методикою Буреша [2]. Тривалість тесту становила 5 хв. Реєстрували вертикальну активність (стійки з опорою і без опори на стінку), горизонтальну активність (кількість

перетнутих квадратів у центрі поля та на периферії), реакції грумінгу (умивання, чищення, викушування шерсті та лапок, почісування), кількість виходів у центр “поля”, латентний період руху із центру “поля” на початку тестування, реакції прийняття та завмирання.

Для порівняння результатів використовували критерій Манна–Уїтні та критерій *t* Стьюдента. Розходження між групами вважали статистично вірогідними при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення вікових аспектів поведінки контрольних тварин в умовах “відкритого поля” виявило прогресуюче зниження у старих (III група) і дуже старих (IV група) щурів загальної (горизонтальної та вертикальної) рухової активності (амбуляції) (рис. 1,а), зниження кількості стійок з опорою на стінку (див. рис. 1,в), а також збільшення тривалості латентного періоду виходу із центра поля (рис. 2 ,а) у порівнянні з молодими 3-місячними тваринами.

У загальній поведінці щурів у “відкритому полі” прийнято виділяти емоційні, рухові та орієнтовно-дослідницькі компоненти [7]. Латентний період відходу з центру “поля” вважають критерієм емоційності, що відображує рівень тривожності [25], тому що реакція “завмирання” у тварини, яка знаходиться в незнайомих умовах, як правило, є наслідком страху, що пригнічує орієнтувально-дослідницьку поведінку [8]. Загальну рухову активність прийнято вважати комплексним показником, що відображує дослідницьку активність та емоційність, а стійки з опорою на стінку – компонентом активної дослідницької поведінки, спрямованої на пошук можливості уникнення стресової ситуації [25].

Відповідно до зазначених інтерпретацій поведінкових реакцій, встановлене в цьому дослідженні, в контрольних щурів вікове

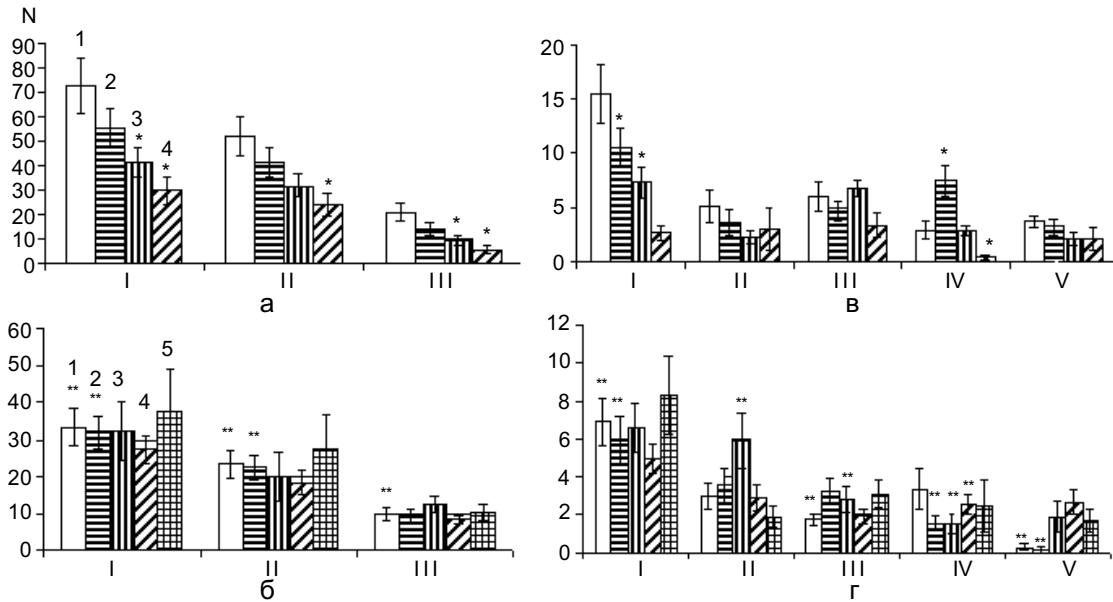


Рис. 1. Кількісні показники поведінки контрольних щурів (а, в) та тварин з калорійно обмеженою дієтою (б, г) різного віку у тесті “відкритого поля”: 1 – 3 міс, 2 – 12 міс, 3 – 24–25 міс, 4 – 28–29 міс, 5 – 35–44 міс. За віссю абсцис на рис. а та б (показники рухової активності) – I – загальна рухова активність, II – загальна горизонтальна рухова активність, III – загальна вертикальна рухова активність; на рис. в і г (показники поведінки) – I – стійки з опорою на стінку, II – стійки без опори на стінку, III – реакції грумінгу, IV – уринації, V – дефекації. За віссю ординат – кількість реакцій поведінки. \*P < 0,05 відмінності, вірогідні щодо 3-місячних тварин, \*\* – щодо контрольних тварин

зниження рухової активності й збільшення тривалості латентного періоду виходу із центра поля можна розцінювати, як зниження орієнтувально-дослідницької поведінки та підвищення емоційної реактивності, тобто як зміну стратегій дослідницької поведінки та активного уникання на стратегію пасивного уникання [6]. Однак у

нашому дослідженні не відзначено зниження з віком кількості стійок без опори на стінку (див. рис. 1,в), які є орієнтовною реакцією – фактором вищого порядку в ієрархії поведінкових реакцій, а також кількості прийомів (3 міс –  $31,7 \pm 4,1$ ; 24 міс –  $40,3 \pm 3,96$ ), що є дослідницьким компонентом амбуляції [25]. У старих і

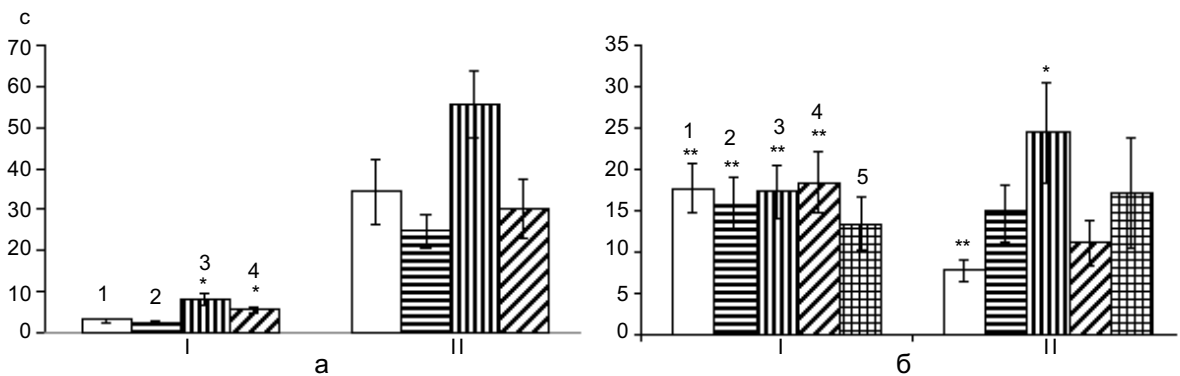


Рис. 2. Тривалість реакцій поведінки контрольних щурів (а) та тварин з калорійно обмеженою дієтою (б) різного віку в тесті “відкритого поля”: 1 – 3 міс, 2 – 12 міс, 3 – 24–25 міс, 4 – 28–29 міс, 5 – 35–44 міс. За віссю абсцис – реакції поведінки – I – латентний період виходу з центра поля, II – загальна тривалість грумінгу. За віссю ординат – тривалість реакцій поведінки, с. \*P < 0,05 відмінності, вірогідні щодо 3-місячних тварин, \*\* – щодо контрольних тварин

дуже старих контрольних щурів також не спостерігалось вікового підвищення кількості дефекацій, які вважають критерієм емоційної реактивності, тривоги, страху, і не відзначено зниження кількості та тривалості грумінгу – форми поведінки, що свідчить про звикання до нової ситуації [25]. Очевидно, вікове зниження рухової активності, яке спостерігалось в старих і дуже старих щурів у відкритому полі, не можна однозначно розцінювати як зниження дослідницької активності, як це звичайно інтерпретується для молодих тварин.

Деякі автори відзначають, що дослідницька та рухова активності можуть бути роз'єднані [12, 22]. Амбуляція тісно пов'язана із загальними метаболічними процесами в організмі [12], і існує зворотна кореляція між руховою активністю та масою тіла [10]. Відомо, що щури є тваринами, які ростуть протягом усього життя та у старості маса їхнього тіла в 2–3 рази вища, ніж у молодості (3 міс –  $173,9 \pm 10,4$ ; 24 міс –  $406,9 \text{ г} \pm 9,11 \text{ г}$ ;  $P < 0,05$ ), тому не виключено, що зниження рухової активності у старих щурів пов'язано зі значним зростанням маси їхнього тіла.

Проте існує велика кількість досліджень на багатьох видах тварин, що демонструють зниження когнітивних функцій у старості – пам'яті, уваги, швидкості обробки інформації, а також моторної функції та дослідницької поведінки [11, 16, 23]. Нині дослідники відзначають широку варіабельність виконання когнітивних тестів серед старих тварин одного виду та гетерогенність ступеня порушення різних функцій організму: виділяють тварин із відсутністю вікових змін когнітивних функцій і різним ступенем порушення виконання когнітивних тестів [16, 23]. Вважають, що варіативність даних поведінкової активності, які одержують в “відкритому полі”, багато в чому пов'язана з проявом індивідуальних типологічних властивостей нервової системи тварин,

основою яких є індивідуальні особливості метаболізму та нейрогуморальної регуляції [3, 5, 8]. Дослідження вікової динаміки поведінкового прояву індивідуальних типологічних властивостей нервової системи тварин може сприяти розумінню причин гетерогенності даних про вікове зниження когнітивних функцій.

Переведення щурів на КОД супроводжувалося зниженням загальної локомоторної активності (див. рис. 1,б), кількості стійок з опорою на стінку (див. рис. 1,г), частоти та тривалості грумінгу та підвищенням латентного періоду виходу з центра поля в 3-місячних дослідних тварин у порівнянні з контрольними щурами такого самого віку (див. рис. 1,б, 2,б).

Зазначені зміни поведінки тварин у цілому можна розцінювати як пригнічення дослідницької активності в умовах негативного емоційного напруження, яке є характерною для стану стресу [10]. Важливо відзначити, що патерн поведінки в умовах “відкритого поля”, що сформувався в дослідних щурів після їхнього переведення на КОД, зберігається у тварин протягом усього життя від молодого до найстарішого віку (за винятком 24–25 міс; див. рис. 1,б,г; 2,б). Це дає змогу говорити про нівелювання вікових змін поведінкових реакцій в умовах КОД. Наші результати підтверджують дані літератури, де вказують, що переведення тварин на КОД супроводжується швидкою зміною фізіологічних показників, які зберігаються протягом усього життя і практично не піддаються віковим змінам [27].

Довічне утримання щурів на КОД супроводжувалося підвищенням тривалості грумінгу (див. рис. 2,б) й збільшенням кількості стійок без опори на стінку (на 99 %; див. рис. 1,г) у 24–25-місячних тварин у порівнянні з 3-місячними. Кількість стійок без опори на стінку в 24–25-місячних дослідних щурів також була вища щодо значень у контрольних тварин такого



самого віку (див. рис. 1, в, г). Ці зміни можуть вказувати на деяке зниження негативного емоційного напруження та активацію орієнтувально-дослідницької поведінки в старих дослідних щурів у порівнянні з молодими дослідними та старими контрольними тваринами такого самого віку. Однак ці вікові відмінності відсутні у дуже старих 28–29-місячних контрольних і дослідних тварин (див. рис. 1, в, г).

Дотепер залишаються нез'ясованими точні механізми дії обмеження калорійності раціону на процеси старіння та тривалість життя. Переведення тварин на низькокалорійний раціон можна назвати хронічним “нутриціоанальним стресом”, адаптація до якого супроводжується переходом на особливий рівень нейрогуморальної регуляції та метаболічної активності організму, що підтримується протягом усього експерименту та формує стратегію виживання [9, 15, 27]. Зниження споживання калорій активує гіпоталамо-гіпофізарно-адреналову систему та індукує в тварин поведінкову адаптацію, яка спрямована на економію енергії та проявляється в зниженні загальної локомоторної активності й появі феномена “заціпеніння” [19].

Відомо, що тривале обмеження калорійності раціону викликає підвищення вмісту глюкокортикоїдів у плазмі крові [20]. Кортикостерон фізіологічно має адаптивний ефект протягом періоду гострого стресу, але при хронічному стресі може викликати патологічні зміни в мозку. Деякі автори вказують на те, що різні моделі обмеження калорійності раціону на тлі підвищеного вмісту кортикостерону спричиняють значне зниження вмісту нейромедіаторів (дофаміну, серотоніну та епінефрину) у різних структурах мозку тварин, що супроводжується розвитком депресії та значним зниженням рухової та дослідницької активності у тесті відкритого поля, однак може модулювати нормальний темп старіння [13,

18]. Вважають, що нейропротекторний ефект обмеження калорійності раціону, який включає підвищення експресії нейротрофічних факторів і зниження вікової активації глії, перевищує пошкоджувальний ефект глюкокортикоїдів [20].

Серед факторів, що сприяють позитивному ефекту КОД, слід зазначити одну особливість її складу. Обмеження калорійності дієти відбувається за рахунок зменшення вмісту насичених жирів, що призводить до значного підвищення в ній відносної частки поліненасичених ліпідів у порівнянні із раціоном контрольних тварин. Відомо, що  $\omega$ -3 поліненасичені жирні кислоти ( $\omega$ - ПНЖК) відіграють важливу роль у функціонуванні клітин мозку в нормі та при патологічних станах [4]. Механізми їх дії пов'язують із модифікацією плинності мембран нейрональних клітин і впливом на нейротрансмітерну функцію [21]. Встановлено участь  $\omega$ -3 ПНЖК у регуляції когнітивної функції, локомоторної та дослідницької активності та емоційного статусу тварин [1, 14]. Зниження вмісту докозагексаєнової кислоти в нервовій тканині старих тварин призводить до зниження загальної локомоторної та дослідницької активності, викликає порушення когнітивних функцій і поведінкових реакцій у тварин. Водночас введення  $\omega$ -3 ПНЖК у раціон нормалізує склад фосfolіпідів мозку, поліпшує когнітивні функції та запобігає розвитку нейродегенеративних захворювань [1]. З огляду на сказане вище, не виключено, що високий вміст  $\omega$ -3 ПНЖК у раціоні щурів із КОД сприяє попередженню вікового зниження локомоторної активності та орієнтувально-дослідницької поведінки щурів, та є одним із факторів, які компенсують шкідливу дію на мозок підвищеного вмісту кортикостерону.

Таким чином, переведення і довічне утримання щурів на дієті з обмеженням калорійності формує особливий патерн поведінки тварин у тесті “відкритого поля”, який практично не змінюється з віком. КОД

індукує у щурів специфічний стан організму, поведінковим проявом якого є пригнічення орієнтувально-дослідницької активності у віці 3 міс та деякою її активацією у 24–25 міс.

**Е.Г. ШАХОВА, О.Н. КРАСНИКОВА,  
Н.А. БАБЕНКО**

### **ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ОГРАНИЧЕНИЯ КАЛОРИЙНОСТИ РАЦИОНА НА ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС**

Исследовали влияние калорийно-ограниченного рациона на ориентировочно-исследовательский компонент поведения 3-, 12-, 24–25-, 28–29- и 35–44-месячных крыс линии Вистар. У контрольных животных установлено прогрессирующее возрастное снижение уровня локомоторной активности. Перевод и пожизненное содержание крыс на рационе с ограничением калорийности сопровождается угнетением ориентировочно-исследовательской активности в возрасте 3 мес и некоторой ее активацией в 24–25 мес по сравнению с контрольными животными того же возраста. Ограничение калорийности рациона формирует особый паттерн поведения животных в тесте “открытого поля”, который практически не изменяется с возрастом.

Ключевые слова: ограничение калорийности рациона, ориентировочно-исследовательское поведение, тест “открытое поле”.

**E.G. Shakhova, O.N. Krasnikova, N.A. Babenko**

### **EFFECTS OF CHRONIC CALORIC RESTRICTION ON THE AGE-ASSOCIATED PECULIARITIES OF EXPLORATIVE BEHAVIOUR IN RATS**

Long-term caloric restriction (CR) has been reported to extend the life spans, delay the onset and decrease the incidence of a broad spectrum of age-associated diseases. However, its effect on rat explorative behaviour is still unclear. In the present study, a number of behavioural measures were continuously monitored in 3-, 12-, 24–25-, 28–29- and 35–44-month-old male Wistar rats that were fed either ad libitum or placed on a caloric restricted diet. A gradual decline in locomotor activity of the ad libitum fed rats has been determined during aging in the open field test. In the CR groups, 3-month-old rats exhibited lower levels of exploratory behavior, compared to rats on the control diet. 24–25-month-old CR rats exhibited higher levels of exploratory behaviour, compared to ad libitum fed animals of the same age. Chronic dietary restriction nullified the age-dependent decline in locomotor activity and explorative behaviour of rats.

Key words: caloric restriction, explorative behavior, open field test.

*Institute of Biology, Kharkov Karazin National University*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бабенко Н.А., Семенова Я.А. Влияние диеты, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами рыбьего жира, на обмен фосфолипидов и когнитивные функции старых крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2008. – № 12. – С. 1400–1406.
2. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высш. шк., 1991. – 299 с.
3. Гуляева Н.В., Степанчиков М.Ю. Биохимические корреляты индивидуально-типологических особенностей поведения крыс // Журн. высш. нервн. деятельности. – 1997. – 47, вып. 2. – С. 239–338.
4. Когтева Г.С., Безуглов В.В. Ненасыщенные жирные кислоты как эндогенные биорегуляторы // Биохимия. – 1998. – 63, №1. – С. 6–15.
5. Костенкова В.Н., Никольская К.А. Сравнительная характеристика психоэмоциональных проявлений у беспородных крыс и крыс линии Вистар // Журн. высш. нервн. деятельности. – 2004. – 54, № 5. – С. 620–631.
6. Кременевская С.И., Гельман В.Я., Зацепин Э.П. Выделение различных компонентов ориентировочной реакции крыс в условиях открытого поля // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1991. – 77, № 2. – С. 124–129.
7. Кулагин Д.А., Болондинский В.К. Нейрохимические аспекты эмоциональной реактивности и двигательной активности крыс в новой обстановке // Успехи физиол. наук. – 1986. – 17, № 1. – С. 92–108.
8. Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте “открытого поля” // Журн. высш. нервн. деятельности. – 1981. – 31, вып. 2. – С. 301–307.
9. Никитин В.Н. Экспериментальные подходы к продлению жизни // Итоги науки и техники: общие проблемы биологии. – М., 1984. – 4. – С. 6–43.
10. Титов С.А., Каменский А.А. Роль ориентировочного и оборонительного компонентов в поведении белых крыс в условиях “открытого поля” // Журн. высш. нервн. деятельности. – 1980. – 30, вып. 4. – С. 704–709.
11. Фролькис В.В., Безруков В.В., Богацкая Л.Н. Старение мозга. – Л.: Наука, 1991. – 277 с.
12. Birke L.I., Archer J. Open-field behaviour of oestrous and dioestrous rats: evidence against an emotionally interpretation // Anim. Behav. – 1975. – 23, № 3. – P. 509–512.
13. Chandler-Laney P.C., Castaneda E., Pritchetta C.E., Smith M.L., Giddings M., Artiga A.I., Boggiano M.M. A history of caloric restriction induces

- neurochemical and behavioral changes in rats consistent with models of depression // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2007. – **87**, № 1. – P. 104–114.
14. Fedorova I., Salem N.J. Omega-3 fatty acids and rodent behavior // *Prost. Leukot. Essent. Fatty Acids.* – 2006. – **75**, № 4–5. – P. 271–289.
  15. Fontan-Lozano A., Lopez-Lluch G., Delgado-Garcia J.M., Navas P., Carrion A.M. Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity // *Nol. Neurobiol.* – 2008. – **38**, № 2. – P. 167–177.
  16. Gage F.H. Experimental approaches to age-related cognitive impairments // *Neurobiol Aging.* – 1988. – **9**, № 5–6. – P. 645–655.
  17. Gillette-Guyonnet S., Vellas B. Caloric restriction and brain function // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2008. – **11**, № 6. – P. 686–692.
  18. Jang J.W., Kim J.G., Kim H.J., Kim B.T., Kang D.W., Lee J.E. Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter // *Brain Res.* – 2007. – **1150**. – P. 100–107.
  19. Li X., Cope M.B., Johnson M.S., Smith D.L., Nagy T.R. Mild calorie restriction induces fat accumulation in female C57BL/6J mice // *Obesity (Silver Spring).* – 2010. – **18**, № 3. – P. 456–462.
  20. Patel N.V., Finch C.E. The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging // *Neurobiol. Aging.* – 2002. – **23**, № 5. – P. 707–717.
  21. Rogers P.J. A healthy body, a healthy mind: long-term impact of diet on mood and cognitive function // *Proc Nutr Soc.* – 2001. – **60**, № 1. – P. 135–143.
  22. Siwak C.T., Tapp P.D., Milgram N.W. Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviors in the Beagle dog // *Learning and memory.* – 2010. – № 8. – P. 317–325.
  23. Sotolongo C.P., Carrillo C.P., Carrillo C.C. Memory. An introduction to the study of the cognitive disorders in normal and pathological aging // *Rev. Neurol.* – 2004. – **38**, № 5. – P. 469–472.
  24. Stewart J., Mitchell J., Kalant N. The effect of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes // *Neurobiol Aging.* – 1989. – **10**, № 6. – P. 669–675.
  25. Walsh R.N., Cummins R.A. The open field test: a critical review // *Psychol. Bull.* – 1976. – **83**, № 3. – P. 482–504.
  26. Yanai S., Okaichi Y., Okaichi H. Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats // *Neurobiol Aging.* – 2004. – **25**, № 3. – P. 325–332.
  27. Masoro E.J. Role of hormesis in life extension by caloric restriction // *Dose-Response.* – 2007. – **5**, № 2. – P. 163–173.

*НДІ біології Харків. нац. ун-ту ім. В.Н.Каразіна*  
*E-mail: farmaleg@rambler.ru*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 30.09.2010*

Т.І. Станішевська, В.І.Соболев

## Характеристика латентних періодів збудження і скорочення скелетного м'яза білих щурів залежно від вмісту циркулюючого трийодтироніну

*В умовах in situ показано, що між латентними періодами збудження і скорочення великогомілкового м'яза білих щурів і вмістом циркулюючого вільного трийодтироніну існує виражений негативний зв'язок; відмінності в абсолютних значеннях латентних періодів на початку і кінці шкали фізіологічних коливань вмісту трийодтироніну сягають 15,5 та 37 % відповідно. Разом з подовженням латентного періоду збудження м'язових волокон великогомілкового м'яза спостерігається подовження латентного періоду його скорочення. Ключові слова: скорочення м'яза, трийодтиронін.*

### ВСТУП

Важливе значення в регуляції функціонального стану нервово-м'язової системи належить тиреоїдним гормонам. Експериментально доведено, що гормони щитоподібної залози впливають на щільність і мобільні характеристики натрієвих каналів [7], активність  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  плазматичної мембрани [7, 9, 12] і міозинової АТФази скоротливого апарату, ступінь спорідненості актинових ниток до  $\text{Ca}^{2+}$  [8, 13], щільність і функціональний стан калієвих каналів мембрани саркоплазматичного ретикулума [2, 10] і активність його кальцієвої помпи [11, 13], швидкість ізометричного скорочення м'яза [5, 6] тощо. Встановлено, що при експериментальному гіпертиреозі спостерігається скорочення латентного періоду, тривалості моносинаптичної відповіді [1], латентного періоду потенціалу дії та збільшення його амплітуди при непрямому подразненні м'яза [3].

Отже, збільшені дози тиреоїдних гормонів викликають численні зміни з боку нервово-м'язового апарату, що є виявом їх патофізіологічного ефекту. Проте залишається

© Т.І. Станішевська, В.І.Соболев

ся відкритим питання про вплив фізіологічних концентрацій гормонів.

Метою роботи було з'ясування в умовах in situ характеру зв'язку між тривалістю латентних періодів збудження та скорочення (ЛПЗ і ЛПС) переднього великогомілкового м'яза білих щурів з одного боку і вмістом циркулюючого вільного трийодтироніну ( $\text{T}_3$ ) – з іншого.

### МЕТОДИКА

Досліди проведено на 50 дорослих безпородних білих щурах-самцях масою  $281 \text{ г} \pm 1,3 \text{ г}$ . У всіх тварин в умовах in situ вимірювали тривалість ЛПЗ і ЛПС переднього великогомілкового м'яза, після чого тваринну забивали, і в плазмі крові визначали концентрацію вільної форми  $\text{T}_3$ .

Хід досліду був таким. Тварину наркотизували (етамінал натрію в дозі  $75 \text{ мг/кг}$ ) і фіксували у верстаті установки. Далі препарували малоомілковий нерв, який поміщали на електроди. Цей нерв іннервує передній великогомілковий м'яз, скорочення якого викликає згинання стопи задньої лапки. До неї прив'язували вантаж масою

20 г. Потім у передній великогомілковий м'яз вводили два металеві голчасті сталеві електроди з міжелектродною відстанню 1 мм, які підключали до біопідсилювача. Це дало змогу реєструвати викликану електроміографічну відповідь (М-відповідь) у вигляді сумарного біоелектричного потенціалу моторної одиниці м'яза під час подразнення нерва поодинокими електричними стимулами (рис.1) і надалі вимірювати ЛПЗ м'яза. Для підсилення його біопотенціалів застосовували диференціальний підсилювач з режекторним гіраторним фільтром (50 Гц), цифровий осцилограф TDS2004C з пам'яттю та комп'ютер.

Паралельно з електроміограмою реєстрували ергограму ізотонічного скорочення м'яза, що дало можливість розрахувати його латентний період.

У першій серії дослідів вимірювали ЛПЗ м'язового волокна за допомогою реєстрації М-відповіді під час поодиноких короткочасних ізотонічних скорочень м'яза. В період проведення досліду малоогомілковий нерв подразнювали електричними імпульсами тривалістю 0,15 мс, частотою 4 Гц. Амплітуду імпульсів електростимулятора під час нанесення подразнення поступово збільшували поки не з'являлася М-відповідь, після чого протягом 4 с проводили комп'ютерний запис викликаних електричних потенціалів м'яза. Аналізуючи отримані результати (рис. 1), вираховували ЛПЗ м'яза (час від початку подразнення нерва до появи М-потенціалу у вигляді електричного сумарного потенціалу м'яза; мілісекунди).

У другій серії дослідів вимірювали ЛПС м'яза при тривалому ізотонічному скороченні. Для цього малоогомілковий нерв подразнювали імпульсами стимулятора тривалістю 0,5 мс протягом 7 с з частотою 60 Гц. Для визначення ЛПС вимірювали час від початку нанесення подразнення до першого прояву метричного скорочення м'яза (рис. 2). У кінці досліду тварин

декапітували, після чого для подальшого визначення концентрації  $T_3$  проводили відбір крові.

Концентрацію гормону визначали за допомогою методу імуноферментного аналізу з використанням системи фірми "ThermoLabsystems" (Фінляндія) та стандартного набору реагентів ТироїдІФА-триодтиронін вільний (Росія).

Для обробки цифрових значень варіаційної статистики використовували аналіз підсумкової статистики, відмінності між двома множинами оцінювали за допомогою двовибіркового F-тесту для дисперсій; характер залежності між досліджуваними показниками визначали на основі аналізу рівнянь регресії, їх коефіцієнтів і кластерного аналізу (Statistica, 7.0, метод k-середніх); достовірність різниці середніх встановлювали з використанням критерію t Стьюдента та вважали достовірними при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Варто відмітити, що середня концентрація  $T_3$  становила  $4,46 \text{ пмоль/л} \pm 0,172 \text{ пмоль/л}$ , що відповідає нормі, встановленої для людини ( $3,95\text{--}6,8 \text{ пмоль/л}$ ). Коефіцієнт варіації значень  $T_3$  (27,4 %) був високим.

На подальшому етапі аналізу викликають інтерес результати вимірювання ЛПЗ великогомілкового м'яза. Середні його значення для усіх щурів становили  $2,86 \text{ мс} \pm 0,064 \text{ мс}$  при коефіцієнті варіації 14,7 % і дисперсії вибірки 0,422. На фрагменті запису електроміограми при подразненні нерва електричними імпульсами тривалістю 0,15 мс (див. рис. 1) видно, що на тлі слабких шумів біопідсилювача реєструється типова М-відповідь у вигляді двофазного потенціалу з амплітудою близько 3,4 мВ. Слід зазначити, що у наших експериментах не передбачалося вимірювання абсолютних значень М-потенціалів, оскільки їх амплітуда залежить від багатьох чинників, зок-

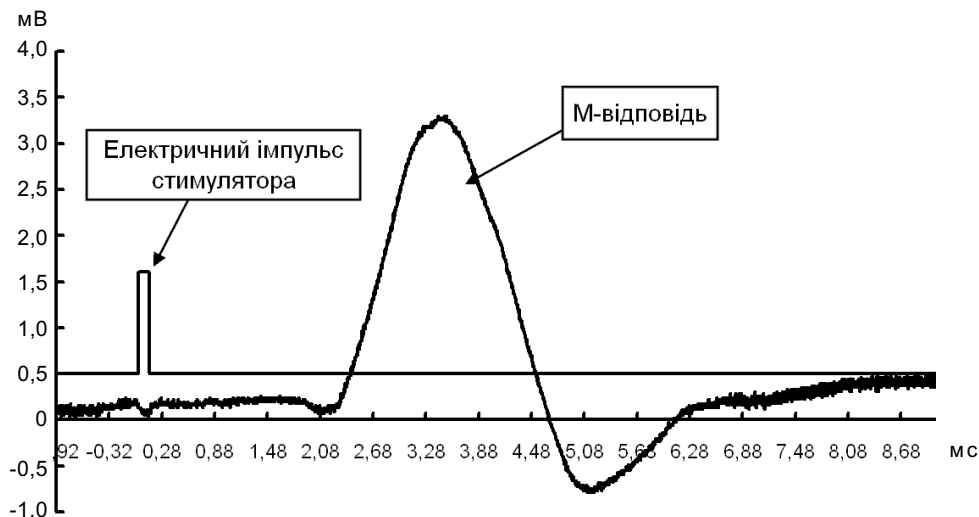


Рис. 1. Визначення часу латентного періоду збудження великогомілкового м'яза білого щура. Наведено запис М-відповіді на поодинокий імпульс стимулятора; обчислений латентний період становить 2,34 мс; крива побудована на основі 2500 точок цифрового сигналу з квантуванням 4 мкс імпортованого до програми Excel; М-потенціал реєструвався за допомогою біполярних голчастих електродів

рема від метричної площі електрода, його розташування в м'язі, міжелектродної відстані тощо.

За детального аналізу вмісту  $T_3$  слід відмітити високу варіабельність цифрового ряду. У зв'язку з цим було проведено кількісний аналіз характеру залежності між вмістом  $T_3$  і заздалегідь виміряними значеннями часу ЛПЗ м'яза із виділенням максимально можливого числа кластерів (за методом k-середніх). З табл.1 видно, що зі збільшенням вмісту  $T_3$  (від  $3,05 \pm 0,14$

у 1-му кластері до  $7,09$  пмоль/л  $\pm 0,15$  пмоль/л в останньому) ЛПЗ м'яза зменшувався, сягаючи на кінці шкали концентрацій  $T_3$  значення  $2,02$  мс  $\pm 0,15$  мс, що було на 36,7 % нижче, ніж на початку шкали ( $P < 0,05$ ). На графіку розсіювання (рис. 3,а), а також у табл. 2 показано, що характер такої залежності у цілому описується рівнянням параболи загального вигляду за високого рівня вірогідності коефіцієнта апроксимації кривої (коефіцієнт детермінації  $R^2 = 0,79$ ,  $P = 3,04 \cdot 10^{-14}$ ).

**Таблиця 1. Залежність між концентрацією вільної форми трийодтироніну крові і значеннями латентних періодів збудження і скорочення великогомілкового м'яза білих щурів ( $M \pm m$ )**

Фізіологічний показник	Концентрація вільної форми трийодтироніну в плазмі крові, пмоль/л			
	Кластери			
	1	2	3	4
	$3,05 \pm 0,14$	$4,00 \pm 0,02$	$4,98 \pm 0,14$	$7,09 \pm 0,15$
Латентний період збудження м'яза (ЛПЗ), мс	$3,19 \pm 0,04$	$3,0 \pm 0,032$	$2,79 \pm 0,08$	$2,02 \pm 0,15$
Різниця відносно значення ЛПЗ у 1-му кластері	-	$-0,19 \pm 0,05$ $-5,9\%$ $P < 0,05$	$-0,4 \pm 0,09$ $-12,5\%$ $P < 0,05$	$-1,17 \pm 0,155$ $-36,7\%$ $P < 0,05$
Латентний період скорочення м'яза (ЛПС), мс	$29,6 \pm 0,33$	$29,8 \pm 0,32$	$28,3 \pm 0,44$	$25,0 \pm 1,28$
Різниця відносно значення ЛПС у 1-му кластері	-	$+0,2 \pm 0,45$ $+0,7\%$ $P > 0,05$	$-1,3 \pm 0,55$ $-4,4\%$ $P < 0,05$	$-4,6 \pm 1,32$ $-15,5\%$ $P < 0,05$

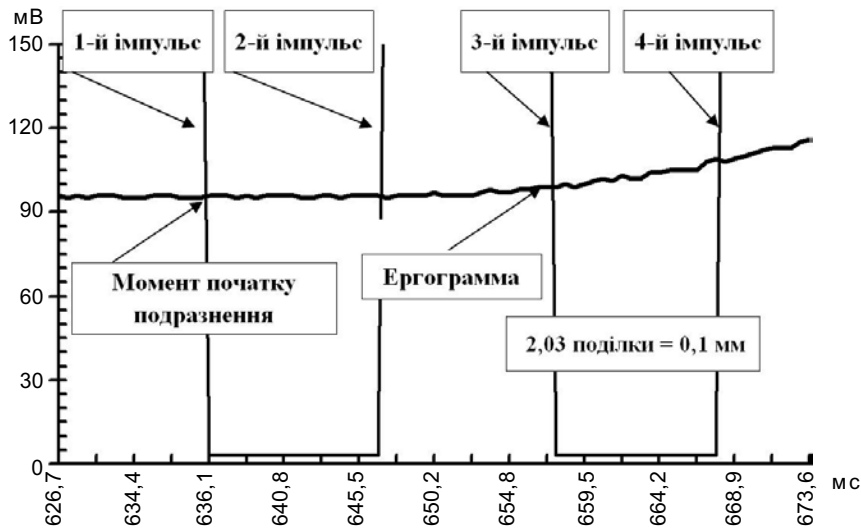


Рис. 2. Визначення часу латентного періоду скорочення великогомілкового м'яза білого щура. Виміряний час латентного періоду скорочення м'яза становить 21 мс

Слід зазначити, що показники варіабельності значення латентного періоду істотно підвищуються зі збільшенням концентрацій  $T_3$  крові (особливо в кінці шкали концентрацій  $T_3$ ). Це дає змогу припустити існування принаймні декількох окремих сукупностей у вибірці значень ЛПЗ м'яза. За допомогою кластерного аналізу методом к-середніх були виділені 2 діапазони концентрацій  $T_3$ : 2,5–4,8 і 4,9–7,6 пмоль/л. Застосування двовибіркового F-тесту для дисперсії показало, що в правій частині шкали концентрацій  $T_3$  (діапазон 4,9–7,6 пмоль/л, тобто на верхній межі норми) сукупність

значень ЛПЗ м'яза статистично вірогідно ( $F=4,23$ ,  $P=0,0008$ ) відрізняється від множини, що характеризує лівобічну частину сукупності (на шкалі концентрацій  $T_3$  у діапазоні 2,5–4,8 пмоль/л). Отже, при наближенні значень концентрації  $T_3$  до верхньої межі норми один з важливих показників функціонального стану нервово-м'язової передачі – ЛПЗ м'яза – не тільки зменшується, але і стає більш варіабельним.

Другим показником, що відображає стан нервово-м'язової передачі, є ЛПС м'яза. Результати показали, що в середньому його час у щурів досліджуваної групи становив

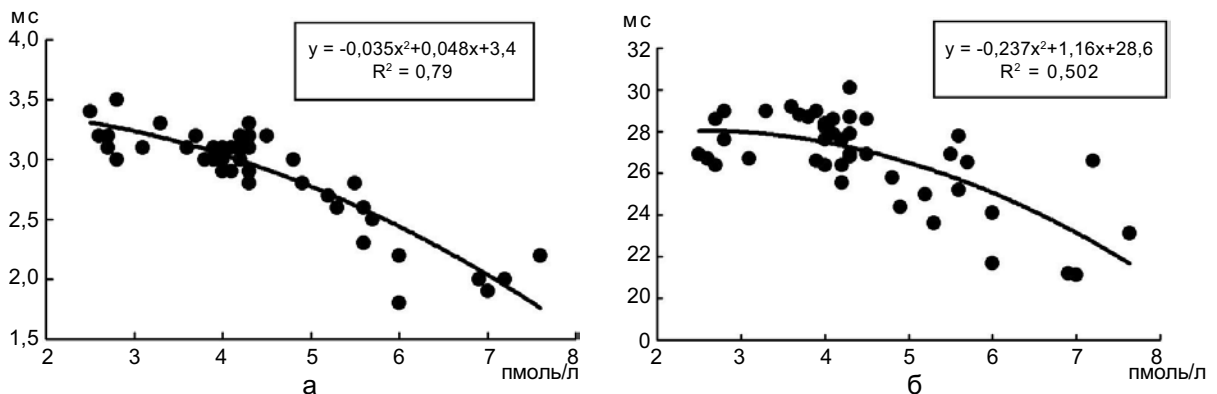


Рис. 3. Характер залежності між вмістом циркулюючого вільного трийодтироніну і значенням латентного періоду збудження (а) і скорочення (б) великогомілкового м'яза білих щурів

**Таблиця 2.** Характеристика залежності значень латентних періодів збудження м'яза (ЛПЗ) і його скорочення (ЛПС) від вмісту циркулюючого вільного трийодтироніну ( $T_3$ )

Вигляд поліноміальної залежності	Статистична характеристика коефіцієнтів у рівняннях		
	Перший коефіцієнт (вільний член)	Другий коефіцієнт	Третій коефіцієнт (квадратичний)
$ЛПЗ=3,4+0,0483[T_3]-0,0348[T_3]^2$	$3,4\pm 0,35$ $P=7,65\ E-12$	$0,0483\pm 0,15$ $P=0,75$	$0,035\pm 0,015$ $P=0,029$
$ЛПС=28,6+1,16[T_3]-0,237[T_3]^2$	$28,6\pm 2,8$ $P=1,25\ E-12$	$1,16\pm 1,19$ $P=0,34$	$-0,237\pm 0,10$ $P=0,048$

28,7 мс ± 0,33 мс при стандартному відхиленні 2,16, медіані і моді 2,88 і 28,9 відповідно. Зрозуміло, що значення ЛПС м'яза повинно бути істотно вище (у нашому випадку у 10 разів), ніж ЛПЗ, що ми і спостерігали.

Аналіз залежності часу ЛПС м'яза від вмісту  $T_3$  показав, що в межах фізіологічних коливань його концентрації значення загалом були сталими, і лише в крайній правій межі норми (понад 5,0 пмоль/л) тривалість ЛПС м'яза різко знижувалася (див. табл.1). Так, за вмістом  $T_3$  у 7,09 пмоль/л ± 0,15 пмоль/л (4-й кластер) її значення становило 25,0 мс ± 1,28 мс, що було на 15,5 % менше ( $P<0,05$ ), ніж на початку фізіологічної шкали концентрацій  $T_3$ , тобто у 1-му кластері.

Загалом залежність між вмістом циркулюючого  $T_3$  і значенням ЛПС м'яза відносно точно описується рівнянням параболи загального виду (табл. 2, рис. 3,б) при достатньому рівні вірогідності апроксимації кривої (коефіцієнт детермінації  $R^2=0,502$ ,  $P=8,8\ E-0,7$ ).

Характер розподілу точок розсіювання (див. рис. 3,б) візуально свідчить про можливе існування декількох окремих множин з різною дисперсією на початку і в кінці діапазону концентрацій  $T_3$ . Дійсно, після використання кластерного аналізу з заданою кількістю кластерів (два) виявилось, що цілісна сукупність  $T_3$ –ЛПС легко розщеплюється на дві частини, два кластери, у діапазоні концентрації  $T_3$  2,5–4,8 і 4,9–7,6 пмоль/л відповідно. Двовибірковий F-

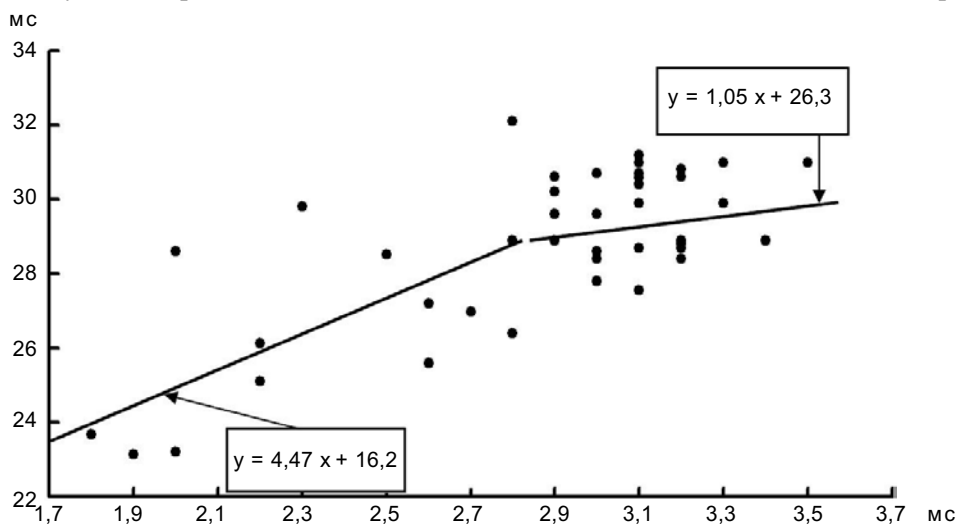


Рис. 4. Залежність часу латентного періоду скорочення м'яза від часу латентного періоду його збудження. За віссю абсцис - латентний період збудження, за віссю ординат - латентний період скорочення



тест для дисперсії показав, що між двома сукупностями існують статистично вірогідні відмінності ( $F=3,25$ ,  $P=0,005$ ).

Особливості використаної методики дають змогу провести аналіз взаємозв'язку ЛПЗ і ЛПС скелетного м'яза. Виявилося, що між згаданими двома показниками існує позитивний зв'язок (рис. 4, табл. 3). При цьому в цілісній вибірці виділяються як мінімум дві сукупності значень. Так, на початку шкали «Х» (діапазон ЛПЗ від 1,8 до 2,8 мс) разом з подовженням ЛПЗ м'яза спостерігалось і подовження ЛПС м'яза при значних статистично вірогідних коефіцієнтах регресії та кореляції. Надалі така залежність зникала. Це свідчить про те, що існують виражені індивідуальні відмінності збудливості м'язових волокон білих шурів, оскільки кожна точка на графіку (див. рис. 4) відображає поєднані показники ЛПЗ і ЛПС для кожного окремого м'яза (тобто тварини). Крім того, можливо виділити принаймні дві популяції скелетних м'язів (дві групи шурів). Якщо виходити зі значення коефіцієнтів регресії у рівняннях (див. табл. 3), то у першому випадку (діапазон 1,8–2,8 мс) він становив  $4,47 \pm 1,66$ , а у другому (діапазон 2,8–3,5 мс)  $1,05 \pm 1,28$  відповідно, тобто був у 4,2 раза меншим ( $P < 0,05$ ). Аналогічний результат, тобто доказ існування щонайменше двох множин у цілісній сукупності, можна одержати і

після використання двовибіркового F-тесту для дисперсій ( $F=5,83$ ,  $P=4,77 E-05$ ).

Пояснення цього, на наш погляд, може бути пов'язане з різним вмістом  $T_3$ , який і є, з одного боку, модулятором провідності нервово-м'язового синапсу (позначається на латентному періоді збудження м'язового волокна), а з іншого боку – модулятором скорочувальної функції м'язового волокна (позначається на латентному періоді його скорочення). Це припущення не позбавлене підстав, оскільки у низці публікацій наведено факти змін практично всіх ланок нервово-м'язового апарату при стані гіпертиреозу [4, 5, 9, 14]. Отримані в нашій роботі результати можуть бути поширені і на фізіологічні ефекти тиреоїдних гормонів, які, отже, є безпосередніми значущими фізіологічними регуляторами основних показників скорочувального акту.

## ВИСНОВКИ

1. Між латентними періодами збудження (ЛПЗ) і скорочення (ЛПС) великогомілкового м'яза білих шурів і вмістом  $T_3$  існує виражений негативний зв'язок; відмінності в абсолютних значеннях латентних періодів на початку і кінці шкали фізіологічних коливань вмісту  $T_3$  сягають 15,5 % для ЛПЗ і 37 % для ЛПС.

2. У варіаційних рядах значень ЛПЗ і

Таблиця 3. Характеристика залежності часу латентного періоду скорочення м'яза (ЛПС) від латентного періоду збудження м'яза (ЛПЗ)

Діапазони ЛПЗ	Рівняння залежності (регресії)	Статистична оцінка коефіцієнтів		
		Постійний член	Коефіцієнт регресії	Коефіцієнт кореляції між показниками
1,8–2,8 мс (лівобічна частина шкали «Х»)	$LPC=4,47 [LPZ] + 16,2$	$16,2 \pm 4,05$ $P=0,0015$	$4,47 \pm 1,66$ $P=0,0197$	$0,61 \pm 0,16$ $P=0,019$
2,8–3,5 мс (правобічна частина шкали «Х»)	$LPC=1,05 [LPZ] + 26,3$	$26,3 \pm 4,19$ $P=6,85 \cdot 10^{-7} E$	$1,05 \pm 1,28$ $P=0,82$	$0,15 \pm 0,17$ $P=0,54$

ЛПС великогомілкового м'яза на підставі різного ступеня варіабельності виділяються дві сукупності, співвіднесені до різних діапазонів фізіологічних коливань вмісту  $T_3$ : менше ніж 6,0 пмоль/л (ліва частина шкали концентрацій  $T_3$ ) і вище за 6,0 пмоль/л (права частина шкали).

3. Разом з подовженням ЛПЗ м'язових волокон великогомілкового м'яза спостерігається подовження ЛПС; при високих значеннях ЛПЗ така залежність зникає; відмінність у коефіцієнтах регресії в рівняннях для різних ділянок шкали значень латентного періоду збудження м'яза сягає 426 %.

**Т.И. Станишевская, В.И.Соболев**

#### **ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАТЕНТНЫХ ПЕРИОДОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ И УКОРОЧЕНИЯ МЫШЦЫ БЕЛЫХ КРЫС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО ТРИЙОДТИРОНИНА**

В условиях *in situ* показано, что между латентными периодами возбуждения и укорочения переднеберцовой мышцы белых крыс и концентрацией циркулирующего свободного трийодтиронина существует выраженная отрицательная связь; различия в абсолютных значениях латентных периодов в начале и конце шкалы физиологических колебаний концентрации трийодтиронина достигают 15,5 и 37% соответственно. Вместе с удлинением латентного периода возбуждения мышечных волокон переднеберцовой мышцы наблюдается удлинение латентного периода ее укорочения; при высоких значениях латентного периода возбуждения такая зависимость исчезает.

Ключевые слова: сокращение мышцы, концентрация, трийодтиронина.

**T.I. Stanishevskaya, V.I.Sobolev**

#### **CHARACTERIZATION OF THE LATENT PERIODS OF EXCITATION AND SHORTENING OF ANTERIOR TIBIAL MUSCLE OF WHITE RATS DEPENDING ON THE BLOOD LEVEL OF TRIIODOTHYRONINE**

In experiments *in situ* it was shown an expressed negative correlation between the duration of latent periods of excitation and contraction of the anterior tibial muscle of white rats and the blood level of free triiodothyronine. The difference in mean

values of latent periods at starting and final points of scale of physiological fluctuations of triiodothyronine level amounted 15,5% and 37,0% respectively. In parallel with lengthening of latent period of anterior tibial muscle excitation it was found an increase in latent period of this muscle contraction. Interestingly, at high values of the latent periods of excitation such dependence disappeared.

Key words: muscle contraction, level of triiodothyronine.

*Donetsk National University*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Гольбер Л.М., Гайдина Г.А., Игнатков В.Я., Алиев М.Н. Патогенез двигательных расстройств при тиреотоксикозе / Под ред. Гольбера Л.М. – М.: Медицина, 1980. – 208 с.
2. Марзоев А.И., Рубцов Б.В., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Действие тироксина на функции саркоплазматического ретикулома скелетных мышц кролика // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1980. – №5. – С.541–542.
3. Неруш П.О., Макій Є.А., Родинський О.Г. Вікові особливості функціонування нервово-м'язової системи щурів за умов гіпертиреозу // Фізіол. журн. – 2001. – 47, №5. – С. 12–17.
4. Соболев В.И., Лапенко Н.Т. Фазы мышечного термогенеза при экспериментальном гипертиреозе // Физиол. журн. СССР. – 1986. – 72, №3. – С. 381–384.
5. Соболев В.И., Москалец Т.В. Влияние экспериментального тиреоза на энергетику изометричного сокращения м'яза білого щура (дослідження *in situ*) // Фізіол. журн. – 2007. – 53, №5. – С. 86–90.
6. Труш В.В., Соболев В.И. Изменение силовых характеристик скелетной мышцы белых крыс в процессе углубления экспериментального гипертиреоза // Архив клин. и эксперим. медицины. – 2003. – 12, №2. – С. 144–150.
7. Brodie C., Sampson S.R. Characterization of thyroid hormone effects on Na-K pump and membrane potential of cultured rat skeletal myotubes // Endocrinology. – 1988. – № 2. – P. 891–897.
8. Caroccia L., Williams D.A., Wrigth A. Effects of thyroid and parathyroid hormones on muscular activity // Proc. Austral. Physiol. and Pharmacol. Soc. – 1988. – P. 19–71.
9. Clausen T., Everts M.E. Regulation of the Na-K pump in skeletal muscle // Kidney Int. – 1989. – №1. – P. 1–13.
10. Connelly T.J., Hayek R., Sukhareva M. L-thyroxine activates the intracellular  $Ca^{2+}$  release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1994. – 32, № 3. – P. 441–448.
11. Davis P.J., Davis F.B., Lawrence W.D. Thyroid hormone regulation of membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase activity // Endocrinol. Res. – 1989. – 15. – P. 651–682.
12. Everts M.E., Clausen T. Effects of thyroid hormone

- on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> transport in resting and stimulated rat skeletal muscle // Amer. J. Physiol. – 1988. – 255, № 5. – P. 604–612.
13. Sampson S.R., Bannett R.R., Shainberg A. Effects of thyroxine on transmembrane resting potentials of skeletal muscle cells in culture // J. Neurosci. Res. – 1982. – **8**, № 4. – P. 595–601.
14. Warnick P.R., Davis P.J., Davis F.B., Cody V, Galindo J.Jr., Blas S.D. Rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone analogues and bipyridines // Biochem. and Biophys. Acta – 1993. – **1153**. – P. 184–190.

Донецьк. нац. ун-т  
E-mail: v.sobolev@mail.ru

Матеріал надійшов до  
редакції 14.04.2011

О.А. Панченко, С.М.Радченко

## Психофізіологічний аналіз ефективності церебральної гемодинаміки за допомогою доплерографічної та реоенцефалографічної візуалізації

*Авторами розроблено інтегральний діагностичний тест у вигляді моделі для психофізіологічної оцінки і прогнозування ефективності церебральної гемодинаміки у випробовуваних, який включає в себе реєстрацію швидкості кровотоку в загальній сонній артерії та рівень психопатизації.*

*Ключові слова: церебральна гемодинаміка, доплерографія, реоенцефалографія, модель психофізіологічної оцінки церебральної гемодинаміки, прогнозування церебральної гемодинаміки.*

В умовах збільшення психоемоційних навантажень на людину продовжує зростати абсолютна кількість судинних «катастроф» головного мозку [1]. За останні 10 років поширеність зазначеної патології збільшилася вдвічі. Нині в Україні зареєстровано 3 млн. хворих із цереброваскулярними розладами. У зв'язку з цим рання діагностика судинних змін головного мозку є пріоритетною та актуальною науковою проблемою [9, 14].

Активация фізіологічних функцій, які забезпечують емоційне напруження людини, може бути невідповідною діяльності, що виконується, і це сприяє розвитку психоемоційних напружень [12]. Встановлено, що психоемоційне навантаження змінює церебральну гемодинаміку [2, 5, 8], що в свою чергу, формує стійкі порушення тону та реактивності судин, розташованих не тільки в ділянках підвищеної функціональної активності головного мозку, але і за їх межами, що є базою для трансформації функціональних розладів мозкового кровообігу в захворювання судинної системи [7, 13]. Але судинно-мозкова реактивність головного мозку може сформувати ефек-

тивну церебральну гемодинаміку, що дасть можливість оптимізувати кровообіг відповідно до нових умов. Тому надзвичайно важливим є вивчення взаємодії гемодинамічних параметрів церебрального кровообігу і психологічних показників, що відображає формування певного психофізіологічного стану [10, 11].

Мета нашої роботи – розробити модель психофізіологічної оцінки і прогнозування ефективності церебральної гемодинаміки.

### МЕТОДИКА

Обстежено 200 осіб віком від 34 до 46 років, з яких 150 (50 жінок і 100 – чоловіків) перебували на обліку у Державному закладі «Науково-практичний, медичний реабілітаційно-діагностичний центр МОЗ України» і 50 практично здорових осіб (24 – чоловіки і 26 – жінок) – студентів Краматорського економіко-гуманітарного інституту. Всього проведено 1460 експериментів, із яких у 562 брали участь жінки, а у 898 – чоловіки. Всі обстежені були поділені на три групи. У I (контрольну) групу ввійшли 50 осіб віком від 30 до 42 років, у

яких стан судинної системи був у межах клінічної норми, в II – 70 осіб віком від 34 до 46 років з дисциркуляторною гіпертонічною енцефалопатією (ДЕ) 2-го ступеня, а у III групу – 80 осіб віком від 34 до 46 років з ознаками ДЕ 3-го ступеня (за клінічним діагнозом, відомим із медичної документації). Надалі II і III групи були об'єднані в одну, оскільки не мали значущих різниць.

Обстеження проводили за допомогою діагностичного автоматизованого комплексу «Кардіо +» (НВО «Метекол», м. Чернігів, Україна, 2004) у положенні хворого «лежачи на спині» після 15-хвилинного відпочинку для стабілізації показників гемодинаміки. При дослідженні гемодинаміки півкуль головного мозку застосовували лобно-соскоподібне розташування електродів [12]. Реоенцефалограму реєстрували одночасно з двох півкуль. При кількісному її аналізі враховували основні реографічні показники: частоту серцевих скорочень (ЧСС), амплітуду систолічної хвилі, амплітуду інцизури тощо [12].

Дослідження церебральної гемодинаміки та магістральних судин ший проводили з використанням програмно-апаратного комплексу “Sonomed – 300”, призначеного для реєстрації, збереження й аналізу доплерограм. Допплерографію робили в дуплексному режимі: екстракраніально досліджували загальну сонну (ЗСА) і хребетну артерії (ХА), інтракраніальним ангіоскануванням – надблокову (НБА) і передньомозкову (ПМА) артерії [1]. Вимір показників кровотоку в ХА, ПМА виконували за допомогою секторного датчика з магістральною частотою 2,0 МГц, НБА – з частотою датчика 8,0 МГц, ЗСА – 4,0 МГц. Для кількісної оцінки кровотоку в артеріях визначали максимальну і мінімальну швидкість кровотоку, інші показники, що розраховувалися за значеннями безпосередньо вимірюваних параметрів доплерограм. Статистичну обробку резуль-

татів проводили у пакеті програм «MedStat» [6].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було проаналізовано ступінь впливу показників психологічного стану на ефективність церебральної гемодинаміки обстежених осіб і побудовано модель їх класифікації у дві групи: норма (контрольна група) і судинні зміни (II і III група).

Як факторні ознаки при побудові вихідної моделі були використані максимальна і мінімальна швидкість кровотоку по ХА; мінімальна швидкість кровотоку по ЗСА і ПМА, середня швидкість кровотоку по ЗСА, ХА, ПМА, пульсаторний індекс по ЗСА, ХА, НБА, систоло-діастолічний індекс по ХА, індекс резистентності по ХА, НБА і ПМА тощо.

При проведенні аналізу як оцінку стану церебральної гемодинаміки (результативна ознака) прогнозувалася величина  $Y$ . Якщо значення результативної ознаки дорівнює нулю ( $Y=0$ ), пацієнта слід зараховувати до групи контролю, якщо  $Y=1$  – до групи осіб з порушеннями церебральної гемодинаміки. Для перевірки якості діагностування порушень церебральної гемодинаміки моделлю всі випадки за допомогою генератора випадкових чисел були розділені на 3 множини: навчальну (138), контрольну (21) і тестову (41).

На першому етапі дослідження була побудована модель діагностування порушень церебральної гемодинаміки на основі усіх параметрів, що вивчалися (всього 63 ознаки). Після цього провели оптимізацію порога прийняття-відкидання з використанням ROC – процедури (пакет програм «MedStat»), при якій було отримане значення  $Y_{crit.} = 0,44$ . Коли в результаті розрахунків у рамках побудованої моделі значення перевищувало вказаний поріг ( $Y > 0,44$ ), пацієнта зараховували до групи з порушеннями церебральної гемодинаміки, у проти-

лежному випадку – до групи осіб з нормальним функціонуванням системи кровопостачання головного мозку. Чутливість моделі на навчальній множині становила 74,3 % (вірогідний інтервал – ВІ – 58,1 – 87,6 %), специфічність – 78,6 % (ВІ – 70,1 – 86,1 %).

Для виявлення показників психологічного стану, найбільшою мірою пов'язаних із судинними змінами ефективності церебральної гемодинаміки, був проведений відбір найбільш значимих ознак. Було відібрано 2 ознаки: рівень психопатизації і максимальна швидкість кровотоку по лівій/правій ЗСА. За цими показниками було побудовано модель класифікації, після вивчення якої провели оптимізацію порога прийняття-відкидання і отримали значення  $Y_{crit.} = 0,809$ . Отже, коли в результаті розрахунків у рамках побудованої моделі значення  $Y$  перевищувало  $Y_{crit.}$  ( $Y > 0,809$ ), діагностувалися судинні порушення церебральної гемодинаміки, у протилежному випадку – норма. Отримана модель описується рівнянням 1:

$$Y = -0,01354X_8 + 0,00584 \cdot X_{36} + 1,359, \quad (1)$$

де  $X_2$ ,  $X_8$  – вихідні параметри моделі (рівень психопатизації і максимальна швидкість кровотоку по ЗСА (загальній сонній артерії) (ліва/права)).

Чутливість моделі на навчальній множині становила 74,3 % (ВІ – 58,1 – 87,6 %), специфічність – 74,8 % (ВІ – 65,8 – 82,7 %). Чутливість і специфічність на навчальній і тестовій множині статистично значуще не відрізняються ( $P=0,68$  і  $P=0,93$  відповідно при порівнянні за критерієм  $\chi^2$ ), що свід-

чить про її адекватність. При цьому зменшення кількості прогнозуючих ознак від 63 до 2 не призвело до зниження якості прогнозування ( $P > 0,7$ ), що вказує на інформативність відібраних перемінних. Для виявлення діагностичної значущості впливу обраних факторних ознак була побудована логістична регресійна модель ( $P < 0,001$  за критерієм  $\chi^2$ ). Результати аналізу цієї моделі приведені в таблиці.

При аналізі зв'язку показників церебральної гемодинаміки з результатами психологічного тестування з'ясувалося, що збільшення показника «емоціональна стійкість» пов'язується зі зменшенням ( $P < 0,05$ ) шансу віднесення до групи з судинними змінами (на кожному одиницю збільшення емоційної стійкості відношення шансів (ВШ) = 0,82 (ВІ – 0,71 – 0,94), а підвищення рівня психопатизації пов'язується зі збільшенням ( $P < 0,05$ ) шансу віднесення до групи з судинними змінами: на кожному одиницю збільшення значення ВШ = 0,90 (ВІ – 0,86 – 0,95), відповідно.

Таким чином, з аналізу побудованої моделі класифікації і результатів логістичної регресійної моделі випливає, що збільшення рівня психопатизації пов'язується зі зменшенням ( $P < 0,05$ ) шансу віднесення до групи осіб із судинними порушеннями (на кожному одиницю збільшення рівня психопатизації ВШ = 0,92 (ВІ – 0,87 – 0,97), для максимальної швидкості кровотоку по лівій/правій ЗСА (загальній сонній артерії) – навпаки, збільшення його значення пов'язується зі збільшенням ( $P < 0,05$ ) шансу віднесення до групи з судинними порушеннями (на кожному одиницю збільшення швидкості

#### Аналіз діагностичної значущості факторних ознак при оцінці судинних змін (логістична регресійна модель)

Факторна ознака	Значення коефіцієнта прогнозування	Рівень значущості відмінності	Відношення шансів (95% вірогідний інтервал)
Рівень психопатизації	-0,088	0,001	0,92 (0,87–0,97)
Максимальна швидкість кровотоку по лівій/правій загальній сонній артерії	0,118	<0,001	1,13 (1,07–1,19)

кровотоку по лівій/правій ЗСА (загальній сонній артерії)  $ВШ = 1,13$  ( $ВІ - 1,07 - 1,19$ ).

Вищенаведені залежності між психологічними показниками і доплерографічними параметрами церебральної гемодинаміки, зокрема, рівнем психопатизації і максимальною швидкістю кровотоку по лівій/правій ЗСА (загальній сонній артерії), більш наочно представлені на рисунку.

Як видно з рисунка, якщо у обстежених спостерігається збільшення максимальної швидкості кровотоку по лівій/правій ЗСА (загальній сонній артерії) і шкали психопатизації, то слід очікувати, що в них будуть формуватися певні судинні зміни і, навпаки, зниження цих показників дає нам змогу прогнозувати надалі формування судинних змін.

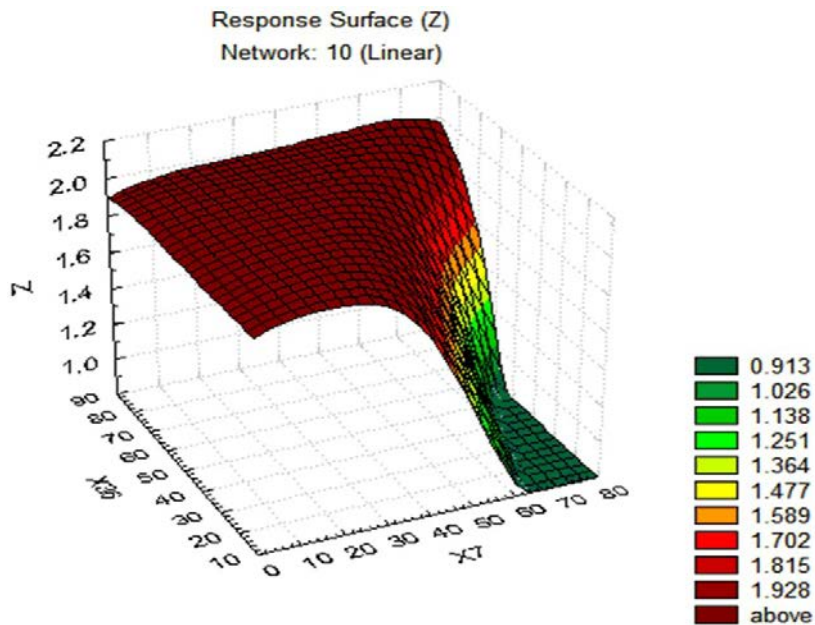
Таким чином, розроблено інтегральний діагностичний тест у вигляді моделі для психофізіологічної оцінки і прогнозування ефективності церебральної гемодинаміки у обстежуваних, який включає в себе реєстрацію швидкості кровотоку в ЗСА і рівень психопатизації. Операційні характеристики тесту становлять значення:  $Se = 74,3\%$  ( $95\%$

$ВІ - 58,1 - 87,6\%$ ),  $Sp = 74,8\%$  ( $95\%$   $ВІ - 65,8 - 82,7\%$ ), де  $Se$  – чутливість моделі,  $Sp$  – специфічність моделі, границя діагностичної норми має критичним значенням  $Y=0,809$ . Отже, зниження значення максимальної швидкості кровотоку по ЗСА нижче від критичного і підвищення рівня психопатизації буде свідчити про можливості формування судинних змін у цій ділянці. Побудована математична модель дає змогу діагностувати порушення церебральної гемодинаміки у осіб з різним психоемоційним станом.

О.А. Панченко, С.М.Радченко

### ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ С ПОМОЩЬЮ ДОППЛЕРОГРАФИЧЕСКОЙ И РЕОЕНЦЕФАЛОГРАФИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Авторами розробтан інтегральний діагностический тест в виде модели для психофизиологической оценки и прогнозирования эффективности церебральной гемодинамики у испытуемых, который включает в себя регист-



Залежності шкали психопатизації і показника максимальної швидкості кровообігу по лівій/правій загальній сонній артерії

рацию скорости кровотока в общей сонной артерии и уровень психопатизации.

Ключевые слова: церебральная гемодинамика, доплерография, реоэнцефалография, модель психофизиологической оценки церебральной гемодинамики, прогнозирование церебральной гемодинамики.

**O.A. Panchenko, S.M.Radchenko**

**PSYCHOPHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF EFFICIENCY OF CEREBRAL HEMODYNAMICS WITH DOPPLEROGRAPHIC AND REOENCEPHALOGRAPHIC IMAGING**

The authors designed the integrated diagnostic test as a model for psychophysiological assessment and prediction of the effectiveness of cerebral hemodynamics in subjects. The test includes the recording of blood flow velocity in the CCA and the level of psychopathisation.

Key words: cerebral hemodynamics, doppler rheoencephalography, model of psychophysiological assessment of cerebral hemodynamics, prognosis of cerebral hemodynamics.

*Medical Rehabilitation Diagnostic Center of Ministry of Public Health of Ukraine,*

*Konstantynivka, Donetsk Region*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Ахметов В.В., Леманев В.Л. Роль ультразвукового линейного доплера в оценке мозговой гемодинамики // Совр. методы ультразвук. диагностики заболеваний сердца, сосудов и внутр. органов: тез. докл. конф. – М., 1996. – С. 19-23.
2. Гурьянов В.Г., Остапенко В.И., Никитенко С.Н., Радченко С.М. Автоматизация анализа реографических исследований // Укр. журн. телемедицины та мед. телематики. – 2007. – 5, № 2. – С. 80.
3. Леонова А.Б. Психодиагностика функциональных состояний человека. – М.:Изд-во Моск. ун-та, 2004. – 200 с.
4. Лурия А.С. Основы нейропсихологии. – М.:

Academia, 2002. – 305 с.

5. Лях Ю.Е., Радченко С.М. Влияние стрессовых факторов на состояние сосудистого русла // Укр. мед. альманах. - 2005. – 8, №4. – С. 114-115.
6. Лях Ю.Е., Гурьянов В.Г., Хоменко В.Н., Панченко О.А. Основы компьютерной биостатистики. Анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MedStat. – Донецк: Папакица Е.К., 2006. – 214 с.
7. Мельникова Т.С., Фарбер Л.А. Временные параметры простой двигательной реакции как показатель функционального состояния мозга человека // Физиология человека. – 2006. – 2, № 5. – С. 83-86.
8. Радченко С.М. Стигматизация сосудистых проблем на эмоционально стрессовые воздействия // Психол. технологии в экстрем. видах деятельности: материалы V междунар. научно-практ. конф. (Донецк, 28–29 мая 2009 г.) – Донецк, 2009. С. 424-425.
9. Радченко С.М. Сосудистые расстройства как нейрофизиологическая проблема // Реабилитация и абилитация человека. Интеграц.-информ. технологии: материалы III научн.-практ. конф. – Київ: КВІЦ, 2004. – С. 346-349.
10. Радченко С.М. Состояние церебральной гемодинамики у лиц с сосудистыми изменениями на раннем этапе по данным доплерографии // Вестник гигиены и эпидемиологии. – 2009. – 13, № 1. – С. 221-226.
11. Радченко С.М., Гур'янов В.Г. Реоенцефалографічна характеристика судинного русла у хворих на дисциркуляторну енцефалопатію // Нейронауки: теор. та клін. аспекти. – 2008. – 4, №2. – С. 67-69.
12. Ронкин М.А., Максименко И.М. О состоянии церебральных сосудов у здоровых людей // Педиатрия. – 2001. - № 11. – С. 83-86.
13. Panchenko O.A., Kut'ko I.I., Chumak T.E., Radchenko S.M. Organic mental disorders liquidators of consequences of failure on the Chernobyl power station // XIV World Congress of Psychiatry. Prague, Czech Republic ( 20–25 sept. 2008). – Suppl. 2. – P. 1369.
14. Radchenko S.M., Panchenko O.A., Liakh U.E. Influence of stressful factors on the condition vascular channel // XIV World Congress of Psychiatry. Prague, Czech Republic (20–25 sept. 2008). – Suppl. 2. – P. 1122.

*ДЗ «Наук.-практ. мед. реабілітаційно-діагност. центр МОЗ України»,  
м. Костянтинівка, Донецької обл.*

*Матеріал надійшов до  
редакції 06.12.2010*



**В. В. Верещака**

## **Особливості системних змін гемомікроциркуляції при хронічних дерматозах**

*Біомікроскопічним дослідженням підлягала кон'юнктива жінок віком від 36 до 55 років, які страждали на atopічний дерматит, мікробну екзему та дифузну aloпецію. Встановлено, що в разі розвитку atopічного дерматиту виявляються ознаки нерівномірності калібра та звивистості артеріол, змієподібної звивистості капілярів, артеріоло-венулярних анастомозів, зменшення кількості функціонуючих капілярів та їх кутів. Порушення паралелізму мікросудин, мікроаневризми, сакуляції, патологічні форми звивистості венул, новоутворені мікросудини, артеріоло-венулярні анастомози, аваскулярні поля та кути капілярів характерні для мікробної екзему. Дифузна aloпеція проявляється збільшенням сакуляцій, нерівномірності калібра венул, спазму та звивистості артеріол, звивистості петель і кутів капілярів, зменшенням їх кількості. Ключові слова: мікроциркуляція, atopічний дерматит, мікробна екзема, дифузна aloпеція.*

### **ВСТУП**

Нині велика увага приділяється стану гемомікроциркуляторного русла (ГМЦР) у розвитку дерматологічної патології [2, 14, 18]. Досить ґрунтовно описані зміни мікросудин у зонах ураження шкіри [14, 20]. Більшість авторів їх пов'язують з місцевими метаболічними змінами [4, 6, 7, 16]. Однак у сучасних працях, присвячених патогенезу дерматозів, констатуються системні зміни ГМЦР [4, 6, 23]. Їх роль у розвитку дерматозів, а також спільні ознаки системних уражень мікросудин невивчені. Залишається відкритим питання про особливості системної мікроциркуляції як диференційної ознаки дерматозів.

Перебудову ГМЦР у розвитку дерматозів розглядають як один з основних патогенетичних факторів [3, 14, 19, 20, 23], який зумовлює їх хронічний перебіг. Терапевтична тактика здебільшого направлена на поліпшення місцевої перфузії у зоні ураження.

Оскільки бульбарна кон'юнктива (БК) є дзеркалом системних мікросудинних змін

за умов життєвого дослідження, її активно використовують у дослідницькій і терапевтичній діяльності. Нами розроблена методика вивчення ГМЦР, яка знайшла відображення у методичних рекомендаціях, схвалених МОЗ України [2].

Мета цієї роботи – дослідити особливості структурних змін судин кон'юнктиви ока при хронічних дерматозах (мікробна екзема, atopічний дерматит, дифузна aloпеція).

### **МЕТОДИКА**

Біомікроскопічним дослідженням підлягала кон'юнктива 90 жінок віком від 36 до 55 років. До I (контрольної) групи ввійшли практично здорові особи, які не мали ознак передчасного старіння шкіри, до II, III і IV групи – жінки, які страждали на atopічний дерматит, мікробну екзему та дифузну aloпецію відповідно.

Кровоносні мікросудини БК досліджували за допомогою щілинної лампи Zeiss SL 160 зі збільшенням від 1 · 5 до 1 · 100 разів і стереоскопічного мікроскопа МССО

(СРСР) зі збільшенням у 3,3–350,2 рази [2].

Оцінка порушень ГМЦР включала визначення судинних змін: звивистість і спазм мікросудин, новоутворені судини, сіткоподібна формація, анастомози, сакуляції, мікроаневризми, клубочки, нерівномірність калібру судин, зміни кількості функціонуючих капілярів, запусівання в судинній сітці лімба, порушення паралелізму мікросудин, петлі, аваскулярні поля, зміни кута розгалуження мікросудин, їх ампутації. Діаметр мікросудин, відстані між ними та їх кількість на одиницю площі досліджували за допомогою об'єкт-мікрометра та каліброчної сітки в проміжній зоні БК.

Нерівномірність калібру мікросудини визначали як різку зміну її діаметра, мікроаневризми – як фрагментарні дилатації артеріол по дотичній до судини, муфтоподібно, автономно (при запусіванні судини). Сакуляції ідентифікували як локальну дилатацію венул. Патологічні зміни мікросудин у вигляді змієподібної, меандричної та штопороподібної звивистості характеризували поступовий розвиток змін форми мікросудин. Клубочки капілярів являли собою граничну ступінь підвищення звивистості мікросудин.

Вірогідність відмінностей при порівнянні середніх арифметичних значень визначали за критерієм *t* Стьюдента, а при порівнянні частоти ознаки у відсотках – методом альтернативного варіювання [10].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Порушення паралелізму в розташуванні мікросудин виявлено у обстежених III групи, що зумовило статистично вірогідні відмінності щодо контролю і свідчить про компенсацію патологічних процесів при трофічних змінах (таблиця).

Частота виявлення мікроаневризм у III групі перевищила показник I групи в 2,8 рази ( $P < 0,001$ ), що говорить про явища судинної дистонії з ознаками метаболічного синдрому.

Сакуляції у осіб II–IV груп спостерігалися майже у 6 разів частіше, ніж у контролі. Це пояснюється застійними явищами у венулярній ланці ГМЦР при хронічних дерматозах і є ознакою міогенної дистонії.

Нерівномірність калібру артеріол переважувала в осіб II групи, а венул – у пацієнтів III і IV груп, що свідчить про ознаки судинної дистонії в різних ланках ГМЦР [15].

Спазм артеріол був характерним для осіб з дифузною алопецією (III група), де його стрівальність перевищила аналогічний показник I групи у 4,2 рази.

Дослідження структури кровоносних судин БК показало, що у осіб II групи була більшою сумарна звивистість артеріол порівняно з I групою у 2,4 рази, а з IV групою у 3,5 рази. Найчастіше в осіб II і IV груп зустрічалася меандрична (26,7 – 30,0% від значень сумарного показника), найбільш рідко – штопороподібна звивистість (10,0 – 20,0% від значень сумарного показника).

Сумарна звивистість венул у обстежених III групи перевищила аналогічне значення у I групі в 4,8 рази ( $P < 0,001$ ), виявлялася меандрична і штопороподібна звивистості венул, які становили 33,3 ( $P < 0,001$ ) і 20,0 % ( $P < 0,01$ ) відповідно.

У осіб II і IV груп сумарна звивистість капілярів була більшою щодо контролю у 2,5 рази за рахунок змієподібної звивистості.

Стрівальність петель у капілярах БК у I – III групах не перевищила 20 %, а в IV групі вона становила 46,7%, що зумовлює зміни перфузії.

Новоутворені судини в осіб III групи виявлялись у 33,3 % випадків ( $P < 0,01$ , порівняно з I групою) і свідчить про наявність критичних станів мікроциркуляції на системному рівні [7, 15].

Кількість артеріоло-венулярних анастомозів відносно I групи була вищою в 4,8 рази у II групі ( $P < 0,001$ ) і в 2,5 рази у IV

групі ( $P < 0,01$ ). Це говорить про прискорене скидання крові з артеріальної ланки у венозну.

Частота помірного зменшення кількості функціонуючих капілярів перевищила показник I групи у 5,5 раза в II групі і в 8 разів у IV групі, що вказує на склеротичні зміни ГМЦР. Про значні порушення мікроциркуляції всіх ланок ГМЦР, свідчать аваскулярні поля, які спостерігалися на БК в осіб II–IV груп, але статистично вірогідні відмінності виявлено лише в III групі, де згаданий показник збільшився у 7 разів.

Частота виявлення кутів капілярів на БК порівняно з I групою мала незначні статистично достовірні відмінності в II і IV групах, де їх кількість була вищою в 3,3 і 3,7 раза

відповідно. Найбільше значення цього показника отримано у осіб III групи (43,3 %,  $P < 0,001$ ). Утворення кутів капілярів і передкапілярів свідчить про виражені морфологічні зміни в системі мікроциркуляції [9, 15]. При змінах кута розгалуження судин порушується осьова орієнтація еритроцитів [8], що призводить до трофічних змін. Патологічні механізми утворення кутів капілярів аналогічні змінам звивистості, однак ступінь трофічних змін при цьому набагато вищий.

На підставі дослідження судинних явищ у різних ланках ГМЦР можна зробити висновок про збільшення при хронічних дерматозах патологічних феноменів у його різних ланках.

**Частота (%) змін судинних показників біомікроскопії бульбарної кон'юнктиви у практично здорових людей різного віку та осіб з ознаками хронічних дерматозів: atopічний дерматит, мікробна екзема, дифузна алопеція (n=30)**

Показник	I група	II група	III група	IV група
Порушення паралелізму мікросудин	13,3	26,7	60,0***	23,3
Мікроаневризми	20,0	23,3	56,7***	20,0
Сакуляції	6,7	36,7**	46,7***	36,7**
Нерівномірність калібру				
артеріол	26,7	60,0***	13,3	23,3
венул	13,3	23,3	53,3**	36,7*
Спазм артеріол	20,0	23,3	20,0	83,3
Звивистість артеріол				
змійоподібна	23,3	26,7	13,3	30,0
меандрична	0	20,0	10,0	33,3***
штопороподібна	0	10,0	0	20,0**
Звивистість венул				
змійоподібна	13,3	13,3	33,3**	23,3
меандрична	0	0	20,0**	0
штопороподібна	0	0	10,0	0
Звивистість капілярів				
змійоподібна	20,0	46,7*	23,3	30,0
меандрична	0	10,0	0	10,0
штопороподібна	0	0	0	6,7
Петлі капілярів	13,3	13,3	20,0	46,7
Новоутворені судини	6,7	13,3	33,3**	13,3
Артеріоло-венулярні анастомози	13,3	63,3	33,3	23,3
Зменшення кількості функціонуючих капілярів	6,7	36,7**	6,7	53,3***
Аваскулярні поля	6,7	20,0	46,7***	23,3
Утворення кутів капілярів	10,0	33,3*	46,7	36,7*

\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  порівняно з I групою.

Таким чином, у разі розвитку atopічного дерматиту виявляються ознаки нерівномірності калібра та звивистості артеріол, змісподібної звивистості капілярів, артеріоло-венулярних анастомозів, зменшення кількості функціонуючих капілярів та їх кутів. Порушення паралелізму мікросудин, мікроаневризми, сакуляції, патологічні форми звивистості венул, новоутворені мікросудини, артеріоло-венулярні анастомози, аваскулярні поля та кути капілярів характерні для мікробної екземи. Дифузна алопеція проявляється збільшенням сакуляцій, нерівномірності калібра венул, спазму та звивистості артеріол, звивистості петель і кутів капілярів, зменшенням їх кількості.

Отримані результати вимагають дослідження ГМЦР безпосередньо в шкірі.

### **В. В. Верещака**

#### **ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕМОМИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ДЕРМАТОЗАХ**

Биомикроскопическим исследованиям подлежала конъюнктива женщин возрастом от 36 до 55 лет, которые страдали atopическим дерматитом, микробной экземой и диффузной алопецией. Установлено, что в случае развития atopического дерматита определяются признаки неравномерности калибра и извитости артериол, змеобразной извитости капилляров, артериоло-венулярных анастомозов, уменьшения количества функционирующих капилляров и их улов. Нарушение параллелизма микрососудов, микроаневризмы, сакуляции, патологические формы извитости венул, новообразованные микрососуды, артериоло-венулярные анастомозы, аваскулярные поля и углы капилляров характерны для микробной экземы. Диффузная алопеция проявляется увеличением сакуляций, неравномерности калибра венул, спазма и извитости артериол, извитости петель и углов капилляров, уменьшением их количества.

Ключевые слова: микроциркуляция, atopический дерматит, микробная экзема, диффузная алопеция.

### **V.V. Vereshchaka**

#### **FEATURES OF SYSTEMIC MICROCIRCULATION IN PATIENTS WITH CHRONIC DERMATITIS**

We investigated the parameters of microcirculation of eyes in

women of 36-55 years age with atopіc dermatitis, mіcrobіc eczema and diffuse alopecia. In persons with atopіc dermatitis the signs of non-uniformity of capillary caliber and their branching were observed. These abnormalities were accompanied by an increase in the quantities of functioning anastomoses, loops and corners of capillaries. Abnormalities of microcirculation which accompany mіcrobіc eczema included alterations in microvessel parallelism, microaneurysm, venous sacculation, pathological forms of branching, vascular new growth, an increased number of functioning anastomose and presence of avascular fields. Diffuse alopecia was characterized by the venous sacculation, branching microveins, non-uniformity of their diameter and spasm of arteriols.

Key words: microcirculation, atopіc dermatitis, mіcrobіc eczema, alopecia.

*Kyiv University Taras Shevchenko*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии: Учеб. пособие. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Верещака В.В., Сидорова Н.М. Методика дослідження гемомікроциркуляторного русла бульбарної кон'юнктиви у стані спокою і при фізичних навантаженнях // Спорт. медицина. – 2007. – № 2. – С. 126–132.
3. Калюжная Л.Д., Верещака В.В. Функциональное состояние кожи при ее преждевременной инволюции // Пробл. старения и долголетия. – 2008. – 11, №2. – С. 193–198.
4. Коровин Н.А., Соловьев Т.С. Микроциркуляция. – М.: Изд-во УДН, 2009. – 99 с.
5. Кукушкин В.И. Микроциркуляторное русло человека. – М.: Медицина, 2009. – 306 с.
6. Магдач И.И. Патогенез хронических дерматозов. – К.: Здоров'я, 2007. – 236 с.
7. Малышко Л.Т. Микроциркуляция. – Харьков: Вища шк., 2005. – 234 с.
8. Маравин Ф.П. Особенности ветвления органных кровеносных сосудов // Арх. патологии. – 2003. – №9. – С. 13 – 21.
9. Селицкая Т.И., Пьянков В.З., Запускалов И.В. Сосуды конъюнктивы глаза в норме и при патологии. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1998. – 120 с.
10. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2010. – 256 с.
11. Сидорова Н.Н. Особенности микроциркуляции конъюнктивы глаза у больных-ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС. – В кн.: Морфофункциональное состояние системы кровообращения у больных с начальными проявлениями ишемической болезни сердца и гипертонической болезни – ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС. – К., Би, 2006. – С. 53–58.

12. Сидорова Н.Н. Современные подходы к использованию нитратов при основных кардиологических заболеваниях. Проблема толерантности // *Therapia*. – 2006. – №2. – С. 38–41.
13. Физиология человека. В 3-х томах. Пер. с англ. / Под ред. Р. Шмидта, Г. Тевса. – М.: Мир, 1996. – Т. 2. – 313 с.
14. Черкасов В.Г., Верещака В.В. Ультраструктурні механізми зміни шкіри лица у процесі старіння сучасної людини європеїдного типу // *Вісник морфології*. – 2005. – №2. – С. 203–206.
15. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. Микроциркуляция. – 2-е изд. стереотип. АМН СССР – М.: Медицина, 1994. – 432 с.
16. Chung K.Y., Kang D.S Regulation of type I collagen and interstitial collagenase mRNA expression in human dermal fibroblasts by colchicine and D-penicillamine // *Yonsei. Med. J.* – 2003. – **98**, №10. – P. 490–495.
17. Jeunger M., Hahn M., Klyszcz T., Steins A. Microangiopathy in the pathogenesis of chronic venous insufficiency // *Curr. Probl. Dermatol.* – 2009. – **155**. – P. 124–129.
18. Stansberry K.B., Peppard H.R., Babyak L.M. Primary nociceptive afferents mediate the blood flow dysfunction in non-glabrous (hairy) skin of type 2 diabetes: a new model for the pathogenesis of microvascular dysfunction // *Diabetes Care*. – 1999. – **21**, №9. – P. 1549–1554.
19. Reihnsner R., Menzel E.J. In vivo study of skin mechanical properties in patients with systemic sclerosis // *J. Amer. Acad. Dermatol.* – 2009. – **32**, №3. – P. 436–442.
20. Reihnsner R., Menzel E.J. Two-dimensional stress-relaxation behavior of human skin as influenced by non-enzymatic glycation and the inhibitory agent aminoguanidine // *J. Biomech.* – 1998. – **32**, №11. – P. 985–993.
21. Schrensen V.B., Wroblewski H., Galatius S. Skin microvascular distensibility and structural microangiopathy in idiopathic dilated cardiomyopathy and after heart transplantation // *Microvasc. Res.* – 2009. – **13**, №1. – P. 44–51.
22. Stucker M., Steinberg J., Memmel U. Differences in the two-dimensionally measured laser Doppler flow at different skin localisations // *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* – 2006. – **14**, №1. – P. 44–51.
23. Tur E. Physiology of the skin-differences between women and men // *Clin. Dermatol.* – 2007. – **27**. – P. 5–16.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка*

*Матеріал надійшов до редакції 24.06.2011*

О.Б. Вадзюк

## Вплив діазоксиду на мембранний потенціал мітохондрій та утворення активних форм кисню в клітинах матки щурів

*Показано часткову деполяризацію мітохондріальної мембрани клітин матки щурів активатором аденозинтрифосфатчутливого калієвого каналу ( $K_{ATФ}$ -каналу) діазоксидом. Деполяризувальний його ефект усувався речовиною, що блокує цей канал, – глібенкламідом. Дослідивши концентраційнозалежний вплив діазоксиду на потенціал мітохондріальної мембрани, ми вираховували значення уявної константи активації  $K_{ATФ}$ -каналу мітохондрій (міто $K_{ATФ}$ -каналу) матки щурів діазоксидом, яке становило  $(5,01 \pm 1,47) \cdot 10^{-6}$  моль/л. Також було продемонстровано збільшення вмісту активних форм кисню (АФК) під впливом діазоксиду, що ефективно усувалося глібенкламідом. Зроблено висновок, що активація міто $K_{ATФ}$ -каналу у клітинах матки щурів частково зменшує потенціал мітохондріальної мембрани та посилює генерацію АФК.*

*Ключові слова: діазоксид, мітохондріальний аденозинтрифосфатчутливий калієвий канал, активні форми кисню, мембранний потенціал, матка.*

### ВСТУП

Аденозинтрифосфат (АТФ)-чутливі калієві канали ( $K_{ATФ}$ -канали) відіграють важливу роль у функціонуванні гладеньких м'язів [11, 17]. Є дані, що активація саме цього типу калієвих каналів бере участь у регуляції їх скоротливої активності [11, 17, 19]. Функціонування  $K_{ATФ}$ -каналів плазматичної мембрани клітин міоцитів є об'єктом інтенсивних досліджень [4, 7], але роль і властивості їх аналогів (міто $K_{ATФ}$ -каналів) у мітохондріальній мембрані міоцитів матки залишаються невивченими. Функціонування міто $K_{ATФ}$ -каналів інтенсивно досліджується на клітинах серця, нервової системи, нирок [2, 3, 6, 8]. Зокрема, було показано, що активація цієї структури у мітохондріях селективним активатором діазоксидом призводить до збільшення об'єму їх матриксу [6, 8], попередження індукції апоптозу [6], інтенсифікації дихання та збільшення концентрації АТФ [3].

Дані щодо впливу активації міто $K_{ATФ}$ -каналу на мембранний потенціал мітохондрій суперечливі [2, 11, 14]. Зокрема, Busija та співавт. [2] показали часткову деполяризацію мітохондріальної мембрани (т. зв. “mild uncoupling” або м'яке роз'єднання) клітин мозку діазоксидом. Деякі автори [11] вважають, що невелике зменшення мембранного потенціалу мітохондрій при активації каналу діазоксидом опосередковує протекторний ефект цього активатора при ішемії. Але іншими дослідниками було показано, що захист міоцитів від метаболічного інгібування за допомогою активації каналу діазоксидом не опосередковується змінами мембранного потенціалу мітохондрій [14]. Як відомо з літературних джерел, вхід іонів  $K$  у мітохондріальний матрикс, спричинений активацією міто $K_{ATФ}$ -каналів діазоксидом, може інтенсифікувати транспорт електронів у електронно-транспортному ланцюзі [3].

© О.Б. Вадзюк

Відомо, що активні форми кисню (АФК) можуть відігравати роль клітинних месенджерів, що не тільки за фізіологічних умов регулюють важливі для клітини метаболічні шляхи [18] та розслаблення гладеньких м'язів [19], але також опосередковують захист клітини в умовах стресу [5, 6, 15, 18]. Деякі автори [12, 15] вказують, що при ішемічному та фармакологічному прекодиціюванні, для яких показана протекторна роль, помірно збільшується вміст АФК, в результаті чого активуються структури та ферменти, функціонування яких попереджує пошкодження клітини при масованому утворенні АФК, котре спостерігається в умовах ішемії–реперфузії. Дані досліджень [5, 6, 12, 15] свідчать, що у механізмах опосередкованого АФК захисту клітин задіяна активація мітоК<sub>АТФ</sub>-каналу. Продемонстровано [5, 6], що АФК активують останній у кардіоміоцитах, функціонування якого в свою чергу призводить до збільшення продукції АФК, які далі активують протеїнкіназу С (ПКС). Зокрема, Nassouna та співавт. [12] демонструють, що кардіопротекторний ефект діазоксиду усувається інгібітором ПКС $\alpha$ , що вказує на те, що мітоК<sub>АТФ</sub>-канал регулює активність ПКС $\alpha$  у кардіоміоцитах. Автори [5, 6, 12, 15] вважають, що у регуляції задіяні АФК, генерація яких відбувається у відповідь на активацію мітоК<sub>АТФ</sub>-каналів. Хоча подібні ефекти були показані для мітоК<sub>АТФ</sub>-каналів кардіоміоцитів і клітин мозку, але досі невідомо, як впливає їхня активація на генерацію АФК у клітинах матки.

Метою нашої роботи було дослідити вплив активатора мітоК<sub>АТФ</sub>-каналу діазоксиду на утворення АФК та утримання потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій ізольованих клітин матки щурів.

## МЕТОДИКА

Суспензію міоцитів матки невагітних щурів отримували за стандартною методикою з

використанням 0,1%-ї колагенази, 0,1%-го бичачого сироваткового альбуміну та 0,01%-го соєвого інгібітора трипсину [16]. Кількість клітин рахували за допомогою камери Горяєва після фарбування трипановим синім. Склад середовища інкубації був таким (ммоль/л): NaCl – 136,9, KCl – 5,36, KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> – 0,44, NaHCO<sub>3</sub> – 0,26, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,26, глюкоза 0,01%, HEPES – 10, CaCl<sub>2</sub> – 0,03; рН 7,4, 37 °С.

Мембранний потенціал досліджували спектрофлуориметрично з використанням потенціалчутливого зонда 3,3'-дигексильоксикарбоціанін йодид (DiOC6(3)) ("Fluka", США). Флуоресценцію DiOC6(3) реєстрували при довжині хвилі збудження 490 нм і випромінювання 510 нм. Для контролю саме мітохондріальної компоненти мембранного потенціалу для кожної проби прописували контрольну пробу, до якої, крім діючих речовин, вносили 30 мкмоль/л СССР ("Sigma-Aldrich", США). СССР-нечутливу компоненту з контролю віднімали, далі працювали лише з чутливою, тобто мітохондріальною компонентою мембранного потенціалу. Концентрація зонда у середовищі інкубації становила 150 нмоль/л. Флуоресцентний сигнал реєстрували з моменту внесення аліквоти розчину зонда. Кількість клітин у пробі була 1 млн/мл.

Дію діазоксиду ("Sigma-Aldrich", США) вивчали у діапазоні концентрації від 1 до 75 мкмоль/л. Апроксимацію кінетичних кривих зростання флуоресцентної відповіді потенціалчутливого зонда при різних концентраціях діазоксиду проводили у термінах хімічної реакції першого порядку, використовуючи відношення  $I = I_{\max} (1 - e^{-kt})$ , де  $I$  та  $I_{\max}$  – миттєва та максимальна (платова у часі) флуоресцентна відповідь зонда,  $k$  – уявна константа швидкості процесу (вимірюється у секундах у мінус першому ступені),  $t$  – час. Відповідно до цього рівняння константу швидкості  $k$  розраховували як від'ємне значення тангенса кута нахилу графіка, лінеаризованого у напівло-

гарифмічних координатах  $\{\ln[(I_{\max} - I)/I_{\max}]; t\}$  ( $r = 0,9-0,99$ ). Початкову швидкість  $V_0$  (відсоток за секунду) розраховували за рівнянням  $V_0 = (dI/dt)_{t=0} = k \cdot I_{\max}$ .

Уявну константу активації мітоК<sub>АТФ</sub>-каналу діазоксидом ( $\langle K_{1/2} \rangle$ ) розраховували у модифікованих координатах Хілла, використовуючи рівняння  $\lg [(V_0 - V_{0d}) / (V_{0d} - V_{dpl})] = n \lg I - n \lg K$ , де  $V_0$ ,  $V_{0d}$  та  $V_{dpl}$  – початкова швидкість реакції у середовищі без діазоксиду, з різними його концентраціями та у середовищі з максимальними діючими концентраціями (50–75 мкмоль/л) відповідно.

Утворення АФК досліджували спектрофлуориметрично з використанням зонда дихлорофлуоресцеїну діацетату (DCF; “Sigma-Aldrich”, США). Флуоресценцію зонда збуджували при довжині хвилі 504 нм, реєстрували при 520 нм. Концентрація зонда у середовищі становила 5 мкмоль/л. Кількість клітин у пробі була 1 млн./мл. Флуоресцентний сигнал реєстрували з моменту внесення аліквоти розчину зонда. Всі діючі речовини (крім N-ацетил цистеїну – НАС) розчиняли у диметилсульфоксиді та вносили у середовище перед додаванням

зонда. У контрольну пробу додавали відповідну аліквоту диметилсульфоксиду також перед додаванням зонда.

Кінетичний аналіз результатів та побудову графіків проводили із використанням програми Microcal Origin, версія 5.0 (“Microcal Software Inc.”, США)

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Внесення аліквоти селективного активатора мітоК<sub>АТФ</sub>-каналів діазоксиду у кінцевій концентрації 50 мкмоль/л у середовище інкубації, що містило міоцити, призводило до часткового зменшення потенціалу мітохондріальної мембрани відносно контролю, що реєструвалося за зниженням значень флуоресценції потенціалчутливого зонда (рис. 1, 1, 2). Але наявність у середовищі інкубації блокатора К<sub>АТФ</sub>-каналів глібенкламід (20 мкмоль/л) попереджала викликану діазоксидом деполаризацію мембрани мітохондрій (див. рис.1, 2, 3). Оскільки дія діазоксиду повністю усувається глібенкламідом, це означає, що зменшення потенціалу мітохондріальної мембрани спричинене саме

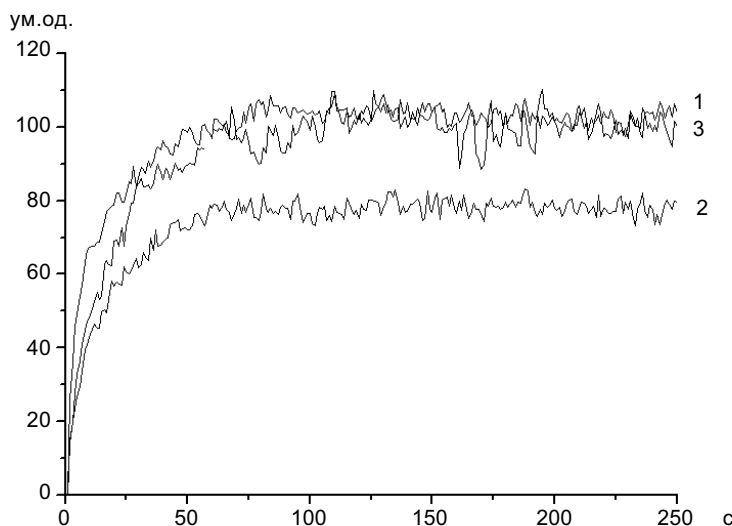


Рис. 1. Дія ефекторів аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів діазоксиду та глібенкламід на мембранний потенціал мітохондрій:

1 – флуоресцентна відповідь зонда DiOC 6(3) у стандартному середовищі інкубації, що містить клітини; 2 – те саме з додаванням діазоксиду (50 мкмоль/л); 3 – з додаванням діазоксиду (50 мкмоль/л) і глібенкламід (20 мкмоль/л)



активацією мітоК<sub>АТФ</sub>-каналів. Утримання мітохондріями мембранного потенціалу має важливе значення для функціонування самих мітохондрій і клітини в цілому. Потенціал на мітохондріальній мембрані регулює, в т.ч. таку важливу функцію мітохондрій, як транспорт іонів кальцію [3, 13]. Показано [13], що м'яке роз'єднання у відповідь на дію діазоксиду пригнічує накопичення Ca<sup>2+</sup> у матриксі мітохондрій. Цей ефект може мати суттєве значення для виживання клітини в умовах стресу, оскільки попереджає індукцію іонами кальцію мітохондріальної пори перехідної проникності.

Для того щоб визначити  $\langle K_{1/2} \rangle$  активації діазоксидом мітоК<sub>АТФ</sub>-каналів матки щурів, ми дослідили вплив цього активатора на потенціал мембрани мітохондрій у широкому діапазоні його концентрацій (1–75 мкмоль/л; див. рис. 2, 1–5). Виявилося, що діазоксид дозозалежно зменшував мембранний потенціал мітохондрій, причому при концентраціях 25–50 мкмоль/л спостерігався максимальний ефект (див. рис. 2, 4, 5).

Використовуючи кінетичний аналіз, були вираховані  $k$  зростання флуоресцентної відповіді зонда у термінах необоротної хімічної реакції першого порядку та розра-

ховані значення початкової швидкості ( $V_0$ ) за рівнянням  $V_0 = k \cdot I_{\max}$ , де  $I_{\max}$  – платове значення флуоресценції зонда за відсутності діазоксиду. Залежність значення  $V_0$  від концентрації діазоксиду представлена на рис. 3,а. Використавши  $V_0$  за різних концентрацій діазоксиду ми вираховали  $\langle K_{1/2} \rangle$  (див. рис. 3,б). Значення  $\langle K_{1/2} \rangle$  міоцитів матки щурів у використаних нами умовах становило  $(5,01 \pm 1,47) \cdot 10^{-6}$  моль/л, що збігається з літературними даними. Так, константа спорідненості діазоксиду до мітоК<sub>АТФ</sub>-каналу до інтактних мітохондрій печінки становить 2,3 мкмоль/л [9], а для мітоК<sub>АТФ</sub>-каналу кардіоміоцитів – 0,8 мкмоль/л [10]. Коефіцієнт Хілла становив 1,12. Це свідчить, що стехіометрія взаємодії діазоксиду з мітоК<sub>АТФ</sub>-каналом становить 1:1.

Відомо, що АФК утворюються у клітині постійно за нормальних умов [18]. У використаних нами умовах, що відповідають умовам нормоксії, при внесенні DCF у середовище інкубації, що містить міоцити, його флуоресценція зростає у часі (рис. 4, 1). Причому таке посилення флуоресцентного сигналу є чутливим до скавенджера АФК NAC. За його наявності

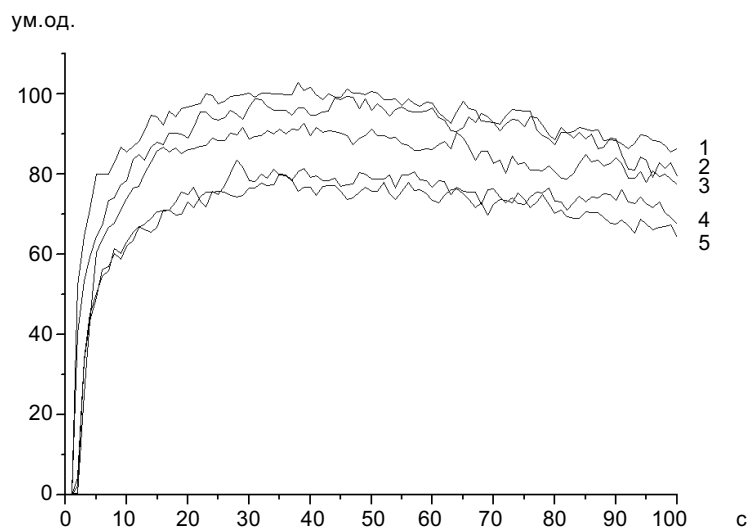


Рис. 2. Вплив різних концентрацій діазоксиду на мембранний потенціал мітохондрій: 1 – флуоресцентна відповідь зонда DіоС6(3) у стандартному середовищі інкубації, що містить міоцити. Криві 2, 3, 4 та 5 отримані за наявності таких концентрацій діазоксиду: 1, 5, 25 та 50 мкмоль/л відповідно.

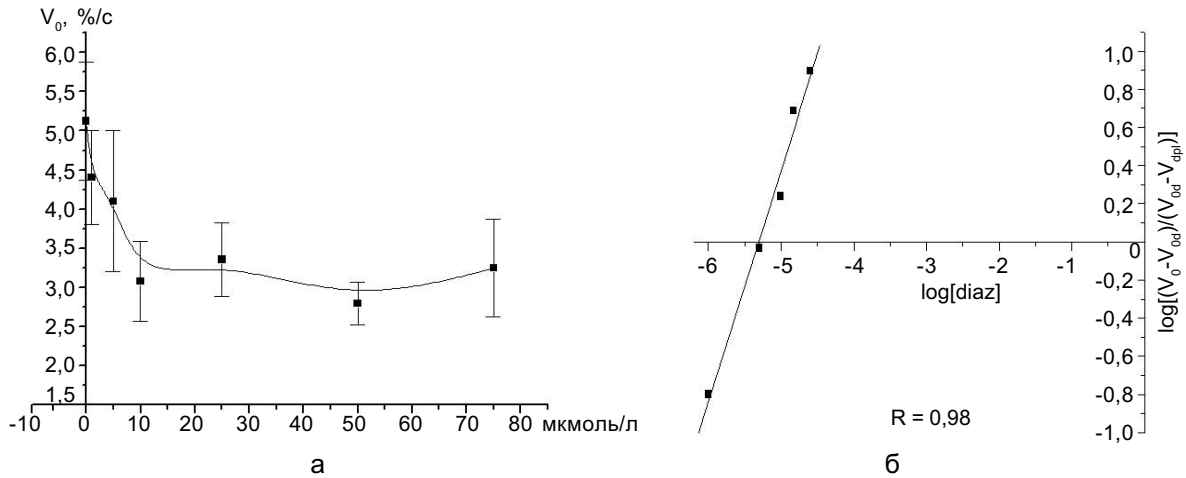


Рис. 3. Концентраційна залежність впливу діазоксиду на початкові швидкості зростання флуоресцентної відповіді потенціалчутливого зонда DioC6(3) (а); використання модифікованих координат Хілла для розрахунку уявної константи активації діазоксидом аденозинтрифосфатчутливого калієвого каналу мітохондрій міоцитів (б)

у дозі 1 ммоль/л, що усуває дію АФК, збільшення флуоресценції DCF не спостерігалось. Внесення діазоксиду у середовище інкубації призводило до більш інтенсивного зростання флуоресценції DCF, ніж у стандартних умовах (див. рис. 4, 1, 2). Але при наявності у середовищі інкубації блокаторів мітоК<sub>АТФ</sub>-каналів глібенкламід або 5-гідроксидеканоату разом з діазок-

сидом (див. рис. 4, 3, 4), зростання флуоресценції DCF уповільнювалось і майже відповідало контрольним умовам, тобто без діазоксиду (див. рис. 4, 1, 3, 4). Причому без діазоксиду ні глібенкламід, ні 5-гідроксидеканоат не впливали на утворення АФК у міоцитах матки. А, отже, зміни флуоресценції АФК-чутливого зонда при внесенні діазоксиду свідчать про збіль-

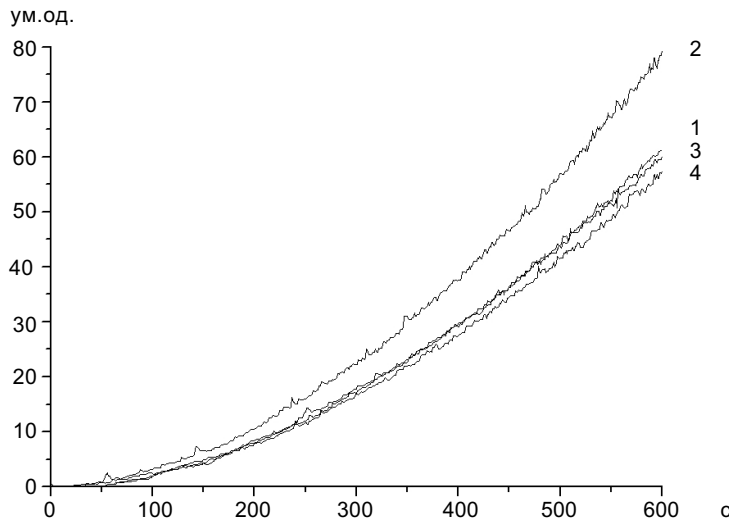


Рис. 4. Вплив діазоксиду на утворення активних форм кисню (АФК) у міоцитах матки щурів: 1 – вимірювання утворення АФК у стандартному середовищі інкубації, що містить клітини, за допомогою флуоресцентного зонду DCF; 2 – генерація АФК при додаванні діазоксиду. Діазоксид (50 мкмоль/л) було додано перед внесенням аліквоти розчину зонду; 3, 4 – блокатори мітохондріальних аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів глібенкламід (20 мкмоль/л) та 5-НД (200 мкмоль/л) відповідно, знімають збільшення утворення АФК під дією діазоксиду. Блокатори вносили разом з діазоксидом перед додаванням аліквоти розчину зонда

шення продукції АФК у міоцитах матки щурів у відповідь на активацію мітоK<sub>АТФ</sub>-каналу.

Таким чином, нами показано, що активація діазоксидом мітоK<sub>АТФ</sub>-каналів у клітинах матки щурів призводить до часткової деполаризації мембрани мітохондрій і збільшення вмісту АФК. Одержані результати дають змогу припускати, що опосередкований активацією мітоK<sub>АТФ</sub>-каналів захист клітини в умовах стресу [1] може бути зумовлений частковим роз'єднанням внутрішньої мітохондріальної мембрани. Показана нами генерація АФК у міоцитах матки у відповідь на активацію мітоK<sub>АТФ</sub>-каналів також може мати важливе фізіологічне значення, оскільки, як відомо, вони є клітинними месенджерами, які беруть участь у таких важливих процесах, як м'язове скорочення та регуляція активності багатьох ензимів, задіяних у захисті клітини в умовах стресу [18, 20].

**О. Б. Вадзюк**

### **ВЛИЯНИЕ ДИАЗОКСИДА НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ И ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ МАТКИ КРЫС**

Показана частичная деполаризация митохондриальной мембраны миоцитов матки крыс активатором аденозинтрифосфат (АТФ)-чувствительного калиевого канала (K<sub>АТФ</sub>) диазоксидом. Деполаризирующее влияние диазоксида снижалось глибенкламидом, известным блокатором этого канала. Изучив концентрационнонезависимое влияние диазоксида на потенциал митохондриальной мембраны, мы рассчитали значение кажущейся константы активации K<sub>АТФ</sub>-канала митохондрий миометрия крыс (митоK<sub>АТФ</sub>) диазоксидом, которое составило  $(5,01 \pm 1,47) \cdot 10^{-6}$  моль/л. Также было продемонстрировано увеличение концентрации активных форм кислорода под действием диазоксида, которое эффективно снималось глибенкламидом. Сделан вывод, что активация митоK<sub>АТФ</sub>-канала в клетках матки крыс частично уменьшает потенциал митохондриальной мембраны и увеличивает продукцию активных форм кислорода.

Ключевые слова: диазоксид, митохондриальный аденозинтрифосфатчувствительный калиевый канал, активные формы кислорода, мембранный потенциал, матка.

**O. B. Vadzyuk**

### **EFFECTS OF DIAZOXIDE ON THE MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND ROS GENERATION IN RAT UTERUS CELLS**

In the present study we demonstrate partial depolarization of the mitochondrial inner membrane from the rat uterus cells upon activation of mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel (mitoK<sub>ATP</sub>) with diazoxide. The estimated affinity constant of diazoxide to mitoK<sub>ATP</sub> from rat uterus cells is  $(5.01 \pm 1.47) \cdot 10^{-6}$  M. We also observed an enhanced generation of reactive oxygen species after addition of diazoxide. Both effects were effectively eliminated by glybenclamide, blocker of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. Our results indicate that activation of mitoK<sub>ATP</sub> in rat uterus cells leads to a partial depolarization of mitochondrial membrane and an increase in ROS concentration. Key words: diazoxide, mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel, reactive oxygen species, membrane potential, uterus.

*Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Akao M., Ohler A., O'Rourke B., Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive Potassium Channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells // *Circulat. Res.* – 2001. – **88**. – P. 1267–1275.
2. Busija D., Katakam P., Rajapakse N.C., Kis B., Grover G., Domoci F., Bari F. Effects of ATP-sensitive potassium channel activators diazoxide and BMS-191095 on membrane potential and reactive oxygen species production in isolated piglet mitochondria // *Brain Res. Bull.* – 2005. – **66**. – P. 85–90.
3. Cancherini D., Trabuco L., Rebousac N., Kowaltowski A. ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels in renal mitochondria // *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2003. – **285**. – P. F1291–F1296.
4. Chien E.K., Zhang Y.Z., Furuta H., Hara M. Expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in female rat reproductive tissues: overlapping distribution of messenger ribonucleic acid for weak inwardly rectifying potassium channel subunit 6.1 and sulfonylurea-binding regulatory subunit 2 // *Amer. J. Obstet. Gynecol.* – 1999. – **180**. – P. 1121–1126.
5. Costa A., Garlid K. Intramitochondrial signalling: interactions among mitoKatp, PKCe, ROS, and MPT // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* – 2008. – **295**. – P. H874–H882.
6. Costa A., Jacob R., Costa C., Andrukhiv K., West I., Garlid K. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, №30. – P. 20801–20808.
7. Curley M., Cairns M.T., Freil A.M. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium // *Mol. Hum. Reprod.* –

2002. – **8**, № 10. – P. 941–945.
8. Facundo H.T.F., Paula J.G., Kowaltowski A.J. Mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$ -channels are redox sensitive pathways that control reactive oxygen species production // *Free Radical Biol. and Med.* – 2007. – **42**. – P. 1039–1048.
  9. Garlid K., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. The mitochondrial  $K_{ATP}$ -channel as a receptor for potassium channel openers // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**. – №15. – P. 8796–8799.
  10. Garlid K. Paucek P., Yarov-Yarovi V. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$ -channels // *Circul. Res.* – 1997. – **81**. – P.1072–1082.
  11. Hanley P. J., Daut J.  $K_{ATP}$ -channels and preconditioning: A re-examination of the role of mitochondrial  $K_{ATP}$  channels and an overview of alternative mechanisms // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2005. – **39**. – P. 17–50.
  12. Hassouna A., Matata B. M., Galinanes M. PKCe is upstream and PKCa is downstream of mitoKATP-channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium // *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – **287**. – P C1418–C1425.
  13. Holmuhamedov E., Wang L., Terzic A. ATP-sensitive  $K^+$ -channel openers prevent  $Ca^{2+}$  overload in rat cardiac mitochondria // *J. Physiol.* – 1999. – **519**. – P. 347–360.
  14. Lawrence C.L., Billups B. B., Rodrigo G.C., Standen N.B. The  $K_{ATP}$ -channel opener diazoxide protects cardiac myocytes during metabolic inhibition without causing mitochondrial depolarization or flavoprotein oxidation // *Brit. J. Pharmacol.* – 2001. – **134**. – P. 535–542.
  15. Lebuffe G., Schumacker P.T., Shao Z.H., Anderson T., Iwase H., Vanden Hoek T.L. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial  $K_{ATP}$ -channel // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* – 2003. – **284**. – P. H299–H308.
  16. Mollard P., Mironneau J., Amedee T. Electrophysiological characterization of single pregnant rat myometrial cells in short-term primary culture // *Amer. J. Physiol.* – 1986. – **19**, №1. – P.C. 47–54.
  17. Shien C.C., Coghlan M., Sullivan J. Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, therapeutic opportunities // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – **52**, №4. – P. 557–593
  18. Signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. Pathways and chemical principles. Eds by Forman H. J., Fucuto J., M. Torres. – New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Acad. Publish., 2004. – P. 411.
  19. Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive  $K^+$ -channels in smooth muscle // *J. Physiol.* – 2006. – **572**, №3. – P. 617–624.
  20. Warren A.Y., Matharoo-Balls B., Shaw R.W. Hydrogen peroxide and superoxide anion modulate pregnant human myometrial contractility // *Reproduction.* – 2005. – **130**. – P. 539–544.

*In-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*  
E-mail: vadzyuk@biochem.kiev.ua;  
olga\_vadzyuk@hotmail.com

*Матеріал надійшов до редакції 02.09.2011*

І. П. Кайдашев

## Активация NF-κB при метаболічному синдромі

*Розглядається формування в сучасних умовах сукупності еволюційно нових причинних факторів, що можуть викликати новий патологічний стан і які реалізуються через еволюційно закріплені типові патологічні процеси. Наводиться аналіз поняття “метаболічний синдром” і його складових. Автор указує на взаємозв’язок інсулінорезистентності, хронічного запалення, артеріальної гіпертензії, ендотеліальної дисфункції та дисліпідемії як проявів одного патологічного процесу, центральною молекулярною основою якого є активация NF-κB. Пропонується сформулювати концепцію перманентної (довготривалої та низькоінтенсивної) активации NF-κB як можливого типового патологічного процесу.*

*Ключові слова: метаболічний синдром, інсулінорезистентність, NF-κB.*

“Одне з важливих завдань патологічної фізіології полягає в тому, щоб дати наукове визначення хвороби, розкрити зміст цього поняття. Від правильного погляду на сутність хвороби залежить успішне дослідження загальних закономірностей її виникнення та розвитку, що в свою чергу потрібно для профілактики і лікування”, – писав Д.О. Альперн [1]. Водночас слід розрізняти поняття “патологічний процес” і “патологічний стан”.

Незначно відрізняються погляди на ці поняття і в більш пізніх працях класиків вітчизняної патофізіології. “Хвороба є порушення нормальної життєдіяльності організму при дії на нього пошкоджувальних агентів, у результаті чого знижуються його пристосувальні можливості” [5]. Разом із тим починає вживатися термін “фактори ризику”. Це допомагає з величезної кількості внутрішніх і зовнішніх факторів виділяти ті, що мають найближче відношення до формування захворювання. Слід мати на увазі, що до чинників ризику відносяться такі, які є причинами чи умовами або навіть ланками патогенезу цього зах-

ворювання, що вимагають подальшого поділу та самостійного аналізу.

Кінець другого тисячоліття ознаменувався появою нових визначень поняття “хвороба”. У поняття первинного ушкодження при хворобі включаються також дефекти управління, порушення інформаційних процесів в організмі, який завжди хворіє як ціле [3].

Найбільш універсальні зі стереотипних “будівельних блоків” спонтанних хвороб запрограмовані у генетичному апараті організму і називаються типовими патологічними процесами, які склались еволюційно і мають стереотипність, універсальність, відносний поліетіологізм і аутохтонність, еквіфінальність, а також характерну онтогенетичну динаміку.

Оскільки типові патологічні процеси – еволюційно відібрані програми, ми можемо простежити філогенез і виявити їх у тому чи іншому вигляді у різних тварин. Розвиваючись, організм людини набував здатності реагувати на неоднакові екзогенні та ендогенні фактори, які переважно представ-

лені екстремальними негативними впливами – нестача поживних речовин, механічні ушкодження, термічні та хімічні фактори, хвильові впливи, інфекційні агенти (переважно бактерії), психосоціальні фактори тощо. У сучасних умовах розвитку цивілізації людина стикається з реструктуризацією таких впливових факторів. Нестача поживних речовин змінюється їх надлишком із переважанням легко засвоюваних вуглеводів, рафінованих жирів, мінімізуються механічні ушкодження, зменшується діапазон температур, змінюється спектр хвильових впливів, підвищується число та концентрації біологічно активних ксенобіотиків. Змінюється спектр мікроорганізмів, які впливають на сучасну людину, зменшується число бактеріальних інфекцій при збільшенні вірусних і внутрішньоклітинних (“гігієнічна теорія” розвитку алергічних захворювань). Збільшується тривалість “штучного світлового дня”.

При такому новому поєднанні факторів, які впливають на людину, використовуються вже існуючі типові реакції, оскільки швидкий розвиток цивілізації не залишає достатнього часу для еволюціонування нових механізмів чи регуляторних/керуючих систем для їх “підлаштування”, “тюнінгу” за нових умов існування.

Таким чином, у сучасних умовах формується сукупність нових причинних факторів, які можуть викликати новий патологічний стан (хворобу?), реалізуючись через еволюційно закріплені типові патологічні процеси, але з певною специфічністю. Якщо на організм починає впливати така група чинників, реакція на яку еволюційно не закріпилася, то це неминуче призведе до розвитку патологічного стану з новим набором типових патологічних процесів. Отже, це може тлумачитися як окреме захворювання, що тільки виникло.

За сучасних умов така група чинників включає в себе зниження фізичної актив-

ності, надлишкове надходження з їжею легко засвоюваних вуглеводів, рафінованих жирів, зміну спектра інфекційних агентів тощо. Відповідно, кожен із цих факторів, окремо і в сукупності впливають на організм, вступаючи у взаємодію з клітинами та тканинами організму, викликають явища інсулінорезистентності, ліпотоксичності, ожиріння, імунного запалення тощо. При цьому черговість виникнення цих пов’язаних між собою явищ визначається реактивністю організму, яка включає в себе весь набір доступних йому адаптивних відповідей, у тому числі всі успадковані норми реакції, а також не успадковані програми, пов’язані з індивідуальним онтогенетичним досвідом і збережені імунологічною пам’яттю і нейропам’яттю.

Значною мірою провідні прояви такого нового патологічного процесу залежатимуть від індивідуальних реактивності організму та дефектів клітинних програм. Наприклад, у розвитку артеріальної гіпертензії важливу роль можуть відігравати поліморфізми генів, що кодують білки ренін-ангіотензивної системи, інсулінорезистентності – поліморфізми генів, які кодують рецептори, котрі активують проліферацію пероксисом і т.д., модулювання імунного запалення – поліморфізм генів Toll-подібних рецепторів [4, 26].

Зупинившись на деяких поняттях патології, що стосуються безпосередньої теми викладу, перейдемо до аналізу поняття “метаболічний синдром” і його складових.

Метаболічний синдром (МС) являє собою у визначеннях провідних міжнародних клінічних організацій, комплекс взаємопов’язаних чинників ризику серцево-судинних захворювань (ССЗ) і діабету. Ці чинники включають дисглікемію, підвищений кров’яний тиск, підвищений вміст тригліцеридів, низький вміст холестерину ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ) і ожиріння (особливо, центральне). Нині увага зосереджена на можливій ролі

інсулінорезистентності як сполучної ланки серед чинників, складових МС, однак патогенез залишається неясним, як і встановлення чітких діагностичних критеріїв [15].

Дискутується важливе питання – чи дійсно МС є синдромом чи сукупністю різнорідних феноменів. Звернімося до визначення поняття “синдром”, яке використовується міжнародними організаціями, – це спрощене поєднання факторів, які спостерігаються разом частіше, ніж окремо і для яких причина часто є не встановленою. Таке визначення синдрому, з нашої точки зору, досить невдале. Тим не менш, МС, на думку таких авторитетних організацій як IDF (Міжнародна діабетична федерація), АНА (Американська серцева асоціація), IAS (Міжнародна атеросклеротична спілка) та ін., цілком відповідає цим критеріям [8].

Перше формальне визначення МС було запропоновано в 1998 р. [7]. У ньому інсулінорезистентність підкреслена як

основний чинник ризику, і доказ наявності цього симптому був необхідним для встановлення діагнозу МС. Діагноз МС за критеріями ВООЗ базувався на кількох маркерах інсулінорезистентності та 2 додаткових факторах ризику, включаючи ожиріння, гіпертензію, високий вміст тригліцеридів, знижений вміст холестерину ЛПВЩ або мікроальбумінемію. Хворі на цукровий діабет (ЦД) 2-го типу не були виключені з діагнозу МС (табл. 1).

У 2001 р. були запропоновані критерії АТР ІІІ (від англ: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III) [29]. Вони не вимагали доказу наявності інсулінорезистентності. Більше того, не було одного обов’язкового фактора, а була необхідна наявність будь-яких 3 із 5 факторів: абдомінальне ожиріння (яке чітко корелювало з інсулінорезистентністю), підвищений вміст тригліцеридів, знижений вміст холестерину ЛПВЩ, підвищений артеріальний тиск і підвищена концентрація

**Таблиця 1. Критерії метаболічного синдрому згідно з ВООЗ (1998)**

Інсулінорезистентність, встановлена при наявності однієї з перерахованих ознак	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Цукровий діабет 2-го типу</li> <li>• Змінений вміст глюкози натще</li> <li>• Порушення толерантності до глюкози або нормальний вміст глюкози (&lt;110 мг/дл), але із її захопленням менше нижньої квартилі для основної популяції при дослідженні еуглікемії</li> </ul>
Додаткові фактори з перерахованих	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Прийом антигіпертензивних препаратів і/або підвищений артеріальний тиск (<math>\geq 140</math> мм рт. ст. систолічний або <math>\geq 90</math> мм рт. ст. діастолічний)</li> <li>• Концентрація тригліцеридів у плазмі <math>\geq 150</math> мг/дл (<math>\geq 1,7</math> ммоль/л)</li> <li>• Холестерин ліпопротеїнів високої щільності &lt; 35 мг/дл (&lt; 0,9 ммоль/л) у чоловіків або &lt; 39 мг/дл (&lt; 1,0 ммоль/л) у жінок</li> <li>• Індекс маси тіла (ІМТ) &gt; 30 кг/м<sup>2</sup> і/або відношення ообводу талії/стегна &gt; 0,9 у чоловіків, <math>\geq 0,85</math> у жінок</li> <li>• Експресія альбуміну з сечею <math>\geq 20</math> мг/хв або співвідношення альбумін/креатин <math>\geq 30</math> мг/г</li> </ul>

Примітка. Метаболічний синдром визначається за наявності інсулінорезистентності та будь-яких двох додаткових факторів.

глюкози натще (змінений вміст глюкози натще або ЦД 2-го типу; табл. 2).

У 2005 р. Міжнародна діабетична (IDF) та Американська серцева асоціації спільно з Національним інститутом серця, легенів та крові (АНА/NHLBI) прийняли нові критерії для клінічної діагностики МС [9, 22]. У них є різні рекомендації щодо обводу талії. IDF опустила вимоги ВООЗ (1998) щодо інсулінорезистентності, але зробила абдомінальне ожиріння одним необхідним чинником із 5 для постановки діагнозу; інші критерії були ідентичні АТР ІІІ, проте абдомінальне ожиріння не було висунуто як обов'язковий фактор ризику. Більше того, відсутнє узгоджене визначення абдомінального ожиріння між IDF і АНА/NHLBI. Нині дискусія між IDF і АНА/NHLBI з питання різниці у визначенні МС триває. Сторони погоджуються з тим, що абдомінальне ожиріння не повинно бути визначальним у встановленні діагнозу, а лише 1 із 5 критеріїв, а наявність будь-яких 3 із 5 факторів є достатнім для діагностики МС (табл. 3).

Як видно з першої графі табл. 3, для визначення порогу варто користуватися значеннями, специфічними для популяції або країни. Декілька авторитетних міжнародних організацій запропонували такі значення для різних етнічних груп, країн.

Таким чином, у табл. 3 представлені найбільш загальноприйняті критерії встановлення діагнозу МС, запропоновані IDF і АНА/NHLBI (2009). Це передбачає, що ризик, пов'язаний зі збільшенням обводу

талії, буде визначатися окремо для кожної популяції.

Безсумнівно, що вчення про МС буде розвиватися і не тільки з точки зору взаємовідношення значення обводу талії, метаболічного ризику та серцево-судинних подій, а й з погляду на етіологію та патогенез МС.

Аналіз складових МС показує, що з моменту опису цього стану відбувся певний “дрейф” значущості компонентів від інсулінорезистентності у бік ожиріння. При цьому проблему ожиріння, і тим більше враховуючи патогенез МС, важко визнати повністю вивченою. Доведено гетерогенність ожиріння, описані особи з ожирінням, але без ознак характерних гормонально-метаболічних порушень, та особи з нормальною масою тіла, але з подібними порушеннями. При цьому схильність до основних неінфекційних захворювань (наприклад, ішемічної хвороби серця, атеросклерозу) у “метаболічно здорових осіб із ожирінням” нижча, ніж в осіб із нормальною масою і метаболічними порушеннями, але все-таки вони знаходяться в більшій зоні ризику, ніж люди з нормальною масою тіла без ознак метаболічних порушень [2].

Якщо простежити просторово-часовий континуум подій у патогенезі МС, то на передній план виходять такі патологічні стани, як гіперглікемія, гіперінсулінемія, інсулінорезистентність, ендотеліальна дисфункція й атеросклероз, ліпотоксичність, запалення, адипозопатія та порушення топографії жиру в організмі.

**Таблиця 2. Критерії метаболічного синдрому згідно з АТР ІІІ (2001)**

Фактор ризику	Визначальний рівень
Абдомінальне ожиріння, представлене як обвід талії	> 102 см у чоловіків > 88 см у жінок
Тригліцериди	≥ 150 мг/дл
Холестерин ліпопротеїнів високої щільності	< 40 мг/дл у чоловіків < 50 мг/дл у жінок
Артеріальний тиск	≥ 130/85 мм рт. ст.
Вміст глюкози натще	≥ 110 мг/дл

Примітка. Метаболічний синдром визначається за наявності будь-яких 3 із 5 вказаних факторів.



**Таблиця 3. Критерії метаболічного синдрому згідно з IDF і АНА/NHLBI (2005 р. із модифікацією 2009 р.)**

Фактор ризику	Визначальний рівень
Збільшення обводу талії	Значення визначається специфічно для країни чи популяції
Підвищення вмісту тригліцеридів (альтернативно, використання препаратів, що знижують вміст тригліцеридів)	$\geq 150$ мг/дл (1,7 ммоль/л)
Знижений вміст холестерину ліпопротеїнів високої щільності (альтернативно, використання препаратів для зниження цього показника)	$< 40$ мг/дл (1,0 ммоль/л) у чоловіків $< 50$ мг/дл (1,3 ммоль/л) у жінок
Підвищений артеріальний тиск (альтернативно, використання антигіпертензивних препаратів)	$\geq 130$ мм рт. ст. систолічний і/або $\geq 85$ мм рт. ст. діастолічний
Підвищення вмісту глюкози натще (альтернативно, використання цукрознижувальних препаратів)	$\geq 100$ мг/дл

Примітка. Метаболічний синдром визначається за наявності будь-яких 3 із 5 вказаних факторів.

Отже, гіперглікемія, що традиційно розглядається як важливий фактор серцево-судинних порушень, в результаті проведених широкомасштабних клінічних досліджень, які довели, що активна нормалізація вмісту глюкози в крові не призводить до зниження ризику розвитку серцево-судинних захворювань, сьогодні видається другорядним чинником порівняно з дисліпідемією і гіпертензією [20, 31]. Клінічні спостереження застосування інсуліну для запобігання розвитку цих захворювань показали його неефективність. Інсулін викликає збільшення маси тіла, переважно за рахунок жирової тканини [24]. Більше того, навіть невелике збільшення вмісту інсуліну в плазмі може викликати важку інсулінорезистентність [16]. Існує безліч опублікованих даних, які показують, що інсулін, особливо у високих дозах, провокує розвиток атеросклерозу, посилює ліпогенез *de novo* та підвищує синтез ліпопротеїдів дуже низької щільності (ЛПДНЩ) у печінці, підсилює транспорт ЛПНЩ у гладеньком'язові клітини артерій, синтез колагену, стимулює проліферацію гладеньких міоцитів, а також, що особливо важливо, запускає безліч генів, які регулюють процеси запалення [13].

У світлі наведених вище факторів гіперінсулінемія та інсулінорезистентність стають однією з основних ланок патогенезу. Сама по собі інсулінорезистентність та пов'язані з нею процеси можуть бути причинами розвитку серцево-судинних захворювань [27, 32]. Були отримані відомості, відповідно до яких пацієнти з ЦД 2-го типу і нормальною масою, а також особи з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози мають прояви інсулінорезистентності з порушенням шляху синтезу глікогену [10]. Отримані та підтвержені дані про наявність інсулінорезистентності вже при порушенні толерантності до глюкози [6, 23].

Виникає обґрунтоване запитання про можливість використання поняття інсулінорезистентності як основи синдрому – синдром інсулінорезистентності [15]. Така можливість підтверджена багатьма клінічними дослідженнями – San Antonio Heart Study, Verona Diabetes Study, Insulin Resistance Atherosclerosis Study тощо, які доводять зв'язок між інсулінорезистентністю та розвитком ССЗ, а саме атеросклерозу. У зв'язку з цим на перший план виступає визначення молекулярних основ інсуліно-

резистентності. Інсулін має важливе значення в активації синтази оксиду азоту, що регулює продукцію NO. Дефіцит останнього призводить до активації багатьох патогенетичних механізмів розвитку атерогенезу [28]. Таким чином, порушення передачі інсулінового сигналу не тільки змінює утилізацію глюкози, але й ініціює розвиток гіпертензії та атеросклерозу.

Відповідно, інсулінорезистентність за умов порушень PI-3-кіназного (метаболічного) шляху при збереженні MAP-кіназного активує багато прозапальних внутрішньоклітинних шляхів, включно з NF- $\kappa$ B/інгібітор  $\kappa$ B і c-Jun N-кінцеву кіназу, а також гени, що беруть участь у запаленні [13].

Важливим є також і те, що порушення PI-3-кіназного шляху при інсулінорезистентності призводить до зниження продукції NO, що у свою чергу викликає розвиток ендотеліальної дисфункції та виникнення атеросклерозу [12].

Отже, наведені дані дають змогу чітко простежити таку послідовність подій: інсулінорезистентність – запалення – атеросклероз. Дефект інсулінової сигналізації, що виник і зафіксувався, ініціює “замкнуте коло”. Порушена утилізація глюкози викликає гіперглікемію, яка стимулює секрецію інсуліну. Внаслідок зміни PI-3-кіназного шляху спостерігається надлишкова стимуляція MAP-кіназного шляху, що посилює тяжкість порушення PI-3-кіназного шляху. Результатом тривалої стимуляції MAP-кіназного шляху є проліферація клітин гладенької мускулатури судин, посилення продукції колагену, надлишкова продукція факторів росту та запальних цитокінів, усе це призводить до розвитку атеросклерозу.

Надзвичайно важливою є участь транскрипційного фактора NF- $\kappa$ B у цих процесах, – одного із ключових регуляторів імунітету, стресорних реакцій, апоптозу та диференціювання клітин. Активация NF- $\kappa$ B спостерігається під дією багатьох стимулів і опосередковує численні транскрипційні прог-

рами. Транскрипція, яка опосередкована мультимолекулярним комплексом NF- $\kappa$ B, контролюється багатьма позитивними та негативними механізмами і ретельно скоординована з іншими сигнальними шляхами [30]. Наприклад, гіперінсулінемія подвоює здатність ангіотензину II в судинних гладеньком’язових клітинах трансактивувати NF- $\kappa$ B [21]. При цьому останній активує численні запальні шляхи, які беруть участь у патогенезі атеросклерозу, I $\kappa$ B (інгібітор  $\kappa$ B) кіназний комплекс (IKK) викликає фосфорилування за серином субстрату інсулінового рецептора-1 (IRS-1), що інгібує передачу інсулінового сигналу та свідчить про тісний взаємозв’язок метаболічних і прозапальних сигнальних шляхів [18]. Це є дуже важливим, оскільки сама активация NF- $\kappa$ B може призводити до інсулінорезистентності і навпаки. Більше того, ангіотензин II не тільки стимулює NF- $\kappa$ B, але і викликає фосфорилування за серином IRS-1, тим самим порушуючи утилізацію глюкози та провокуючи інсулінорезистентність [17].

Виникає закономірне питання: порушення передачі інсулінового сигналу визначається спадковими чи набутими вадами? Безсумнівно, що відповідь буде компромісною. Багато генів включаються в регуляцію обміну глюкози, MAP- і PI-3-кіназного шляхів, NF- $\kappa$ B сигналізацію, регуляцію судинного тону тощо. Епігеномні впливи, спадкові зміни цих генів можуть змінювати активність їхніх продуктів.

Однією з важливих патологічних ланок аналізованого процесу є так звана ліпотоксичність, порушення обміну глюкози під дією накопиченої жирової тканини [33]. Внутрішньоклітинні токсичні метаболіти обміну триацилгліцеролу і неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК: діацилгліцерол, цераміди, ЖК-ацил CoA) викликають явища вираженої інсулінорезистентності через порушення передачі інсулінового сигналу та багатьох механізмів обміну глюкози [25]. Ці патологічні зміни

тісно пов'язані з низькоінтенсивним хронічним запаленням [19].

Однією з ключових молекул, що реалізують прозапальні клітинні шляхи, є фактор транскрипції NF-κB, який одночасно бере участь у розвитку інсулінорезистентності. Каскад подій спрощено можна уявити в такому вигляді: після активації прозапальних чинників (у т.ч., ЖК-ацил СоА) вільний NF-κB переміщується в ядро і зв'язується з κB-последовностями ДНК, стимулює синтез ФНП-α, IL-1β, IL-6, РКС; у свою чергу ФНП-α, IL-6, РКС викликають фосфорилування за серином IRS-1, інгібують передачу інсулінового сигналу та викликають інсулінорезистентність [14]. Багато речовин ліпідної природи, включно з НЕЖК, можуть зв'язуватися з мембранними рецепторами, наприклад, із TLR4, і активувати NF-κB.

Ліпотоксичність може проявлятися і у формі “адипозопатії” [11]. Адипоцити продукують низку біологічно активних речовин, які дистантно впливають на стан міоцитів, гепатоцитів, ендотеліоцитів (адипокіни). При цьому жирова тканина осіб з ожирінням і хворих на ЦД 2-го типу інфільтрована мононуклеарними клітинами

та перебуває в стані хронічного запалення. Адипоцити та інфільтруючі моноцити/макрофаги секретують ФНП-α, резистин, IL-6, інгібітор активатора плазміногену-1, ангіотензиноген, які індукують інсулінорезистентність і підсилюють атерогенез.

Таким чином, інсулінорезистентність, хронічне запалення, артеріальна гіпертензія, ендотеліальна дисфункція і дисліпідемія є взаємопов'язаними проявами одного патологічного процесу, центральною молекулярною основою якого є активація NF-κB (див. рисунок).

Аналізуючи сам термін “метаболічний синдром”, його не можна визнати вдалим відносно патологічного стану, описаного вище. Тим більше, не можна розглядати цей стан як сукупність окремих непов'язаних факторів ризику ССЗ. Йдеться про сукупність ознак, які завдяки загальному механізму виникнення об'єднуються закономірним і регулярним чином, характеризуючи певний хворобливий стан організму.

Враховуючи, що всі ознаки, які складають МС мають спільну молекулярну основу, пов'язану з активацією NF-κB, пропонується на сучасному етапі сформу-



NF-κB як молекулярна основа патологічного процесу при метаболічному синдромі

лювати концепцію перманентної активації NF- $\kappa$ B як можливого типового патологічного процесу. Створення такої концепції, її експериментальне та клінічне підтвердження, розкриють широкі перспективи поглиблення знань про патогенез таких поширених захворювань, як ЦД 2-го типу, ішемічна хвороба серця й атеросклероз, гіпертензія та ожиріння, намічаючи нові напрямки в експериментальній терапії та фармакології.

**И.П. Кайдашев**

### **АКТИВАЦИЯ NF- $\kappa$ B ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ**

Рассматривается формирование в современных условиях совокупности эволюционно новых причинных факторов, которые могут вызывать новое патологическое состояние, реализующееся через эволюционно закрепленные типовые патологические процессы. Приводится анализ понятия “метаболический синдром” и его составляющих. Автор указывает на взаимосвязь инсулинорезистентности, хронического воспаления, артериальной гипертензии, эндотелиальной дисфункции и дислипидемии как проявлений одного патологического процесса, центральной молекулярной основой которого является активация NF- $\kappa$ B. Предлагается на современном этапе сформулировать концепцию перманентной (длительной и низкоинтенсивной) активации NF- $\kappa$ B в качестве возможного типового патологического процесса.

Ключевые слова: метаболический синдром, инсулинорезистентность, NF- $\kappa$ B.

**I.P. Kaidashev**

### **NF- $\kappa$ B ACTIVATION AS A MOLECULAR BASIS OF PATHOLOGICAL PROCESS BY METABOLIC SYNDROME**

The paper examines the formation of evolutionary advanced causal factors set in modern conditions which may cause new pathological condition (state), being implemented through evolutionary fixed and standard pathological processes. The analysis of the notion of “metabolic syndrome” and its components has been performed. The correlation between insulin resistance, chronic inflammation, arterial hypertension, endothelial dysfunction and dyslipidemia has been indicated as the manifestations of one pathologic process, the central molecular basis of which is the activation of NF- $\kappa$ B. At the current stage it has been suggested to set up the conception of NF- $\kappa$ B permanent (long-lasting, low grade) activation as a possible model of pathological process.

Key words: metabolic syndrome, insulin resistance, NF- $\kappa$ B.

*Higher State Educational Establishment of Ukraine  
“Ukrainian Medical Stomatological Academy”, Poltava*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Альперн Д.Е. Патологическая физиология. – М. : Медицина, 1965. – 434 с.
2. Берштейн Л.М., Коваленко И.Г. “Метаболически здоровые” лица с ожирением и метаболические признаки ожирения у лиц с нормальной массой тела: что за этим стоит? // Пробл. эндокринологии. – 2010. – №3 – С. 47–51.
3. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Основы общей патологии. Часть 1. Основы общей патофизиологии. – СПб. : ЭЛБИ, 1999. – 624 с.
4. Измайлова О.В., Шликова О.А., Боброва Н.О., Кайдашев И.П. Зв'язок поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 зі схильністю до окремих урогенітальних інфекцій // Цитология и генетика. – 2011. – № 4. – С.29–35.
5. Патологическая физиология / Под ред. чл.-корр. АМН СССР Н.Н. Зайко. – К.: Вища школа, 1985. – 575 с.
6. Abdul-Ghani M.A., Jenkinson C.P., Richardson D.K., Tripathy D., DeFronzo R.A. Insulin secretion and action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study (VAGES) // Diabetes. – 2006. – 55. – P. 1430–1435.
7. Alberti K., Zimmer P. Definition, diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications, part1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a World Health Organization consultation // Diabet. Med. – 1998. – 15. – P. 539–553.
8. Alberti K.G., Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z., Cleeman J.I., Donato K.A., Fruchart J.C., James W.P., Loria C.M., Smith S.C. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity // Circulation. – 2009. – 120. – P. 1640–1645.
9. Alberti K.G., Zimmer P., Shaw J. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The Metabolic Syndrome -a new worldwide definition // Lancet. – 2005. – 366. – P. 1059–1062.
10. Bajaj M., DeFronzo R.A. Metabolic and molecular basis of insulin resistance // J. Nucl. Cardiol. – 2003. – 10. – P. 311–323.
11. Bays H., Mandarino L., De Fronzo R.A. Role of the adipocytes, FFA, and ectopic fat in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: PPAR agonists provide a rational therapeutic approach // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2004. – 89. – P. 463–478.
12. Behrendt D., Ganz P. Endothelial function. From vascu-

- lar biology to clinical applications // Amer. J. Cardiol. – 2002. – **21**. – P. 40L–48L.
13. Coletta D.K., Balas B., Chavez A.O., Baig M., Abdul-Ghani M., Kashyap S.R., Folli F., Tripathy D., Mandarino L.J., Cornell J.E., DeFronzo R.A., Jenkinson C.P. Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle in vivo // Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2008. – 294. – P. E910–E917.
  14. De Alvaro C., Teruel T., Hernandez R., Lorenzo M. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappa B kinase in a p38 mark-dependent manner // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**. – P. 17070–17078.
  15. De Fronzo R. A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis : the missing links. The Claude Bernard lecture 2009 // Diabetologia. – 2010. – **53**. – P. 1270–1287.
  16. Del Prato S., Leonetti F., Simonson D.C. Effect of sustained physiologic hyperinsulinaemia and hyperglycaemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man // Ibid. – 1994. – **37**. – P. 1025–1035.
  17. Folli F., Bouchie J.L., Kahn C.R., Hansen H., Feener E.P. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels // J. Clin. Invest. – 1997. – **100**. – P. 2158–2169.
  18. Gao Z., Hwang D., Bataille F., Lefevre M., York D., Quon M.J., Ye J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**. – P. 48115–48121.
  19. Garg R., Tripathy D., Dandona P. Insulin resistance as a proinflammatory state: mechanisms, mediators, and therapeutic interventions // Curr. Drug Targets. – 2003. – **4**. – P. 487–492.
  20. Gerstein H.C., Miller M.E., Byington R.P., Goff D.C. Jr., Bigger J.T., Buse J.B., Cushman W.C., Genuth S., Ismail-Beigi F., Grimm R.H. Jr., Probsteld J.L., SimonsMorton D.G., Friedewald W.T. Effects of intensive glucosae lowering in type 2 diabetes // N. Engl. J. Med. – 2008. – **358**. – P. 2345–2359.
  21. Golovchenko I., Goalstone M.L., Watson P., Brownlee M., Draznin B. Hyperinsulinemia Enhances Transcriptional Activity of Nuclear Factor-kB Induced by Angiotensin II, Hyperglycemia, and Advanced Glycosylation End Products in Vascular Smooth Muscle Cells // Circulat. Res. – 2000. – **87**. – P. 746–762.
  22. Grundy S. M., Cleeman J.I., Daniels S.R., Donato K.A., Eckel R.H., Franklin B.A., Gordon D.J., Krauss R.M., Savage P.J., Smith Jr. S.C., Spertus J.A., Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement // Circulation. – 2005. – **112**. – P. 2735–2752.
  23. Gulli G., Ferrannini E., Stern M., Haffner S., DeFronzo R.A. The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose-tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents // Diabetes. – 1992. – **41**. – P. 1575–1586.
  24. Holman R.R., Thorne K.I., Farmer A.J., Davies M.J., Keenan J.F., Paul S., Levy J.C. Addition of Biphasic, Prandial, or Basal Insulin to Oral Therapy in Type 2 Diabetes // N. Engl. J. Med. – 2007. – **357**. – P. 1716–1730.
  25. Kashyap S., Belfort R., Berria R., Suraamornkul S., Pratipranawatr T., Finlayson J., Barrentine A., Bajaj M., Mandarino L., DeFronzo R., Cusi K. Discordant effects of a chronic physiological increase in plasma FFA on insulin signaling in healthy subjects with or without a family history of type 2 diabetes // Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2004. – **287**. – P. E537–E546.
  26. Kaydashev I.P., Rasin A.M., Shlykova O.A., Gorbas' I.M., Smirnova I.P., Petrushov A.V., Rasin M.S. Frequency of Pro12Ala-Polymorphism of the Gene PPAR $\gamma$ 2 in the Ukrainian Population and Its Possible Relation to the Development of the Metabolic Syndrome // Cytol. and Genet. – 2007. – **41**, № 5. – P.298–302.
  27. Miranda P.J., DeFronzo R.A., Califf R.M., Guyton J.R. Metabolic syndrome: evaluation of pathological and therapeutic outcomes // Amer. Heart J. – 2005. – **149**. – P. 20–45.
  28. Naruse K., Shimizu K., Muramatsu M., Toki Y., Miyazaki Y., Okumura K., Hashimoto H., Ito T. Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation // Arterioscler Thromb. – 1994. – **14**. – P. 746–752.
  29. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report // Circulation. – 2002. – **106**. – P. 3143–3421.
  30. Oeckinghaus A., Hayden M.S., Ghosh S. Crosstalk in NF-kB signaling pathway // Nat. Immunol. – 2011. – **12** (8). – P. 695–708
  31. Patel A., MacMahon S., Chalmers J., Neal B., Billot L., Woodward M., Marre M., Cooper M., Glasziou P., Grobbee D.E., Hamet P., Harrap S., Heller S., Liu L.S., Mancia G. et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes // New Engl. J. Med. – 2008. – **358**. – P. 2560–2725.
  32. Reaven G. M. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease // Diabetes. – 1988. – **37**. – P. 1594–1607.
  33. Unger R.H. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome // Trends Endocrinol. Metab. – 2003. – **14**. – P. 398–403.

Вищий навч. заклад України “Укр. мед. стомат. академія”, Полтава  
E-mail: [congres2007@yandex.ru](mailto:congres2007@yandex.ru)

Матеріал надійшов до  
редакції 03.08.2011

## ЮВІЛЕНІ ДАТИ



### **Василь Максимович Мороз**

(до 70-річчя з дня народження)

Василь Максимович Мороз – відомий нейрофізіолог, педагог, організатор вищої медичної освіти. В його особі вдало та гармонійно сполучається численна кількість привабливих рис, котрі характеризують його як високообдаровану людину, здатну різнобічно й щедро реалізувати свої творчі здібності.

Народився В.М. Мороз 2 лютого 1942 р. у селі Озеро Немирівського району Вінницької області. У 1949–1956 рр. навчався в Озерянській семирічній школі. Продовжив навчання у Чуківській середній школі Брацлавського району, яку закінчив у 1959 р. У 1961 р. став студентом Вінницького медичного інституту ім. М.І. Пирогова.

Закінчивши навчання (1967), працював лікарем-терапевтом Шпиківської райлікарні Вінницької області. Заслужив шану, любов людей. У 1968 р. був запрошений до Вінницького медичного інституту ім. М.І. Пи-

рогова на посаду асистента кафедри нормальної фізіології. Весь подальший трудовий шлях пов'язаний з цим навчальним та науковим закладом. Починав він свою наукову й педагогічну діяльність під керівництвом професора Ніни Василівни Братусь. Навчався в аспірантурі (1969–1972). У наступні роки обіймав на кафедрі нормальної фізіології посади асистента (1972–1976), доцента (1976–1984), професора (1984–1991), завідувача кафедри (з 1991 р.). На будь-якому посту, завдяки виключній працездатності, таланту організатора та педагога, проявив себе як висококваліфікований викладач-лектор, чудовий вихователь молоді. Ці риси характеру вдало поєднуються з властивістю до невпинного творчого пошуку.

У 1972 р. Василь Максимович в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР (м. Київ) захистив кандидатську дисертацію, яка була присвячена вивченню електричних реакцій кори мозочка на звукові стимули і йому було присуджено науковий ступінь кандидата медичних наук. Академік П.М. Серков, який був офіційним опонентом на захисті, згадував, що при вивченні дисертації переконався, що в особі Василя Максимовича ми маємо талановитого дослідника, експериментатора з високою вимогливістю до точності й переконливості отриманих результатів.

Після захисту кандидатської дисертації науковий пошук не припиняється. Розгортаються багатопланові дослідження механізмів поведінкової реакції, а саме ролі мозочка, базальних гангліїв, кори великих півкуль в організації та здійсненні автоматизованих рухів. Плідній реалізації творчих задумів сприяло відрядження за кордон, до Академії наук Чехословаччини. Згодом, якось у приватній бесіді керівник Інституту фізіології, всесвітньо відомий нейрофізіолог Ян Буреш пригадував свій подив і захоп-

лення з приводу надзвичайної наполегливості та працьовитості молодого науковця з Вінниці. Мабуть цим і можна пояснити гостинність маститого вченого – приватне повторне запрошення Василя Максимовича до Праги для остаточного завершення експерименту. Отриманий матеріал став основою докторської дисертації “Інтегративна функція мозочка, базальних гангліїв і моторної кори в програмуванні й регуляції рухів”, блискуче захищеної ним у 1983 р. в Інституті фізіології АН УРСР ім. О.О. Богомольця.

Нині В.М. Мороз – видатний нейрофізіолог, під його керівництвом проводяться дослідження ролі структур головного мозку в здійсненні поведінкової реакції цілісного організму – центральні механізми програмування та контролю довільних рухів. Подальший творчий розвиток Василь Максимович здійснює в численних роботах разом з учнями, молодими співробітниками: висвітлюється значення цілої низки структур головного мозку – латерального гіпоталамуса, префронтальної (асоціативної) кори мозку (М.В. Йолтухівський), вентролатерального ядра таламуса (О.В. Власенко), базолатерального мигдалеподібного тіла (О.Д. Омельченко), гіпокампа (І.Л. Рокунець). Так сформувалася наукова школа, очолювана професором Морозом.

Невпинно удосконалюються і збагачуються комплексні дослідження. У зв’язку з розробкою та запровадженням нових методичних прийомів і технологій, що мають пріоритетне значення (методи реєстрації електричних реакцій окремих нейронів мозкових центрів у вільній поведінці тварини під час руху, мікропроцесорного квантування рухів, а також імпульсних реакцій нейронів), розкриваються перспективи оцінки закономірностей мозкових функцій.

Важливим напрямком наукового пошуку є розробка інтегративної медичної антропології як науки про цілісність, мінливість і

реабілітаційні можливості людини внаслідок адаптації. Для цього в університеті створено науково-дослідний центр, проголошений у 1993 р. базою Міжнародної академії інтегративної антропології, Президентом якої обрано В.М.Мороза (1997).

З 1991 р. Василь Максимович – член Всесвітньої організації з вивчення мозку (IBRO), у 1995 р. – обраний академіком Академії вищої школи, у 2010 – академіком Національної академії медичних наук України.

У співробітництві зі своїм учнем професором П.Ф. Колісником, В.М. Мороз працює над розробкою моніторингового контролю за ефективністю лікування захворювань вертебрального генезу. Під його керівництвом було проаналізовано закономірності адаптивних реакцій до низьких доз радіаційного випромінювання, що практикується в бальнеотерапії при призначеннях природних радонових ванн на базі курорту Хмільник.

Як визнаний науковець, Василь Максимович очолює спеціалізовану вчену раду Д 05.600.02 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, редактор журналів “Вісник Вінницького медичного університету”, “Biomedical and biosocial anthropology”, заступник редактора журналу “Вісник морфології”, член редакційних колегій “Фізіологічного журналу”, журналів “Медична освіта”, “Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія”, “Проблеми медичної науки та освіти”, “Архів експериментальної та клінічної медицини”.

Перу В. М. Мороза належить більше ніж 350 наукових праць, у т.ч. 37 монографій і навчальних посібників, 30 винаходів. Під його керівництвом підготовлено 21 докторські та кандидатські дисертації. Учні Василя Максимовича плідно працюють у ВНЗ України на наукових, педагогічних й адміністративних посадах.

З 1975 по 1982 рр. В.М. Мороз виконував

обов'язки вченого секретаря Ради інституту. З 1982 по 1984 рр. працював заступником декана, а з 1984 по 1986 – деканом педіатричного факультету. Висока вимогливість до себе, до співробітників і студентів, поряд з об'єктивністю та доброзичливістю стали приводом ректору інституту професору В.Д. Білику для рекомендації Василя Максимовича на посаду проректора з навчально-виховної роботи. У 1988 р. у Вінницькому медінституті вперше відбулися демократичні вибори ректора. Один із претендентів – Василь Максимович Мороз, якому тоді виповнилося лише сорок шість, досить виважено й просто виклав свою програму, що базувалася на конкретиці, прагматизмі. І професорсько-викладацький склад, не роздумуючи, проголосував за Мороза. У важких економічних умовах Василю Максимовичу вдалося зберегти колектив, наростити науковий потенціал. У 1994 р. Вінницький медичний інститут був акредитований за четвертим (найвищим) рівнем. З урахуванням завдань зі впровадження в життя вимог Концепції розвитку охорони здоров'я населення України, у ВНМУ створено стоматологічний і фармацевтичний факультети, відкрито підготовку фахівців зі спеціальностей: „стоматологія”, „фармація”, „клінічна фармація”, „медична психологія” та післядипломне вдосконалення лікарів із сімейної медицини.

Стрімко підвищується авторитет В.М. Мороза як талановитого керівника: він неодноразово обирався депутатом обласної Ради народних депутатів, обраний головою Асоціації медичних ВНЗ України (1988). Міністерство освіти й науки України затвердило його головою ради ректорів ВНЗ Подільського регіону. В.М.Мороз є членом колегії та президії вченої ради МОЗ України. У 1993 р. йому присвоєно почесне звання Заслуженого працівника науки та

техніки України. У 1997 р. Указом Президента України нагороджений орденом “За заслуги” III ступеня, у 2002 – орденом Ярослава Мудрого V ступеня. 24 серпня 2003 р. у День незалежності Указом Президента України за визначні особисті заслуги перед Українською державою у підготовці висококваліфікованих фахівців для охорони здоров'я, багаторічну плідну наукову, педагогічну та громадську діяльність В.М. Мороз удостоєний високого звання „Герой України” зі врученням ордена Держави.

Глибоке розуміння суті сучасних процесів медичної освіти, медичної науки – це те, що притаманне Василю Максимовичу з перших років його роботи на керівних посадах у медичному університеті й вивело його на роль лідера в керівництві. Обраний ним напрямок забезпечує постійне зростання наукових здобутків колективу, швидку розробку та опанування нових технологій науково-педагогічними кадрами.

Загалом, характеризуючи Героя України, доктора медичних наук, професора, академіка НАМН України, Заслуженого працівника науки та техніки України, ректора Вінницького національного медичного університету ім.М.І.Пирогова – В.М.Мороза як педагога, вченого, керівника та просто справжню людину, підсумовуючи його напрацювання, можна стверджувати, що він є представником державних діячів, які творчо, попри всі негаразди, шукають шлях до швидкого засвоєння та втілення в життя найкращих світових досягнень розвитку вищої медичної школи, виховання сучасних молодих спеціалістів, раціонального використання досвіду минулих поколінь.

Сьогодні Василь Максимович повний сил та енергії, працює над втіленням нових ідей. Бажаємо йому творчих успіхів, наснаги та здоров'я.





### **Микола Васильович Макаренко**

(до 75-річчя з дня народження)

6 лютого 2012 р. відомому вченому в галузі фізіології вищої нервової діяльності людини, диференціальної психофізіології та психофізіології, доктору біологічних наук, професору, академіку Аерокосмічної академії України, лауреату Премії ім. О.О. Богомольця Миколі Васильовичу Макаренко виповнилося 75 років.

Народився Микола Васильович в селі Охінки, Прилуцького району, Чернігівської області в селянській сім'ї. В цьому самому селі закінчив семирічну школу, а в селі Переволочна – десятирічну. В 1959 р. вступив і в 1963 р. з відзнакою закінчив Черкаський державний педагогічний інститут ім. 300-річчя возз'єднання України з Росією за спеціальністю фізичне виховання, а в 1966 р. – достроково аспірантуру при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та захистив кандидатську дисертацію.

В Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця пропрацював до 2011 р, займаючи різні посади. До 1969 р. працював молодшим науковим співробітником у лабораторії В.О. Трошихіна, з 1969 р. по 1973 рік – у лабораторії оживлення відділу гіпоксичних станів (завідувач – академік М.М. Сиротинін), з 1973 р. по

1994 р. – в лабораторії фізіології вищої нервової діяльності людини (з 1980 р. по 1994 р. – її завідувачем), а з 1994 р. і до середини 2011 р. – провідним науковим співробітником відділу фізіології головного мозку.

У різні роки займав посади професора кафедри фізіології в Черкаському, Херсонському, Волинському університетах; посади старшого, провідного чи головного наукового співробітника у Військово-гуманітарному інституті, НДІ проблем військової медицини, Головному медичному управлінні СБУ, НДЦ (гуманітарних проблем) ЗС України, Українській військово-медичній академії, Національному НДІ оборонних технологій і військової безпеки України.

Напрямок наукової діяльності умовно можна розподілити на такі етапи. Перший – це вивчення вікових змін властивостей основних нервових процесів у дрібних лабораторних тварин за різних умов ендокринної і гуморальної регуляції (при гіпо- та гіперфункції залоз внутрішньої секреції). Другий – з'ясування ролі індивідуально-типологічних властивостей в компенсаторних реакціях на швидкість замикання тимчасових умовнорефлекторних зв'язків та швидкості відтворення умовнорефлекторного стереотипу, серцево-судинної та дихальної систем в післяреанімаційний період собак після різних строків і видів клінічної смерті (електротравми, кровопускання тощо).

Третій етап охоплює період близько 40 років діяльності, включає два вектора. Один із них – вивчення формування та становлення психофізіологічних функцій людини в онтогенезі, під час якого встановлено закономірності та особливості розвитку властивостей основних нервових процесів та сенсомоторної реактивності різного ступеня складності.

Нерівномірність формування різних за складністю психофізіологічних функцій

дала змогу сформулювати концепцію структурно-функціональної гетерохронії розвитку, стабілізації й інволюції механізмів мозкової діяльності людини. Другий вектор – прикладний, який включає аспекти фізіології вищої нервової діяльності та диференціальної психофізіології і спрямований на вивчення індивідуальних відмінностей між людьми та їх роль у професійній діяльності і на цій основі розробка науково-обґрунтованих критеріїв і методик для професійного психофізіологічного відбору та профорієнтації, методик оцінки функціонального стану людини в різних умовах трудової діяльності, контролю і профілактики виникнення несприятливих зрушень у нервовій системі та їх корекції.

Протягом цього етапу розроблено низку методичних прийомів і апаратів для експрес-діагностики властивостей основних нервових процесів, сенсомоторної сфери, психофізіологічних і вегетативних функцій, особистісних властивостей людини. Це прилади ПНН-3-01 (прилад нервової напруги), ПНДО (прилад нейродинамічних обстежень), комп'ютерні системи «Славутич», «Прогноз», «Діагност-1», які нині застосовуються в різних країнах світу. На методики з діагностування індивідуальнотипологічних властивостей та рівня сенсомоторної реактивності людини отримано патенти на винахід. Створена та запроваджена в практику автоматизована методика виявлення психофізіологічного напруження операторів з керування рухомими об'єктами.

М.В. Макаренком запропонована та науково обґрунтована функціональна рухливість основних нервових процесів – як самостійна властивість вищої нервової діяльності. Вона характеризується максимальною швидкістю чи максимальною кількістю переробки розумової інформації різного ступеня складності з диференціювання позитивних і так званих негативних умовних сигналів у заданому ліміті

часу і є інтегральним показником всіх швидкісних можливостей нервової системи: сприйняття сигналу, його аналізу, прийняття рішення на його виконання, видачі команди і її реалізація в ефекторних реакціях, що зумовлене не тільки швидкісними процесами у периферичній нервовій системі, а, що саме важливо, особливостями функціонування центральних кіркових структур, їх аналітико-синтетичною діяльністю. Методика з виявлення цієї властивості пройшла апробацію на надійність і валідність, генетичну зумовленість і вважається загальноновизнаною.

Ним також доведено, що функціональна рухливість і сила основних нервових процесів є базовими властивостями в забезпеченні сомато-вегетативних та психомоторних функцій, а також навчальної, професійної та спортивної діяльності. Саме ці властивості є найбільш імовірною фізіологічною передумовою у відмінностях між людьми.

Результати наукової діяльності представлені в 370 працях, в т.ч.: шести монографіях з проблем реанімації, професійного відбору, психофізіології операторської праці та методик вивчення індивідуальних психофізіологічних відмінностей між людьми, онтогенезу психофізіологічних функцій; двох брошурах з питань розвитку радянської космонавтики та відбору першого заgonу космонавтів; у десяти патентах на винахід і авторських свідоцтвах; дев'яти раціоналізаторських пропозиціях. Під його керівництвом підготовлено 6 докторів і 23 кандидати наук, які працюють в різних країнах світу. За монографію «Психофизиологические функции человека и операторский труд» Президією академії наук України в 1992 р. йому було присуджено премію імені О.О. Богомольця.

Громадська діяльність – вона ж і наукова діяльність. Доктор біологічних наук, професор, академік Аерокосмічної Академії, заслужений діяч науки і техніки

України. Член Президії Українського товариства фізіологів ім. І П Павлова, член редколегії та редакційних рад журналів «Физиология человека РАН», «Фізіологічний журнал», «Гуманітарний вісник Збройних Сил України», «Збірник наукових праць МО Військового гуманітарного інституту Національного університету оборони», а також вісників та альманахів Ніжинського державного університету ім. М.В.Гоголя, Волинського національного університету ім. Лесі Українки, Черкаського національного університету ім. Богдана Хмельницького, Херсонського державного університету, Миколаївського державного університету ім. В.О.Сухомлинського, Державного НДІ фізичної культури і спорту. Був членом спеціалізованої вченої ради із захисту докторських та кандидатських дисертацій при Київському національному університеті ім.Тараса Шевченка, а нині – в Інституті психології ім. Г.С.Костюка НАПН України та спеціалізованій вченій раді із захисту кандидатських дисертацій в Національному університеті оборони України; член Наукової ради НДЦ гуманітарних проблем ЗС України, член Президії бюро Федерації космонавтики України.

У 2001 р. в Охінківській середній загальноосвітній школі, в якій раніше навчався, за власні кошти заснував благодійно-заохочувальний фонд Миколи Макаренка, метою якого є розвиток благодійництва, утвердження гуманізму та милосердя в суспільстві, сприяння розвитку освіти та науки, виявлення серед школярів талановитої творчої молоді та допомога їм.

В юні та молоді роки був секретарем комсомольської організації Переволочанської середньої школи, очолював комсомольську організацію в с.Охінки, був секретарем комсомольської організації

факультету фізичного виховання та спорту Черкаського педагогічного інституту ім. 300-річчя возз'єднання України з Росією, більше 20 років був членом ЖБК ОКП АН України та заступником голови Спортивного клубу «Наука» АН України, уповноваженим фізіологічного товариства ім. І.П.Павлова та ін.

За роки роботи в Інституті фізіології та в НДЦ, де нині працює на посаді провідного наукового співробітника відділу військово-психологічних досліджень, відзначений грамотами і подяками, в тому числі знаками «Ударник комуністичної праці» за 1971 та 1980 рр.; «Переможець соціалістичного змагання» 1979 р.; «Ударник одинадцятої п'ятирічки» 1986 р. У 1983 р. нагороджений медаллю «В пам'ять 1500-річчя Києва», в 1988 р. рішенням Президії бюро Федерації космонавтики СРСР – медаллю імені академіка С.П.Корольова, від імені Президії Верховної Ради СРСР в 1990 р. – медаллю «Ветеран праці», в 1990 р. відповідно до постанови Державного Комітету Ради Міністрів СРСР з справ винахідництва та відкриття – нагрудним знаком «Изобретатель СССР», в 1998 р. – Президентом України – медаллю Жукова, в 2004 р. за заслуги з відродження духовності в Україні та утвердження Помісної Української Православної Церкви – орденом Святого Рівноапостольного князя Володимира Великого III ступеня, Наказом Міністра оборони України в 2006 р. нагороджено медаллю «15 років Збройним Силам України» та нагрудними знаками «Науково-дослідний центр гуманітарних проблем ЗС України» і «Національний університет оборони України».

Щиро поздоровляємо шановного Миколу Васильовича з 75-річним ювілеєм, зичимо здоров'я та творчого довголіття.



**Руслан Федорович Макулькін**  
(до 80-річчя з дня народження)

Руслан Федорович Макулькін народився 31 грудня 1931 р. у сім'ї військового в місті Полоцьку в Білорусії. В 1949 р. після закінчення середньої школи вступає до Одеського медичного інституту ім. М.І.Пирогова на лікувальний факультет, який успішно закінчує в 1955 р., з відзнакою отримавши диплом лікаря загального профілю. Навчаючись у вузі, Р.Ф. Макулькін займається в студентському науковому гуртку на кафедрі факультетської хірургії під керівництвом завідувача кафедри професора М.П. Соколовського. Вже тоді проявилися неординарні здібності Р.Ф. Макулькіна як хірурга. Але несподіваний поворот долі привів його до аспірантури при кафедрі нормальної фізіології, де його керівником стає видатний вчений, професор П.М. Серков, в майбутньому академік НАН України. По закінченні аспірантури в 1958 р. Р.Ф. Макулькін працює асистентом кафедри нормальної фізіології.

В цей період він опановує низку надзвичайно складних нейрохірургічних методик, досліджує механізми роботи мозку з

використанням електроенцефалографічної методики, зокрема використовує механізми функціонування деаферентованого мозку, динаміку кіркової та кірково-таламічної взаємодії при глибокому аферентному “недовантаженні” мозку за умов його нейрональної ізоляції, а також досліджує компенсаторні механізми порушень функцій мозку після повного видалення однієї півкулі. На базі цих досліджень було обґрунтовано висновки про білатеральне представництво в корі мозку рецепторних та ефекторних функцій і про дубльоване формування дуг різноманітних умовних рефлексів у двох півкулях мозку та фіксації в них життєво важливої інформації.

В 1962 р. Руслан Федорович успішно захищає дисертацію на здобуття вченого ступеня кандидата медичних наук. Ще одним напрямком його діяльності в цей період є вивчення нейрофізіологічних механізмів зворотного розвитку різноманітних рефлексів орієнтування.

18 жовтня 1965 р. Р.Ф. Макулькін був обраний за конкурсом на посаду доцента кафедри нормальної фізіології. В цей період відбувається його становлення як педагога. Його захоплюючі, яскраві лекції вражають своєю закінченою логікою і глибиною. Багато поколінь студентів – нині видатних спеціалістів у різних галузях медицини, згадують цей унікальний феномен “лекцій Макулькіна”.

З 1969 по 1999 рр. Р.Ф. Макулькін – завідувач кафедри патологічної фізіології Одеського медичного інституту ім. М.І. Пирогова. Не можна не відмітити ще одного наставника Руслана Федоровича Макулькіна – директора Інституту патофізіології Російської АМН академіка Г.Н. Крижановського.

Основне наукове зацікавлення Р.Ф. Макулькіна в цей час – дослідження механізмів епілептизації мозку. На основі принципу детермінанти та теорії генераторних, детермінантних і системних механізмів

нейропатологічних синдромів, розроблених академіком Г.Н. Крижановським, Р.Ф. Макулькіним і співробітниками кафедри патологічної фізіології створено нові моделі епілептичного синдрому: 1) модель багатовогнищевої кіркової епілепсії у вигляді єдиного комплексу епілептичної активності, що формується детермінантним вогнищем і 2) модель скроневої (гіпокампальної) епілепсії (фармакологічний кіндлінг). Це дало змогу отримати принципово нові дані стосовно патогенетичної терапії цих синдромів: 1) ліквідація детермінантного вогнища; 2) вплив на епілептичну (патологічну) систему через пригнічення активності її проміжних ланок (залежних вогнищ) за допомогою застосування комплексної патогенетичної терапії і 3) вплив на неї через активацію структур мозку, що становлять антиепілептичну систему (хвостате ядро, задній відділ гіпоталамуса, каудальне ретикулярне ядро мозку, архіпалеоцеребелум, покривне і зубчасте ядра мозочка).

Рішенням Вищої атестаційної комісії при Раді Міністрів СРСР від 29 травня 1983 р. Макулькіну Руслану Федоровичу присвоєно вчений ступінь доктора медичних наук, а 20 січня 1984 р. – звання професора кафедри патологічної фізіології.

Наукові праці та винаходи професора Р.Ф. Макулькіна відмічені державними нагородами. Його теоретичні й експериментальні дослідження дали змогу розробити та втілити в клініку нервових захворювань, нейрохірургії і психіатрії оригінальні методи діагностики і комплексної терапії судомного синдрому.

Р.Ф. Макулькін представляв вітчизняну науку на Міжнародному конгресі патофізіологів (м. Варна, Болгарія – 1978 рік), XX

Міжнародному конгресі з проблем епілепсії (Осло, 1993), на міжнародних симпозиумах (м. Тбілісі – 1982, Ленінград – 1984, Тбілісі – 1986). Наказом Президії Верховної Ради нашої держави від 16 червня 1989 року йому присуджено почесне звання заслуженого діяча науки і техніки України.

Під керівництвом професора Р.Ф. Макулькіна підготовлено 24 кандидатські та 4 докторські дисертації. Серед його учнів – завідувач кафедри нормальної фізіології ОДМУ, заслужений діяч науки і техніки України, професор О.А. Шандра, завідувач кафедри біофізики, інформатики і медичної апаратури ОДМУ, професор Л.С. Годлевський, завідувач лабораторії імунології і патоморфології тканин, д.м.н. Т.В. Дегтяренко та ін.

Руслан Федорович опублікував 350 наукових праць, з них 5 книг, серед яких монографія «Біогенні стимулятори і імунореактивність», 1997 р., має 15 авторських свідоцтв на винаходи. Він входить до складу редакційних рад «Фізіологічного журналу» НАН України, журналу «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» Российской АМН, Одеського медичного журналу. Є членом спеціалізованих Рад із захисту докторських та кандидатських дисертацій Одеського державного медичного університету, а також Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П.Філатова АМН України. За останні 10 років з його участю було надруковано більше ніж 40 наукових статей, головним чином з дисципліни «Історія медицини».

Від щирого серця вітаємо ювіляра. Бажаємо йому міцного здоров'я, втілення нових творчих задумів, бути для своїх учнів і колег прикладом яскравої унікальної особистості.

## CONTENTS

O.V. Akopova, L.I. Kolchinskaya, Nosar V.I., Bouryi V.A., Mankovska I.N., V.F. Sagach. Cytochrome <i>c</i> as an amplifier of ROS release in mitochondria	3
R.B. Strutynskiy, A.V. Kotsuruba, A.P. Neshcheret, R.A. Rovenets, A.A. Moibenko. The changes of metabolism in myocardium at ischemia-reperfusion and activating of the ATP-sensitive potassium channels	13
A. Kotsuruba, Yu. Korkach, S. Talanov, O. Baziluk, L. Stepanenko, V. Sahach. Arginase-nitric oxide synthase system changes due to adaptation to swimming in adult and aged rat hearts	27
O.S. Bogorad-Kobelskaya, N.M. Zholobak, Z.M. Olevinskaya, M.Ya. Spivak. The antiviral activity of diphenyl derivatives in different model systems	36
I. V. Vereshchaka, A. V. Gorkovenko. Superposition of the motor commands during creation of static efforts by human hand muscles	43
Nadija Fartushok, Oksana Khavrona, Yuriy Fedevych, Oleksandr Sklyarov. Changes in the antioxidant system and level of proinflammatory cytokin IL-1 $\beta$ in the blood patients of sufferi	51
V.V. Garkavenko, G.V. Storozhenko, O.N. Krasnikova, N.A. Babenko. Correction of age-related changes in sphingolipid content in rat tissues by acid sphingomyelinase inhibition	56
E.G. Shakhova, O.N. Krasnikova, N.A. Babenko. Effects of chronic caloric restriction on the age-associated peculiarities of explorative behaviour in rats	61
T.I. Stanishevskaya, V.I. Sobolev. Characterization of the latent periods of excitation and shortening of anterior tibial muscle of white rats depending on the blood level of triiodothyronine	68
O.A. Panchenko, S.M. Radchenko. Psychophysiological analysis of efficiency of cerebral hemodynamics with dopplerographic and reoencephalographic imaging	76
V.V. Vereshchaka. Features of systemic microcirculation in patients with chronic dermatoses	81
O. B. Vadzyuk. Effects of diazoxide on the mitochondrial membrane potential and ROS generation in rat uterus cells	86
<b>REVIEWS</b>	
I.P. Kaidashev. NF-kB activation under metabolic syndrome	93
<b>JUBILEE DATES</b>	102